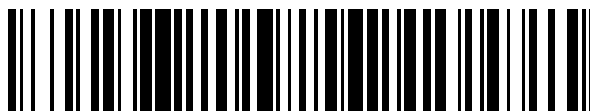


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 203**

51 Int. Cl.:

A01N 25/04 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006** E 10178203 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** EP 2260706

54 Título: **Composición anti-fúngica mejorada**

30 Prioridad:

04.10.2005 EP 05109190

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.10.2016

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

**RIJN VAN, FERDINAND THEODORUS JOZEF y
WILDEBOER, WILLEM JOHANNES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 586 203 T3

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

Composición anti-fúngica mejorada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición anti-fúngica mejorada, a un procedimiento para preparar una composición anti-fúngica de este tipo y a su uso.

Antecedentes de la invención

10 La necesidad de métodos mejorados de conservación de alimentos es grande. Se ha estimado que aproximadamente una cuarta parte del suministro mundial de alimentos se pierde como resultado de la descomposición microbiana e infecciones microbianas transmitidas por los alimentos representan una amenaza constante y grave para la salud humana.

15 La descomposición por hongos puede conducir a graves pérdidas económicas. Varios productos alimenticios, p. ej., productos agrícolas, productos lácteos y cárnicos, frutas y verduras y productos derivados, productos de panadería y cosméticos son muy susceptibles al desarrollo de hongos. Ejemplos de productos lácteos son el queso, queso fresco, requesón y yogur. Embutidos curados secos son un ejemplo de los productos cárnicos. Ejemplos de productos agrícolas son cultivos como los cereales, frutos secos, frutas, verduras y bulbos de flores. La descomposición por hongos no sólo afecta a la calidad del producto, sino que también representa un riesgo para la salud. Es bien sabido que algunas especies de hongos, que crecen, p. ej., en productos lácteos y embutidos, pueden producir micotoxinas. Algunas micotoxinas son extremadamente peligrosas, ya que pueden causar enfermedades letales. Por lo tanto, siempre se debe evitar el brote de los hongos no deseados en y sobre los productos alimenticios.

20 Técnicas de conservación de alimentos, p. ej., tratamiento térmico, congelación, ultrasonidos, irradiación y envasado en atmósfera modificada, reducen significativamente la carga microbiana, pero de especial preocupación es la evidencia de que los alimentos procesados están siendo contaminados con microorganismos después del procesamiento y antes del envasado. De creciente preocupación en la industria alimentaria es el deterioro microbiano de diversos alimentos tales como productos lácteos y cárnicos, aderezos, pastas para untar, margarinas y marisco. Especialmente los productos alimenticios en el intervalo de pH de 2,0 a 7,0 se sabe que son susceptibles a la descomposición microbiana por levaduras, hongos, bacterias tolerantes de ácidos y/o bacterias formadoras de esporas mesófilas o termófilas y no formadoras de esporas.

25 En su mayoría, los alimentos procesados no se consumen directamente después del procesamiento, permitiendo de esta manera que se desarrollen bacterias, levaduras u hongos introducido por la contaminación posterior. Dado que el consumo de alimentos puede producirse sin recalentar los alimentos procesados a temperaturas suficientes durante un tiempo suficiente, existe el riesgo de intoxicación alimentaria o descomposición de los alimentos. Además de ello, la tendencia reciente a alimentos mínimamente procesados con las cualidades nutricionales y sensoriales intrínsecas de los alimentos crudos y frescos ha planteado un nuevo riesgo de seguridad. Tratamientos de conservación más suaves tales como alta presión hidrostática y campos eléctricos pulsados han demostrado tener éxito, pero dependen de obstáculos eficaces, es decir, la cadena del frío y la adición de agentes antimicrobianos naturales.

30 Ha habido una amplia investigación realizada en el campo de la seguridad alimentaria para desarrollar composiciones anti-fúngicas eficaces. Natamicina, también conocida como pimarcina o tennecetina, es un antibiótico de polieno, que ha sido conocida desde finales de los cincuenta (Struyk *et al.* Antibiot. Ann 1957-1958, 878) y que se utiliza actualmente como un conservante en muchos productos alimenticios y agrícolas. El documento US 5.821.233 describe natamicina que exhibe una alta velocidad de liberación de al menos 3 µg/24 horas durante las primeras 24 horas cuando entra en contacto sobre un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 40 µg de natamicina. El documento US 5.997.926 describe complejos de natamicina con velocidades de liberación similares. Para algunas aplicaciones de alimentos, este tipo de natamicina con una alta velocidad de liberación no ofrece una protección adecuada, ya que, por ejemplo, la duración de la protección no es suficiente y/o la estabilidad de la natamicina no es óptima. Como consecuencia de ello, sería necesaria una cantidad más alta de natamicina para ofrecer una protección adecuada. Natamicina con una alta velocidad de liberación también puede penetrar demasiado en el producto tratado, que puede ser no deseado en algunos productos.

5 Para controlar la liberación de natamicina, se ha propuesto la encapsulación, véase, por ejemplo los documentos WO2005/018322 y US2005/042341. La encapsulación no altera las características de la propia natamicina, sino que trata de asegurar una liberación más lenta de natamicina mediante la aplicación de una barrera adicional. Esto requiere automáticamente etapas de formulación adicionales después de la recuperación de la natamicina de una fuente de natamicina, que hace que el proceso de producción de natamicina sea más complicado cuando la natamicina en sí sería cambiado para dar una liberación más lenta.

El documento WO97/29207 describe un procedimiento para la recuperación de natamicina a partir de un caldo de fermentación que contiene biomasa y natamicina, que comprende desintegrar la biomasa y separar la natamicina del caldo de fermentación así tratado.

10 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones anti-fúngicas mejoradas que puedan resolver al menos algunos de estos problemas: liberación más lenta, duración más larga de la protección y/o una estabilidad mejorada.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a una composición anti-fúngica mejorada, especialmente se proporciona una natamicina, que exhibe una baja velocidad de liberación de natamicina. Esta natamicina se prepara preferiblemente mediante el procedimiento definido más adelante.

Procedimiento para preparar natamicina que exhibe una baja velocidad de liberación de natamicina

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de la natamicina de la invención con una baja velocidad de liberación de natamicina tal como se define más adelante. En el procedimiento de la invención, la natamicina se recupera de un caldo de fermentación que contiene biomasa y natamicina y dicho procedimiento comprende:

las etapas del procedimiento de la reivindicación 1.

25 La primera ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención es que, sin encapsulación u otro modo de procesamiento complejo, conduce a un producto de natamicina que tiene una velocidad de liberación más lenta que las formulaciones de alta liberación de natamicina tales como los documentos US 5.997.926 y US 5.821.233, y otros productos de natamicina comercialmente disponibles tales como Delvociid[®] y Delvociid[®] Instant, tal como se ilustra en los Ejemplos. Al mismo tiempo, la velocidad de liberación es lo suficientemente alta para ofrecer una protección más larga. Sorprendentemente, el procedimiento de producción de acuerdo con la invención conduce a un producto con nuevas características que no podría haber sido anticipado a partir de la técnica anterior.

30 Una segunda ventaja es que el procedimiento mantiene la ventaja de los procedimientos anteriores, véase, por ejemplo, el documento WO 97/29207, de que natamicina se separa de la biomasa y otras impurezas sin utilizar disolventes orgánicos, que es preferible desde un punto de vista medioambiental.

Las fermentaciones que producen natamicina habitualmente resultan en un caldo de fermentación que comprende natamicina, sólidos de biomasa, nutrientes disueltos o suspendidos, otros productos de fermentación y agua.

35 El caldo de fermentación contiene, en general, de al menos 2 g/l de natamicina, preferentemente al menos 7 g/l de natamicina. Por ejemplo, la concentración de natamicina en el caldo de fermentación puede ser de aproximadamente 7 g/l tal como se describe en el documento WO 93/03170. Dado que la natamicina tiene una solubilidad muy baja en agua bajo condiciones de fermentación típicas, la natamicina en el caldo de fermentación está presente en forma sólida. Preferiblemente, la natamicina está presente principalmente en forma sólida. Principalmente significa al menos 50%, preferiblemente al menos 70% y más preferiblemente al menos 80%.
40 Natamicina en forma sólida significa 'natamicina no disuelta en agua'. La forma sólida de natamicina presente en el caldo de fermentación puede comprender, preferentemente, partículas de natamicina. Las partículas de natamicina son cristales de natamicina que, por ejemplo, pueden tener las siguientes formas: cristales en forma de aguja, cristales en forma de disco, o similares. Durante la fermentación se forman partículas de natamicina. Habitualmente, las partículas de natamicina tienen diámetros que oscilan entre 0,5-20 micrómetros. El diámetro de la partícula de natamicina es la mayor distancia de una parte de la partícula al otro extremo de la partícula. Se han observado partículas de natamicina en forma de aguja con un diámetro de más de 40 micrómetros. Los diámetros pueden determinarse utilizando un microscopio. Preferiblemente, en el procedimiento de la invención, el caldo de fermentación comprende partículas de natamicina con un diámetro medio de partícula de al menos 2 micrómetros,
45

más preferiblemente las partículas de natamicina tienen un diámetro medio de partícula de al menos 5 micrómetros, y lo más preferiblemente las partículas de natamicina tienen un diámetro medio de partícula de al menos 10 micrómetros.

5 La biomasa de los organismos *Streptomyces*, utilizados en la producción de natamicina, consiste generalmente en racimos (micelios) de hilos, aunque también pueden estar presentes otras formas de biomasa, p. ej., los llamados "gránulos". En estos hilos (hifas) están presentes compartimientos en los que se localizan actividades celulares. El tamaño de estos hilos, tal como se presentan en los racimos, es, en general, de 10-30 micrómetros (oscilando los diámetros entre 0,5-1,0 micrómetros).

10 De acuerdo con un procedimiento preferido, la natamicina está presente principalmente en forma sólida en el caldo de fermentación. Preferiblemente, al menos 50% de la natamicina está presente en forma sólida, más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%.

Etapas (a)

15 En la presente invención, el caldo de fermentación obtenido al final del proceso de fermentación es tratado para desintegrar la biomasa. La desintegración de la biomasa puede resultar en la lisis, solubilización de materias celulares y fragmentación (reducción de tamaño) de los racimos y los hilos. La desintegración de la biomasa puede verificarse mediante la visualización de la biomasa con un microscopio (aumento 400 x). La desintegración es completa si apenas se pueden observar a través del microscopio racimos o hilos de la biomasa. La desintegración de la biomasa también puede determinarse midiendo la viscosidad del caldo de fermentación. Por ejemplo, durante la desintegración de una biomasa del tipo racimo, la viscosidad disminuye. Si la viscosidad no disminuye sustancialmente tras un tratamiento ulterior, la biomasa será desintegrada lo suficientemente. Aunque diferentes condiciones de fermentación o diferentes organismos *Streptomyces* utilizados en la producción de natamicina pueden resultar en formas de la biomasa algo diferentes presentes al final de la fermentación, un experto en la técnica es capaz de encontrar una duración adecuada de la desintegración de la biomasa de cualquier caldo de fermentación.

25 Homogeneización, mezcladura de alta cizalla y técnicas ultrasónicas o tratamientos térmicos, de pH (alcalino) o enzimáticos o tratamientos con agentes tensioactivos pueden, por ejemplo, utilizarse solos o en combinación para desintegrar la biomasa. Las técnicas de desintegración se eligen de manera que se obtenga una desintegración sin afectar sustancialmente a la natamicina. La mayor parte de la natamicina, por lo menos 80%, preferiblemente hasta el 100%, mantiene su forma sólida y la actividad de la natamicina no se reducirá sustancialmente. Además, resultará evidente para un experto en la técnica que las técnicas de desintegración pueden no afectar de manera sustancial al tamaño de partículas de natamicina. Si el tamaño de partícula de natamicina se reduce como el tamaño de partícula de la biomasa, entonces la separación de la natamicina de la biomasa sería difícil. Un ejemplo eficaz de desintegración es el uso de un tratamiento térmico, opcionalmente combinado con un tratamiento del pH.

35 Un tratamiento térmico puede aplicarse al caldo de fermentación al final de la fermentación (p. ej. en el fermentador, después de haber cesado todos los suministros (p. ej., fuentes de oxígeno, carbono o nitrógeno)). El tratamiento térmico puede llevarse a cabo, por ejemplo, durante 1 a 8 horas y, por ejemplo, a 30 hasta 50°C. Preferiblemente, el tratamiento térmico puede llevarse a cabo a 30 hasta 40°C. Las temperaturas más altas pueden resultar en una floculación, precipitación y coagulación, lo que afectaría negativamente a la separación de la biomasa de las partículas de natamicina.

40 Un tratamiento de pH durante, por ejemplo, 1 a 8 horas y, por ejemplo, a un pH de 8 a menos de aproximadamente 10 puede realizarse también fácilmente al final de la fermentación en el fermentador. A un pH por encima de 10, la natamicina se volverá más soluble y más vulnerable a la inactivación, lo que podría afectar negativamente al rendimiento de recuperación y a la pureza de la natamicina final. El hidróxido de sodio o cualquier otro material cáustico compatible, por ejemplo hidróxido de amonio o hidróxido de potasio, se puede utilizar para aumentar el pH.

45 Después de la incubación alcalina el caldo se neutraliza mediante ácido clorhídrico u otro ácido compatible, por ejemplo ácido fosfórico, ácido sulfúrico o ácido acético. Preferiblemente, la neutralización tiene lugar después de separar la natamicina del caldo de fermentación.

50 Tratamientos enzimáticos pueden implicar la incubación con enzimas que descomponen la pared celular y/o enzimas que descomponen polímeros orgánicos tales como lisozima, xilanasas, celulasas, proteasas, glucanasas, lipasas y amilasas. Las enzimas, solas o en forma de mezclas de enzimas, generalmente se incuban bajo las condiciones

óptimas para que operen las enzimas. Las enzimas contribuyen a la lisis de células y a la solubilización de polímeros orgánicos.

La homogeneización puede implicar el uso de un homogeneizador tipo Manton-Gaulin. El caldo de fermentación es forzado a través de un orificio. Debido a las fuerzas de presión, la biomasa se desintegrará.

- 5 La desintegración de la biomasa mediante técnicas ultrasónicas puede obtenerse mediante la aplicación de ondas ultrasónicas al caldo de fermentación, que proporcionará la oscilación del líquido celular que las paredes de las células no pueden soportar. La desintegración de la biomasa mediante mezcla de alta cizalla implica la aplicación de altas fuerzas de cizalla a la biomasa. Estas altas fuerzas de cizalla se pueden obtener mediante sacudimiento u otra agitación mecánica. Determinados fermentadores pueden estar equipados, por ejemplo, con dispositivos de agitación que sean capaces de proporcionar las altas fuerzas de cizalla necesarias para desintegrar la biomasa. Durante la fermentación, la agitación se puede adaptar al crecimiento óptimo o las condiciones de producción de natamicina para la biomasa. Después de la fermentación la agitación se puede adaptar con el fin de desintegrar la biomasa, por ejemplo, mediante la aplicación de altas velocidades de agitación. La mezcla de alta cizalla también puede conseguirse, por ejemplo, utilizando mezcladores Waring (u otros) de alta cizalla.
- 10
- 15 La desintegración de la biomasa mediante un tratamiento con agentes tensioactivos puede implicar, por ejemplo, el uso de compuestos de octilfenoxipolietoxietanol tales como compuestos de tipo Triton. El caldo de fermentación puede incubarse con, por ejemplo, 0,01 a 1% de, por ejemplo, Triton X-100 durante, por ejemplo, 1 a 24 horas.

Etapa (b)

- 20 Después de la etapa de desintegración de la biomasa, la natamicina se separa de la biomasa para obtener una suspensión de natamicina. Debido al tratamiento de desintegración, la biomasa consiste ahora principalmente en pequeñas partículas sólidas y/o materia solubilizada. En los casos en los que las técnicas de separación convencionales utilizadas en los procesos de recuperación para productos de fermentación se utilicen principalmente para separar el sólido de la fase líquida, las técnicas de separación utilizadas preferiblemente en la presente invención separan las partículas sólidas de la biomasa desintegrada, por ejemplo sobre la base de diferencias de tamaño y/o diferencias de densidad. Las técnicas de separación utilizadas preferiblemente en la presente invención no tendrán como resultado una fase líquida transparente, sino que resultarán en una fase líquida turbulenta que contiene la mayoría de las partículas sólidas más pequeñas y/o menos densas (que comprenden principalmente la biomasa desintegrada).
- 25

- 30 Con el fin de separar la biomasa de las partículas de natamicina, el caldo de fermentación puede, por ejemplo, tratarse utilizando una técnica de separación por gradiente de gravedad. La técnica de separación por gradiente de gravedad separa las partículas de natamicina tanto de las impurezas solubles como insolubles. Técnicas de separación por gradiente de gravedad incluyen, por ejemplo, centrifugación por gradiente de gravedad y pueden utilizar, por ejemplo, columnas de flujo ascendente e hidrociclones. Técnicas de separación por gradiente de gravedad hacen uso del principio de que las partículas de diferentes densidades y/o tamaños se pueden separar cuando estas partículas de diferentes densidades y/o tamaños son sometidos a la gravedad o fuerzas equivalentes.
- 35

- 40 Durante la desintegración de la biomasa las partículas de biomasa se hacen más pequeñas. Esto hace que sea posible separar la biomasa de las partículas de natamicina. Habitualmente, más de 90% de la biomasa desintegrada y otras impurezas se pueden separar con la técnica de separación por gradiente de gravedad. La eficiencia de la separación se puede aumentar mediante la adición de agua y/o una sal (p. ej. cloruro sódico) al caldo de fermentación desintegrado.

- 45 El uso de técnicas de separación por gradiente de gravedad tiene la ventaja de que es posible modificar fácilmente o dirigir el proceso de acuerdo con la pureza y el rendimiento del producto final deseado. Mediante la variación de las condiciones de funcionamiento, se pueden aumentar la pureza o el rendimiento. En general, cuando aumenta la pureza, el rendimiento disminuirá y viceversa. El procedimiento de acuerdo con la invención puede, por ejemplo, proporcionar natamicina de aproximadamente 70% p/p de pureza (base anhidra) en materia seca con un rendimiento de aproximadamente 90%. Utilizando diferentes parámetros del proceso, con el procedimiento de la presente invención también se puede obtener natamicina de aproximadamente 90% p/p de pureza (base anhidra) basada en materia seca con un rendimiento de aproximadamente 80%. Incluso es posible producir varios productos de distintas calidades a partir de un caldo de fermentación.

Técnicas de separación por gradiente de gravedad darán mejores resultados, p. ej., purezas y/o rendimientos más altos, si se aumenta la diferencia de densidad de las partículas y/o el tamaño entre las partículas de producto y las impurezas. Por lo tanto, se prefiere que el caldo de fermentación contenga partículas de natamicina que tengan un diámetro medio de partícula de al menos 2 micrómetros. El diámetro se determina preferiblemente utilizando un microscopio. Preferiblemente, el diámetro medio de las partículas de natamicina es de al menos 5 micrómetros, más preferiblemente al menos 10 micrómetros. Se han observado caldos de fermentación que contienen partículas de natamicina con un diámetro medio de aproximadamente 25 micrómetros. Dado que la natamicina puede estar presente en el caldo de fermentación con diámetros que oscilan entre por debajo de 0,05 micrómetros y aproximadamente 40 micrómetros, resultará evidente para un experto en la técnica que las partículas más pequeñas pueden perderse durante la separación. Además, resultará evidente para un experto en la técnica que fracciones de partículas de natamicina con diámetros grandes de gran pureza pueden obtenerse mediante la técnica de separación por gradiente de gravedad. Las condiciones bajo las cuales se hace funcionar la técnica de separación por gradiente de gravedad determinan qué fracción de la natamicina se recuperará. En general, partículas de natamicina más grandes pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el uso de condiciones de baja cizalla durante la fermentación, o sembrando la fermentación con partículas de natamicina pequeñas o prolongando la fermentación.

La centrifugación por gradiente de gravedad puede simularse a escala de laboratorio haciendo funcionar una centrífuga por tandas durante menos tiempo o con un número menor de revoluciones por minuto en comparación con el funcionamiento estándar de la centrífuga, lo que resultaría en una clara separación de los sólidos de los líquidos.

En una escala de producción, la centrífuga se hace funcionar habitualmente de forma continua. En comparación con el funcionamiento normal de este tipo de centrífuga, el tiempo de espera en la centrífuga disminuye con el fin de separar la natamicina de la biomasa desintegrada. Cuanto menor sea el tiempo de espera, tanto mayor será la pureza y menor el rendimiento de la natamicina obtenida. Un experto en la técnica es capaz de encontrar un tiempo de espera adecuado que corresponda a una relación pureza:rendimiento optimizada o deseada.

Al final de la etapa (b), la suspensión de natamicina obtenida tiene preferiblemente un volumen total que es aproximadamente 5 a 10% en comparación con el caldo de fermentación original y que contiene preferiblemente menos de 20% v/v de resto de biomasa. Más preferiblemente, la suspensión de natamicina obtenida tiene un volumen total que es aproximadamente 6 a 8% en comparación con el caldo de fermentación original y que contiene menos de 15% v/v de resto de la biomasa. Lo más preferiblemente, la suspensión de natamicina obtenida tiene un volumen total que es aproximadamente 6 a 8% en comparación con el caldo de fermentación original y que contiene menos de 10% v/v de resto de la biomasa.

Etapa (c)

En una siguiente etapa del procedimiento de la invención, el pH de dicha suspensión de natamicina se ajusta a un valor de al menos 10 y se añade una cantidad de un disolvente sustancialmente miscible con agua, suficiente para disolver la natamicina en dicha suspensión de natamicina.

Preferiblemente, el disolvente miscible en agua utilizado en la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en acetona, metanol, etanol, propanol, isopropanol, propanodiol, tetrahidrofurano.

De acuerdo con una realización preferida, el pH de la etapa (c) se ajusta a un valor que oscila entre 10,0 y 11,0, preferiblemente entre 10,2 y 10,8, más preferiblemente entre 10,3 y 10,6 y lo más preferiblemente se ajusta a un valor de aproximadamente 10,4.

El pH de la suspensión de natamicina se ajusta preferentemente mediante la adición de una cantidad apropiada de un agente alcalino tal como NaOH, KOH, Na₂CO₃, K₂CO₃.

La adición de un disolvente miscible en agua y el aumento del pH de la suspensión de natamicina conduce a una disolución que comprende natamicina disuelta.

Etapa (d)

Posteriormente, cualesquiera sólidos insolubles se separan de dicha disolución de natamicina ajustada en pH. La separación de los sólidos insolubles puede llevarse a cabo utilizando cualquier método adecuado tal como filtración

5 en membrana, filtración profunda o centrifugación. Un experto en la técnica será capaz de realizar la separación de sólidos insolubles utilizando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. Preferiblemente, la eliminación de los residuos restantes se hace mediante filtración en membrana, seguida de una filtración en profundidad. Después de la filtración de membrana, la torta de filtro se lava con una disolución de propanol para separar cualquier natamicina disuelta de la torta. Preferiblemente, la disolución de propanol es 35% v/v. Preferiblemente, la filtración en profundidad se realiza en un filtro que tiene un diámetro de los poros de al menos 0,4 μm . Más preferiblemente, el filtro tiene un diámetro de los poros de al menos 0,25 μm .

Etapa (e)

10 Posteriormente, el pH de la disolución de natamicina se reduce a un nivel suficiente para precipitar la natamicina y para formar una suspensión de natamicina. Se puede utilizar cualquier producto químico de carácter ácido para bajar el pH. Un ejemplo de un producto químico de carácter ácido adecuado es ácido clorhídrico. El pH se baja a un valor que oscila entre 5,0 y 8,0. Preferiblemente, el pH se reduce a un valor que oscila entre 5,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,5 y 6,5. Lo más preferiblemente, el pH se reduce hasta alcanzar un valor de aproximadamente 6,0. Preferiblemente, el pH se reduce utilizando pequeñas etapas de pH con el fin de asegurar la
15 formación de cristales cristalinos que poseen alta pureza (preferiblemente con agitación continua).

Una pequeña etapa de pH significa preferiblemente que se realiza la adición de una cantidad adecuada de un agente acidificante para alcanzar una reducción de 0,1, preferiblemente 0,2 y más preferiblemente 0,3 unidades de pH cada 5 minutos. El pH se baja preferiblemente 0,3 unidades de pH cada 5 minutos hasta que la disolución se vuelva turbia. Después de agitar continuamente a este pH, el pH se reduce con 0,3 unidades de pH cada 3 minutos
20 hasta que el pH sea 6,0.

Opcionalmente, antes de bajar el pH de la disolución de natamicina, la temperatura de esta disolución puede aumentar desde 20°C a 35°C.

Después de la cristalización la temperatura de la suspensión de natamicina baja a 5°C para aumentar el rendimiento.

Etapa (f)

En una etapa adicional del procedimiento de la invención, la natamicina se separa de dicha suspensión de natamicina. Preferiblemente, la natamicina se separa utilizando un filtro prensa de membrana. Después de la filtración, la natamicina se lava utilizando una disolución de propanol y posteriormente se seca mediante ventilación de la torta de filtro de natamicina. Preferiblemente, la disolución de propanol es 35% v/v. Preferiblemente, la torta de
30 filtro producida se suspende una vez más utilizando una disolución de propanol al 70% y posteriormente se filtra para reducir aún más el contenido de agua.

Etapa (g)

Opcionalmente, después de la etapa de separación, la suspensión de natamicina se puede, por ejemplo, secar con el fin de obtener un producto seco. Se puede utilizar cualquier técnica de secado conveniente, p. ej., secado en vacío, secado por conducción o secado por convección. Dado que la natamicina es estable en la forma cristalina de la misma [natamicina.3 H₂O], es crítico no secar el producto hasta un contenido en humedad por debajo de aproximadamente 7%. El secado en vacío se lleva a cabo preferiblemente a aproximadamente 40°C.
35

Preferiblemente, el secado se realiza utilizando un mezclador Nauta hecho funcionar en vacío. El secado se termina cuando se alcanza una temperatura de 40°C. Preferiblemente, después del secado, la temperatura de la natamicina se reduce hasta por debajo de 20°C para evitar el crecimiento microbiano de cualquier posible contaminación.
40

Etapa (h)

Opcionalmente, la natamicina secada, obtenida en la etapa (g) se tritura preferiblemente utilizando un molino de martillo con el fin de obtener cristales que tengan un diámetro que oscile entre 1 y 50 μm , preferiblemente 1 y 10 μm . De acuerdo con una realización preferida, la natamicina se tritura tal como se describe en el documento US
45 6.576.617.

Natamicina

Sorprendentemente, la natamicina obtenible por dicho procedimiento exhibe una velocidad de liberación baja y/o una disminución en la velocidad de liberación con respecto a la natamicina conocida en la técnica. Por lo tanto, la invención también se refiere a una natamicina obtenible mediante dicho procedimiento descrito anteriormente. La natamicina de acuerdo con la invención exhibe una velocidad de liberación baja y/o una disminución en la velocidad de liberación tal como se define más adelante. De acuerdo con una realización preferida, la natamicina de la invención no se incorpora en cualquier formulación específica para obtener estas características. Es la natamicina per se la que exhibe estas características. La persona experta entenderá que el alcance de la invención no se limita a la natamicina preparada de acuerdo con el procedimiento de la invención.

10 Natamicina definida por tener una disminución específica en la velocidad de liberación

De acuerdo con una realización preferida, la velocidad de liberación de la natamicina de la invención disminuye en 1 a 45 por ciento después de al menos 9 días, cuando entra en contacto sobre un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 5 a 40 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación en estas condiciones se reduce en un 10 a 45 por ciento, incluso más preferiblemente en un 20 a 45 por ciento y lo más preferiblemente en un 40 a 45 por ciento.

Preferiblemente, la velocidad de liberación de la natamicina disminuye en un 1 a 45 por ciento después de 9 días, cuando entra en contacto sobre un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 40 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación en estas condiciones disminuye en un 10 a 45 por ciento, incluso más preferiblemente en un 20 a 45 por ciento y lo más preferiblemente en un 40 a 45 por ciento después de 9 días.

Incluso más preferiblemente, la velocidad de liberación de la natamicina disminuye en un 1 a 35 por ciento después de 9 días, cuando se pone en contacto sobre un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 10 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación disminuye en un 10 a 35 por ciento, más preferiblemente en un 20 a 35 por ciento y lo más preferiblemente en un 30 a 35 por ciento.

25 Natamicina definida por tener una velocidad de liberación específica

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la natamicina exhibe una velocidad de liberación que oscila entre 6 y 10 por ciento de la carga de soporte inicial después de al menos 9 días, cuando se ensayó en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 5 a 40 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación oscila entre 6 y 8 por ciento, más preferiblemente entre 6 y 7 por ciento y lo más preferiblemente entre 6 y 6,5 por ciento.

Preferiblemente, la natamicina exhibe una velocidad de liberación que oscila entre 0,60 y 0,90 µg/día después de 11 días, cuando se ensaya en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 10 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación oscila entre 0,60 y 0,80, más preferiblemente entre 0,60 y 0,70 y lo más preferiblemente entre 0,60 y 0,65.

Incluso más preferiblemente, la natamicina exhibe una velocidad de liberación que oscila entre 0,35 y 0,50 µg/día después de 11 días, cuando se ensaya en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 5 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación oscila entre 0,35 y 0,45, y lo más preferiblemente entre 0,35 y 0,40.

De acuerdo con una realización preferida, la natamicina exhibe:

- 40 - una velocidad de liberación que disminuye en un 1 a 45 por ciento después de al menos 9 días, al entrar en contacto con un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga del soporte de 5 a 40 µg de natamicina, y/o
- una velocidad de liberación que oscila entre 6 y 10 por ciento de la carga inicial de soporte después de al menos 9 días, cuando se ensaya en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 5 a 40 µg de natamicina, y
- 45 - una velocidad de liberación que oscila entre 0,1 y 2,0 µg cada 24 horas a lo largo

- de las primeras 24 horas, cuando entra en contacto con un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 40 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación oscila entre 0,5 y 2,0, más preferiblemente entre 1,0 y 2,0 y lo más preferiblemente entre 1,5 y 2,0,
- 5 - opcionalmente, los cristales de natamicina tienen un diámetro que oscila entre 1 y 50 µm, preferiblemente entre 1 y 10 µm.

De acuerdo con una realización preferida, la natamicina exhibe:

- 10 - una velocidad de liberación que disminuye en un 1 a 45 por ciento después de al menos 9 días, al entrar en contacto con un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga del soporte de 5 a 40 µg de natamicina, y/o
- una velocidad de liberación que oscila entre 6 y 10 por ciento de la carga inicial de soporte después de al menos 9 días, cuando se ensaya en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 5 a 40 µg de natamicina, y
- 15 - una velocidad de liberación que oscila entre 0,1 y 1,0 µg cada 24 horas a lo largo de las primeras 24 horas, cuando entra en contacto con un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro, y una carga de soporte de 10 µg de natamicina. Más preferiblemente, la velocidad de liberación oscila entre 0,2 y 1,0, más preferiblemente entre 0,4 y 1,0 y lo más preferiblemente entre 0,8 y 1,0,
- 20 - opcionalmente, los cristales de natamicina tienen un diámetro que oscila entre 1 y 50 µm, preferiblemente entre 1 y 10 µm.

El ensayo utilizado para medir la velocidad de liberación de natamicina se ha descrito en el ejemplo 1 de esta solicitud. En síntesis, la muestra que comprende natamicina se aplica a un soporte. El soporte puede ser cualquier material que proporcione un transporte ilimitado de agua. Preferiblemente, el soporte es un disco de papel de filtro, más preferiblemente el disco de papel de filtro utilizado en el ejemplo 1. Posteriormente, el soporte cargado con la composición de natamicina se aplica a la superficie de una placa de agar sembrado con células de levadura o fúngicas (en el ejemplo 1 se utilizaron células de *Saccharomyces cerevisiae*). La placa de agar y el soporte se incuban posteriormente a una temperatura tal que la natamicina se libera en el agar (en el ejemplo 1, la temperatura elegida es de 6°C) durante 24 horas. Después de haber retirado el soporte de la placa de agar, ésta se incuba bajo condiciones que permiten el crecimiento de dichas células (en el ejemplo 1, la temperatura es 30°C) durante un período elegido. En este caso, el período es de 24 horas o 48 horas, dependiendo del tipo de velocidad de liberación deseada a determinar. Finalmente, se determina la inhibición del crecimiento de células en el agar debido a la presencia de la natamicina, que ha sido liberada del soporte en el agar. El tamaño de la zona de inhibición es una medida de la natamicina liberada de la muestra.

35 Natamicina con una velocidad de liberación de natamicina baja de este tipo es muy atractiva para todas las aplicaciones en las que, por ejemplo, se desea una larga protección. Por ejemplo, en queso o embutidos o en otros productos cárnicos tales como aves de corral o en marisco y de panadería en donde se desea una protección de al menos varias semanas contra hongos.

40 De acuerdo con una realización preferida, un disolvente miscible en agua está presente con la natamicina de la invención. Preferiblemente, el disolvente miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, metanol, etanol, propanol, propanodiol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos.

Uso de la natamicina de la invención

La invención se refiere, además, a una composición anti-fúngica que comprende la natamicina de la invención que exhibe una baja velocidad de liberación de natamicina. De acuerdo con una realización preferida, la composición anti-fúngica de la invención comprende adicionalmente al menos otro agente anti-microbiano seleccionado del grupo que consiste en un conservante ácido débil, dióxido de azufre, sulfito, nitrato, nitrito, dicarbonato de dimetilo, bifenilo, difenilo, ortofenilfenol, tiabendazol, un ácido inorgánico, un imidazol y una bacteriocina. Todos estos componentes son ya conocidos por la persona experta en la técnica y se describen brevemente a continuación:

- 50 1. un conservante ácido débil tal como ácido sórbico, ácido propiónico, ácido benzoico, ácidos p-hidroxibenzoicos, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético o un metal alcalino o sal de metal alcalino de los mismos;

2. un compuesto anti-fúngico de polieno, preferiblemente natamicina;
3. dióxido de azufre o sulfitos;
4. nitrato y nitrito;
5. dicarbonato de dimetilo;
- 5 6. bifenilo, difenilo, ortofenilfenol o tiabendazol;
7. un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico;
8. un imidazol tal como imazalilo; y/o
9. cualquier compuesto anti-fúngico conocido en la técnica para uso como un conservante para productos alimenticios, protección de cultivos o tratamiento post-cosecha de frutos, verduras o cereales, productos farmacéuticos o cosméticos.
- 10 10. nisina o pediocina o lisozima.

Preferiblemente, el agente antimicrobiano es un conservante ácido orgánico débil y/o natamicina. El conservante ácido orgánico débil puede ser ácido sórbico, ácido propiónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido cítrico o una sal de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, o mezclas de los mismos. De acuerdo con una realización más preferida, el agente anti-microbiano es ácido sórbico, sorbato de potasio o calcio; ácido benzoico, benzoato de sodio, potasio o calcio; natamicina o mezclas de los mismos.

La composición antimicrobiana que comprende una bacteriocina será activa contra las bacterias. Nisina es una sustancia antibacteriana similar a un péptido, producida por microorganismos tales como *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Es principalmente activa contra bacterias gram-positivas. La nisina es no tóxica y está libre de efectos secundarios. La nisina es una sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS) y se utiliza ampliamente en una diversidad de alimentos. Ejemplos de productos de este tipo son queso procesado, leche, nata, postres lácteos, mezclas de helados, huevo líquido, productos de harina calentados al horno, aderezos y cerveza. La nisina es estable al calor y puede soportar temperaturas de esterilización con una pérdida mínima de actividad. El Comité de Organización Mundial de la Salud en Patrones Biológicos ha establecido una preparación de referencia internacional de nisina, la unidad internacional (UI en adelante). Delvoplus® y Nisaplin®, nombres de marcas de concentrados de nisina se distribuyen, respectivamente, por DSM y Danisco. Delvoplus® y Nisaplin® contienen 2,5% de nisina pura o 1 millón de UI por gramo. Niveles eficaces de nisina para conservar los productos alimentarios varían de 10 a 800 UI/g o 0,25 a 20 ppm de nisina.

La invención se refiere, además, a un producto tratado con la composición anti-fúngica de la invención. La composición anti-fúngica de la presente invención se puede utilizar para tratar una amplia diversidad de productos alimenticios y piensos tales como queso, queso rallado, yogur, mantequilla, productos cárnicos procesados, embutidos, cereales, verduras, frutas, productos de frutas y comidas listas para usar. La composición anti-fúngica también se puede utilizar para el tratamiento de bebidas tales como zumos de frutas, limonadas, té helado, vino y cerveza. Aplicaciones en agricultura tales como pulverización en el campo o en invernaderos o tratamiento post-cosecha también se incluyen en esta invención. Ejemplos de cultivos son cereales, frutas, verduras, legumbres, frutos secos, hierbas, flores y plantas. También semillas, bulbos de flores y patatas de siembra se pueden tratar con la composición anti-fúngica de esta invención. Ejemplos de aplicaciones farmacéuticas o cosméticas son composiciones para aplicaciones tópicas, lociones, cremas, ungüentos, champús y jabones.

Preferiblemente, la natamicina de la invención se incorpora en un recubrimiento de alimentos. Preferiblemente, el recubrimiento se utiliza para recubrir una carne o producto lácteo. Todos los recubrimientos tal como se describe en el documento EP 1 239 732B se incorpora con ello como referencia en este contexto. En síntesis, un recubrimiento de este tipo se utiliza preferiblemente en el recubrimiento de un queso, un embutido o un producto derivado. Todos los tipos de polímeros descritos en esta patente también se pueden utilizar en un revestimiento que comprende la natamicina de la invención. Adicionalmente, el agente anti-oxidante y/o agente quelante tal como se describe en el documento EP 1 239 732 B también se pueden añadir a la natamicina de la invención y/o al recubrimiento que comprende la natamicina de la invención.

La invención también se refiere al uso de la composición anti-fúngica de la invención para el tratamiento de un producto susceptible a la descomposición por hongos. La invención se refiere adicionalmente a un método para conservar un producto susceptible a la descomposición por hongos mediante tratamiento del producto con la composición anti-fúngica de la invención.

- 5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Método microbiológico para determinar la disponibilidad de un componente anti-fúngico

- 10 Este ejemplo describe un método microbiológico para determinar la disponibilidad de un componente anti-fúngico dentro de una composición anti-fúngica. En este ejemplo, natamicina es el componente anti-fúngico.

15 Discos de papel de filtro (discos de ensayo S&S Antibiotics Test Discs nº 321260) con un diámetro de 0,6 cm se cargaron con la preparación a ensayar de tal manera que cada uno de los discos se cargó con 40 µg de natamicina, p. ej., 50 µl de una muestra que contiene 800 ppm de la natamicina a ensayar se aplicó a un disco. Los discos se colocaron entonces en agar, que se sembró con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Las placas de Petri que contenían el agar se almacenaron a continuación durante 24 horas a 6°C para permitir que la natamicina se libere en el agar. En estas condiciones, *Saccharomyces* no crece. Como referencia, los discos estaban recién cargados con un intervalo de cantidades conocidas de natamicina disueltas en metanol acuoso.

20 Al día siguiente, los discos de muestra se transfirieron a nuevas placas de Petri que contenían agar sembrado con *Saccharomyces cerevisiae*. Discos nuevos recién cargados con un intervalo de cantidades conocidas de natamicina disuelta se prepararon para su uso como una referencia. Las nuevas placas con los discos de la muestra y la nueva referencia se almacenaron a 6°C durante 24 horas y las placas viejas que contenían la natamicina liberada se incubaron a 30°C durante 24 horas.

25 El tamaño de la zona de inhibición es una medida de la natamicina liberada del disco de muestra. La cantidad de natamicina liberada se puede calcular por métodos conocidos per se. Repitiendo el proceso, la natamicina liberada puede ser medida sobre una base diaria. Alternativamente, pueden elegirse otros períodos de tiempo de liberación.

Ejemplo 2

Procedimiento de producción de natamicina con propiedades mejoradas

30 Un caldo de fermentación de *Streptomyces natalensis* que contenía natamicina con un diámetro medio de partícula de aproximadamente 10 micrómetros se incubó a una temperatura de 35°C durante 3 horas. Este caldo tratado térmicamente se trató adicionalmente a una centrifugación por gradiente de gravedad. La centrifuga se hizo funcionar en condiciones tales que la mayoría de los sólidos de biomasa se retiraron junto con el sobrenadante. Este tratamiento resultó en una suspensión de natamicina al 70% p/p (base anhidra) basada en materia seca. El rendimiento de natamicina era de aproximadamente 97%. Después se añadió una disolución de propanol para obtener una suspensión de natamicina que contiene propanol al 35% v/v. Se añadió una disolución de NaOH para aumentar el pH de la suspensión a 10,4 con el fin de disolver la natamicina. Subsiguientemente, la disolución de natamicina se filtró utilizando un filtro prensa de membrana equipado con una tela de filtro que tiene un tamaño de poros de al menos 10 µm. Subsiguientemente, la torta del filtro se lavó con una disolución de propanol al 35% v/v. Después de la filtración de membrana, se llevó a cabo una filtración en profundidad utilizando un tamaño de poros de 0,25 micras. Subsiguientemente, los filtros de filtración en profundidad se lavaron con una disolución de propanol al 35% v/v. Después de la filtración en profundidad, el pH del filtrado se redujo a 6,0 mediante reduciendo el pH a 0,3 unidades de pH durante 5 minutos mediante la adición de ácido clorhídrico con el fin de precipitar la natamicina de dicho filtrado. Subsiguientemente, las aguas madre se separaron después por filtración de membrana. Para reducir adicionalmente el contenido de agua, los cristales se lavaron utilizando una disolución de propanol. La torta de natamicina producida se secó utilizando un secador de vacío. Los cristales secados se micronizaron luego a entre 1 y 10 micrómetros.

Ejemplo 3

Comparación de la velocidad de liberación de la natamicina de la invención con natamicina de la técnica anterior

5 Utilizando el método descrito en el ejemplo 1, se comparó el perfil de la velocidad de liberación de la nueva natamicina de liberación lenta con el perfil de la velocidad de liberación de natamicina conocida comercial Delvolid® (DSM, Países Bajos). Suspensiones de las preparaciones de natamicina se prepararon de una manera tal que cada una de las suspensiones contenía 800 ppm de natamicina como tal. 50 µl de cada una de las respectivas mezclas se aplicaron sobre un disco de filtro de papel y se analizó la velocidad de liberación mediante el método del ejemplo 1. Los resultados se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 1: Velocidad de liberación inicial (40 µg de carga de soporte)

	Velocidad de liberación después de 24 horas (µg/24 horas)	Velocidad de liberación después de 48 horas (µg/24 horas)
Natamicina de liberación lenta	<2	<1,8
Delvolid®	<3	<2

10 Tabla 2: Disminución de la velocidad de liberación después de 9 días

	% de disminución en la velocidad de liberación
Natamicina de liberación lenta (10 µg de carga de soporte)	35
Natamicina de liberación lenta (40 µg de carga de soporte)	45
Delvolid® (40 µg de carga de soporte)	58

Tabla 3: Velocidad de liberación después de 11 días

	Velocidad de liberación (µg/24 horas)
Natamicina de liberación lenta (5 µg de carga de soporte)	0,35
Natamicina de liberación lenta (10 µg de carga de soporte)	0,6
Natamicina de liberación lenta (40 µg de carga de soporte)	1,2
Delvolid® (10 µg de carga de soporte)	1,1

La natamicina de liberación lenta de acuerdo con la invención tiene claramente una velocidad de liberación más lenta que una preparación de natamicina disponible comercialmente (Delvolid®).

Ejemplo 4

15 Comparación de la velocidad de liberación de la natamicina de la invención con natamicina de la técnica anterior en bebidas

20 La velocidad de liberación de la nueva natamicina de liberación lenta se comparó con la de natamicina Delvolid® Instant (DSM, Países Bajos) comercial conocida mediante la medición de su estabilidad química en diversas bebidas. Las preparaciones de natamicina se suspendieron en bebidas a una concentración final de 150 a 170 ppm de natamicina. Las bebidas que contienen natamicina se almacenaron a 4°C y la concentración de natamicina en la bebida se midió en el tiempo. Los resultados se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 1: Detalles de bebidas

Bebida	Fabricante	pH
Zumo de tomate	Appelsientje (J44E3 34:38), Friesland Foods, Países Bajos	4,2
Té helado	Plus Supermarket (05125SE25056), Países Bajos	3,2

Tabla 2: Degradación de natamicina en bebidas

Bebida	Tiempo (semanas)	Degradación total (ppm)		
		Natamicina de liberación lenta	Natamicina de Delvolid® Instant	Diferencia
Zumode tomate	1	5,1	8,6	3,5
	2	13,1	13,7	0,6
	3	20,1	26,5	6,4
	4	23,2	27,9	4,7
	5	28,9	32,6	3,7
Té helado	1	3,4	14,9	11,5
	2	5,4	15,5	11,1
	3	3,2	15,3	12,1
	4	15,0	28,2	13,2
	5	17,4	31,7	14,3

5 Los datos demuestran que se degrada menos natamicina de liberación lenta que natamicina en Delvolid® Instant en el zumo de tomate y té helado. Puesto que la fracción disuelta de una formulación de natamicina es susceptible a la degradación, los resultados indican que la fracción disuelta de natamicina de liberación lenta es menor que la de natamicina en Delvolid® Instant. Por lo tanto, la velocidad de liberación de natamicina de liberación lenta es menor que la de Delvolid® Instant en ambas bebidas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de natamicina a partir de un caldo de fermentación que contiene biomasa y natamicina, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) desintegrar la biomasa mediante calentamiento durante 1 a 8 horas a 30 hasta 50°C;
 (b) separar la natamicina del caldo de fermentación tratado de este modo mediante centrifugación por gradiente de gravedad para obtener una suspensión de natamicina;
 (c) ajustar el pH de la suspensión de natamicina a un valor que oscila entre 10,0 y 11,0 y añadir una cantidad de propanol suficiente para disolver la natamicina en la suspensión de natamicina;
- 10 (d) separar los sólidos insolubles de la disolución de natamicina obtenida en la etapa (c) mediante filtración en membrana, seguida de filtración en profundidad;
 (e) bajar el pH de la disolución de natamicina obtenida en la etapa (d) a un pH de 5 a 8 para precipitar la natamicina;
 (f) separar mediante filtración la natamicina de la suspensión de natamicina;
- 15 (g) secar la natamicina separada; y
 (h) reducir el tamaño de la natamicina secada.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que al menos 50% de la natamicina presente en el caldo de fermentación está en forma sólida.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que después de la filtración en membrana en la etapa d, la torta de filtro se lava con una disolución de propanol.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el pH en la etapa (e) se reduce a un pH de 5,5 a 6,5.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que después de la filtración en la etapa f, la natamicina se lava con una disolución de propanol.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la natamicina separada se seca en vacío.
7. Natamicina, que comprende una velocidad de liberación que disminuye en 1 a 45 por ciento después de al menos 9 días, cuando se pone en contacto en un soporte con una superficie de agar de 0,6 cm de diámetro y una carga de soporte de 5 a 40 µg de natamicina.
- 30 8. Natamicina de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que un disolvente miscible en agua está presente con la natamicina.
9. Natamicina de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizada por que la natamicina se incorpora en un recubrimiento de alimentos.
10. Natamicina de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizada por que la natamicina está comprendida en una composición anti-fúngica.
- 35 11. Natamicina de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por que la composición anti-fúngica comprende, además, al menos otro agente antimicrobiano seleccionado del grupo que consiste en un conservante ácido débil, dióxido de azufre, sulfito, nitrito, dicarbonato de dimetilo, bifenilo, difenilo, ortofenilfenol, tiabendazol, un ácido inorgánico, un imidazol y una bacteriocina.
- 40 12. Un producto seleccionado del grupo que consiste en queso, embutidos u otro producto cárnico tal como aves de corral, marisco y productos de panadería tratados con natamicina de acuerdo con la reivindicación 7.
13. Un producto tratado con natamicina de acuerdo con la reivindicación 10 u 11.
14. Un producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que el producto se selecciona del grupo que consiste en queso, queso rallado, yogur, mantequilla, productos cárnicos procesados, embutidos, cereales, verduras, frutas, productos de frutas, comidas listas para usar, legumbres, frutos secos, hierbas, flores, plantas, bulbos de flores, patatas de siembra, y bebidas tales como zumos de frutas, limonadas, té helados, vino y cerveza.
- 45

15. Método para preservar un producto susceptible de descomposición por hongos, tratando el producto con natamicina de acuerdo con la reivindicación 10 u 11.