

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 626**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A23L 3/3535 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014** **PCT/NL2014/050014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014** **WO14112869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014** **E 14700533 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017** **EP 2945496**

54 Título: **Proceso de producción de nisina mejorado**

30 Prioridad:

15.01.2013 US 201361752541 P
26.02.2013 EP 13156751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.09.2017

73 Titular/es:

PURAC BIOCHEM BV (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL

72 Inventor/es:

DIERDORP-ANDREAE, BRENDA MARJA;
MEIJER, JASPER;
MCELMURY, SCOTT ALLAN;
BLONK, JOHANNES CORNELIUS ADRIANUS y
MOREHOUSE, LANSEN COURT

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 634 626 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

Proceso de producción de nisina mejorado

Campo de la invención

5 [0001] La presente invención se refiere a los procesos de fermentación. Más en particular, se proporciona un método mejorado para la producción de fermentos de ácido láctico, que también contienen nisina.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Para prevenir la descomposición y el deterioro de la calidad de productos alimenticios, comúnmente se añaden conservantes. Durante décadas, los conservantes de alimentos sintetizados químicamente han sido la opción principal para conseguir este objetivo. Más recientemente, se han incrementado las cuestiones de seguridad respecto a estos conservantes de alimentos sintetizados químicamente. Desde entonces, ha habido un interés creciente en sustancias antimicrobianas derivadas de alimentos tradicionales.

15 [0003] Las bacterias ácido lácticas son microorganismos útiles, que han sido utilizados tradicionalmente en la producción de varios productos alimenticios fermentados. La fermentación de ácido láctico produce la inhibición del crecimiento de otras bacterias contaminantes. Reduciendo el pH de los sistemas de producción de ácido láctico por fermentación de ácido láctico, la descomposición y el deterioro de la calidad de tales productos alimenticios puede evitarse y/o reducirse. Adicionalmente, se ha determinado que algunas sustancias antimicrobianas adicionales, tales como las bacteriocinas, son producidas por algunas bacterias ácido lácticas. Una bacteriocina conocida para controlar los patógenos en los alimentos es la nisina. La nisina es producida por cepas de *Lactococcus lactis* e inhibe una amplia gama de bacterias gram-positivas. Estas bacteriocinas pertenecen al grupo de los lantibióticos (bacteriocinas de clase I) y tienen una larga historia como conservantes alimenticios.

20

[0004] Cada vez es más común usar fermentos que contengan ácido láctico y nisina producidos por dichas cepas a modo de agentes conservantes en todo tipo de productos alimenticios.

25 [0005] Los métodos convencionales de fermentación de bacteriocina son generalmente ineficientes en lo que respecta a la producción de nisina a gran escala (comercial) debido a los limitados índices de producción y a la concentración final insatisfactoria de nisina. Prolongar el proceso de fermentación intrínsecamente también aumenta el riesgo de contaminar los lotes de producción. Lo que es más importante, los índices de producción de nisina lentos provocan que la producción comercial de nisina sea costosa. Otro factor relevante respecto al coste son los medios de fermentación requeridos, relativamente costosos.

30 [0006] Los fermentos que contienen nisina sólo se producen excepcionalmente en la misma planta donde se aplican para producir los productos alimenticios finales. En la mayoría de los casos, los fermentos que contienen nisina se fabrican en una planta para ser usados normalmente algún tiempo después en otra planta en la producción del producto alimenticio. Los productos de fermentación, por lo tanto, frecuentemente necesitan ser procesados para crear formulaciones que se puedan almacenar durante un tiempo sin que pierdan calidad y/o actividad, que se puedan transportar eficazmente y que sean fáciles de manejar y dosificar en la producción de productos alimenticios. Por cuestiones económicas, frecuentemente, es conveniente ofrecer estos productos en forma concentrada. Tales formulaciones pueden ser apropiadas en formulaciones líquidas, semilíquidas o sólidas, cada tipo de formulación tiene sus ventajas y desventajas específicas. La elección más preferible normalmente variará dependiendo de si se trata de un uso o de otro.

35

40 [0007] Las posibilidades de producir formulaciones líquidas, semilíquidas y/o sólidas estables y fáciles de utilizar de fermentos que contengan nisina, están determinadas en gran parte por el comportamiento termodinámico de la(s) sal(es) de ácido láctico, que constituyen la mayor parte del fermento. Este comportamiento termodinámico establece las condiciones requeridas para el procesamiento subsiguiente en el tipo formulación elegido y también determina qué condiciones pueden tener a su vez un impacto significativo en el contenido/actividad de nisina en la formulación.

45

[0008] Por último, pero no por ello menos importante, los requisitos normativos organolépticos, dietéticos y alimenticios establecen de forma adicional limitaciones a la fermentación, las etapas de procesamiento posteriores y los tipos y cantidades de las sustancias que deben usarse en esta.

50 [0009] J.S. VAN'T HUL ET AL: "Neutralization/recovery of lactic acid from *Lactococcus lactis*: effects on biomass, lactic acid, and nisin production", WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 13, no.

5, 1997, páginas 527-532, XP055071927, ISSN: 0959-3993, DOI: 10.1023/A:1018509207939 hace referencia a un estudio de los efectos de la neutralización de ácido láctico en la producción de biomasa, de ácido láctico y de nisina durante la fermentación de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de nisina. Este indica que es necesaria la regulación de pH para conseguir una alta población de células, producción de ácido láctico y grado de nisina. Generalmente, el control de pH se ha llevado a cabo mediante la adición de álcali para formar sal ácida. Mediante pruebas de lote alimentado se comparó la eficacia de NaOH, NH_4OH y NH_4CO_3 como agentes neutralizantes. El medio de fermentación empleado contenía vinaza fina (que comprende aprox. un 20% de proteína cruda) y el fermentador se empleó a pH 6.5, 30°C. Los cultivos se incubaron de 10 a 12 horas a 30°C antes de usarse como inóculo fermentador. En general, NH_4OH funcionó significativamente mejor que NaOH o NH_4CO_3 como agente neutralizante. El hecho de que éste suministró una fuente adicional de nitrógeno hizo que se considerase el responsable del aumento del crecimiento celular, la producción de nisina y ácido láctico observada en el medio basado en vinaza.

[0010] DE VUYST L, VANDAMME E J: "Nisin, A Lantibiotic Produced by *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications" In: DE VUYST L, VANDAMME E J: "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria", 1994, Chapman Hall, XP008163106, páginas 151-221 es el capítulo de un manual que trata de las propiedades, biosíntesis, fermentación y aplicaciones de la nisina. Divulga que una fermentación con *L. lactis* de un medio basado en glucosa, autolisado de levadura, hidrógeno-fosfato de potasio, sulfato de magnesio y cloruro sódico tuvo como resultado contenidos de nisina de 1000 IU/ml. La adición de cuatro aminoácidos (como fuente de nitrógeno) a un medio mínimo aumentó significativamente la producción de nisina. Las condiciones de fermentación normalmente incluyen la incubación a 28-30°C durante 12-24 horas y el control de pH en un rango de 5.0-6.8. La nisina se describió como adecuada para la conservación de productos alimenticios.

[0011] PEREZ-GUERRA N ET AL: "Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 36, no. 2, 2002, páginas 119-125, XP002699033 se refiere a un estudio de la producción de bacteriocinas de *L. lactis* CECT 539 usando desperdicios del procesamiento de mejillones. Las cepas crecieron en caldo MRS, los cultivos de trabajo fueron subcultivados dos veces en cultivos líquidos en el mismo medio a 30°C antes de usarse. El medio hidrolizado contenía 0.65 g/l de nitrógeno. Se consiguió un aumento de producción de nisina en medios tamponados con 0.10 M de hidrogenofalato de potasio /NaOH. El crecimiento máximo de *L. Lactis* se obtuvo después de 15 horas de incubación. La síntesis de nisina cesó cuando el pH del medio disminuyó hasta menos de 4.

[0012] KALRA M S, DUDANI A T: "Effect of calcium carbonate on nisin production in a milk culture", INDIAN JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 26, no. 1, 1973, páginas 146-148, XP008163503, divulga los resultados de un estudio sobre el efecto del carbonato cálcico en la producción de nisina en un cultivo de leche. Se usaron tres niveles de CaCO_3 , es decir, 1.0, 2.0 y 3.0% y su adición permitió la neutralización del ácido láctico producido en el medio, que tuvo como resultado un pequeño cambio de pH durante la incubación, presentado con valores de aproximadamente 5.5. De esta forma se puede incrementar la producción de nisina.

[0013] En resumen, los fabricantes de composiciones conservantes que contienen nisina se topan con cantidad de desafíos tecnológicos interrelacionados para optimizar el proceso y satisfacer las necesidades y requisitos impuestos por los usos (finales) específicos del producto, particularmente con respecto al índice de producción y rendimiento, estabilización de la actividad, y el procesamiento en formulaciones estables y fáciles de utilizar. Se entiende que mantener los costes de fabricación a un nivel aceptable siempre es un factor del diseño del proceso.

[0014] El objeto de la invención es proporcionar métodos para producir fermentos que contengan nisina y formular tales fermentos en conservantes. En particular, es objeto de la presente invención proporcionar procesos mejorados para producir fermentos que contengan nisina mediante cultivo (por lote) simple y eficaz que permita convertir los procesamientos subsiguientes simples bien en un producto líquido, semilíquido o en polvo seco, que contenga un contenido de nisina y una estabilidad suficientes, buenas propiedades de manipulación y propiedades organolépticas satisfactorias.

Resumen de la invención

[0015] La presente invención proporciona un proceso de producción de fermento de lactato que contiene nisina y que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un medio nutritivo que comprenda una solución de un sustrato fermentable y una fuente de nitrógeno en un medio acuoso;
- b) inocular dicho medio nutritivo con bacterias ácido lácticas que producen nisina; y

- c) incubar el medio nutritivo inoculado bajo condiciones favorables para el crecimiento y/o actividad metabólica de dichas bacterias ácido lácticas durante un periodo suficiente para producir un caldo de fermentación que contenga un mínimo de 20 g/l de equivalentes de lactato y/o al menos 1000 IU/ml de actividad equivalente de nisina, durante dicho periodo se controla el pH del caldo de fermentación por adición de uno o más agentes alcalinizantes que comprenden sales de sodio alcalino y de calcio alcalino, donde la proporción Na:Ca (p/p) de las sales adicionadas se sitúa en el rango de 1/6 - 1/1, preferiblemente en el rango de 1/6 - 1/2.

[0016] En una forma de realización ventajosa de la invención, el medio nutritivo comprende una base láctea, preferiblemente de suero de leche.

- 10 [0017] En una forma de realización ventajosa de la invención, el medio nutritivo se inocula con un medio de inoculación que comprende bacterias ácido lácticas activadas.

[0018] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende la etapa adicional d1) de acidificación del caldo de fermentación por la adición de un ácido, preferiblemente un ácido láctico, en una cantidad suficiente para reducir el pH del caldo de fermentación por debajo de 4.8.

- 15 [0019] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende la etapa adicional d2) de inactivación de las bacterias ácido lácticas sometiendo el caldo de fermentación a una temperatura de al menos 40 °C durante un periodo de al menos 10 minutos.

- 20 [0020] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende la etapa adicional e) de concentrar el fermento obtenido en la etapa c) o d) hasta obtener un contenido de sustancia seca de al menos un 30 % en peso, preferiblemente en el rango de 30-50 % en peso, por evaporación.

[0021] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende la etapa adicional f) de enfriamiento del concentrado obtenido en la etapa e) a una temperatura por debajo de 40 °C.

[0022] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende la etapa adicional e') desecado por atomización del fermento obtenido en la etapa c) o d) para producir un polvo suelto.

- 25 [0023] La presente invención también proporciona los fermentos y productos fermentados obtenibles por el método descrito anteriormente y sus varias aplicaciones como conservante.

[0024] Estos y otros aspectos y formas de realización de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la siguiente descripción detallada y en el trabajo experimental descrito en la sección posterior.

- 30 Descripción detallada de la invención

- 35 [0025] Como se indica aquí, la primera etapa a) del proceso comprende la preparación de un medio nutritivo. En este documento, el término "medio nutritivo" se utiliza para hacer referencia al medio en la forma original preparado para la fermentación. El medio nutritivo suministra los sustratos y los nutrientes que las bacterias ácido lácticas necesitan para crecer y producir los distintos productos de fermentación. El medio nutritivo es normalmente un medio acuoso que comprende un sustrato fermentable, una fuente de nitrógeno y micronutrientes, donde las bacterias ácido lácticas pueden crecer y reproducirse. En principio, cualquier combinación de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y micronutrientes se puede utilizar siempre que esta promueva el crecimiento de las bacterias ácido lácticas.

- 40 [0026] El término 'caldo de fermentación' se utiliza en este caso para referirse al medio nutritivo después de la inoculación con las bacterias ácido lácticas. Así, en el sentido estricto, se pueden distinguir diferentes tipos de "caldos de fermentación" basándonos en la etapa en la que la fermentación ha progresado: (i) medios de nutrientes en la forma proporcionada originalmente que incluyen bacterias directamente después de la inoculación; (ii) medios de nutrientes en proceso de fermentación donde alguno o la mayor parte de los nutrientes originalmente proporcionados ya ha sido consumido y productos de fermentación incluyendo lactato
45 que han sido excretados en los medios por las bacterias; y, (iii) medios que han sido sacados del fermentador después de que parte de los nutrientes o todos los nutrientes hayan sido consumidos.

[0027] Como se utiliza en este caso, el término "sustrato fermentable" se refiere a la fuente de carbono que se convierte en otro compuesto por la acción metabólica de bacterias ácido lácticas. Como fuente de carbono

pueden usarse los mono-, di-, tri-, oligo- y polisacáridos, en particular, azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa y/o (hidrolizados) de almidón. Preferiblemente, en esta invención, el sustrato es el carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en lactosa, sacarosa y glucosa, de la forma más preferible, lactosa.

5 [0028] Estos carbohidratos pueden derivar de una variedad de fuentes, tales como productos lácteos productos derivados de plantas, frutas o vegetales, por ejemplo, melaza, fruta o jugos vegetales, fruta o pulpa vegetal, etc. La invención se puede practicar utilizando uno o más carbohidratos en forma parcial o sustancialmente purificada. Alternativamente, la invención puede practicarse utilizando una materia prima que contenga uno o más carbohidratos.

10 [0029] El medio nutritivo contiene normalmente al menos 1 g/l, más preferiblemente 5-300 g/l, de la forma más preferible 10-80 g/l, del carbohidrato.

15 [0030] Ejemplos adecuados de fuentes de nitrógeno incluyen proteína derivada de plantas, tal como proteína de soja y proteína de guisante, proteína de productos lácteos, levadura o extracto de levadura, extracto de carne, varios tipos de hongos de fermentación, al igual que hidrolizados de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Se prefiere que la fuente de nitrógeno comprenda aminoácidos libres y/o péptidos cortos. Se pueden preparar fuentes de nitrógeno adecuadas hidrolizando una fuente de proteína. En una forma de realización de la invención, la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo consistente en proteína de guisante, extractos de levadura e hidrolizados de proteínas de productos lácteos, más preferiblemente extractos de levadura e hidrolizados de proteínas de productos lácteos, especialmente hidrolizado de caseína.

20 [0031] El medio nutritivo contiene normalmente al menos 0.1 g/l, más preferiblemente 0.2-50 g/l, de la forma más preferible 0.5-20 g/l de la fuente de nitrógeno. Estas cantidades se refieren al peso total de los sólidos secos del material adicionado como la fuente de nitrógeno por litro de medio nutritivo, como entenderán los expertos en la técnica. Por lo tanto, el medio nutritivo contiene normalmente al menos 0.1 g/l, más preferiblemente 0.2-50 g/l, de la forma más preferible 0.5-20 g/l de proteínas, péptidos y/o aminoácidos libres.

25 [0032] En alguna forma de realización de la invención, el medio nutritivo comprende otros micronutrientes que favorecen la acción metabólica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas, tales como vitaminas, minerales, cofactores y/o otros oligoelementos. Los micronutrientes se usan generalmente en un índice de al menos 0.01 % (p/v), preferiblemente un índice de entre 0.1 y 2 % (p/v) en el medio nutritivo. Normalmente, las fuentes de carbohidrato y/o fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar conforme a la invención contienen intrínsecamente micronutrientes.

35 [0033] Una forma de realización particularmente preferida de la invención se refiere a la fermentación de un producto lácteo. Como se utiliza en este caso, el término "lácteo" se refiere a la leche entera (animal), componentes de la leche al igual que productos derivados de leche, tal como suero de leche, permeato de suero de leche, permeato de leche, yogur y quark y productos derivados de la preparación de yogur y quark. En algunas formas de realización preferidas, por volumen, el componente principal del medio nutritivo es el producto lácteo. En algunas formas de realización, el medio nutritivo comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, o al menos el 99.9% del volumen de leche, por ejemplo, un producto seleccionado de leche entera, leche cruda, leche desnatada, leche reconstituida, leche condensada, leche rehidratada y similar. En alguna forma de realización, el medio nutritivo comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, o al menos el 99.9% del peso de los sólidos secos de sólidos de leche, por ejemplo, sólidos de leche entera, sólidos de leche cruda, sólidos de leche desnatada, suero de leche y similares. En una forma de realización particularmente preferida, dicho sólido de leche es suero de leche.

45 [0034] Otra forma de realización preferida de la invención se refiere a la fermentación de un producto derivado de fruta o vegetales, tal como zumos, pastas o pulpa derivados de fruta o vegetales. En algunas formas de realización preferidas, por volumen, el componente principal del medio nutritivo es el producto derivado de fruta o vegetales. Ejemplos adecuados incluyen tomate, zanahoria, espinacas, melaza, etc. En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el producto derivado de fruta o vegetales es un zumo obtenido por compresión mecánica o macerando la fruta cruda o vegetal. En algunas formas de realización, el producto derivado de fruta o vegetales comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, o al menos el 99.9% del volumen del medio nutritivo. En algunas formas de realización, el medio nutritivo comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% del peso de los sólidos secos de sólidos de fruta o vegetales.

[0035] Como se ha indicado aquí, la etapa posterior b) comprende la inoculación del medio nutritivo con bacterias ácido lácticas que producen nisina.

[0036] Conforme a esta invención, las "bacterias ácido lácticas" son capaces de producir nisina. En algunas formas de realización preferidas, las bacterias ácido lácticas pertenecen al orden Lactobacillales, preferiblemente al género *Lactococcus*. La bacteria ácido láctica productora de nisina pertenece de la forma más preferible a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, y ejemplos de la misma incluyen JCM 7638, ATCC 11454, NCDO 497 e IFO 12007. En las formas de realización preferidas, las bacterias ácido lácticas son bacterias ácido lácticas que tienen un estado GRAS.

[0037] En algunas formas de realización, el caldo de fermentación comprende una única especie de bacterias ácido lácticas productoras de nisina, mientras que, en otras formas de realización, el caldo de fermentación comprende una mezcla de cepas de bacterias ácido lácticas, al menos una de las cuales es capaz de producir nisina. En una forma de realización se utiliza una mezcla de cepas de bacterias ácido lácticas productoras de nisina.

[0038] En una forma de realización, el medio nutritivo se inocula con un caldo de fermentación que comprende bacterias ácido lácticas activadas. El término 'activado' se utiliza en este caso para indicar que la composición usada para inocular el medio nutritivo comprende bacterias ácido lácticas en un estado activo metabólicamente. Cuando las bacterias se introducen en el medio nutritivo durante la siembra directa, es decir, en forma de concentrado seco, líquido o congelado, las bacterias no producen su efecto inmediatamente y requieren tiempo para convertirse en activas. Este 'desfase temporal', también denominado 'periodo de latencia', puede implicar el restablecimiento de las bacterias almacenadas en la forma natural (etapa de rehidratación de las bacterias), la restauración de la actividad metabólica y/o la adaptación al nuevo ambiente. Conforme a una forma de realización preferida de esta invención, la inoculación del medio nutritivo (producción) se realiza con un caldo de fermentación que comprende bacterias ácido lácticas activadas, que acortan típicamente el periodo de latencia, que puede reducir significativamente en general el tiempo de fermentación. El uso de bacterias ácido lácticas activadas también puede incrementar el índice de reproducción durante la etapa exponencial y/o el índice de ácido láctico y/o producción de nisina durante las etapas exponenciales y/o fijas del proceso de fermentación.

[0039] En una forma de realización de la invención, se utiliza un caldo de fermentación que comprende bacterias ácido lácticas activadas para la inoculación del medio nutritivo, donde el caldo comprende más de 12 g/l de equivalentes de lactato, más preferiblemente más de 14 g/l, de la forma más preferible más de 16 g/l. Como se utiliza en este caso, el término "equivalente de lactato" hace referencia al total del ácido láctico libre y de la base conjugada (ácido disociado), como entenderán los expertos de la materia. Los términos "ácido láctico" y "ácido láctico libre" se emplean aquí de forma intercambiable para referirse a la forma ácida. El término lactato se refiere a la forma disociada del ácido láctico. La sal (disuelta) de lactato también se denomina específicamente en este caso "sal de lactato".

[0040] En una forma de realización de la invención, el caldo de fermentación que comprende bacterias ácido lácticas activadas usadas para la inoculación del medio nutritivo se prepara incubando las bacterias ácido lácticas en un medio de activación, que es similar en su composición al medio nutritivo de producción. En una forma de realización de la invención, el medio de activación tiene la misma composición que el medio nutritivo de producción. En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el medio de activación está enriquecido en comparación con el medio nutritivo de producción, preferiblemente uno o más nutrientes aplicados en el medio nutritivo de producción se utilizan en cantidades excesivas en el medio de activación, lo que normalmente significa que la concentración es de al menos el 120 % de la concentración empleada en el medio nutritivo. Más preferiblemente, el medio de activación comprende uno o más de dichos nutrientes en concentraciones de al menos el 130 % de las concentraciones empleadas en el medio nutritivo de producción, aún más preferiblemente al menos el 140 %. En una forma de realización particularmente preferida de la invención, la fuente de nitrógeno se usa en cantidades excesivas en el medio de activación.

[0041] Como entenderán los expertos en la técnica, el caldo de fermentación que comprende bacterias ácido lácticas activadas se puede preparar utilizando un equipo y una metodología estándar.

[0042] Como se ha indicado aquí, el proceso comprende una etapa c), donde el medio nutritivo inoculado se incuba para producir un caldo de fermentación que comprende lactato y nisina. La producción de fermentos ácido lácticos a escala requiere el control estricto de las condiciones de fermentación, en particular del pH. Si no se controla el pH, la formación de ácido láctico como un producto de la acción metabólica de las bacterias productoras de ácido láctico, el pH disminuirá mientras proceda la fermentación. Una disminución de pH por debajo de un valor crítico, dependiendo del microorganismo usado en el proceso, podría afectar negativamente al proceso metabólico del microorganismo y finalmente detener el proceso de fermentación. El valor crítico exacto dependerá del conjunto específico de condiciones de incubación. En general, es preferible que, durante las etapas de incubación, el pH del caldo de fermentación se mantenga en el rango de 4.5 a 8.0, preferiblemente en el rango de 4.8 a 6.5, más preferiblemente en el rango de 5.0-6, por ejemplo 5.5, para evitar la inhibición de producción de lactato. Se considera que la inhibición del producto de lactato ha ocurrido cuando la cantidad de lactato producida en la fermentación (por lote) no aumenta más de aproximadamente el 3% con otra incubación

durante un periodo de hasta aproximadamente doce horas bajo las mismas condiciones. Esta definición supone que en el caldo de fermentación todavía están disponibles suficientes nutrientes para la producción de lactato y se aplica tanto a operaciones por lotes como continuas.

5 [0043] Tal como se ha mencionado anteriormente, la prevención de la disminución de pH por debajo del valor crítico se realiza añadiendo uno o más agentes alcalinizantes que comprenden sales alcalinas de sodio y de calcio. La alcalinización, como se utiliza en este caso, hace referencia al efecto de reducir la cantidad de ácido en una solución para cualquier extensión y, por lo tanto, incrementar el valor de pH. No implica un incremento del pH por encima del pH neutro. Como tal, el término 'alcalinización' se considera sinónimo de 'neutralización' e intercambiable con éste. El término "sal alcalina" hace referencia a una sal orgánica o inorgánica del respectivo metal alcalino o metal alcalinotérreo, que reacciona con un ácido para aceptar átomos de hidrógeno y/o donar un par de electrones de valencia, y, como tal, se puede añadir al caldo de fermentación para aumentar el pH al valor deseado. Los ejemplos de las sales alcalinas conforme a la invención incluyen hidróxidos de sodio y calcio, carbonatos de sodio y calcio. En una forma de realización preferida de la invención, uno o más agentes alcalinizantes comprenden hidróxido sódico e hidróxido cálcico.

15 [0044] En parte, la invención reside en el hallazgo de que es ventajoso usar tanto sales de sodio como de calcio como agente alcalinizante y especialmente combinar sales de sodio y de calcio en cantidades dando como resultado una proporción Na:Ca (p/p) en el rango de 1/6 - 1/1. En una forma de realización más preferida de la invención, una proporción Na:Ca (p/p) está en el rango de 1/6 - 1/2, más preferiblemente en el rango de 1/5.5-1/2.5, de la forma más preferible una proporción Na:Ca (p/p) en el rango de 1/5-1/3, por ejemplo, 1/4.

20 [0045] Como entenderán los expertos en la técnica, en el contexto de esta invención no es fundamental que las sales de sodio y de calcio se mezclen o no antes de la adición al fermento. Está previsto que las sales de sodio y de calcio se agreguen separadamente al fermento, lo que se puede hacer simultáneamente o posteriormente. Sin embargo, por cuestiones prácticas se prefiere mezclar previamente las sales de sodio y de calcio, como entenderán aquellos expertos en la técnica. Por lo tanto, el presente proceso normalmente comprende la adición de una alcalinización que comprende una mezcla de sales alcalinas de sodio y de calcio en cantidades relativas que producen las proporciones anteriormente mencionadas de iones de sodio y de calcio. En una forma de realización aún más preferida de la invención, se añade un agente alcalinizante en forma de solución acuosa de sales alcalinas de sodio y de calcio en cantidades relativas que producen las proporciones anteriormente nombradas de iones de sodio y de calcio, por ejemplo, una solución acuosa de 2.5-20 % (p/v) de hidróxido sódico, preferiblemente 3-10 % (p/v), por ejemplo, aproximadamente 5 % p/v, y 5-40 % (p/v) de hidróxido cálcico, preferiblemente 10-30 % (p/v), por ejemplo, aproximadamente 20 % (p/v).

35 [0046] También está previsto que se puedan utilizar otros agentes alcalinizantes conjuntamente con las sales alcalinas de sodio y de calcio. Por ejemplo, también se puede añadir otros hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, tal como hidróxido potásico. Normalmente, sólo se utilizan otros agentes alcalinizantes en cantidades menores. Se prefiere que las sales alcalinas de sodio y de calcio se usen en tales cantidades que al menos el 75 % de la cantidad total en moles de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos añadidos sea calcio y sodio, más preferiblemente al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 97%.

40 [0047] Como entenderán los expertos en la técnica, el control del pH normalmente implica la administración continua o repetida de agentes alcalinizantes. El proceso está preferiblemente automatizado para el control preciso del pH a un valor predeterminado.

[0048] La fermentación, generalmente, se llevará a cabo a temperaturas empleadas de forma convencional en los procesos de fermentación de ácido láctico. Normalmente se utilizarán temperaturas en el rango de 20 °C a 40 °C, preferiblemente temperaturas en el rango de 20 °C a 35 °C, tal como aproximadamente 30 °C.

45 [0049] Bajo las condiciones aquí descritas, las fermentaciones a una escala de producción se pueden realizar con una duración normalmente variable entre 10 y 24 horas, aunque la invención no está particularmente limitada al aspecto. Se prefieren generalmente tiempos de fermentación más cortos, ya que estos reducen intrínsecamente los riesgos de contaminación del caldo de fermentación con otras especies microbiológicas.

50 [0050] La incubación se puede realizar utilizando un equipo estándar para un procesamiento por lotes y/o continuo. Normalmente, el proceso se realiza en un fermentador de producción (estándar) que comprende una cuba con un volumen de al menos 250 L, al menos 500 L o al menos 1000 L.

[0051] En una forma de realización preferida de la invención, el proceso se realiza por lotes. En el procesamiento por lotes según esta invención, el contenido de lactato del caldo de fermentación aumentará gradualmente siempre que se evite la disminución del pH mediante la adición de uno o más agentes alcalinizantes. Aun así, en

algún momento, se puede conseguir "limitar la concentración de lactato", que es la concentración de lactato (concentración de ácido láctico no disociado y disociado) a la que, bajo un determinado conjunto de condiciones de incubación (pH, medio nutritivo, temperatura, grado de aireación), se inhibe la posterior producción de lactato. En otras palabras, el crecimiento y/o producción de material de lactato puede detenerse debido a la acumulación de uno o más productos de fermentación, al igual que en respuesta a la disminución del pH resultante de la producción de productos de fermentación, es decir, la reacción de fermentación tiene un punto de autolimitación para el conjunto determinado de condiciones de incubación. Los presentes inventores determinaron que el contenido de nisina normalmente alcanza su máximo antes de que la reacción de fermentación haya alcanzado el punto de autolimitación y puede disminuir si la fermentación continua por encima de dicho punto. En el presente proceso, la etapa de incubación se detiene normalmente antes del punto donde la concentración de equivalentes de lactato alcanza 25 g/L, preferiblemente 24 g/L, más preferiblemente 23 g/L, más preferiblemente 22 g/L. Preferiblemente, se permite proceder a la etapa de incubación hasta el punto donde la concentración de equivalentes de lactato excede 15 g/L, más preferiblemente 17 g/L, más preferiblemente 18 g/L, más preferiblemente 19 g/L, de la forma más preferible 20 g/L. El presente proceso normalmente conlleva la producción de un caldo que contiene una concentración final de nisina de al menos 1000 IU/ml, preferiblemente de al menos 2000 IU/ml, y más preferiblemente de al menos 2500 IU/ml, por ejemplo, aproximadamente 3000 IU/ml.

[0052] En una forma de realización preferida de esta invención, el proceso de fermentación se detiene por la adición de una cantidad de ácido al caldo de fermentación, en particular de ácido láctico, suficiente para detener la producción de lactato. El proceso se establece por consiguiente tal y como se define en el apartado anterior, donde la etapa c) va seguida de una etapa d1) que comprende añadir una cantidad de ácido para reducir el pH del caldo fermentado hasta por debajo de 6, preferiblemente por debajo de 5.5, preferiblemente por debajo de 5, por ejemplo, de 4.7. En una forma de realización particularmente preferida, dicho ácido es ácido láctico. El ácido láctico normalmente se añade en forma de líquido concentrado o diluido, tal como en forma de una solución acuosa con un contenido de ácido láctico de al menos 100 g/l, aunque la invención no está particularmente limitada en este aspecto. Se ha demostrado que esta etapa de acidificación del caldo de fermentación mediante la adición de ácido mejora en general significativamente la producción de nisina y/o mejora la estabilidad de nisina durante tratamientos posteriores que implican el calentamiento de la composición.

[0053] Tras la incubación del medio nutritivo inoculado durante un periodo suficiente para alcanzar los niveles de lactato y nisina deseados, opcionalmente, después de parar la fermentación por la adición de un ácido, el caldo de fermentación se somete normalmente a otro tratamiento cuyo fin es la inactivación de las bacterias de ácido láctico por tratamiento térmico. Se proporciona por consiguiente un proceso tal y como ha definido anteriormente, que comprende la etapa adicional d2) de calentar el caldo de fermentación obtenido después de la etapa c) o d1) sometiendo a este a una temperatura de al menos 40 °C, al menos 45 °C, o al menos 50 °C, durante un periodo de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 minutos para inactivar las bacterias ácido lácticas.

[0054] El caldo de fermentación obtenido utilizando la presente invención se puede procesar en una formulación del producto adecuada sencillamente eliminando el agua, normalmente para obtener una pasta. El lactato estará presente principalmente como mezcla de sales de sodio y de calcio y los presentes inventores han determinado que estos fermentos pueden concentrarse idóneamente en contenidos sólidos secos de un 30 % en peso o más sin el problema de que se cristalicen las sales del producto. Los presentes inventores, además, descubrieron que el procesamiento del fermento para convertirlo en una forma concentrada conforme a esta forma de realización, dio resultados particularmente ventajosos en términos de calidad del producto resultante, especialmente en cuanto a actividad (final) de nisina y/o propiedades organolépticas. Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, se proporciona un proceso como se ha descrito anteriormente, que comprende la etapa adicional e) de concentrar el fermento obtenido en la etapa c), d1) o d2) en una pasta con un contenido en sustancias secas de al menos el 30 % en peso, preferiblemente en el rango de 30-50 % en peso. Se puede utilizar cualquier proceso convencional para realizar la etapa e). En una forma de realización preferida, la etapa e) se realiza sometiendo el fermento obtenido en la etapa c), d1) o d2) a un ambiente con temperaturas superiores a las del ambiente, normalmente a un ambiente de 55-70 °C, y, preferiblemente, de presión reducida, por ejemplo, a una presión de 190-250 mbar. Para realizar esta etapa se pueden usar equipos convencionales, bien conocidos por los expertos de la materia.

[0055] En una forma de realización, siguiendo la etapa e), el líquido concentrado o pasta se enfría rápidamente a una temperatura inferior a 40 °C, preferiblemente inferior a 30 °C, más preferiblemente inferior a 20 °C, más preferiblemente a una temperatura inferior a 10 °C. Los presentes inventores determinaron que esta etapa influye significativamente en la calidad del producto resultante, especialmente en la actividad (final) de nisina y/o las propiedades organolépticas, por ejemplo, en comparación con productos que no se enfrían rápidamente después de la etapa e). Por consiguiente, se proporciona una forma de realización de la invención que comprende una etapa f) donde el líquido concentrado o la pasta obtenida en la etapa e) se enfría a una temperatura inferior a 40 °C, preferiblemente inferior a 30 °C, más preferiblemente inferior a 20 °C, más preferiblemente a una

temperatura inferior a 10 °C, normalmente por la colocación de éste en un ambiente de temperatura inferior a la temperatura ambiente durante un periodo suficiente para realizar la disminución de temperatura anteriormente nombrada. En una forma de realización particularmente preferida, esta etapa comprende la colocación de la composición en un equipo de refrigeración o enfriamiento con una temperatura inferior a 15 °C, inferior a 10 °C o inferior a 5 °C. Preferiblemente, durante esta etapa, el líquido o pasta concentrada se agita para evitar la acumulación de material en partes del equipo.

[0056] Alternativamente, el caldo de fermentación obtenido utilizando la presente invención se puede procesar para convertirlo en un producto de polvo suelto por evaporación de sustancialmente todo el agua. Tales polvos, que contienen lactato de calcio anhidro en combinación con lactato de sodio en la mayor parte, combinan una alta estabilidad con un comportamiento de rehidratación/disolución excelente. En particular, los fermentos obtenidos conforme a la invención, en este contexto, tienen propiedades superiores en comparación con los fermentos que contienen sólo lactato de calcio como la sal de lactato principal.

[0057] Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, se proporciona un proceso como se ha descrito anteriormente, que comprende la etapa adicional e') de someter el fermento obtenido en la etapa c), d1) o d2) a una etapa de secado para producir una composición en polvo seca con un contenido de agua inferior al 10 % en peso, preferiblemente inferior al 5 % en peso, más preferiblemente inferior al 3.5 % en peso. En una forma de realización, la etapa e') comprende el secado por pulverización del fermento, para producir un producto de polvo de flujo libre. Preferiblemente, el secado del líquido acuoso comprende el secado por atomización del líquido acuoso. En el presente método, antes del secado por atomización, el líquido acuoso se puede concentrar por evaporación. Preferiblemente, el líquido acuoso tiene un contenido de sustancia seca de 1-80 % en peso, de la forma más preferible de 10-60 % en peso cuando se alimenta en un secado de pulverización.

[0058] Alternativamente, se puede producir un polvo secando primero el líquido acuoso para producir un residuo seco, por ejemplo, mediante secado en tambores rotatorios y posteriormente reduciendo el tamaño del residuo seco, por ejemplo, por trituración, molienda o corte. En una forma de realización de la invención, un fermento se puede concentrar y enfriar opcionalmente conforme a las etapas e) y f) como se ha descrito anteriormente, antes de ser sometido a otra etapa de secado e') para producir una composición en polvo seca.

[0059] Debido al uso de uno o más agentes alcalinizantes que comprenden sales alcalinas de sodio y de calcio en sus relativas cantidades anteriormente nombradas, la presente invención permite la producción de fermentos, incluyendo fermentos a base de productos lácteos que no necesitan ningún proceso de clarificación u otro tipo de proceso dirigido a eliminar ciertos componentes (sólidos) del caldo de fermentación para obtener un producto conservante aceptable apto para el uso alimentario. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, se proporciona un proceso tal y como se ha definido aquí anteriormente, donde el caldo de fermentación no se somete a una etapa de tratamiento donde la materia sólida disuelta o no disuelta se elimina del caldo fermentado según la etapa c), es decir, independientemente de la aplicación de las etapas opcionales d), e) y/o f).

[0060] Otro aspecto de la invención concierne a un producto de fermento de lactato obtenible mediante los procesos tal y como se ha definido anteriormente. El uso de uno o más agentes alcalinizantes descritos aquí logra un producto que contiene lactato principalmente en forma de lactato de sodio y de calcio, que confiere determinadas propiedades ventajosas a los productos de fermentación, especialmente con respecto a la capacidad para procesar tales productos de fermentación en varios líquidos, formulaciones semilíquidas y sólidas y/o con respecto a las propiedades organolépticas de estos productos de fermentación.

[0061] En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el producto de fermento de lactato contiene al menos un 25 % en peso de lactato, basándose en el peso de los sólidos secos, más preferiblemente, al menos un 40 % en peso, de la forma más preferible al menos un 50 % en peso. Como se entenderá, este incluye todos los tipos de lactato, incluyendo ácido láctico libre al igual que lactato que contiene sales.

[0062] Normalmente, en el producto de fermento de lactato de la invención, la parte principal de lactato está en forma de sales de sodio y de calcio. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, se proporciona un producto de fermento de lactato tal y como se ha definido aquí, que comprende aniones de lactato y cationes de sodio y de calcio, donde la cantidad de cationes de sodio y de calcio excede 0.5 del equivalente estequiométrico, preferiblemente éste excede 0.75 del equivalente estequiométrico, más preferiblemente éste excede 0.9 del equivalente estequiométrico. Además, en una forma de realización preferida, se proporciona un producto de fermento de lactato tal y como se ha definido aquí que comprende aniones de lactato y sodio y cationes de calcio, donde la cantidad de sodio y cationes de calcio es igual a o inferior a 1.0 del equivalente estequiométrico. Como entenderán los expertos en la materia, el equivalente estequiométrico se refiere a la cantidad combinada de cationes de sodio y de calcio que teóricamente sería necesaria para proporcionar contraiones para todos los aniones de lactato.

[0063] Como se ha indicado aquí anteriormente, en una forma de realización, el producto normalmente contendrá iones de sodio y de calcio en una proporción Na:Ca (p/p) en el rango de 1/6 - 1/2. En una forma de realización más preferida de la invención, una proporción Na:Ca (p/p) en el rango de 1/5.5-1/2.5, de la forma más preferible, una proporción Na:Ca (p/p) en el rango de 1/5-1/3, por ejemplo, 1/4.

[0064] En una forma de realización preferida particularmente, como se entiende en el apartado anterior, el producto de fermento de lactato contiene niveles apreciables de nisina. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la invención, se proporciona un producto de fermento de lactato tal y como se ha definido anteriormente que contiene al menos 0.10 mg de nisina por g de sustancia seca, más preferiblemente al menos 0.20 mg de nisina por g de sustancia seca, de la forma más preferible al menos 0.25 mg de nisina por g de sustancia seca. Debe entenderse que la nisina, en realidad, hace referencia a diferentes variantes de nisina, tal como nisina A y nisina Z, que difieren en su secuencia de aminoácidos, normalmente sólo por un único aminoácido. La variante más común es la nisina A. El tipo de nisina producido dependerá solamente de la elección de la cepa bacteriana usada para la fermentación. Las cepas preferidas en el contexto de la presente invención normalmente producirán nisina A. Por lo tanto, la nisina es preferiblemente nisina A. Las cantidades nombradas de nisina, como entenderán aquellos expertos en la materia, se aplican igualmente a todas las variantes de nisina. Además, cabe señalar que se supone que 1 microgramo de nisina equivale a 40 UI. Por lo tanto, los niveles preferidos de nisina corresponden a actividades de al menos 400 UI, al menos 800 UI y al menos 1000 UI, todos por g de sustancia seca, respectivamente.

[0065] Otros aspectos de la presente invención conciernen al uso de un producto de fermento de lactato tal y como se define en cualquiera de los apartados anteriores para la conservación de un producto alimentario, especialmente un producto alimenticio o una bebida, más en particular un producto seleccionado del grupo que consiste en quesos procesados y naturales, carnes cocinadas, alimentos enlatados, mariscos, bebidas alcohólicas, postres de productos lácteos, bebidas/líquidos de productos lácteos, comidas preparadas, aderezos, salsas, productos de harina, productos de huevo líquido, etc.; y a métodos para preservar tales productos alimentarios que comprenden la etapa de incorporar o aplicar a estos un producto de fermento de lactato tal y como se define en cualquiera de los apartados anteriormente mencionados. Los fermentos de lactato de la invención son particularmente útiles para la preservación contra la alteración por un microorganismo, especialmente un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Listeria* spp, *clostridium* spp, bacterias ácido lácticas y *bacillus* spp. Está dentro del alcance de los expertos en la materia determinar las dosificaciones más apropiadas para la protección óptima contra el deterioro y evitar el impacto negativo en otros aspectos de calidad del producto alimentario, especialmente en las propiedades organolépticas. Como se ha explicado anteriormente, los presentes productos de fermento de lactato se pueden aplicar en dosificaciones altas relativamente sin impacto negativo en las propiedades organolépticas y el contenido de sal.

[0066] Para una comprensión apropiada de este documento y de sus reivindicaciones, debe entenderse que el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para decir que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que estén presentes más de uno de estos elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", así, normalmente significa "al menos uno".

[0067] Los siguientes ejemplos sólo se ofrecen para uso ilustrativo, y no están de ninguna manera destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0068] Matraces de lotes (2 L) se usan como reactores para la fermentación. Este reactor se esteriliza vacío durante 20 min a 121 °C. Todos los cultivos se realizan asépticamente. Se usa polvo de suero de leche en 5% p/p y extracto de levadura en 0.2% p/p (basado en peso en seco) como medio nutritivo (pasteurizado durante 30 min a 80 °C dentro del reactor) en todas fermentaciones. Una mezcla de Ca(OH)₂/NaOH (composición en la tabla de abajo) se utiliza para controlar el pH, que se mantiene a aproximadamente al 5.5.

[0069] Un primer matraz de lote que contiene el medio nutritivo se inocula con una materia prima de glicerol de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 y se incuba durante toda la noche a 30 °C. El inóculo es 2.5% p/p. Durante la etapa exponencial de crecimiento, el fermento del primer matraz de lote se transfiere como inóculo al siguiente reactor de 2 L que contiene medio nutritivo, que se encuentra bajo las mismas condiciones. La fermentación en el segundo reactor se detiene después de que la concentración de lactato haya alcanzado más de 25 g/l. Alrededor de 10 ml de ácido láctico son suficientes (80% sólidos secos) para reducir el pH a 4.7. El reactor se

mantiene a 50 °C durante 1 hora para la inactivación. Después de eso, el fermento se enfría. La cantidad de nisina final es de alrededor de 3000 IU/ml.

Agente alcalinizante	NaOH	Ca(OH) ₂
Concentración de materia prima pura (%)	50.0	25.0
Proporción en la base (%)	10.5	89.5
Concentración final en la base (%)	5.3	22.4
proporción (-) Ca ²⁺ /Na ⁺	4.0	

5 [0070] El fermento se puede purificar y/o concentrar más según métodos conocidos por un experto en la materia. Mediante la evaporación, por ejemplo, se puede preparar una pasta o un concentrado. Mediante secado por atomización, por ejemplo, se puede preparar un polvo.

[0071] Una pasta producida por la evaporación de un fermento como la preparación anterior, con un contenido de sustancia seca de 35.2%, que comprende nisina con una actividad de 67064 UI/g (basada en 100% MS).

10 [0072] Del fermento se examinan varias propiedades, como la estabilidad de la actividad de nisina en el fermento, al igual que en concentrados de la misma, y las propiedades organolépticas del fermento. El fermento y los concentrados tienen suficiente estabilidad de actividad de nisina para permitir el transporte y el almacenamiento del producto conforme a la práctica industrial usual. La incorporación del fermento y/o concentrados del mismo en varios productos alimentarios en dosificaciones eficaces produce propiedades organolépticas que se prefieren generalmente en relación con aquellas obtenidas con fermentos de nisina del estado de la técnica.

15 Ejemplo 2:

[0073] El fermento de ácido láctico se produce según el procedimiento del ejemplo 1. El fermento crudo no está purificado y procesado en polvo mediante secado por pulverización.

20 [0074] Los productos con lactato de calcio anhidro fueron obtenidos por secado a una temperatura del producto durante el proceso de secado por pulverización de 90 °C, mientras que la temperatura del aire varía entre 165 y 180 °C.

[0075] Los productos con pentahidrato de lactato de calcio fueron obtenidos utilizando la técnica de granulación por pulverización utilizando un lecho fluidizado en funcionamiento continuo. La temperatura del producto era de 60 °C, la temperatura del aire de fluidificación era de 110 °C.

25 [0076] Para las pruebas de disolución, se pesaron con precisión 2 g de un polvo en un vaso de plástico y se añadieron dos perlas de vidrio con un diámetro de 6 mm. La mezcla se mezcló manualmente durante 1 min. Para evitar la absorción de agua, se purgó el aire con nitrógeno seco. Se realizaron pruebas de disolución añadiendo la muestra de polvo a 198 g de agua desmineralizada que fueron agitados con un agitador magnético. Tales son las condiciones de prueba, que las condiciones *sink* siempre se cumplen (es decir, después de la disolución completa del material, la concentración en el líquido es inferior a aproximadamente el 30% de la solubilidad de saturación). Se calcularon los tiempos para alcanzar el 10%, 50%, 90% y 95% de la disolución completa.

30 [0077] Para las pruebas de estabilidad, las muestras se almacenan en jarras de cristal selladas herméticamente para prevenir cualquier intercambio de humedad. Las muestras han sido almacenadas a temperaturas de 4°C, temperatura ambiente (alrededor de 18-22°C) y 40°C. Las propiedades de los polvos se evalúan visualmente en diferentes momentos. El polvo de fermento es estable cuando permanece como un polvo de flujo libre.

35 [0078] Es posible neutralizar el caldo de fermentación usando hidróxido cálcico (Ca(OH)₂), hidróxido sódico (NaOH) o una combinación de los mismos. Esto conduce a una determinada proporción de calcio a sodio (Ca/Na) en el producto final. Un producto sólido que contenga sólo Na no es adecuado debido al alto contenido de Na y a la inaceptable higroscopicidad del producto seco. Se ha producido un producto sólido con lactato de calcio anhidro y con una alta proporción de Ca/Na de 20. Este producto tenía la desventaja de tener un sabor inaceptable y un largo tiempo de disolución (95%) de 88 s.

40 [0079] Un producto con pentahidrato de lactato de calcio y una proporción de Ca/Na de 3-4 fue aceptable desde el punto de vista del sabor y contenido de Na. El tiempo de disolución (95%) de este producto es de alrededor de 30 s, lo que es aceptable. Sin embargo, el producto carece de estabilidad suficiente. Esto se debe a que el lactato de calcio está presente en forma de pentahidrato de lactato de calcio. El lactato de sodio, que está

también presente, supuestamente, fue capaz de extraer el agua de cristalización de cristales de pentahidrato de lactato de calcio. Esto lleva a la disolución del lactato de sodio en el agua extraída del lactato de calcio y, como resultado de ello, la formación de la pasta, incluso cuando se envasa en sobres de aluminio.

- 5 [0080] Se ha descubierto que un producto con anhidrato de lactato de calcio y lactato de sodio (en una proporción de Ca/Na de 3) todavía tiene un tiempo de disolución aceptable (95%) de 31 s. Asimismo, tiene una estabilidad aceptable probada, ya que no se produjo la formación de pasta. La composición de este producto fue la siguiente:

Actividad de nisina Total (basada en 100% MS, UI/g)	59082
Ácido láctico (% p/p)	51
Ácido succínico (% p/p)	1.12
Nitrógeno Total (% p/p)	1.6
Na (% p/p)	2.9
Ca (% p/p)	8.1
Lactosa (% p/p)	11
pH (10%)	4.7

Ejemplo 3

- 10 [0081] Para probar el impacto de sabor del calcio y del sodio en los agentes neutralizantes se han preparado productos modelo. La leche se usó como el producto de referencia. Se han preparado diferentes muestras que consisten en leche a la que se le ha añadido nisina y/o fermentos de lactato con diferentes concentraciones de calcio y sodio, como se presentan en la tabla siguiente.

Código	Blanco	Basado en Na	Basado en Ca	Modelo A	Modelo B	Modelo C
pH	6.73	6.77	6.7	6.71	6.69	6.7
Na añadido	0	0.97	0.06	0.16	0.32	0.24
Ca añadido	0	0.08	1.25	0.89	0.39	0.65
Proporción Ca:Na añadido		0.08:1	20:1	5.4:1	1.2:1	2.7:1

- 15 [0082] Estas muestras fueron evaluadas por un panel. Los resultados se analizan mediante análisis de componentes principales y se resumen en un Biplot (cf. B.S. Everitt, An R and S-Plus Companion to Multivariate Analysis). El Biplot se representa en la figura 1.

[0083] En los resultados se observa con claridad que el uso de sodio como el único contraión en el agente neutralizante (basado en NA) produce un sabor salado, mientras que el uso de calcio como único contraión (basado en Ca) produce un sabor astringente y amargo. Usando ambos, tanto calcio como sodio, en una proporción de entre aproximadamente 1:1 y 6:1 p/p se puede conseguir un sabor mucho más neutral.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de un fermento de lactato que contiene nisina y que comprende las etapas consecutivas de:
 - a) proporcionar un medio nutritivo que comprende una solución de un sustrato fermentable y una fuente de nitrógeno en un medio acuoso;
 - b) inocular dicho medio nutritivo con bacterias ácido lácticas productoras de nisina; e
 - c) incubar el medio nutritivo inoculado bajo condiciones favorables para el crecimiento y/o actividad metabólica de dichas bacterias ácido lácticas durante un periodo suficiente para producir un caldo de fermentación que contenga al menos 20 g/l de equivalentes de lactato y/o al menos 1000 IU/ml de actividad equivalente de nisina, durante dicho periodo el pH del caldo de fermentación se controla añadiendo uno o más agentes alcalinizantes que comprenden sales alcalinas de sodio y de calcio, donde la proporción Na:Ca (p/p) de las sales añadidas está en el rango de 1/6 - 1/1, preferiblemente 1/6 - 1/2..
2. Proceso según la reivindicación 1, donde durante la etapa c) el pH del caldo de fermentación se mantiene en el rango de 4.8 a 6.0.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el medio nutritivo comprende un producto lácteo.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa b) comprende la inoculación de dicho medio nutritivo con un medio de inoculación que comprende bacterias ácido lácticas activadas.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende la etapa adicional d1) de acidificación del caldo de fermentación mediante la adición de un ácido, preferiblemente ácido láctico, en una cantidad suficiente para reducir el pH del caldo de fermentación hasta por debajo de 4.8.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende la etapa adicional d2) de inactivar las bacterias ácido lácticas sometiendo el caldo de fermentación a una temperatura de al menos 40 °C durante un periodo de al menos 10 minutos.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende la etapa adicional e) de concentrar el fermento obtenido en la etapa c) o d) hasta obtener un contenido de sustancia seca de al menos 30 % en peso, preferiblemente en el rango de 30-50 % en peso, mediante evaporación.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende la etapa adicional f) de enfriar el concentrado obtenido en la etapa e) a una temperatura por debajo de 40 °C.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende la etapa adicional e') de secado por atomización del fermento obtenido en la etapa c) o d) o para producir un polvo suelto.
10. Proceso según la reivindicación 9, donde el polvo seco tiene un contenido de agua inferior al 5 % en peso.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio nutritivo comprende suero de leche.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso no comprende una etapa donde se elimina el material no disuelto del caldo fermentado.
13. Fermento obtenible mediante el proceso definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
14. Fermento según la reivindicación 13, donde el fermento contiene al menos 0.25 mg de nisina por gramo de sustancia seca.
15. Uso de un fermento según la reivindicación 13 o 14 para la conservación de un producto alimentario.

