

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 324**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A23L 3/3544 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 14/335 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014 PCT/NL2014/050016**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14112871**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014 E 14700535 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2945498**

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

30 Prioridad:

15.01.2013 US 201361752584 P
15.01.2013 EP 13151293

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SLIEKERS, ARNE OLAV;
MEIJER, JASPER y
VISSER, DIANA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 656 324 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

5 Campo de la invención

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

10 Antecedentes de la invención

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

15

[0003] Las bacterias de ácido láctico son microorganismos útiles, que han sido usados generalmente en la producción de diversos productos alimenticios fermentados. La fermentación de ácido láctico produce la inhibición del crecimiento de otras bacterias contaminantes. Debido a la reducción del pH de los sistemas con ácido láctico producida mediante la fermentación de ácido láctico, la decadencia y el deterioro de la calidad de tales productos alimenticios se pueden evitar y/o reducir.

20

[0004] Adicionalmente, se ha determinado que ciertas sustancias antimicrobianas adicionales, tales como las bacteriocinas, son producidas por algunas bacterias de ácido láctico. Una bacteriocina conocida para el control de patógenos en el alimento es la nisina. La nisina se produce 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 un largo historial como conservante alimentario.

25

[0005] Se está volviendo cada vez más común usar ácido láctico y fermentos que contienen nisina producidos por tales cepas como agentes conservantes en todo tipo de productos alimenticios.

30

[0006] Los métodos de fermentación de bacteriocina convencionales son generalmente ineficientes para la producción de nisina a gran escala (comercial) debido a índices de producción limitados y concentraciones de nisina finales insatisfactorias. Prolongar el proceso de fermentación también aumenta intrínsecamente los riesgos de contaminación de los lotes de producción. De manera más importante, los índices de producción de nisina lentos hacen que la producción de la nisina comercial sea costosa. Otro factor de coste pertinente son los requisitos relativamente costosos del medio de fermentación.

35

[0007] Los fermentos que contienen nisinas solo se producen excepcionalmente en la misma planta donde son también aplicados para producir los productos alimenticios finales. En la mayoría de los casos, los fermentos que contienen nisina serán fabricados en una planta para ser usados, típicamente algún tiempo más tarde, en otra planta en la producción del producto alimenticio. Los productos de fermentación, por lo tanto, frecuentemente necesitan ser procesados en formulaciones que se puedan almacenar durante algún tiempo sin pérdida de calidad y/o actividad, se puedan transportar eficazmente y sean convenientes para manejar y para dosificar en la producción de productos alimenticios. Frecuentemente, para este propósito, los fermentos se formulan como un polvo seco. Tales productos de fermento en polvo, sin embargo, tienen diferentes inconvenientes: se genera polvo en la manipulación, y la dosificación y mezcla de cantidades pequeñas de polvos en los productos es difícil. Las composiciones conservantes líquidas son, por lo tanto, preferidas a veces.

40

45

50

[0008] Las posibilidades de producir formulaciones líquidas y semilíquidas estables y fáciles de utilizar de fermentos que contienen nisina son en gran parte determinadas por el comportamiento termodinámico de la(s) sal(es) de ácido láctico, que constituyen el grueso del fermento. Este comportamiento termodinámico establece las condiciones requeridas para el posterior procesamiento en el tipo de formulación elegido, condiciones que a su vez pueden tener un impacto significativo en el contenido/actividad de nisina en la formulación.

55

[0009] Por último, pero no por ello menos importante, requisitos reguladores organolépticos, dietéticos y alimenticios ponen restricciones adicionales a la fermentación y los pasos de procesamiento posterior y los tipos y cantidades de los materiales para ser usados en la misma.

60

[0010] En resumen, los fabricantes de composiciones conservantes que contienen nisina encuentran un número de desafíos tecnológicos interrelacionados para optimizar el proceso y satisfacer las necesidades y requisitos impuestos por usos (finales) específicos del producto, en particular con respecto al índice de producción y el rendimiento, la estabilización de la actividad, y el procesamiento en formulaciones estables y fáciles de utilizar. Como se entenderá, mantener los costes de fabricación a un nivel aceptable es siempre un factor en el diseño del proceso. De Vuyst L, Vandamme E J: "Nisin, A Lantibiotic Produced by *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis,

65

5 Fermentation and Applications" en: De Vuyst L, Vandamme E J: "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria", 1994, Chapman Hall, páginas 151-221 es un capítulo de manual referente a propiedades, biosíntesis, fermentación y aplicaciones de la nisina. Divulga que una fermentación de *L. lactis* de un medio basado en glucosa, autolisado de levadura, fosfato de hidrógeno de potasio, sulfato de magnesio y cloruro sódico resultó en valoraciones de nisina de 1000 UI/ml. La adición de cuatro aminoácidos (que son una fuente de nitrógeno) a un medio mínimo aumentó significativamente el rendimiento de nisina. Las condiciones de fermentación típicas incluyen incubación a 28-30 °C durante 12-24 horas y control del pH en el rango de 5,0-6,8. La nisina es descrita como adecuada para la conservación de productos alimenticios. Perez-Guerra N et al: "Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-33(3)27 using mussel-processing wastes" *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 36, nº 2, 2002, páginas 119-125 se refiere a un estudio en la producción de bacteriocinas de *L. lactis* CECT 539 que usa procesamiento de residuos de mejillones. Las cepas fueron cultivadas en caldo MRS, los cultivos de trabajo fueron subcultivados dos veces en cultivos líquidos en el mismo medio a 30 °C antes de su utilización. El medio hidrolizado contenía 0,65 g/l de nitrógeno. La producción de nisina mejorada fue conseguida en medios tamponados con 0,10 M de ftalato de hidrógeno 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 a menos de 4. 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, ISSN: 0959-3993, DOI: 10.1023/A:1018509207939 se refiere a un estudio de los efectos en la biomasa, ácido láctico y producción de nisina de la neutralización de ácido láctico durante la fermentación de bacterias de ácido láctico (LAB) que producen nisina. Se indica que la regulación del pH se necesita para conseguir poblaciones de células, rendimientos de ácido láctico y valoraciones de nisina elevados. Generalmente, el control del pH ha sido realizado mediante la adición de álcali para formar la sal ácida. Pruebas por lote alimentado compararon la eficacia de NaOH, NH₄OH y NH₄CO₃ como agentes neutralizantes. El medio de fermentación empleado contenía vinaza fina (que comprendía aprox. 20 % de proteína cruda) y el fermentador fue operado a pH 6,5, 30 °C. Los cultivos fueron incubados entre 10 y 12 horas a 30 °C antes de usar como un inóculo fermentador. En general, el NH₄OH funcionó significativamente mejor tanto que el NaOH o el NH₄CO₃ como que el agente neutralizante. El hecho de que proporcionara una fuente adicional de nitrógeno fue considerado como el responsable del aumento en el crecimiento celular y la producción de nisina y de ácido láctico observado en el medio basado en vinaza. Es un objeto de la invención proporcionar métodos para producir fermentos que contienen nisina y formular tales fermentos en conservantes. Es en particular un objeto de la presente invención proporcionar procesos mejorados para producir fermentos que contienen nisina mediante el cultivo (de lotes) simple y eficaz y que permiten el simple procesamiento posterior en un líquido o producto semilíquido, con contenido de nisina y estabilidad suficientes, buenas propiedades de manipulación y propiedades organolépticas satisfactorias.

Resumen de la invención

35 [0011] La presente invención proporciona un proceso de producción de un fermento láctico que contiene nisina que comprende los pasos consecutivos de:

- 40 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 de ácido láctico que producen nisina; e
- 45 c) incubar el medio nutritivo inoculado bajo condiciones favorables al crecimiento y/o actividad metabólica de dichas bacterias de ácido láctico que producen nisina, durante un periodo suficiente para producir un caldo de fermentación que contiene al menos 10 g/l de equivalentes de lactato y/o al menos 1000 UI/ml de actividad equivalente de nisina, periodo durante el que el pH del caldo de fermentación se controla mediante la adición de un agente de alcalinización que incluye una sal de potasio alcalina.

50 [0012] De forma imprevista, los presentes inventores observaron que el uso de hidróxido potásico como un agente neutralizante tiene determinadas ventajas particulares como se hará aparente a los expertos en la técnica basándose en la descripción y ejemplos de aquí en adelante.

55 [0013] En una forma de realización de la invención, se proporciona el uso de fermentos de ácido láctico activados específicos como medio de inoculación, como será explicado e ilustrado con más detalle a continuación, para mejorar el índice y la eficiencia del proceso de fermentación.

[0014] Además, en una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende el paso 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 a menos de 4,8.

60 [0015] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende el paso adicional d2) de inactivar las bacterias de ácido láctico sometiendo el caldo de fermentación a una temperatura de al menos 40 °C durante un periodo de al menos 10 minutos. El proceso comprende el paso adicional e) de concentrar el fermento obtenido en el paso c) o d) hasta un contenido en sólidos secos de al menos 50 % en peso, por ejemplo, por evaporación. El presente proceso produce un producto que comprende lactato principalmente en forma de lactato de potasio. El lactato de potasio que contiene fermentos demostró que permite la concentración en contenidos de lactato particularmente elevados

mientras que se mantiene el lactato en la solución, dando como resultado un producto líquido concentrado estable físicamente que es fácil de manejar.

5 [0016] En una forma de realización ventajosa de la invención, el proceso comprende el paso adicional f) de enfriamiento del concentrado obtenido en el paso e) a una temperatura inferior a 40 °C.

10 [0017] En una forma de realización ventajosa de la invención, el caldo de fermentación comprende una base de productos lácteos. Los presentes inventores establecieron que se puede producir productos conservantes líquidos satisfactorios por fermentación de una base de productos lácteos conforme a la invención, sin tener que aplicar operaciones de clarificación/purificación posteriores.

[0018] La presente invención también proporciona los fermentos y productos de fermentos obtenibles por el método descrito anteriormente y sus diversas aplicaciones como conservantes.

15 [0019] Estos y otros aspectos y ejemplos de realización de la invención se harán aparentes a los expertos en la técnica basándose en la siguiente descripción detallada y el trabajo experimental descrito en la sección posterior.

Descripción detallada de la invención

20 [0020] Como se ha comentado en este documento, el primer paso a) del proceso comprende la preparación de un medio nutritivo. En este documento, el término "medio nutritivo" se utiliza para referirse a medios en la forma originalmente proporcionada para la fermentación. El medio nutritivo provee los sustratos y los nutrientes que las bacterias de ácido láctico necesitan para crecer y para producir los diversos productos de fermentación. El medio nutritivo es típicamente un medio acuoso que comprende un sustrato fermentable, una fuente de nitrógeno y micronutrientes, donde las bacterias de ácido láctico pueden crecer y reproducirse. En principio cualquier combinación de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y micronutrientes se puede utilizar en tanto que esta promueva el crecimiento de las bacterias de ácido láctico.

30 [0021] El término "caldo de fermentación" se utiliza en este caso para referirse al medio nutritivo después de la inoculación con las bacterias de ácido láctico. Así, en el sentido estricto, diferentes tipos de "caldos de fermentación" pueden diferenciarse basándose en la fase a la que la fermentación ha progresado: (i) medios nutritivos en la forma originalmente proporcionada con bacterias directamente después de la inoculación; (ii) medios nutrientes que experimentan fermentación donde algunos o la mayor parte de los nutrientes proporcionados originalmente han sido ya consumidos y productos de fermentación con lactato han sido excretados en los medios por las bacterias; y, (iii) medios que han sido quitados del fermentador después de que parte o la totalidad de los nutrientes hayan sido consumidos.

40 [0022] 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 las bacterias de ácido láctico. Como una fuente de carbono, mono-, di-, tri-, oligo y polisacáridos pueden ser usados, en particular azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa y/o (hidrolizados de) almidón. Preferiblemente, en esta invención, el sustrato es un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en lactosa, sacarosa y glucosa, de la forma más preferible lactosa.

45 [0023] Estos carbohidratos pueden ser derivados a partir de una variedad de fuentes, tales como productos lácteos y productos derivados de plantas, frutas o verduras, por ejemplo, melazas, jugos frutales o vegetales, pulpa de fruta o verduras, etc. La invención se puede practicar utilizando uno o más carbohidratos en forma parcial o sustancialmente purificada. Alternativamente, la invención puede ser practicada utilizando una materia prima que contiene uno o más carbohidratos.

50 [0024] El medio nutritivo contiene típicamente al menos 1 g/l, más preferiblemente 5-300 g/l, de la forma más preferible 10-80 g/l, del carbohidrato.

55 [0025] Ejemplos adecuados de fuentes de nitrógeno incluyen proteína derivada vegetal, 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 anteriormente mencionadas. Se prefiere que la fuente de nitrógeno comprenda aminoácidos libres y/o péptidos cortos. Las fuentes de nitrógeno adecuadas se pueden preparar hidrolizando una fuente de proteína. En una forma de realización de la invención, la fuente de nitrógeno es seleccionada del grupo consistente en extractos de levadura e hidrolizados de proteínas de productos lácteos, especialmente hidrolizado de caseína.

60 [0026] El medio nutritivo contiene típicamente 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 en sólidos secos total del material adicionado como la fuente de nitrógeno por litro de medio nutritivo, como será entendido por aquellos expertos en la técnica. Por lo tanto, el medio nutritivo contiene típicamente 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.

65

5 [0027] En alguna forma de realización de la invención, el medio nutritivo además comprende micronutrientes que favorecen la acción metabólica de crecimiento de las bacterias de ácido láctico, tales como vitaminas, minerales, cofactores y/u otros oligoelementos. Los micronutrientes se usan generalmente a razón de al menos 0,01 % (p/v), preferiblemente a razón de entre 0,1 y 2 % (p/v) en el medio nutritivo. Típicamente, las fuentes de carbohidrato y/o fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar conforme a la invención contienen intrínsecamente micronutrientes.

10 [0028] Una forma de realización particularmente preferida de la invención concierne la fermentación de una base de productos lácteos, es decir un medio nutritivo que comprende como componente principal un producto lácteo. Como se utiliza en este caso, el término "producto lácteo" se refiere a leche (de animal) entera, 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 cuajada y productos derivados de la preparación de yogur y cuajada. En algunos ejemplos de realización preferidos, en volumen, el componente mayor 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 similares. 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 en sólidos secos 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.

20 [0029] Otra forma de realización preferida de la invención concierne la fermentación de un producto derivado de fruta o verdura, tal como jugos, pastas o pulpas derivados de frutas o verduras. En algunos ejemplos de realización preferidos, en volumen, el componente mayor del medio nutritivo es el producto derivado de fruta o verdura. Ejemplos adecuados incluyen tomate, zanahoria, espinaca, melaza, etc. En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el producto derivado de fruta o verdura es un jugo obtenido por compresión mecánica o maceración de la fruta o verdura cruda. En algunas formas de realización, el producto derivado de fruta o verdura 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 en sólidos secos de sólidos frutales o vegetales.

25 [0030] Como se ha declarado en este documento, el paso posterior b) comprende inocular el medio nutritivo con bacterias de ácido láctico que producen nisina, preferiblemente con un medio de inoculación que comprende un fermento que contiene bacterias de ácido láctico que producen nisina activadas.

30 [0031] Conforme a esta invención, las "bacterias de ácido láctico" son capaces de producir nisina. En algunos ejemplos de realización preferidos, las bacterias de ácido láctico pertenecen al orden *Lactobacillales*, preferiblemente al género *Lactococcus*. Las bacterias de ácido láctico que producen nisina pertenecen más preferiblemente a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, y ejemplos de las mismas incluyen JCM 7638, ATCC 11454, NCD0 497 e IFO 12007. En ejemplos de realización preferidos, las bacterias de ácido láctico son bacterias de ácido láctico que tienen estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro).

35 [0032] En algunas formas de realización, el caldo de fermentación comprende una única especie de bacterias de ácido láctico que producen nisina, mientras que, en otros ejemplos de realización, el caldo de fermentación comprende una mezcla de cepas de bacterias de ácido láctico, al menos una de las cuales es capaz de producir nisina. En una forma de realización, se usan mezclas de cepas de bacterias de ácido láctico que producen nisina.

40 [0033] Conforme a una forma de realización de la invención, el medio de inoculación comprende un caldo que contiene bacterias de ácido láctico que producen nisina activadas. El término "activadas" se utiliza en este caso para indicar que la composición usada para inocular el medio nutritivo comprende bacterias de ácido láctico en un estado metabólicamente activo. Cuando las bacterias se introducen en el medio nutritivo durante siembra directa, es decir en forma de un concentrado seco, líquido o congelado, las bacterias no producen su efecto inmediatamente y requieren tiempo para volverse activas. Este "lapso de tiempo", también referido como "fase de latencia", puede implicar el restablecimiento de las bacterias almacenadas en la forma natural (fase de rehidratación de las bacterias), la restauración de la actividad metabólica y/o la adaptación al nuevo ambiente. Además, se ha establecido por los inventores que el uso de sales de potasio alcalinas como un agente de alcalinización durante la fermentación afecta negativamente al índice de fermentación. Se ha descubierto que el uso de composiciones de bacterias de ácido láctico activadas específicas contrarresta este efecto. Por lo tanto, como se ha declarado anteriormente, en una forma de realización preferida de la invención, la inoculación (de la producción) del medio nutritivo se hace con un caldo de fermentación que comprende bacterias de ácido láctico activadas, típicamente para acortar la fase de latencia, que pueden reducir significativamente el tiempo global de fermentación, y/o para aumentar el índice de reproducción durante la fase exponencial y/o el índice de ácido láctico y/o la producción de nisina durante las fases exponenciales y/o estacionarias del proceso de fermentación.

45 [0034] En una forma de realización de la invención, un caldo de fermentación que comprende bacterias de ácido láctico activadas se usa 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" se refiere al total del ácido láctico libre y la base conjugada (ácido disociado), como será

entendido por aquellos de habilidad ordinaria. Los términos "ácido láctico" y "ácido láctico libre" son empleados de forma intercambiable aquí para referirse a la forma ácida, el término lactato se refiere a la forma disociada de ácido láctico. La sal (disuelta) de lactato es también específicamente denominada en este caso como "sal de lactato".

5 [0035] En una forma de realización de la invención, el caldo de fermentación que comprende bacterias de ácido láctico
activadas usado para la inoculación del medio nutritivo se prepara incubando las bacterias de ácido láctico en un medio
de activación, que es similar en 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 se enriquece en comparación con el medio
10 nutritivo de producción, preferiblemente uno o más nutrientes aplicados en el medio nutritivo de producción son usados
en cantidades excedentes en el medio de activación, típicamente significando que la concentración es al menos 125 %
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 150 %, al menos 175 %, al menos 200 %, al menos 250 % o al
15 menos 300 % de las concentraciones empleadas en el medio nutritivo de producción. En una forma de realización
particularmente preferida de la invención, la fuente de nitrógeno se usa en cantidades excedentes en el medio de
activación.

[0036] Como será entendido por expertos en la técnica, el caldo de fermentación que comprende bacterias de ácido
20 láctico activadas se puede preparar utilizando un equipo y metodología estándar.

[0037] Como se ha declarado en este documento, el proceso comprende un paso c), donde el medio nutritivo inoculado
se incuba para producir un caldo de fermentación que comprende lactato y nisina. La fermentación de ácido láctico en la
escala de producción requiere el control estricto de las condiciones de fermentación, en particular del pH. Sin control del
pH, la formación de ácido láctico como producto de la acción metabólica de las bacterias productoras de ácido láctico, el
25 pH se reducirá a medida que la fermentación proceda. Una reducción del pH por debajo de un valor crítico, dependiendo
del microorganismo usado en el proceso, podría afectar negativamente el proceso metabólico del microorganismo y
finalmente llevar el proceso de fermentación a su detención. El valor crítico exacto dependerá del conjunto específico de
condiciones de incubación. En general, se prefiere que, durante el paso 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-
30 6, por ejemplo 5,5, para prevenir la inhibición de la producción de lactato. La inhibición de la producción de lactato se
considera que ha ocurrido cuando la cantidad de lactato producida en una fermentación (por lotes) no aumenta en más
de aproximadamente el 3 % tras incubación adicional durante un periodo de hasta aproximadamente doce horas bajo
las mismas condiciones. Esta definición supone que nutrientes suficientes para la producción de lactato están todavía
disponibles en el caldo de fermentación y se aplica tanto para las operaciones por lotes como para operaciones
35 continuas.

[0038] Tal como se ha mencionado anteriormente, la prevención de la reducción del pH por debajo del valor crítico se
realiza añadiendo un agente de alcalinización que comprende sales de potasio alcalinas. La alcalinización, como se
utiliza en este caso, se refiere al efecto de reducir la cantidad de ácido en una solución en cualquier medida y, por lo
tanto, aumentar el valor del pH. No implica un aumento del pH por encima del neutro. Como tal, el término
"alcalinización" se considera como sinónimo e intercambiable con "neutralización". El término "sal de potasio alcalina"
significa una sal orgánica o inorgánica de potasio, 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. Ejemplos de las sales de potasio alcalinas conforme a la invención incluyen hidróxido potásico y
45 carbonato potásico. En una forma de realización preferida de la invención el agente de alcalinización comprende
hidróxido potásico.

[0039] En una forma de realización de la invención, el proceso comprende la adición de hidróxido potásico,
especialmente la adición de una solución acuosa que contiene al menos 25 g/l de hidróxido potásico, preferiblemente
50 50-600 g/l de hidróxido potásico.

[0040] Se prevé que otros agentes neutralizantes se puedan utilizar conjuntamente con hidróxido potásico. Por ejemplo,
otro álcali o hidróxidos de metal alcalinotérreo, tales como sodio y/o hidróxido potásico, se pueden adicionar además de
KOH. Es sin embargo preferido que el KOH y otro álcali o hidróxidos de metal alcalinotérreo se usen en tales relativas
55 cantidades que al menos el 50 % de la cantidad total de moles de álcali e iones metálicos alcalinotérreos adicionados
sea potasio, más preferiblemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, o al menos
el 95 %.

[0041] Como será entendido por los expertos en la técnica, el control del pH típicamente implicará la administración
60 continua o repetida de agente neutralizante. El proceso es preferiblemente automatizado para el control preciso del pH
en un valor predeterminado.

[0042] La fermentación generalmente será llevada a cabo a temperaturas empleadas de forma convencional en los
procesos de fermentación de ácido láctico. Típicamente se emplearán temperaturas en el rango de 20 °C a 40 °C, con
65 temperaturas en el rango de 20 °C a 35 °C, tal como aproximadamente 30 °C, siendo preferidas.

5 [0043] Típicamente, el proceso de la presente invención produce un índice máximo de producción de lactato que excede 2 g/l/h, expresado como equivalentes de lactato. Recae en las capacidades de la persona experta determinar el índice de producción máximo, por ejemplo, trazando la concentración de lactato en el fermento en diversos puntos temporales y determinando el (primer) derivado del punto más empinado de la curva. El presente proceso produce preferiblemente un índice de producción máximo en el fermentador de producción final que excede 2,2 g/l/h, más preferiblemente excede 2,3 g/l/h, más preferiblemente excede 2,4 g/l/h, más preferiblemente excede 2,5 g/l/h.

10 [0044] Típicamente, el índice máximo de producción de lactato, conforme a la presente invención, se alcanza en las primeras 15 horas después de la iniciación del paso c), más preferiblemente en las primeras 14 horas, en las primeras 13 horas, en las primeras 12 horas, en las primeras 11 horas o las primeras 10 horas después de la iniciación del paso c).

15 [0045] El presente proceso permite típicamente la producción de un caldo que contiene una concentración final de equivalentes de lactato de al menos 18 g/L, preferiblemente al menos 20 g/L, más preferiblemente al menos 22 g/L, todavía más preferiblemente al menos 23 g/L, y de la forma más preferible al menos 24 g/L, por ejemplo 25 g/L.

[0046] Bajo las condiciones aquí descritas, se pueden realizar fermentaciones de escala de producción con una duración que típicamente varía entre 10-24 horas, aunque la invención no está particularmente limitada en este aspecto.

20 [0047] La incubación se puede realizar utilizando equipo estándar para procesamiento por lotes y/o continuo. Típicamente el proceso se realiza en un fermentador de producción (estándar) que comprende un vaso con un volumen de al menos 250 L, al menos 500 L o al menos 1000 L.

25 [0048] En una forma de realización preferida de la invención, el proceso se realiza de una manera por lotes. En un proceso por lotes según esta invención, el contenido de lactato en el caldo de fermentación aumentará gradualmente siempre y cuando la reducción del pH sea evitada por la adición del uno o más agentes de alcalinización. Aun así, en algún punto la "concentración de lactato límite" puede ser alcanzada, que es la concentración de lactato (concentración de ácido láctico no disociado y disociado) en la que, bajo un conjunto dado de condiciones de incubación (pH, medio nutritivo, temperatura, grado de aireación), se inhibe una mayor producción de lactato. En otras palabras, el crecimiento y/o la producción de material de lactato pueden detenerse debido a la acumulación de uno o más productos de fermentación, así como en respuesta a la reducción del pH resultante de la producción de productos de fermentación, es decir la reacción de fermentación tiene un punto de autolimitación para el conjunto dado de condiciones de incubación. Los presentes inventores establecieron que el contenido de nisina alcanza típicamente su máximo antes de que la reacción de fermentación haya alcanzado el punto de autolimitación y puede reducirse si la fermentación es continuada más allá de dicho punto. En el presente proceso, el paso de incubación se detiene típicamente 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, el paso de incubación se deja proceder al 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 típicamente produce la producción de un caldo que contiene una concentración final de nisina de al menos 1000 UI/ml, preferiblemente al menos 2000 UI/ml, y más preferiblemente al menos 2500 UI/ml, por ejemplo, de aproximadamente 3000 UI/ml.

45 [0049] En una forma de realización preferida de esta invención, el proceso de fermentación se detiene mediante la adición al caldo de fermentación de una cantidad de ácido, en particular ácido láctico, suficiente para detener la producción de lactato. Un proceso es previsto por consiguiente tal y como se ha definido anteriormente, donde el paso c) es seguido por un paso d1) que comprende añadir una cantidad de ácido para reducir el pH del caldo fermentado a inferior a 6, preferiblemente a inferior a 5,5, preferiblemente a inferior a 5, por ejemplo, a 4,7. En una forma de realización particularmente preferida, dicho ácido es ácido láctico. El ácido láctico será típicamente adicionado 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 descubierto que este paso de acidificación del caldo de fermentación mediante la adición de ácido mejora significativamente el rendimiento global de la nisina y/o que mejora la estabilidad de la nisina durante tratamientos posteriores que implican el calentamiento de la composición.

55 [0050] Tras la incubación del medio nutritivo inoculado durante un periodo suficiente para alcanzar los niveles deseados de lactato y/o nisina, el caldo de fermentación obtenido es típicamente sometido a un tratamiento adicional para inactivar las bacterias de ácido láctico. Por lo tanto, se proporciona un proceso tal y como se ha definido en este documento anteriormente, que comprende el paso adicional e) de someter el caldo de fermentación obtenido después del paso c) o d), que se calienta a una temperatura de al menos 40 °C, al menos 45 °C, o al menos 50 °C, durante un periodo de al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 minutos, para inactivar las bacterias de ácido láctico.

65 [0051] El caldo de fermentación obtenido utilizando la presente invención se puede procesar en una formulación de producto adecuada sencillamente eliminando el agua, como para obtener un concentrado. El lactato estará presente principalmente como la sal de potasio y los presentes inventores han establecido que estos fermentos se pueden concentrar en un nivel particularmente alto sin el problema de que las sales se cristalicen fuera del producto. Los presentes inventores, además, descubrieron que el procesamiento del fermento 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 la actividad de nisina y/o a las propiedades organolépticas (finales). Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, se proporciona un proceso como se ha descrito anteriormente, que comprende el paso adicional e) de concentrar el fermento obtenido en el paso c), d1) o d2) en un concentrado con un contenido en sólidos secos de al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 55 % en peso, más preferiblemente al menos 60 % en peso. Cualquier proceso convencional puede utilizarse para realizar el paso e). En una forma de realización preferida, el paso e) se realiza sometiendo el fermento obtenido en el paso c), d1) o d2) a un ambiente de temperaturas mayores que la temperatura ambiente, típicamente a un ambiente de 55-70 °C, y, preferiblemente, a presión reducida, por ejemplo, a una presión de 190-250 mbar. Para realizar este paso, se puede usar equipo convencional con el que una persona de habilidad media está bien familiarizada.

[0052] En una forma de realización, tras el paso e), el concentrado 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 establecieron que este paso ayuda significativamente a la calidad del producto resultante, especialmente la actividad de nisina y/o las propiedades organolépticas (finales), por ejemplo, en comparación con productos que no se enfrían rápidamente después del paso e). Por consiguiente, se proporciona una forma de realización de la invención que comprende un paso f) donde el concentrado obtenido en el paso 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, típicamente colocándolo en un ambiente de temperaturas inferiores a la temperatura ambiente durante un periodo suficiente para realizar la anteriormente mencionada disminución de la temperatura. En una forma de realización particularmente preferida, este paso comprende colocar la composición en un equipo de enfriamiento o de refrigeración configurado a una temperatura inferior a 20 °C, inferior a 15 °C o inferior a 10 °C. Preferiblemente, durante este paso, el líquido concentrado se agita para evitar la acumulación de material en las partes del equipo.

[0053] Debido al uso de una sal de potasio alcalina como el agente de alcalinización, la presente invención permite la producción de fermentos, incluidos los fermentos basados en productos lácteos, que no necesitan ningún procesamiento de clarificación u otro tipo de procesamiento dirigido a la eliminación de ciertos componentes (sólidos) del caldo de fermentación para obtener un producto conservante apto para uso alimentario aceptable. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, se proporciona un proceso tal y como se ha definido en este documento anteriormente, donde el caldo de fermentación no se somete a un paso de tratamiento donde la materia sólida disuelta o no disuelta se quita del caldo fermentado después del paso c), es decir independientemente de la aplicación de los pasos opcionales d), e) y/o f).

[0054] Otro aspecto de la invención concierne un producto de fermento láctico, especialmente un concentrado, obtenible por el proceso tal y como se ha definido en este documento anteriormente. El uso de la sal de potasio alcalina conforme a esta invención produce un producto que contiene cantidades sustanciales de lactato en forma de sal de potasio, que confiere propiedades particularmente ventajosas al fermento.

[0055] En una forma de realización particularmente preferida de la invención, un concentrado de la invención contiene lactato y cationes de potasio en una proporción molar de 1/0,5 o menos, preferiblemente de 1/0,6 o menos, de 1/0,7 o menos, de 1/0,8 o menos, o de 1/0,9 o menos, por ejemplo, de 1/1. Preferiblemente es superior a 1/1,5.

[0056] Como se entenderá a partir de lo anterior, el producto de fermento láctico toma típicamente la forma de un concentrado, que ofrece diferentes ventajas generalmente reconocidas sobre los productos pulverulentos. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la invención, un se proporciona producto de fermento láctico como se ha descrito en este documento anteriormente, donde el producto de fermento láctico tiene una actividad acuática inferior a 0,9, más preferiblemente inferior a 0,8, de la forma más preferible inferior a 0,7. El concentrado de la invención contiene al menos 30 % (p/v) de lactato de potasio, más preferiblemente al menos 30 % (p/v), al menos 35 % (p/v), al menos 40 % (p/v), al menos 45 % (p/v) o al menos 50 % (p/v).

[0057] En una forma de realización particularmente preferida, como se entenderá a partir de lo anterior, el concentrado de la invención contiene niveles apreciables de nisina. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la invención, se proporciona un concentrado tal y como se ha definido en este documento 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 nisina en realidad denota diferentes variantes de nisina, tales como nisina A y nisina Z, que difieren en su secuencia de aminoácidos, típicamente solo en un único aminoácido. La variante más común es nisina A. El tipo de nisina producida dependerá solamente de la elección de la cepa bacteriana usada para la fermentación. Las cepas preferidas en el contexto de la presente invención típicamente producirán nisina A. Por lo tanto, la nisina es preferiblemente nisina A. Las cantidades nombradas de nisina, como entenderán aquellos con habilidad media, se aplican igualmente a todas las variantes de nisina. Además, se debe destacar que aquí se supone que 1 microgramo de nisina es igual 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.

[0058] Además, como se entenderá a partir de lo anterior, el concentrado se caracteriza por un contenido de sodio relativamente bajo. Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la invención, se proporciona un producto de fermento láctico tal y como se ha definido en este documento anteriormente, que contiene menos de 3000 mg de sodio por kg de sustancia seca, preferiblemente menos de 2500 mg sodio por kg de sustancia seca, más preferiblemente menos de 2000 mg de sodio por kg de sustancia seca.

[0059] Aspectos adicionales de la presente invención conciernen el uso de un producto de fermento láctico tal y como se define en cualquier parte de lo anteriormente mencionado para la conservación de un producto alimenticio, 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, bebidas sin alcohol, postres de productos lácteos, bebidas/líquidos de productos lácteos, comidas preparadas, ensaladas, preparaciones, salsas, productos a base de harina, productos de huevo líquidos, etc.; y a métodos de conservación de tales productos alimenticios que comprenden el paso de incorporar en ellos o aplicar en ellos un producto de fermento láctico tal y como se define en cualquier parte de lo anteriormente mencionado. Los fermentos lácticos de la invención son útiles particularmente en la conservación contra la alteración por un microorganismo, especialmente un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Listeria spp*, *Clostridium spp*, bacterias de ácido láctico y *Bacillus spp*. Recae en la competencia de aquellos competentes en la técnica el determinar las dosis más apropiadas para la protección óptima contra la alteración al tiempo que se evita el impacto negativo en otros aspectos de la calidad del producto alimenticio, especialmente las propiedades organolépticas y el contenido de sal. Como se ha explicado anteriormente, los presentes productos de fermento láctico se pueden aplicar en dosis relativamente altas sin impacto negativo en las propiedades organolépticas y el contenido de sal.

[0060] Así, la invención se ha descrito por referencia a ciertos ejemplos de realización mencionados anteriormente. Se reconocerá que estos ejemplos de realización son susceptibles a diversas modificaciones y formas alternativas bien conocidas por aquellos competentes en la técnica. Aunque se han descrito ejemplos de realización específicos, estos son solo ejemplos y no son limitantes sobre el alcance de la invención.

[0061] Además, para una comprensión apropiada de este documento y en sus reivindicaciones, debe entenderse que el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos después de la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no son excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por tanto normalmente significa "al menos uno".

[0062] Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para uso ilustrativo y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1 fermentación

[0063] Se usan matraces de lote (2 L) como reactores para fermentación. Este reactor es esterilizado vacío durante 20 min a 121 °C. Todos los cultivos son realizados asépticamente. El polvo de suero de leche de 5 % p/p y el extracto de levadura de 0,2 % p/p (basado en peso en seco) se usan como un medio nutritivo (pasteurizado durante 30 min a 80 °C dentro del reactor). KOH de 25 % p/p fue usado como agente de alcalinización para controlar el pH, que se mantiene a alrededor de 5,5. La temperatura de fermentación es de 30 °C.

[0064] Un primer matraz de lote con polvo de suero de leche y medio de extracto de levadura es inoculado a partir de una materia prima de glicerol de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e incubado durante toda la noche a 30 °C. El inóculo era de 2,5 % p/p. Durante la fase exponencial de crecimiento el fermento del primer matraz de lote es transferido como inóculo para el siguiente reactor de matraz de lote 2 L con polvo de suero de leche de 5 % p/p y extracto de levadura de 0,2% p/p ejecutado bajo las mismas condiciones. La fermentación en el segundo reactor se detiene cuando la concentración de lactato alcanza 25 g/l. Alrededor de 10 ml de ácido láctico (80 % de sólidos secos) son suficientes para reducir el pH a 4,7. El reactor se mantiene a 50 °C durante 1 hora para inactivación. El contenido de nisina final es de alrededor de 3000 UI/ml.

[0065] El fermento del segundo reactor de matraz de lote se somete a evaporación para producir un concentrado (aproximadamente de 50 % (p/v) de lactato de potasio). El concentrado es suficientemente estable para el almacenamiento. La incorporación del concentrado en varios productos alimenticios en dosis eficaces produce propiedades organolépticas que son generalmente favorecidas sobre aquellas obtenidas con fermentos de nisina de la técnica anterior.

Ejemplo 2: fermentación con inóculo activado

[0066] En una variante del proceso anterior, un inóculo mucho más fuerte se crea añadiendo medio nutritivo enriquecido al primer reactor, añadiendo 0,4 - 1 % p/p de extracto de levadura. Esto resulta en un tiempo de fermentación más

rápido en el primer reactor. Utilizar inóculo "activado" del primer reactor para iniciar el reactor final con polvo de suero de leche de 5 % p/p y extracto de levadura de 0,2 % p/p, conforme al ejemplo 1, produce un tiempo de fermentación más rápido y rendimiento global significativamente mejorado.

5 [0067] El fermento obtenido conforme a esta variante se somete a evaporación para producir un concentrado (aproximadamente 50 % (p/v) de lactato de potasio). El concentrado es suficientemente estable para el almacenamiento. La incorporación del concentrado en diversos productos alimenticios en dosis eficaces produce propiedades organolépticas que son generalmente favorecidas sobre aquellas obtenidas con fermentos de nisina de la técnica anterior.

10

Ejemplo 3: estabilidad de la nisina

15 [0068] El fermento de ácido láctico que contiene nisina es producido después del procedimiento del ejemplo 2. El producto final fue preparado a partir del fermento crudo y concentrado por evaporación a 55° Brix, tratado con calor a 75 °C durante 15 seg. y empaquetado asépticamente en bolsas de 2 kg. El pH final del producto concentrado fue de 5,4. Parte del material fue tomado separadamente y el pH fue ajustado a 4,7 añadiendo ácido clorhídrico. Las muestras fueron colocadas en viales plásticos y almacenadas para pruebas de estabilidad junto con el material original.

20 [0069] Para pruebas de estabilidad ambas muestras (pH 5,4 y pH 4,7) fueron almacenadas a temperaturas de 4 °C, temperatura ambiente (25 °C) y 40 °C. Se hicieron mediciones de la actividad de nisina a los 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 meses para todas las temperaturas y la reducción de la actividad fue determinada por comparación de la muestra de referencia almacenada a -28 °C (para reducir la variación de error en las mediciones).

25 [0070] Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 1 es un gráfico que describe la reducción de la actividad de nisina de las muestras originales (pH=5,4) con el tiempo (% de actividad medido a -28 °C) cuando se almacenan a 4 °C, 25 °C y 40 °C. La figura 2 es un gráfico que describe la reducción de actividad de nisina de las muestras ajustadas (pH=4,7) con el tiempo (% de actividad medido a -28 °C) cuando se almacena a 4 °C, 25 °C y 40 °C. Los resultados como se muestra en las figuras 1 y 2 indican que la actividad de nisina es fuertemente impactada por la temperatura y se reduce sustancialmente a medida que la temperatura aumenta. La diferencia de pH entre las muestras parece tener un efecto significativo en la estabilidad de la nisina, particularmente cuando se almacena a temperatura ambiente (25 °C). A temperaturas de almacenamiento de 4 y 25 °C los concentrados tienen un periodo de conservación considerable de al menos 6 meses, durante el cual el deterioro de la nisina activada está dentro de los límites aceptables.

30

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de un fermento láctico que contiene nisina que comprende los pasos consecutivos de:
- 5 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 de ácido láctico que producen nisina;
- 10 c) incubar el medio nutritivo inoculado bajo condiciones favorables para el crecimiento y/o la actividad metabólica de dichas bacterias de ácido láctico que producen nisina, durante un periodo suficiente para producir un caldo de fermentación que contiene al menos 10 g/l de equivalentes de lactato y/o al menos 1000 UI/ml de actividad equivalente de nisina, periodo durante el cual el pH del caldo de fermentación se controla mediante la adición continua o repetida de un agente de alcalinización que incluye una sal de potasio alcalina;
- y.
- 15 e) concentrar el fermento obtenido en el paso c) hasta un contenido en sólidos secos de al menos 50 % en peso.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde el paso b) comprende inocular dicho medio nutritivo con un medio de inoculación que comprende un fermento que contiene bacterias de ácido láctico que producen nisina activada.
- 20 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde durante la incubación el pH del caldo de fermentación se mantiene en el rango de 4,5 a 8,0, preferiblemente en el rango de 5,0 a 6,0.
4. Proceso según la reivindicación 2, donde el fermento de ácido láctico activado comprende más de 14 g/l de equivalentes de lactato.
- 25 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende el paso 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 a menos de 4,8.
- 30 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso comprende el paso adicional d2) de inactivar las bacterias de ácido láctico 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 el paso adicional f) de enfriar el concentrado obtenido en el paso e) a una temperatura inferior a 40 °C.
- 35 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio nutritivo comprende un producto lácteo.
- 40 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio nutritivo comprende suero de leche.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso no comprende un paso en el que se quite materia no disuelta del caldo fermentado.
- 45 11. Producto obtenible por el proceso definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto contiene lactato de potasio en una concentración de al menos 30 % (p/v).
12. Producto según la reivindicación 11, donde el producto contiene al menos 0,25 mg de nisina por gramo de sustancia seca.
- 50 13. Uso de un producto según cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para la conservación de un producto alimentario.

Fig. 1

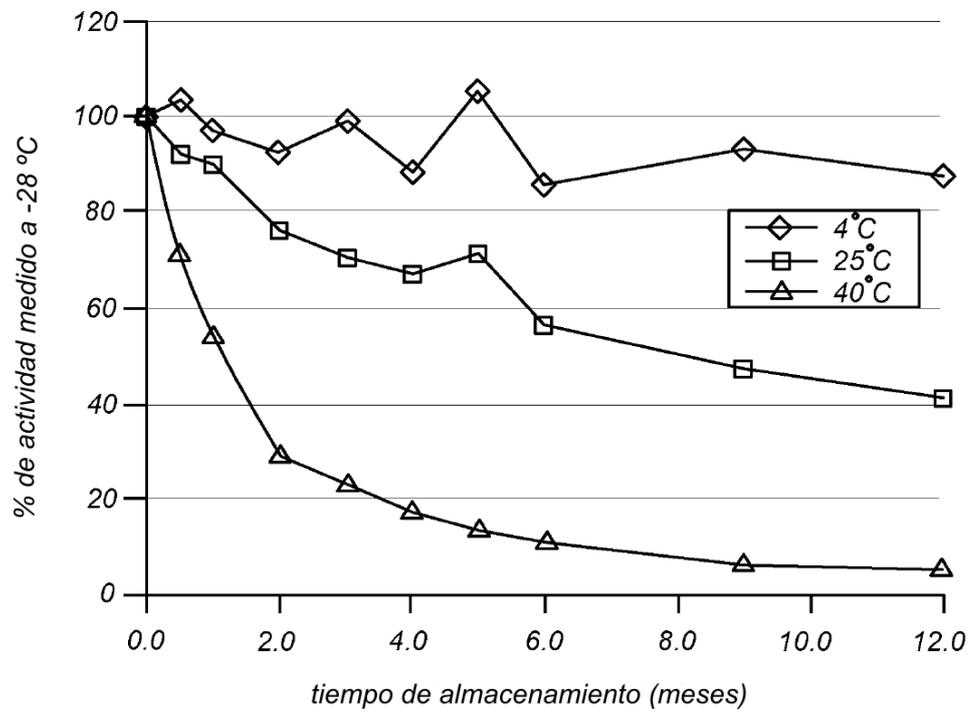


Fig. 2

