

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 327**

51 Int. Cl.:

A23C 3/08 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A21D 2/26 (2006.01)
A21D 15/08 (2006.01)
A23B 4/20 (2006.01)
A23B 9/26 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)
A23B 7/154 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2011 PCT/EP2011/067821**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049213**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2011 E 11767732 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2627202**

54 Título: **Uso de una composición que comprende un péptido antimicrobiano como un conservador de alimentos**

30 Prioridad:

13.10.2010 GB 201017283
12.10.2010 PT 2010105331

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2021

73 Titular/es:

CONSUMO EM VERDE - BIOTECNOLOGIA DAS PLANTAS, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Cantanhede Núcleo 04
Lote 2
3060-197 Cantanhede, PT

72 Inventor/es:

CARREIRA, ALEXANDRA MANUELA LOURENÇO;
VALADAS DA SILVA MONTEIRO, SARA ALEXANDRA y
DE SEIXAS BOAVIDA FERREIRA, RICARDO MANUEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 807 327 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

Uso de una composición que comprende un péptido antimicrobiano como un conservador de alimentos

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de agentes antimicrobianos que se enfocan en microorganismos que descomponen alimentos.

10 Introducción

La conservación de alimentos es el proceso de tratar alimentos para prevenir o inhibir descomposición de alimentos causado por degradación química/enzimática endógena y/o causada o acelerada por un microorganismo. Existe un número de técnicas para conservar alimentos, algunos de los cuales inhiben procesos endógenos (por ejemplo, antioxidantes), algunos de los cuales inhiben procesos microbianos (por ejemplo, antimicrobianos), y algunos de los cuales inhiben ambos tipos de proceso (por ejemplo, congelación). Un compuesto que se usa para inhibir descomposición de alimentos es comúnmente referido como un conservador, que puede ser, por ejemplo, un antioxidante o un antimicrobiano.

20 Las técnicas de conservación de alimentos particulares incluyen secado, calefacción, refrigeración o congelación, inhibición osmótica (por ejemplo, uso de jarabes o sal), empaque al vacío, enlatado y embotellado, hacer jalea, plantación, "juggling", irradiación por ionización, procesamiento de campo eléctrico a pulso, conservación de alimentos a presión alta, y conservación de alimentos a presión de agua ultra alta, uso de antioxidantes y/o uso de conservadores antimicrobianos (por ejemplo, dióxido de azufre, dióxido de carbono, etanol, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico, benzoatos, nitratos y nitritos, sulfitos, propionato de calcio y metilcloroisotiazolinona).

25 A pesar del número relativamente grande de técnicas de conservación de alimentos que en la actualidad se emplean, se necesita desarrollar conservadores antimicrobianos nuevos. Esto es porque las inaptitudes de muchas técnicas pre-existentes para efectivamente dirigir microorganismos y problemas con eficacia y/o seguridad de muchos conservadores antimicrobianos pre-existentes en particular.

30 Muchas técnicas de conservación de alimentos que intentan crear condiciones de crecimiento no favorables para microorganismos son ineficaces contra organismos que sobreviven en condiciones extremas (por ejemplo, especie *Pseudomonas* puede crecer a temperaturas muy bajas; *Bacillus coagulans* es resistente a calor y tolerante a ácido; muchas especies de *Aspergillus* demuestran oligotrofia; la especie *Zygosaccharomyces* tienen alta xerotolerancia).

35 Muchos conservadores antimicrobianos pre-existentes tienen actividad moderada, en especial contra microorganismos con resistencia innata o adquirida, y/o espectro estrecho. Por ejemplo, las especies *Zygosaccharomyces* tienen alta tolerancia a etanol, ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico y dióxido de azufre. Además, un número de conservadores antimicrobianos pre-existentes han estado asociados con varios efectos laterales tales como problemas respiratorios o ADD. En ejemplos particulares, dióxido de azufre está irritando a los tubos bronquiales de asmáticos, nitritos son potencialmente carcinógenos, benzoatos han estado asociados con varias alergias, asma, erupciones de piel y daño cerebral.

45 Además, técnicas efectivas para inhibir crecimiento microbiano en alimentos, tal como actividad de pH bajo y agua baja, a menudo son inaceptables al consumidor (por ejemplo, dar un sabor a ácido) o tener implicaciones de salud negativas (por ejemplo, alta sal o azúcar).

50 Entre los objetivos de la presente invención está intentar una solución de estos problemas, y específicamente, por ejemplo, proveer un agente antimicrobiano nuevo con actividad potente y de espectro amplio contra microorganismos al mismo tiempo teniendo toxicidad baja.

Se reconocen los siguientes documentos de la técnica anterior:

55 El documento WO2007/010459 desvela una proteína antimicrobiana extraída del género *Lupinus* para su uso en agricultura como pulverizador antifúngico.

M.D.L. OLIVEIRA ET AL: "Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity" con fecha de 2008 desvela un método para aislar una proteína antimicrobiana a partir de una semilla de *Eugenia uniflora* usando cromatografía de intercambio iónico.

60 Breve descripción de la invención

65 De manera sorprendente los inventores han descubierto que el polipéptido de Blad de *Lupinus* muestra actividad antimicrobiana potente contra un número grande de organismos bacterianos y fúngicos diversos que causan descomposición de alimentos. Los inventores también han encontrado que el polipéptido de Blad es no tóxico, por tanto haciendo a Blad un compuesto excelente para usarse como un conservador de alimentos antimicrobiano.

5 Por consiguiente, los inventores proveen el uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad mostrada en SEC ID NO: 4 o un variante activo del mismo para prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo, en donde dicho variante activo tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos con SEC ID NO: 4 o bien un fragmento de SEC ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, y en donde en el caso de un alimento vegetal el alimento es un alimento cosechado. Preferiblemente, dicho microorganismo es una bacteria (preferiblemente una especie que descompone alimento del género *Pseudomonas* o *Bacillus*) o un hongo (preferiblemente una especie que descompone alimento de uno de los siguientes géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*).

10 En modalidades preferidas, el alimento se deriva de, provee, o es, una fruta, una nuez, un vegetal, una semilla, un azúcar, un producto lácteo, un alimento líquido o en pasta, carne, pescado o pan.

15 En modalidades preferidas, el alimento es una fresa, preferiblemente en donde el microorganismo es *Botrytis cinerea* o *Colletotrichum acutatum*, preferiblemente *Botrytis cinerea*.

En modalidades preferidas, dicha composición además comprende un agente quelante.

20 Los inventores también proveen un método de prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo que comprende administrar a un alimento en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad mostrada en SEC ID NO: 4 o un variante activo del mismo, en donde dicho variante activo tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos con SEC ID NO: 4 o bien un fragmento de SEC ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, y en donde en el caso de un alimento vegetal el alimento es un alimento cosechado.

Descripción de los dibujos

30 La invención será descrita con referencia a los dibujos acompañantes, en donde:

La figura 1 muestra la secuencia codificadora precursora de β -conglutina de *Lupinus albus* (SEC ID NO: 1); y

La figura 2 muestra el fragmento interno de la secuencia codificadora precursora de β -conglutina que corresponde a Blad (SEC ID NO: 3).

35 Descripción detallada de la invención

Blad

40 Blad ("banda de *Lupinus albus* doce" – banda de *L. albus* dulce) fue el nombre dado a un producto en descomposición estable e intermediario de β -conglutina, la proteína de almacenamiento principal presente en semillas del género *Lupinus*. Se caracterizó como un polipéptido 20 kD, compuesto de 173 de residuos de aminoácidos, y codificado por un fragmento interno (519 nucleótidos, depositados en GenBank bajo el número de acceso ABB13526) del gen codificando el precursor de β -conglutina de *Lupinus* (1791 nucleótidos, publicados en GenBank, bajo el número de acceso AAS97865). Cuando secuencias terminales de Blad codificadoras de cebadores se usan para ampliar una secuencia de ADN de *Lupinus* genómico, se obtiene un producto de ~620 bp, indicando la presencia de un intrón en el fragmento de genes codificando Blad. Blad que ocurre de manera natural es el componente principal de un glicooligómero de 210 kD que se acumula exclusivamente (siguiendo proteólisis limitada intensiva de β -conglutina) en los cotiledones de especie *Lupinus*, entre los días 4 y 12 después del comienzo de germinación. Pese a que dicho oligómero es glicosilado, Blad que ocurre de manera natural no es glicosilado. El glicooligómero que contiene Blad está compuesto de varios polipéptidos, los principales exhibiendo masas moleculares de 14, 17, 20, 32, 36, 48 y 50 kD. El polipéptido de 20 kD, Blad, es por mucho el polipéptido más abundante dentro del oligómero y parecer ser el único con actividad de lectina. Blad que ocurre de manera natural constituye aproximadamente 80% de la proteína cotiledonaria total en plántulas de 8 días de edad.

55 La secuencia codificadora precursora de β -conglutina de *L. albus* (SEC ID NO: 1) es dada en la figura 1. La secuencia codificadora de subunidad origen de β -conglutina se ubica en los residuos 70 a 1668. La subunidad codificada origen de β -conglutina de residuo de 533 aminoácidos (SEC ID NO: 2) es:

MGKMRVRFPTLVVLVGLVFLMAVSIIGIAYGEKDVLSHERPEEREQE EWQPRRQR
 PQSRREEREQE QEQGSPSYPRRQSGYERRQYHERSEQREEREQEQQGSPSYSRR
 QRNPYHFSSQRFQOTLYKNRNGKIRVLERFDQRTNRLLENLQNYRIVEFQSKPNTLI
 LPKHSADADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNPDDN
 QKLRVVKLAI PINNPGYFYDFYPSSTKDQQS YFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQRI
 IILGNEDEQEYEEQRRGQEQSDQDEGVIVIVSKKQIQKLTKHAQSSSGKDKPSSDSG
 PFNLRSNPIYSNKYGNFYEITPDRNPQVQDLNISLTYIKINEGALLLPHYNSKA
 IYVVVVDEGEGNYELVGI RDQQRQDEQEEKEEEVIRYSARLSEGDI FVI PAGYP
 ISINASSNLRLLGFGINADENQRNFLAGSKDNVIRQLDRAVNELTFPGSAEDIER
 LIKNQQQS YFANGQPQQQQQQQSEKEGRRRGRGSSLPF

El fragmento interno de la secuencia codificadora precursora de β -conglutina que corresponde a Blad (SEC ID NO: 3) es dado en la figura 2. El polipéptido Blad (SEC ID NO: 4) es:

5 RRQRNPYHFSSQRFQOTLYKNRNGKIRVLERFDQRTNRLLENLQNYRIVEFQSKPNT
 LILPKHSADADYVLVVLNGRATITIVNPDRRQAYNLEYGDALRIPAGSTSYILNP
 DNQKLRVVKLAI PINNPGYFYDFYPSSTKDQQS YFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQ
 RIILGNED

10 La invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo. Por lo tanto, se refiere a una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia de polipéptido de SEC ID NO: 4 o un variante activo del mismo. En modalidades alternativas, la composición consiste en esencia de un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo y/o el polipéptido antimicrobiano consiste en esencia de Blad o un variante activo del mismo. En otras modalidades, el polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste en esencia de) Blad o un variante activo del mismo se puede usar en forma aislada.

15 Un variante activo de Blad es un variante de Blad que retiene la habilidad de actuar como un antimicrobiano (es decir, tiene actividad antimicrobiana – ver más adelante para una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla). "Un variante activo de Blad" incluye dentro de su alcance un fragmento de SEC ID NO: 4. Un fragmento de SEC ID NO: 4 se selecciona que es al menos 60%, preferiblemente por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%,
 20 preferiblemente por lo menos 90% y muy preferible al menos 95% de la longitud de SEC NO: 4. Blad o un variante del mismo en general tiene por lo menos 10 residuos de aminoácidos, tales como al menos 100, 120, 140, 160 o 173 residuos de aminoácidos.

25 "Un variante activo de Blad" también incluye dentro de su alcance una secuencia de polipéptido que tiene homología con SEC ID NO: 4, al menos 60%, preferiblemente por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 97%, y muy preferible al menos 99% de identidad, por ejemplo, sobre la secuencia completa o sobre por lo menos 100, preferiblemente por lo menos 120, preferiblemente por lo menos 140, y muy preferible al menos 160 o más residuos de aminoácidos contiguos. Los métodos de medir homología de proteína son bien conocidos en la técnica y serán entendidos por aquellos expertos en la técnica en el presente contexto, la homología es calculada sobre la base de identidad de aminoácido (a veces referida como "homología dura").

35 El variante de Blad activo homólogo típicamente difiere de la secuencia de polipéptido de SEC ID NO: 4 por sustitución, inserción u omisión, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5 a 8 o más sustituciones, omisiones o inserciones. Las sustituciones preferiblemente son 'conservadoras', es decir que un aminoácido se puede sustituir con un aminoácido similar, por lo que aminoácidos similares comparten uno de los siguientes grupos: residuos aromáticos (F/H/W/Y), residuos alifáticos no polares (G/A/P/I/L/V), alifáticos polares-no cargados (C/S/T/M/N/Q) y alifáticos polares-cargados (D/E/K/R). Los sub-grupos preferidos comprenden: G/A/P; I/L/V; C/S/T; N/Q; D/E y K/R.

40 Un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo (como se describió antes) puede consistir de Blad o un variante activo del mismo con cualquier número de residuos de aminoácidos agregados a la terminal N y/o terminal C siempre y cuando el polipéptido retenga actividad antimicrobiana (una vez más, ver más adelante una descripción del nivel de dicha actividad y cómo medirla). Preferiblemente, no más de 300 residuos de aminoácidos se agregan a cualquiera o ambos extremos de Blad o un variante activo del mismo, más preferible no
 45 más de 200 residuos de aminoácidos, preferiblemente no más de 150 residuos de aminoácidos, preferiblemente no más de 100 residuos de aminoácidos, preferiblemente no más de 80, 60 o 40 residuos de aminoácidos, muy preferible no más de 20 residuos de aminoácidos.

Un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste en esencia de) Blad o un variante activo del mismo (como se describió antes) se puede utilizar en la invención en la forma de una proteína purificada (por ejemplo, eliminada de una fuente vegetal, animal o microbiana) y/o recombinante. La producción de una forma recombinante permite la producción de variantes activos de Blad.

Los métodos de purificar Blad que ocurre de manera natural ya se describen en la técnica (por ejemplo, Ramos y otros (1997) *Planta* 203(1): 26-34 y Monteiro y otros (2010) *PLoS ONE* 5(1): e8542). Una fuente adecuada de Blad que ocurre de manera natural es una planta de género *Lupinus*, tal como *Lupinus albus*, preferiblemente un cotiledón de dicha planta, preferiblemente cosechada entre alrededor de 4 y aproximadamente 14 días después del inicio de germinación, más preferible cosechada 6 a 12 días después del inicio de germinación (tal como 8 días después del comienzo de germinación). Se describen métodos en la técnica para una extracción de proteína total conduciendo a un extracto crudo que comprende Blad, y para una purificación de proteína de dicho extracto conduciendo a un extracto parcialmente purificado, por ejemplo, comprendiendo el glicooligómero que contiene Blad que comprende Blad. Para aislar Blad en sí entonces uno puede usar SDS-PAGE y/o, preferiblemente, HPLC de fase invertida (RP) en una columna de C-18.

Una manera alternativa de obtener un extracto parcialmente purificado que comprende el glicooligómero que comprende Blad es utilizar la actividad de unión de quitina de Blad. El glicooligómero se une en una manera muy fuerte a una columna de quitina como parte de una purificación de cromatografía de afinidad a quitina, siendo eludido con 0,05 N HCl. Detalles de un ejemplo de este método de purificación son los siguientes:

Cotiledones de plantas de lupina de 8 días de edad se cosecharon y homogenizaron en Milli-Q más agua (pH ajustado a 8,0), conteniendo 10 mM CaCl_2 y 10 mM MgCl_2 . El homogenizado se filtró a través de estopilla y se centrifugó a 30.000 g durante 1 hora a 4°C. La bolita posteriormente se suspendió en 100 mM de regulador de Tris-HCl, pH 7,5, conteniendo 10% (p/v) NaCl, 10 mM EDTA y 10 mM EGTA, agitado durante 1 hora a 4°C, y centrifugado a 30.000 g durante 1 hora a 4°C. La fracción de globulina total, contenida en el sobrenadante, se precipitó con sulfato de amonio (561 g/l), se dejó agitando en frío durante 1 hora y se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C. La bolita obtenida se disolvió en 50 mM regulador de Tris-HCl, pH 7,5, desalado en columnas PD-10 equilibradas en el mismo regulador y pasaron a través de una columna de cromatografía de afinidad a quitina pre-equilibrada en el mismo regulador. La columna fue lavada con 50 mM regulador de Tris-HCl, pH 7,5, y las proteínas unidas eludidas con 0,05 N HCl. Las fracciones eludidas se neutralizaron de inmediato con 2 M Tris y las fracciones pico se agruparon, liofilizaron y analizaron por SDS-PAGE.

Para la preparación de la columna de quitina, se obtuvo quitina cruda de Sigma y se procesó de la siguiente manera: la muestra de quitina se lavó extensivamente con Milli-Q más agua, seguido por 0,05 N HCl. Después se lavó con 1% (p/v) carbonato de sodio y después con etanol, hasta que la absorbencia del lavado fue menos de 0,05. Después se empacó quitina en una punta de pipeta y se equilibró con 50 mM regulador de Tris-HCl, pH 7,5

Los métodos de producir proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Dichos métodos como se aplican aquí involucrarán insertar el polinucleótido codificando un polipéptido que comprende Blad o un variante activo del mismo en un vector de expresión adecuado – permitiendo la yuxtaposición de dicho polinucleótido con uno o más promotores (por ejemplo, un promotor inducible, tal como T7lac) y con otros polinucleótidos o genes de interés – introduciendo el vector de expresión en una célula u organismo adecuado (por ejemplo, *Escherichia coli*), expresando el polipéptido en la célula u organismo transformado y eliminando el polipéptido recombinante expresado de esa célula u organismo. Para ayudar a dicha purificación, el vector de expresión se puede construir de modo que el polinucleótido adicionalmente codifica, por ejemplo, una etiqueta terminal que puede ayudar en la purificación: por ejemplo, una etiqueta de residuos de histidina para purificación de afinidad. Una vez purificado el polipéptido recombinante, la etiqueta de purificación se puede eliminar del polipéptido, por ejemplo, por corte proteolítico.

En una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste en esencial de) Blad o un variante activo del mismo, dicho polipéptido está de preferencia en forma parcialmente purificada, más preferible en forma purificada. Dicho polipéptido está de preferencia en forma parcialmente purificada, más preferible en forma purificada. Dicho polipéptido es parcialmente purificado cuando está presente en un ambiente carente de uno o más otros polipéptidos con el cual se asocia de manera natural y/o es representado por al menos aproximadamente 10% de la proteína total presente. Dicho polipéptido se purifica cuando está presente en un ambiente carente de todo, o a lo mucho, otros polipéptidos con los cuales se asocia de manera natural. Por ejemplo, Blad purificado significa que Blad representa por lo menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70% al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de la proteína total en una composición.

En una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o consiste en esencia de) Blad o un variante activo del mismo, el contenido de proteína *Lupinus* puede consistir en esencia del glicooligómero que contiene Blad que comprende un polipéptido que comprende (o consiste en esencia de) Blad o un variante activo del mismo.

Una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende (o que consiste en esencia de) Blad también puede ser una formulación que comprende otro compuesto(s) agregado a la composición por el experto en la técnica.

5 *Descomposición de comida y alimentos*

10 La descomposición de un alimento por un microorganismo significa cualquier alteración de un alimento por un microorganismo que resulta en un cambio en, por ejemplo, el sabor, olor o apariencia (por ejemplo, forma, color, textura, firmeza) que disminuye su valor nutricional y/o comercial. Por alimento se quiere decir cualquier sustancia líquida o sólida destinada para consumo por un humano o animal por razones nutricionales o de placer. El alimento puede ser consumido directa o indirectamente (por ejemplo, después de cocinar o procesar, tal como refinación de cereales).

15 Donde sea aplicable, el alimento preferiblemente se contempla en una forma aislada de su ambiente natural, tal como alimentos de planta cosechados (por ejemplo, fruta, vegetales, semillas) y productos aislados de animales (por ejemplo, carne, pescado, leche). El alimento se puede derivar de, puede proveer, o puede ser, una fruta, una nuez un vegetal, una semilla, un azúcar, un producto lácteo, un alimento líquido o en pasta, carne, pescado o pan. Los alimentos derivados de fruta incluyen vino y jugo de frutas. Las plantas que proveen semillas incluyen cereales (por ejemplo, maíz, trigo, cebada, sorgo, mijo, arroz, avena y centeno) y legumbres (por ejemplo, frijoles, chícharos y lentejas). Los azúcares, preferiblemente sacarosa, se pueden derivar de remolacha o caña de azúcar. Los productos lácteos incluyen leche, crema, queso y yogurt. El alimento líquido o en pasta incluye sopa, salsas, pepinillos, mayonesa, crema para ensalada y otros aderezos, conservas, jarabe y alimento para bebé. Los alimentos de carne y/o pescado contemplados se pueden procesar o de lo contrario, y se pueden cocinar o de lo contrario. Otros alimentos particulares que se contemplan se pueden encontrar en la siguiente sección, que se refiere a alimentos de ejemplo que se pueden descomponer por microorganismos que se pueden dirigir en los usos y métodos de la invención.

25 Los alimentos también incluyen alimentos compuestos pre-preparados tales como sándwiches, pays, quiches, etc., en especial aquellos actualmente diseñados para almacenamiento enfriado.

30 Agentes microbianos

Los inventores proveen el uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo para prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo. Los microorganismos que pueden causar descomposición de un alimento – comida – microorganismos de descomposición – incluyen, en particular, bacteria y hongos. En dicho uso, el polipéptido antimicrobiano puede ser considerado como un conservador de alimentos antimicrobiano.

40 El polipéptido antimicrobiano se puede usar para prevenir o inhibir descomposición de alimento por bacteria Gram-positivo o Gram-negativo. Las dianas bacterianas particularmente preferidas (con ejemplos de alimentos que pueden descomponer dados en corchetes) incluyen: especie *Pseudomonas* que descompone alimento, tales como *Pseudomonas aeruginosa* (berro y lechuga), *Pseudomonas syringae* (varios alimentos derivados de planta tales como remolacha, trigo y cebada), *Pseudomonas tolaasii* (champiñón), *Pseudomonas agarici* (champiñón), *Pseudomonas fragi* (productos lácteos) y *Pseudomonas lundensis* (leche, queso, carne y pescado), muy preferible *P. aeruginosa*; y especie *Bacillus* que descompone alimento tales como *Bacillus subtilis* (jitomate, papa, pan) y *Bacillus coagulans* (leche, jugo de tomate).

50 El polipéptido antimicrobiano se puede usar para prevenir o inhibir descomposición de alimentos por hongos unicelulares (levadura) o multicelulares (moho, filamentoso). Las dianas de levadura particularmente preferidas (con ejemplos de alimentos que se pueden descomponer dados en corchetes) incluyen: especie *Saccharomyces* de descomposición de alimento, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (azúcar, jarabes de azúcar, vino y bebidas gaseosas tales como jugos de fruta); especie *Kluyveromyces* que descompone alimento, tal como *Kluyveromyces marxianus* (queso); y especie *Zygosaccharomyces* que descompone alimentos, tales como *Zygosaccharomyces bailii* (vino, jugo de frutas, aderezos para ensalada y salsa de tomate) y *Zygosaccharomyces rouxii* (jarabes de azúcar, jugos de fruta, mermeladas y aderezos). Las dianas de moho particularmente preferidas (con ejemplos de alimentos que se pueden descomponer dados en corchetes) incluyen: especie *Alternaria* que descompone alimentos, tales como *Alternaria alternata* (papa), *Alternaria arborescens* (tomate), *Alternaria arbusti* (pera asiática), *Alternaria brassicae* (vegetales), *Alternaria brassicicola* (cosecha de col), *Alternaria carotiincultae* (zanahoria), *Alternaria conjuncta* (chirivía), *Alternaria dauci* (zanahoria), *Alternaria euphorbiicola* (cosechas de col), *Alternaria gaisen* (pera), *Alternaria infectoria* (trigo), *Alternaria japonica* (cosechas de col), *Alternaria petroselinii* (perejil), *Alternaria selini* (perejil), *Alternaria solani* (papa, tomate) y *Alternaria smyrnii* (alejandro, perejil); especie *Aspergillus* que descompone alimento, tales como *Aspergillus fumigatus* (nueces, papa, arroz y pan), *Aspergillus niger* (fruta y vegetales, por ejemplo, uvas y cebollas), y *Aspergillus flavus* (elote, cacahuate); especie *Fusarium* que descompone alimento, tales como *Fusarium oxysporum* (fruta) y *Fusarium graminearum* (cebada, trigo y maíz); especie *Botrytis* que descompone alimento, tal como *Botrytis cinerea* (fresa, uva y tomate); y especie *Colletotrichum* que descompone alimento, tales como *Colletotrichum actuatum* (fresa, apio, manzana, aguacate, berenjena, café y guayaba), *Colletotrichum coccodes*

(tomate, papa), *Colletotrichum capsici* (albahaca, garbanzo, pimienta), *Colletotrichum crassipes* (maracuyá), *Colletotrichum gloeosporioides* (vegetales y fruta, por ejemplo, membrillo y manzana), *Colletotrichum graminicola* (cereales), *Colletotrichum kahawae* (café), *Colletotrichum lindemuthianum* (frijol), *Colletotrichum musae* (plátano), *Colletotrichum nigrum* (tomate), *Colletotrichum orbiculare* (melón, pepino), *Colletotrichum pisi* (chicharo) y *Colletotrichum sublineolum* (arroz).

En modalidades preferidas, el polipéptido antimicrobiano se usa para prevenir o inhibir descomposición de una fruta por un microorganismo, preferiblemente una fresa, y de preferencia en donde el microorganismo es *Botrytis cinerea* o *Colletotrichum acutatum*, preferiblemente *Botrytis cinerea*.

El experto en la técnica podrá identificar, a través de métodos de rutina, una concentración adecuada (es decir, una concentración efectiva) con la cual usar el polipéptido antimicrobiano para prevenir o inhibir descomposición en cualquier serie particular. Preferiblemente, por ejemplo, se usa Blad a una concentración de al menos 1 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 100 mg/ml, o por lo menos 150 mg/ml, y hasta 350 mg/ml, hasta 500 mg/ml, hasta 600 mg/ml, hasta 1 mg/ml, hasta 2,5 mg/ml, hasta 5 mg/ml o hasta 10 mg/ml. Preferiblemente, la concentración de Blad seleccionado es entre 10 mg/ml y 5 mg/ml, más preferible entre 50 mg/ml y 2,5 mg/ml, más preferible entre 100 mg/ml y 1 mg/ml, e incluso más preferible entre 150 mg/ml y 600 mg/ml (tal como aproximadamente 250 mg/ml). Los inventores han provisto evidencia (ver ejemplos 4 y 5) que Blad es no tóxico a animales a por lo menos 400 mg/ml.

De manera sorprendente, los inventores han descubierto que una combinación de Blad con un agente quelante (por ejemplo, EDTA) produce un efecto antimicrobiano sinérgico. Por lo tanto, preferiblemente, un agente quelante se usa para mejorar la actividad antimicrobiana de un polipéptido antimicrobiano, y el uso de tal agente quelante puede disminuir la concentración del polipéptido antimicrobiano requerido para lograr un nivel particular de prevención o inhibición de descomposición. Un agente quelante (también conocido como un quelante, un quelatador o un agente secuestrante) es cualquier compuesto que une a un ion metálico para formar un complejo no covalente y reduce la actividad del ion. Agentes quelantes adecuados incluyen carboxilatos de poliamino tales como EDTA (ácido etileno-diaminatetraacético) y EGTA (etilenglicol bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético ácido). Preferiblemente, se usa EDTA como el agente quelante, preferiblemente a una concentración de por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, o por lo menos 100 mg/ml, y hasta 500 mg/ml, hasta 1 mg/ml, hasta 5 mg/ml, hasta 10 mg/ml, o hasta 20 mg/ml. Preferiblemente, EDTA se usa a una concentración de entre 0,1 mg/ml y 1 mg/ml.

Resultados

El polipéptido antimicrobiano se usa para inhibir el crecimiento de un microorganismo que descompone alimento (significando que tiene actividad microbiostática) y/o para matar dicho microorganismo (significando que tiene actividad microbicida) en un alimento de modo que se previene o inhibe descomposición de dicho alimento por dicho microorganismo. El experto en la técnica podrá identificar una dosis adecuada y/o concentración para obtener una inhibición de crecimiento particularmente deseado o asesinato del microorganismo.

Preferiblemente, cuando se usa como un agente microbiostático, el polipéptido antimicrobiano reduce la velocidad de crecimiento por 10%, más preferible por 50%, más preferible por 75%, más preferible por 90%, más preferible por 95%, más preferible por 98%, más preferible por 99%, e incluso más preferible por 99,9% en comparación con condiciones equivalentes en donde el polipéptido antimicrobiano no está presente. Muy preferible el polipéptido antimicrobiano previene cualquier crecimiento del microorganismo.

Preferiblemente, cuando se usa como un agente microbicida, el polipéptido antimicrobiano mata 10% de la población de los microorganismos, más preferible 50% de dicha población, más preferible 75% de dicha población, más preferible 90% de dicha población, más preferible 95% de dicha población, más preferible 98% de dicha población, más preferible 99% de dicha población, e incluso más preferible 99,9% de dicha población en comparación con condiciones equivalentes en donde el polipéptido antimicrobiano no está presente. Muy preferible, el polipéptido antimicrobiano mata toda la población del microorganismo.

Cuando se usan para prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo, el polipéptido antimicrobiano se usa en una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir una cantidad que provee un nivel de inhibición de crecimiento y/o asesinato de un microorganismo de modo que se logra un nivel clínicamente detectable de prevención o inhibición (por ejemplo, una disminución en la velocidad de descomposición), en comparación con condiciones equivalentes en donde el polipéptido antimicrobiano no está presente. Preferiblemente, la cantidad efectiva del polipéptido antimicrobiano no es tóxica al sujeto humano o animal.

Usos y métodos

La invención provee el uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo para prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo. A este extremo también se provee un método de prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo que comprende administrar a un alimento en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que

comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende Blad o un variante activo del mismo. Preferiblemente, la cantidad efectiva del polipéptido antimicrobiano es no tóxico a humanos o animales. La prevención o inhibición de descomposición puede ocurrir durante el almacenamiento, transporte, manejo, procesamiento o muestra del alimento.

5 Una composición que comprende el polipéptido antimicrobiano, por ejemplo, se puede mezclar en el alimento o, por ejemplo, se puede aplicar a la superficie del alimento (por ejemplo, como una película líquida o una aspersión). El alimento también se puede sumergir en (y opcionalmente mantener en) dicha composición. Para cualquier alimento particular, el uso de dicha composición como un conservador se puede combinar con cualquier otra técnica de conservación de alimentos conocida, antimicrobiana o de lo contrario, incluyendo secado, calefacción, refrigeración o congelación, inhibición osmótica (por ejemplo, uso de jarabes o sal), empaque al vacío, enlatado o embotellado, hacer jalea, plantación, "jugging", irradiación por ionización, procesamiento de campo eléctrico a pulso, conservación de alimentos a presión alta, y conservación de alimentos a presión de agua ultra alta, uso de antioxidantes y/o uso de conservadores antimicrobianos (por ejemplo, dióxido de azufre, dióxido de carbono, etanol, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico, benzoatos, nitratos y nitritos, sulfitos, propionato de calcio y metilcloroisotiazolinona).

Ejemplos

En los siguientes ejemplos BLAD denota el glicooligómero conteniendo Blad que ocurre de manera natural comprendiendo el polipéptido de Blad de 20 kD, purificado como Ramos y otros (1997) *Planta* 203(1): 26-34: ver partes de "Plant material and growth conditions" (Material de planta y condiciones de crecimiento) y "Purification of proteins" (Purificación de proteínas) de la sección de Materiales y Métodos de ese documento.

Definiciones:

25 MIC – Concentración mínima inhibidora: la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo.

30 MFC/MBC – Concentración mínima fungicida/bactericida (o concentración mínima letal): la concentración más baja de un agente antimicrobiano necesario para matar 99,9% del inóculo inicial después de 24 horas bajo una serie estandarizada de condiciones.

Ejemplo 1 – Actividad bactericida de BLAD.

MIC y MBC de BLAD para varias especies bacterianas (usando medio de Mueller-Hinton):

| Especie bacteriana | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 32-256 | 128-256 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 8 | > 512 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 4 | > 512 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 | > 512 |
| <i>Salmonella thyphimurium</i> | 64 | 128 |

35 En particular, *P. aeruginosa* y *B. Subtilis* pueden causar descomposición de alimentos. Se descubrió que BLAD es bacterioestático a 100 mg/ml y bactericida a 250 mg/ml contra *P. aeruginosa*. Contra *P. aeruginosa*, BLAD a 50 mg/ml o EDTA a 1 mg/ml inhibe el crecimiento (es decir, ambos son bacterioestáticas) sino una combinación de los dos es bactericida.

40 Ejemplo 2 – Actividad fungicida de BLAD.

MIC y MFC de BLAD para varios hongos filamentosos (usando medio de RPMI)

| Especie fúngica | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Alternaria sp.</i> | 64 | > 512 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 32 | > 512 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 32-64 | > 512 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 128 | 512 |
| <i>Colletotrichum acutatum</i> | 64 | > 512 |
| <i>Colletotrichum gloesporioides</i> | 64 | > 512 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 64 | > 512 |

45 MIC y MFC de BLAD para varios hongos filamentosos (usando varios medios)

| Cepa | MIC (mg/ml) | | | |
|--|--------------|------------|-------------|--------------|
| | PDB | PDB pH 7,5 | AM3 | RPMI |
| <i>Botrytis cinerea</i> BM | 128 (1) | 4 – 8 (3) | 8 – 32 (3) | 128 (2) |
| <i>B. cinerea</i> BT | 32 – 128 (3) | 8 (3) | 16 – 32 (3) | 64 – 128 (3) |
| <i>Colletotrichum kahawae</i> (de Kenia) | 32 | 4 | 1 – 4 | 64 |
| <i>C kahawae</i> (de Zimbabwe) | 16 | 4 – 8 | 4 – 16 | 64 |

Datos de atmósfera de inhibición (diámetro) para BLAD contra *Botrytis cinera* BM en agar de dextrosa de papa (PDA) a 0,6% o 0,9% p/v (3 días de incubación a 25°C):

| BLAD por disco (mg) | Diámetro de atmósfera promedio en 0,6% agar (mm) | Diámetro de atmósfera promedio en 0,9% agar (mm) |
|---------------------|--|--|
| 20 (mg) | 0 | 0 |
| 50 (mg) | 13 | 0 |
| 100 (mg) | 25,5 | 11 |
| 200 (mg) | 36 | 22 |

5 En 0,6% agar, se inhibió en aumento el crecimiento de *B. Cinera* con cantidades en aumento de BLAD de 20 mg/ml a 200 mg. Se observó una inhibición menos marcada a 5 mg/ml y 10 mg/ml en 0,9% agar.

10 Datos de atmósfera de inhibición (diámetro) para BLAD a 200 mg/disco contra varias levaduras en PDA con 0,9% (p/v) agar (3 a 5 días de incubación a 25°C):

| Levadura | Diámetro de atmósfera de inhibición promedio (mm) |
|---------------------------------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 30 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 28 |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | >40 |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 40 |

15 BLAD a 200 mg/disco mostró inhibición de crecimiento significativa de todas estas levaduras, todas de las cuales pueden causar descomposición de alimentos.

Ejemplo 3 – Ensayos de conservación/descontaminación de fresa

20 La susceptibilidad de fresas a contaminación de *B. Cinerea* después del tratamiento con BLAD fue investigada. Hasta 38% de las fresas no tratadas suministradas por un proveedor comercial se encontraron contaminadas (tamaño de muestra: diez cajas de 500 g), enfatizando el problema de contaminación de fresas.

Protocolo de ensayo –

- 25 1. Preparar muestras homogéneas y representativas.
2. Lavar en agua y descontaminar usando 70% v/v etanol.
3. Enjuagar dos veces en agua.
4. Tratar con BLAD a varias concentraciones (omitido para control): inmerso en solución de tratamiento durante 1 minuto antes de dejar secar en platos Petri de incubación (conteniendo un agua estéril de alojamiento de esponja húmeda, papel de filtro y malla de plástico).
- 30 6. Inocular cada fresa con 10 ml de *B. Cinerea* solución de spora a $1-5 \times 10^6$ esporas/ml.
7. Incubar durante 5 días bajo las siguientes condiciones:

35 Temperatura: 25°C (+/- 3°C)
 Humedad relativa: 80-90%
 Iluminación: protegido de luz solar directa

8. A intervalos, recolectar 1 g de muestra y homogenizar usando un vórtice.
9. Realizar dilución decimal en serie.
- 40 10. Dispersar en medio sólido y realizar conteo de colonia.

Se realizaron todas las técnicas de manejo bajo condiciones estériles, usando material en autoclave.

Los siguientes datos representan el porcentaje de fresas infectadas con *B. Cinerea* después de inoculación con la solución de spora de *B. Cinerea*:

| Días post- inoculación | Concentración de BLAD (mg/ml): | | | | |
|------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 (control) | 50 | 150 | 250 | 350 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 44 | 22 | 3 | 0 | 0 |
| 2 | 63 | 63 | 15 | 6 | 5 |
| 3 | 93 | 77 | 46 | 50 | 40 |
| 4 | 100 | 100 | 56 | 70 | 60 |
| 5 | 100 | 100 | 73 | 70 | 64 |

BLAD a concentraciones de 150 mg/ml a 350 mg/ml retrasó significativamente el comienzo de contaminación con *B.*

Cinerea y redujo la proporción total de fresas contaminadas en comparación con el control.

Ejemplo 4 – Estudio de toxicidad dérmica de BLAD en conejillos de indias.

5 El estudio convencional llevado a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Lisboa, a nombre del Instituto Superior de Agronomía (18 de julio de 2006 – 1 de agosto de 2006) usando Guía de OECD para probar químicos, No. 402, Toxicidad Dérmica Aguda. El estudio fue conducido de conformidad con buena práctica de laboratorio y bienestar de animales.

10 La toxicidad dérmica aguda de BLAD fue evaluada después de exposición a dosis única en conejillos de indias, que son ampliamente aceptados como animales adecuados para estudios de toxicidad dérmica. BLAD se aplicó a la piel lampiña en dos grupos de 10 animales cada uno, con dosificación a 200 mg/ml y 400 mg/ml respectivamente. Después de exposición, los animales se mantuvieron bajo observación durante un periodo de 15 días, durante el cual la masa corporal, morbidez y mortalidad fueron registrados.

15 Materiales y Métodos –

1. Materiales

20 Artículo de prueba: BLAD fue suministrado a 5 mg/ml (líquido opaco amarillento, 0-4°C) y almacenado a -80°C.

Animales: conejillos de indias albinos; cepa: Dunkin Hartley (HsdPoc: DH) por Harlan Iberica, Barcelona.

Número de animales usados: 30; peso corporal: 400-449 g; edad: 6 semanas.

25 Alojamiento: los animales fueron colocados de manera individual en cajas de polietileno con virutas de madera esterilizada (Lignocel).

Condiciones de ambiente:

a) Fotoperiodo: ciclos de luz/oscuridad durante 12 horas en 12 horas.

b) Ambiente controlado: una temperatura promedio de 19/22°C y humedad promedio de 60%.

30 Adaptación: los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales de la prueba durante siete días antes del comienzo de la prueba.

35 Alimento: Dieta Global 2014, Dieta de mantenimiento de roedores suministrada por Harlan Iberica, Barcelona, agua *ad libitum*.

2. Métodos

40 Administración: los animales fueron rasurados 48 horas antes de la prueba y sólo los animales que tuvieron piel libre de lesiones fueron tomados en el estudio. Una alícuota de 1 ml (a 200 mg/ml o 400 mg/ml) se aplicó a la piel rasurada de cada animal.

45 Diseño de estudio: los 30 animales del estudio se dividieron en cuatro grupos, dos grupos de diez animales cada uno y dos grupos con cinco animales cada uno. Un grupo de ten animales fue expuesto a BLAD a 200 mg/ml (grupo de prueba 1) y otro grupo de diez animales fue expuesto a BLAD a 400 mg/ml (grupo de prueba 2). Los dos grupos de cinco animales sirvieron como controles: un grupo fue expuesto a agua (alícuota de 1 ml) mientras otro grupo no fue sometido a ninguna administración sino manejada como todos los demás grupos.

50 Resultados: después de la exposición los animales fueron observados diariamente durante 15 días para registrar cualquier signo de morbidez o incluso muerte. En términos de morbidez, se puso atención particular a apariencia posible de lesiones en la piel en el sitio de exposición y signos posibles de toxicidad general tales como cambios en patrones de comportamiento normal. El peso corporal fue evaluado de manera individual antes de la exposición y al final del periodo de prueba.

55 Resultados –

60 A ninguna concentración de BLAD hubo signos de ningún cambio físico en el área de administración dérmica o cambios en beber/comercialmente disponible o comportamiento general. No ocurrieron reacciones o muerte con la administración de BLAD. El aumento en masa corporal fue similar en todos los grupos (y fue consistente con el aumento esperado de animales en desarrollo de dicha edad joven).

Conclusiones –

65 BLAD a concentraciones de hasta 400 mg/ml (y posiblemente mayor) no muestra toxicidad dérmica.

Ejemplo 5 – Estudio de toxicidad oral de BLAD en ratas albinas.

Se llevó a cabo estudio confidencial en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Lisboa, a nombre del Instituto Superior de Agronomía, usando Guía de OECD para probar químicos, No. 401, Toxicidad Oral Aguda. El estudio fue conducido de conformidad con buena práctica de laboratorio y bienestar de animales.

La toxicidad oral aguda de BLAD fue evaluada después de exposición a dosis única en ratas, que son ampliamente aceptados como animales adecuados para estudios de toxicidad oral. BLAD se administró por gavaje en dos grupos de 10 animales cada uno, con dosificación a 200 mg/ml y 400 mg/ml respectivamente. Después de exposición, los animales se mantuvieron bajo observación durante un periodo de 15 días, durante el cual la masa corporal, morbidez y mortalidad fueron registrados. Después del periodo de observación, a los animales se les practicó la eutanasia y necropsia.

Materiales y Métodos –

1. Materiales

Artículo de prueba: BLAD fue suministrado a 5 mg/ml (líquido opaco amarillento, 0-4°C) y almacenado a -80°C.

Animales: *Rattus norvegicus*; cepa: Wistar Hannover adquirido por el vivero de la Facultad de Medicina Veterinaria de Lisboa de Harlan Iberica, Barcelona.

Número de animales usados: 30; peso corporal: 250-300 g; edad: 10 semanas.

Alojamiento: los animales fueron colocados de manera individual en cajas de polietileno con virutas de madera esterilizada (Lignocel).

Condiciones de ambiente:

a) Fotoperiodo: ciclos de luz/oscuridad durante 12 horas en 12 horas.

b) Ambiente controlado: una temperatura promedio de 19/22°C y humedad promedio de 60%.

Adaptación: los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales de la prueba durante siete días antes del comienzo de la prueba.

Alimento: Dieta Global 2014, Dieta de mantenimiento de roedores suministrada por Harlan Iberica, Barcelona, agua *ad libitum*.

2. Métodos

Administración: una alícuota de 1 ml (a 200 mg/ml o 400 mg/ml) se aplicó a cada animal por intubación oral (oro-esofágico), comúnmente conocido como gavaje. La administración se llevó a cabo con una sonda de metal apropiada para la especie de animal usado. Los animales se sometieron a ayuno durante 18 horas antes de la administración y alimentados 3 horas después de la administración.

Diseño de estudio: los 30 animales del estudio se dividieron en cuatro grupos, dos grupos de diez animales cada uno y dos grupos con cinco animales cada uno. Un grupo de ten animales fue expuesto a BLAD a 200 mg/ml (grupo de prueba 1) y otro grupo de diez animales fue expuesto a BLAD a 400 mg/ml (grupo de prueba 2). Los dos grupos de cinco animales sirvieron como controles: un grupo fue expuesto a agua (alícuota de 1 ml) mientras otro grupo no fue sometido a ninguna administración sino manejada como todos los demás grupos.

Resultados: después de la administración, los animales fueron observados diariamente durante 15 días para registrar cualquier signo de morbidez o incluso muerte. El peso corporal fue evaluado de manera individual antes de la exposición y al final del periodo de prueba. Después del periodo de observación, a los animales se les aplicó la eutanasia (por asfixia en una atmósfera saturada con dióxido de carbono) para examinación post-mortem posterior.

Resultados –

A ninguna concentración de BLAD hubo signos de ningún cambio físico en el área de administración dérmica o cambios en beber/comercialmente disponible o comportamiento general. No ocurrieron reacciones o muerte con la administración de BLAD. El aumento en masa corporal fue similar en todos los grupos (y fue consistente con el aumento esperado de animales en desarrollo de dicha edad joven). La observación de la necropsia/macroscópica de los órganos de la cavidad torácica y abdominal reveló ningún cambio.

Conclusiones –

BLAD a concentraciones de hasta 400 mg/ml (y posiblemente mayor) no muestra toxicidad oral.

Listado de secuencias

<110> CEV - Biotechnologia das Planta S.A. et al

<120> Conservador de alimentos

5 <130> P11336 WO

<150> PT105331
<151 > 12-10-2010

10 <150> GB1017283.1
<151 > 13-10-2010

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1791
<212> ADN
<213> *Lupinus albus*

20 <400> 1

ES 2 807 327 T3

gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caaccttaata 60
 taatcaaata tgggtaagat gagagtgagg tttccaacgt tagtgttggt actaggaata 120
 gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaagagt 180
 catgagagggc ctgaggaaag agaacaagag gagtggcaac ctaggagaca acgacctcaa 240
 agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gagcaggggt ctccctcata cccacgcagg 300
 cagagtgggt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagagggga agagagagag 360
 caagaacaac aacaaggttc tccctcatac tcacgtagac aaaggaacct ttatcacttc 420
 agctctcaaa gattccaaac tctttacaaa aataggaatg gcaaaatccg tgtgctcgag 480
 aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagttc 540
 caatcaaac ctaacactct cattctccct aaacactctg atgctgacta cgtcctcggt 600
 gtactcaatg gtagagccac aatcacgata gtaaaccctg atagaagaca agcatataac 660
 cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa cttcatatat ccttaacccg 720
 gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctogcaatac ccatcaacaa tcttggtac 780
 ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc 840
 aggaacactt tagaggccac cttcaatact cgttatgaag agatacaaaag gattatttta 900
 gggaatgagg atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gagcgaccaa 960
 gacgaggggg tgatagtgat agtttcaaag aaacagatcc aaaaattgac aaaacacgct 1020
 caatcttcat caggaaaaga caaacctct gattctggcc ccttcaactt gagaagcaat 1080
 gagcccatat attcaacaa gtatgggaac ttctatgaaa tcactccaga tagaaacct 1140
 caagttcagg atttgaatat ctctctcacc tatataaaaa ttaacgaggg agctttggtg 1200
 ttgccacact ataactcaa ggccatatat gtagtcgtgg ttgatgaagg agaaggaaat 1260
 tatgaactgg taggtattcg agatcaacaa cgacaacaag atgagcaaga agagaaagag 1320
 gaagaagtga taaggtatag tgctagatta tcagaaggtg acatttttgt aattccagca 1380
 ggttatccaa tttccatcaa tgcttcctca aatcttcgct tgcttgatt tggcatcaat 1440
 gctgatgaaa accagaggaa tttcctcgca ggttctaaag acaatgtgat aaggcagtta 1500
 gatagagcag tgaatgagct cacattccct ggttctgctg aagatattga gagattaatc 1560
 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc aacaacaaca acaacaacaa 1620
 agtgagaagg agggaaggcg tggaagaagg ggttcatctc ttccattttg agcacttttt 1680
 actaagctgt tttaaaagct actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata 1740
 ataaaactaa agttggacct ttgtactaat aatgtaata aaaaaaaaa a 1791

ES 2 807 327 T3

<211> 533
 <212> PRT
 <213> *Lupinus albus*

5

<400>2

Met Gly Lys Met Arg Val Arg Phe Pro Thr Leu Val Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Val Phe Leu Met Ala Val Ser Ile Gly Ile Ala Tyr Gly Glu Lys
 20 25 30

Asp Val Leu Lys Ser His Glu Arg Pro Glu Glu Arg Glu Gln Glu Glu
 35 40 45

Trp Gln Pro Arg Arg Gln Arg Pro Gln Ser Arg Arg Glu Glu Arg Glu
 50 55 60

Gln Glu Gln Glu Gln Gly Ser Pro Ser Tyr Pro Arg Arg Gln Ser Gly
 65 70 75 80

Tyr Glu Arg Arg Gln Tyr His Glu Arg Ser Glu Gln Arg Glu Glu Arg
 85 90 95

Glu Gln Glu Gln Gln Gln Gly Ser Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Gln Arg
 100 105 110

Asn Pro Tyr His Phe Ser Ser Gln Arg Phe Gln Thr Leu Tyr Lys Asn
 115 120 125

Arg Asn Gly Lys Ile Arg Val Leu Glu Arg Phe Asp Gln Arg Thr Asn
 130 135 140

ES 2 807 327 T3

Arg Leu Glu Asn Leu Gln Asn Tyr Arg Ile Val Glu Phe Gln Ser Lys
 145 150 155 160
 Pro Asn Thr Leu Ile Leu Pro Lys His Ser Asp Ala Asp Tyr Val Leu
 165 170 175
 Val Val Leu Asn Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ile Val Asn Pro Asp Arg
 180 185 190
 Arg Gln Ala Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Asp Ala Leu Arg Ile Pro Ala
 195 200 205
 Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Leu Asn Pro Asp Asp Asn Gln Lys Leu Arg
 210 215 220
 Val Val Lys Leu Ala Ile Pro Ile Asn Asn Pro Gly Tyr Phe Tyr Asp
 225 230 235 240
 Phe Tyr Pro Ser Ser Thr Lys Asp Gln Gln Ser Tyr Phe Ser Gly Phe
 245 250 255
 Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Thr Phe Asn Thr Arg Tyr Glu Glu Ile
 260 265 270
 Gln Arg Ile Ile Leu Gly Asn Glu Asp Glu Gln Glu Tyr Glu Glu Gln
 275 280 285
 Arg Arg Gly Gln Glu Gln Ser Asp Gln Asp Glu Gly Val Ile Val Ile
 290 295 300
 Val Ser Lys Lys Gln Ile Gln Lys Leu Thr Lys His Ala Gln Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Lys Pro Ser Asp Ser Gly Pro Phe Asn Leu Arg Ser
 325 330 335
 Asn Glu Pro Ile Tyr Ser Asn Lys Tyr Gly Asn Phe Tyr Glu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Asp Arg Asn Pro Gln Val Gln Asp Leu Asn Ile Ser Leu Thr Tyr
 355 360 365
 Ile Lys Ile Asn Glu Gly Ala Leu Leu Leu Pro His Tyr Asn Ser Lys
 370 375 380
 Ala Ile Tyr Val Val Val Val Asp Glu Gly Glu Gly Asn Tyr Glu Leu

ES 2 807 327 T3

| | |
|---|-----|
| cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc totcaaagat tocaaactct ttacaaaaat | 60 |
| aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttgaccaa gaaccaatag acttgagaat | 120 |
| ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaaccta acacttcat tctccctaaa | 180 |
| cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat cacgatagta | 240 |
| aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct | 300 |
| ggctcaactt catatatect taaccgggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc | 360 |
| gcaataccca tcaacaatcc tggctaactt tatgatttct atccatcgag tactaaagac | 420 |
| caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aacactttag aggccacctt caatactcgt | 480 |
| tatgaagaga taaaaggat tattttaggg aatgaggat | 519 |

<210> 4
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> *Lupinus albus*

 <400> 4

5

ES 2 807 327 T3

Arg Arg Gln Arg Asn Pro Tyr His Phe Ser Ser Gln Arg Phe Gln Thr
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Asn Arg Asn Gly Lys Ile Arg Val Leu Glu Arg Phe Asp
 20 25 30

Gln Arg Thr Asn Arg Leu Glu Asn Leu Gln Asn Tyr Arg Ile Val Glu
 35 40 45

Phe Gln Ser Lys Pro Asn Thr Leu Ile Leu Pro Lys His Ser Asp Ala
 50 55 60

Asp Tyr Val Leu Val Val Leu Asn Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ile Val
 65 70 75 80

Asn Pro Asp Arg Arg Gln Ala Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Asp Ala Leu
 85 90 95

Arg Ile Pro Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Ile Leu Asn Pro Asp Asp Asn
 100 105 110

Gln Lys Leu Arg Val Val Lys Leu Ala Ile Pro Ile Asn Asn Pro Gly
 115 120 125

Tyr Phe Tyr Asp Phe Tyr Pro Ser Ser Thr Lys Asp Gln Gln Ser Tyr
 130 135 140

Phe Ser Gly Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Thr Phe Asn Thr Arg
 145 150 155 160

Tyr Glu Glu Ile Gln Arg Ile Ile Leu Gly Asn Glu Asp
 165 170

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad mostrada en SEC ID NO: 4 o un variante activo del mismo para prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo, en donde dicho variante activo tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos con SEC ID NO: 4 o bien un fragmento de SEC ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, y en donde en el caso de un alimento vegetal el alimento es un alimento cosechado.
- 10 2. Un uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el microorganismo es una bacteria o un hongo.
3. Un uso de conformidad con la reivindicación 2, en donde la bacteria es una especie que descompone el alimento del género *Pseudomonas* o *Bacillus*.
- 15 4. Un uso de conformidad con la reivindicación 2 en donde el hongo es una especie que descompone alimento de uno de los siguientes géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*.
- 20 5. Un uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el alimento se deriva de, provee, o es, una fruta, una nuez, un vegetal, una semilla, un azúcar, un producto lácteo, un alimento líquido o en pasta, carne, pescado o pan.
6. Un uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el alimento es una fresa.
- 25 7. Un uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde el microorganismo es *Botrytis cinerea* o *Colletotrichum acutatum*, preferiblemente *Botrytis cinerea*.
8. Un uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un agente quelante.
- 30 9. Un método de prevenir o inhibir descomposición de un alimento por un microorganismo que comprende administrar a un alimento en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia Blad o un variante activo del mismo, en donde dicho variante activo tiene actividad antimicrobiana y comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos con SEC ID NO: 4 o bien un fragmento de SEC ID NO: 4 que tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, y en donde en el caso de un alimento vegetal el alimento es un alimento cosechado.
- 35

Figura 1

```

1 gatggcgatg aatgaacact gcgtttgctg gctttgatga aaatcgagtg caacctaata
61 taatcaaata tgggtaagat gagagtgagg tttccaacgt tagtgttggg actaggaata
121 gtattcctca tggcagtgtc aattggtatt gcttatggag aaaaagatgt gctaaagagt
181 catgagaggc ctgaggaaag agaacaagag gagtggcaac ctaggagaca acgacctcaa
241 agtagaaggg aagagagaga gcaagagcaa gagcagggtt ctccctcata cccacgcagg
301 cagagtgggt atgagaggag acaataccat gagaggagtg agcagaggga agagagagag
361 caagaacaac acaaggttc tcctcatalc tcacgtagac aaaggaaccc ttatcacttc
421 agctctcaaa gattccaaac tctttacaaa aataggaatg gcaaaaatccg tgtgctcgag
481 aggtttgacc aaagaaccaa tagacttgag aatctccaaa actaccgcat tgttgagttc
541 caatcaaaac ctaacactct cattctccct aaacactctg atgctgacta cgtcctcgtt
601 gtactcaatg gttaggccac aatcacgata gtaaaccttg atagaagaca agcatataac
661 cttgagtatg gcgatgctct cagaatccca gctggctcaa cttcatalat ccttaacccg
721 gatgacaacc agaagcttag agtagtcaag ctcgcaatac ccatacaaaa tcctgggctac
781 ttttatgatt tctatccatc gagtactaaa gaccaacaat cctacttcag tggcttcagc
841 aggaacactt tagaggccac cttcaatact cgttatgaag agatacaaaag gattatttta
901 gggaaatgagg atgagcaaga atatgaggaa caaaggcgtg ggcaagagca gagcgaccaa
961 gacgaggggg tgatagtgat agtttcaaaag aaacagatcc aaaaattgac aaaaacagct
1021 caatcttcat caggaaaaga caaacctctt gattctggcc ccttcaactt gagaagcaat
1081 gagcccatat attcaaaaaa gtatgggaac ttctatgaaa tcaactccaga tagaaaacct
1141 caagttcagg atttgaatat ctctctcacc tatataaaaa ttaacgaggg agctttgttg
1201 ttgccacact ataactcaaa ggccatatal gtagtctggt ttgatgaagg agaaggaaat
1261 tatgaactgg taggtattcg agatcaacaa cgacaacaag atgagcaaga agagaaaagag
1321 gaagaagtga taaggtatag tgctagatta tcagaagggtg acatthttgt aattccagca
1381 ggttatccaa ttcccatcaa tgcttctca aatcttcgct tgcttggtt tggcatcaat
1441 gctgatgaaa accagaggaa ttccctcgca gttctctaaag acaatgtgat aaggcagtta
1501 gatagagcag tgaatgagct cacattccct gttctgctg aagatattga gagattaatc
1561 aaaaaccaac aacagtctta ctttgcaaat ggtcagcctc aacaacaaca acaacaacaa
1621 agtgagaagg agggaaaggcg tggaagaagg gttcatctc ttccattttg agcacttttt
1681 actaagctgt tttaaaagct actatcatgt aagagctcat agtgagctac tgagagaata
1741 ataaaactaa agttggacct ttgtactaat aatglttaata aaaaaaaaa a

```

Figura 2.

```

1  cgtagacaaa ggaaccctta tcacttcagc tctcaaagat tccaaactct ttacaaaaat
61  aggaatggca aaatccgtgt gctcgagagg tttagacaaa gaaccaatag acttgagaat
121 ctccaaaact accgcattgt tgagttccaa tcaaaacctt aactctcat tctccctaaa
181 cactctgatg ctgactacgt cctcgttgta ctcaatggta gagccacaat cacgatatga
241 aaccctgata gaagacaagc atataacctt gagtatggcg atgctctcag aatcccagct
301 ggctcaactt catatatcct taaccoggat gacaaccaga agcttagagt agtcaagctc
361 gcaataccca tcaacaatcc tggctacttt tatgatttct atccatcgag tactaaagac
421 caacaatcct acttcagtgg cttcagcagg aaccttttag aggccacctt caataactcg
481 tatgaagaga tacaaggat tattttaggg aatgaggat

```