

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 723**

51 Int. Cl.:

**A23L 3/3571** (2006.01)  
**A23B 4/22** (2006.01)  
**A23B 7/155** (2006.01)  
**A23K 10/16** (2006.01)  
**A23K 30/00** (2006.01)  
**A23L 3/3472** (2006.01)  
**A23L 3/3562** (2006.01)  
**A61L 2/16** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2017 PCT/CA2017/050068**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017 WO17124197**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2017 E 17740944 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3405044**

54 Título: **Composición bioconservante de alimentos y usos de la misma**

30 Prioridad:

**22.01.2016 CO 1615040 0**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.10.2021**

73 Titular/es:

**SOLUTIONS BIOLOGIQUES INTELLIGENTS-  
BIOINTELLIGENZA INC. (100.0%)  
784 rue de Rougemont  
Quebec, Quebec G1X 2M2, CA**

72 Inventor/es:

**PEREZ ACOSTA, ADRIANA ALEJANDRA**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 864 723 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición bioconservante de alimentos y usos de la misma

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente colombiana número de serie 16 15040 0000 0000, presentada el 22 de enero de 2016.

10 Declaración con respecto a la investigación o desarrollo patrocinado por el gobierno

N.A.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a composiciones usadas para la conservación y seguridad de alimentos y para desinfectar superficies inanimadas y usos de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones bioconservantes que comprenden una combinación específica de bacterias cooperantes (consorcio de bacterias de ácido láctico) y un agente activador (fuente de energía) las cuales pueden usarse en productos alimenticios frescos y cocidos y en superficies inanimadas para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y promover la seguridad y conservación de los alimentos.

Antecedentes de la invención

25 La seguridad alimentaria se ha orientado a encontrar soluciones que den respuesta al riesgo de contaminación provocado por diversos microorganismos patógenos, a los que están expuestos los alimentos, en particular los procesados. Durante el procesamiento y almacenamiento, es posible que crezcan microorganismos patógenos que afectan las propiedades nutricionales del alimento, que generan cambios organolépticos indeseables y facilitan la producción de toxinas.

30 La búsqueda constante de una adecuada inocuidad alimentaria ha impulsado el desarrollo de mecanismos cada vez más efectivos, orientados hacia la mitigación de microorganismos patógenos tales como *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli enterohemorrágica* (O157: H7), *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus Rhizopus*, los cuales pueden contaminar los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y distribución, provocando enfermedades a los consumidores.

35 Los alimentos procesados son aquellos que resultan de una transformación de la materia prima, y que se mezclan con otras sustancias (por ejemplo, aglutinantes, aromatizantes, conservantes) para proporcionarles propiedades organolépticas mejoradas. Entre los alimentos procesados se incluyen patés, embutidos, mortadela, jamón y toda la línea de embutidos, verduras en escabeche y frutas enteras en jarabe.

40 Existen sistemas de conservación que se usan actualmente en la industria de alimentos procesados para detener la contaminación de los alimentos por microorganismos patógenos y extender la vida útil de los alimentos. Entre los diversos conservantes para dichos alimentos, se encuentran los conservantes químicos (por ejemplo, nitritos y nitratos) y los conservantes naturales (por ejemplo, ácido ascórbico y ácido láctico). Los primeros tienen un potencial carcinógeno considerable en el ser humano y no inhiben por completo el crecimiento de microorganismos contaminantes, mientras que los segundos generan alteraciones organolépticas en el producto debido a la alta concentración en la que deben usarse.

45 Los bioconservantes son sustancias que se producen biológicamente por microorganismos (cultivos iniciadores) que han demostrado ser letales para los patógenos y pueden usarse para conservar diferentes tipos de alimentos, que incluye los alimentos procesados. La ingesta de bioconservantes es segura en seres humanos e incluso puede ser beneficiosa para el correcto funcionamiento del cuerpo, como en el caso de los probióticos. El uso de determinadas cepas de microorganismos como cultivos iniciadores (iniciadores) puede ayudar a garantizar la seguridad de los bioconservantes y, adicionalmente, conferir y/o mejorar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos.

50 En el campo de fabricar alimentos se han desarrollado diversos productos que contienen uno o más microorganismos con fines nutricionales y de bioconservación. La Patente de Estados Unidos núm. 6780447 describe un producto que comprende ácido sórbico y al menos una bacteriocina que se produce por *Lactobacillus delbrueckii var. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* las cuales pueden usarse individualmente o junto con otros aditivos en la agricultura, más particularmente en los piensos para la cría de ganado.

65 La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos US20140271994 describe una composición para alimentar a las mascotas con carne con cultivos microbianos, que comprende al menos un microorganismo

seleccionado de *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus láctico*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii var. bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*.

5 La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos US20100272854 describe una composición y método para aumentar la viabilidad de *bifidobacterias* microorganismos tipo, durante el almacenamiento de productos alimenticios frescos fermentados que contienen una o más cepas de *Bifidobacteria* y acacia. Esta especie se conoce por ser un poderoso probiótico, pero su alto costo limita su uso como conservante. El documento WO 2006/097415 A1 describe una mezcla de ácido láctico bacteriano y/o bifidobacterias en la fabricación de masa madre. Weinberg y otros, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23, páginas 218-222, describe el efecto de Lactobacillus buchneri y L. plantarum, aplicados en el ensilado. El documento WO 2013/185344 A1 describe la producción de ácido láctico a partir de fermentaciones mediante el uso de cultivos bacterianos mixtos. El documento CA 2 833 937 A1 describe bacterias lácticas y composiciones que las contienen contra resfriados bacterianos.

15 Si bien existe una variedad de composiciones conservantes para alimentos procesados, así como también no procesados (frescos), sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevas composiciones conservantes que sean más efectivas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos mientras mantienen las propiedades organolépticas y extiendan la vida útil de los productos alimenticios.

20 Resumen de la invención

Los inventores han descubierto que algunas cepas de bacterias de ácido láctico (LAB) exhiben un comportamiento sinérgico cuando se combinan en proporciones definidas y se formulan junto con un agente activador específico como una composición bioconservante. Se demostró que la composición bioconservante inhibe efectivamente el crecimiento de microorganismos patógenos durante períodos de tiempo más largos (días) y mantiene o incluso mejora las propiedades organolépticas de los productos alimenticios.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición bioconservante que comprende un consorcio de LAB junto con un agente activador y, opcionalmente, un vehículo. La presente invención se define mediante las reivindicaciones anexas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición bioconservante de alimentos que comprende (i) un consorcio de bacterias de ácido láctico que comprende (a) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y (b) al menos una bacteria del ácido láctico heterofermentativa; y (ii) un agente activador, siendo dicha composición bioconservante como en las reivindicaciones adjuntas.

En las modalidades (i) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:1); (ii) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (2:1); (iii) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:2); o (iv) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico es una bacteria probiótica de ácido láctico; y al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:3)

En las modalidades, el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende además al menos una bacteria probiótica de ácido láctico (homofermentativa o heterofermentativa). En las modalidades, (i) al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa comprende al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas; y al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas, al menos una bacteria de ácido láctico heterofermentativa y al menos una bacteria de ácido láctico probiótico están en una relación (1:1:1); (ii) al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa comprende al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas; y al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas, al menos una bacteria de ácido láctico heterofermentativa y al menos una bacteria de ácido láctico probiótico están en una relación (1:2:1); o (iii) al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa comprende al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas; y al menos una bacteria de ácido láctico homofermentativa que produce proteasas, al menos una bacteria de ácido láctico heterofermentativa y al menos una bacteria de ácido láctico probiótico están en una relación (1:3:1). En las modalidades, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico es una bacteria homofermentativa de ácido láctico.

En las modalidades, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico comprende o consiste en *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sakei*, *Carnobacterium fish*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas.

En las modalidades, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico comprende o consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sake*, *Carnobacterium fish*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas.

5 En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Pediococcus*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus reuteri*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Leuconostoc mesenteroides*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus johnsonii*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus sake*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Carnobacterium fish*. En las modalidades particulares, al menos una bacteria probiótica de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus curvatus*.

15 Al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico consiste en *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. leichmannii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus ruminis* o cualquier combinación de al menos dos (por ejemplo, dos, tres, al menos tres, etc.) de los mismos.

20 En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus acidophilus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus amylophilus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus amylovorus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus animalis*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus crispatus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus farciminis*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus gasseri*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus jensenii*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus ruminis*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus salivarius*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus sharpeae*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus vitulinus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico no comprende ni consiste en *Lactobacillus yamanashiensis*.

40 Al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico consiste en *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* o cualquier combinación de al menos dos (por ejemplo, dos, tres, al menos tres, etc.) de los mismos.

45 En modalidades particulares, al menos una bacteria heterofermentativa no comprende ni consiste en *Leuconostoc*. En modalidades particulares, al menos una bacteria heterofermentativa no comprende ni consiste en *Pediococcus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria heterofermentativa no comprende ni consiste en *Lactobacillus plantarum*. En modalidades particulares, al menos una bacteria heterofermentativa no comprende ni consiste en *Lactobacillus rhamnosus*. En modalidades particulares, al menos una bacteria heterofermentativa no comprende ni consiste en *Lactobacillus helveticus*.

50 En las modalidades, el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

En las modalidades, el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende además *Bifidobacterium*.

55 En las modalidades, el consorcio de bacterias de ácido láctico consiste en *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. En las modalidades particulares, el consorcio de bacterias de ácido láctico consiste en *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una relación de 1:1.

60 En las modalidades, la concentración de cada especie bacteriana del consorcio de bacterias de ácido láctico en la composición está entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y alrededor de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. En las modalidades, la concentración total de bacterias del consorcio de bacterias de ácido láctico en la composición está entre  $2 \times 10^4$  y alrededor de  $5 \times 10^8$  UFC/ml. En las modalidades, la concentración total de bacterias del consorcio de bacterias de ácido láctico está entre  $3,9 \times 10^6$  y aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC/ml. En las modalidades, la concentración total de bacterias en el consorcio de bacterias de ácido láctico en la composición está entre aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC/ml.

65

- 5 El agente activador de la composición consiste en almidón. En las modalidades, el almidón comprende o consiste en almidón de patata, almidón de ñame, almidón de yuca, almidón de arroz, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de plátano o cualquier combinación de al menos dos de los mismos. En las modalidades, el almidón tiene un contenido de amilosa mayor o igual al 10 % (p/p). En las modalidades, el almidón tiene un contenido de amilopectina menor o igual al 90 % (p/p). En las modalidades, el almidón tiene una relación de amilosa: amilopectina entre aproximadamente 17:83 (p/p) y aproximadamente 24:76 (p/p).
- 10 En las modalidades, el almidón es almidón de yuca, almidón de ñame o una combinación de los mismos. En las modalidades, el almidón es almidón de yuca y la concentración del almidón de yuca en la composición está entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 1 % (p/v). En las modalidades, la concentración del almidón de yuca en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 0,3 % (p/v).
- 15 En las modalidades, el almidón es almidón de ñame y la concentración del almidón de ñame en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 3 % (p/v). En las modalidades, el almidón es almidón de ñame y la concentración del almidón de ñame en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v). En las modalidades, la concentración de almidón de ñame en la composición es aproximadamente 0,3 % (p/v). En las modalidades, la concentración de almidón de ñame en la composición es aproximadamente 2 % (p/v).
- 20 En las modalidades, el agente activador comprende o consiste en un extracto (por ejemplo, acuoso) de cáscaras de plátano y la concentración del extracto en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 20 % (p/v). En modalidades preferentes, el agente activador es un extracto de cáscaras de plátano y la concentración del extracto en la composición está entre aproximadamente el 5 % (p/v) y aproximadamente el 20 % (p/v). En las modalidades, la concentración del extracto de cáscaras de plátano en la composición es de aproximadamente 15 % (p/v).
- 25 El agente activador consiste en un carbohidrato que tiene de 3 a 5 átomos de carbono. En las modalidades, el carbohidrato es xilitol, D-ribosa, D-arabinosa, D-lixosa, D-xilosa, D-treosa, D-eritrosa, D-ribulosa, D-xilulosa, D-eritrolulosa o cualquier combinación de al menos dos de los mismo. En las modalidades, la concentración de carbohidratos en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v). En las modalidades, el carbohidrato es xilitol y la concentración de xilitol en la composición es aproximadamente 1,5 % (p/v).
- 30 El agente activador comprende un fructooligosacárido (FOS). En las modalidades, el FOS comprende o consiste en fructano o inulina.
- 35 En las modalidades, la composición de la presente invención se proporciona en forma líquida. En las modalidades, la composición de la presente invención se proporciona en forma liofilizada.
- 40 En las modalidades, la composición bioconservante de la presente invención comprende además un vehículo (diluyente o portador (grado alimenticio)).
- 45 La presente invención también proporciona un kit o empaque comercial para la preparación y uso de la composición bioconservante de alimentos descrita anteriormente. En las modalidades, el kit comprende un consorcio de bacterias de ácido láctico; y (ii) un agente activador como se describe anteriormente. En el kit, el consorcio de bacterias de ácido láctico se puede proporcionar en forma liofilizada o en forma líquida. De manera similar, el agente activador también se puede proporcionar en forma liofilizada o en forma líquida. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para aumentar la vida útil de los alimentos, para tratar una superficie inanimada que entra en contacto con los alimentos o para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno en los alimentos o en superficies inanimadas que entran en contacto con alimentos (por ejemplo, durante el empaque o procesamiento de alimentos).
- 50 La presente invención también se refiere a un método para aumentar la vida útil de los alimentos (por ejemplo, alimentos frescos; alimentos cocinados, alimentos procesados, alimentos secos, alimentos enlatados, etc.) que comprende aplicar (poner en contacto) la composición bioconservante de alimentos descrita anteriormente a los alimentos o una superficie inanimada la que entra en contacto con los alimentos.
- 55 La presente invención se refiere además a un método para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno en alimentos que comprende aplicar (poner en contacto) la composición bioconservante de alimentos descrita anteriormente a alimentos o una superficie inanimada (por ejemplo, superficie sintética) que entra en contacto con alimentos.
- 60 La composición bioconservante de la presente invención se puede activar opcionalmente antes de ponerla en contacto con el alimento o la superficie inanimada que se va a tratar (por ejemplo, mediante la incubación de la composición bioconservante durante, por ejemplo, 1-5 h a 37 °C), de manera que la fase adaptativa del consorcio de bacterias en la composición bioconservante comienza antes de entrar en contacto con el alimento o la superficie a tratar.
- 65

La presente invención se refiere además al uso de la composición o kit bioconservante descrito anteriormente para aumentar la vida útil de los alimentos o para tratar una superficie inanimada (por ejemplo, una superficie sintética) que entra en contacto con los alimentos.

5 La presente invención también se refiere al uso de la composición o kit bioconservante descrito anteriormente para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno en los alimentos.

En las modalidades, el microorganismo patógeno es *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* o cualquier combinación o al menos dos de los mismos.

10 En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es un alimento fresco. En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es un alimento procesado y/o cocinado. En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es un alimento enlatado. En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es carne cruda (por ejemplo, carne picada). En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es una verdura o fruta fresca.  
15 En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es un alimento seco o húmedo para mascotas. En las modalidades, el alimento mencionado anteriormente es un regalo para mascotas.

La presente invención también proporciona un consorcio de bacterias y un agente activador para su uso en composiciones bioconservantes de alimentos.

20 Breve descripción de las figuras

En las figuras adjuntas:

25 La Figura 1 muestra un diagrama del metabolismo de la glucosa de una bacteria homofermentativa de ácido láctico (LAB) como *Lactobacillus bulgaricus*;

La Figura 2 muestra un diagrama del metabolismo de la glucosa de una LAB heterofermentativa como *Streptococcus thermophilus*;

30 La Figura 3 muestra el crecimiento bacteriano de un consorcio de bacterias de la presente invención (1:1) de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* sobre tres sustratos cárnicos (cerdo (puerco), pollo y embutido). Cada curva representa el número total de bacterias (*Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) tiempo extraordinario;

35 La Figura 4 muestra el crecimiento de un consorcio de bacterias de la presente invención (1:1) de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en presencia de diversas fuentes de carbono. (A) almidón de yuca (0,1 %) y xilitol (1,3 %); (B) Peptona (0,2 %) y glucosa (0,01 %);

40 La Figura 5 muestra la estructura química del almidón de yuca (tapioca);

La Figura 6 muestra el crecimiento de un consorcio de bacterias de la presente invención (1:1 de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) en presencia de varias concentraciones de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*);

45 La Figura 7 muestra el crecimiento del consorcio de bacterias de la presente invención (1:1) de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en presencia de una concentración del 15 % de extracto de cáscara de plátano (es decir, plátanos verdes del género *Musa* cuyos frutos son usados generalmente para cocinar);

50 La Figura 8 muestra el proceso de producción de un extracto de cáscaras (cáscaras) de plátano para su uso como un agente activador de acuerdo con la presente invención; y

55 La Figura 9 muestra el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en una muestra de cerdo mediante el uso de la composición bioconservante del Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

60 Las bacterias de ácido láctico (LAB) son microorganismos beneficiosos compuestos por una gran cantidad de géneros, que incluyen *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacteria* que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o indeseables en los alimentos, permitiendo extender su vida útil. Una descripción más detallada y completa de las características y propiedades de las LAB se puede encontrar en la revisión de Parra Huertas (1), que se incorpora por referencia en su totalidad.

65 Las LAB se usan ampliamente como cultivos iniciadores (iniciadores) en la industria láctea, así como también en carnes, verduras y cereales. Los cultivos iniciales o iniciadores se pueden definir como una especie o combinación de

especies microbianas que, una vez añadidas a un alimento, inician un conjunto de transformaciones en sus componentes básicos (carbohidrato-proteína-lípido), que se traducen en cambios en la textura, color y sabor de la comida. De manera similar, los cultivos iniciadores son capaces de generar sustancias como ácido láctico, ácido cítrico y CO<sub>2</sub>, que favorecen la conservación de los alimentos.

La presente invención se refiere a una composición bioconservante para alimentos que comprende un consorcio de bacterias de ácido láctico, al menos un agente activador y, opcionalmente, un vehículo. La composición bioconservante de acuerdo con la invención puede ser líquida, semisólida o sólida, y cada uno de sus componentes puede incorporarse y/o formularse individualmente o combinados como una mezcla.

En un aspecto, la presente invención proporciona un consorcio de bacterias de bacterias de ácido láctico que comprende:

(i) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas y al menos una bacteria de ácido láctico heterofermentativa, en una relación (1:1);

(ii) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico, en una relación (2:1);

(iii) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico, en una relación (1:2).

(iv) al menos una bacteria probiótica homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico, en una relación (1:3);

(v) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria probiótica de ácido láctico (homofermentativa o heterofermentativa, preferentemente homofermentativa), en una relación (1:1:1);

(vi) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria probiótica de ácido láctico (homofermentativa o heterofermentativa, preferentemente homofermentativa), en una relación (1:2:1);

(vii) al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria probiótica de ácido láctico (ya sea homofermentativa o heterofermentativa, preferentemente homofermentativa), en una relación (1:3:1).

Tabla 1: Ejemplos no limitantes de bacterias homofermentativas, heterofermentativas y probióticas que pueden incluirse en el consorcio de bacterias de la presente invención (ver Samaniego Fernández, Sosa del Castillo. *Lactobacillus* spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de estudios biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).

Bacterias homofermentativas de ácido láctico que producen proteasa	Bacterias heterofermentativas de ácido láctico	Bacterias probióticas de ácido láctico
<i>Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii subesp. lactis</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii subesp. leichmannii</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	<i>Lactobacillus ramnosus</i>	<i>Lactobacillus sake</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Carnobacterium fish</i>
<i>Lactobacillus animalis</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>		<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus farciminis</i>		
<i>Lactobacillus gasseri</i>		

(continuación)

	Bacterias homofermentativas de ácido láctico que producen proteasa	Bacterias heterofermentativas de ácido láctico	Bacterias probióticas de ácido láctico
5	<i>Lactobacillus jensenii</i>		
	<i>Lactobacillus ruminis</i>		
10	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
	<i>Lactobacillus sharpeae</i>		
	<i>Lactobacillus vitulinus</i>		
15	<i>Lactobacillus yamanashiensis</i>		

Se encontró que cierto grupo de bacterias homofermentativas de ácido láctico no son compatibles con las bacterias heterofermentativas (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*) usado en el consorcio de bacterias de la presente invención. Se cree que la ausencia de cooperación y efecto sinérgico observado con estas bacterias se debe al hecho de que fermentan casi exclusivamente hexosas (por ejemplo, monosacáridos como glucosa, dextrosa, manosa, alosa, galactosa, talosa, etc.). Por lo tanto, en presencia de sustratos complejos (por ejemplo, almidón), los aminoácidos necesarios para el crecimiento de *Streptococcus* no se producen en absoluto o en cantidades insuficientes y no pueden mantener el crecimiento y la actividad de las bacterias heterofermentativas (por ejemplo, *S. thermophilus*) en el consorcio de bacterias. Por tanto, un aspecto importante de la presente invención reside en la relación que existe entre la especie bacteriana en el consorcio de bacterias y su adaptación a la fuente de carbono, lo que le permite inhibir efectivamente los microorganismos patógenos.

Tabla 2: Ejemplos no limitantes de bacterias homofermentativas de ácido láctico incompatibles (ver Samaniego Fernández, Sosa del Castillo. *Lactobacilos* spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de estudios biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba)

	Bacterias de ácido láctico incompatibles
35	<i>Lactobacillus agilis</i>
	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
	<i>L. casei</i> subesp. <i>casei</i>
40	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
	<i>Lactobacillus maltaromicus</i>
	<i>Lactobacillus murinus</i>

Además, los solicitantes han encontrado que *Bifidobacterium* y *Streptococcus thermophilus* no pueden cooperar y necesitan la presencia de bacterias homofermentativas de ácido láctico para ser efectivas en una composición bioconservante. *Bifidobacterium* y *Streptococcus thermophilus* no pueden usarse solo como un consorcio de bacterias de acuerdo con la presente invención.

En las modalidades, la presente invención proporciona un consorcio de bacterias que comprende al menos dos LAB seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus thermophilus* en una relación de 1:1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1:1: 1, 1: 2: 1, 1: 3: 1 o 1: 2: 3 y en una concentración entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml (por ejemplo,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml) para cada microorganismo. En una modalidad preferente, el consorcio está formado por LAB *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una proporción de 1:1 y en una concentración de aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC/ml de cada especie bacteriana.

Se pueden obtener cepas de bacterias de ácido láctico de la composición bioconservante de la presente invención a partir de cultivos disponibles comercialmente (por ejemplo, Clerici-Sacco, *Streptococcus t* 510, cultivos termofílicos, SAP 230 A) o aislado de productos lácteos como queso o yogur. Para un fácil manejo, las cepas se pueden almacenar mediante procedimientos de liofilización convencionales.

El bioconservante de la presente invención comprende además un agente activador que proporciona al consorcio de bacterias de la presente invención, la energía necesaria para activar su complejo enzimático, iniciar su crecimiento de manera controlada y cooperativa (mediante la regulación del tiempo en cada una de las fases) y para mantener su actividad metabólica.

El agente activador de acuerdo con la invención puede ser cualquier compuesto que pueda servir como fuente de energía para el consorcio de bacterias, que incluye almidón, glucosa, dextrosa, xilitol, peptona, suero y mezclas de los mismos. Sin embargo, el solicitante ha descubierto que determinadas fuentes de energía funcionan sorprendentemente bien con el consorcio de bacterias de la presente invención. Las fuentes de energía (carbono) particularmente útiles que pueden usarse incluyen almidón (por ejemplo, almidón de ñame y almidón de yuca), xilitol (y otros carbohidratos de 3-5 carbonos) y un extracto de cáscaras de plátano. El uso de fuentes de energía tales como agentes activadores en el bioconservante permiten un crecimiento bacteriano y una actividad metabólica óptimos. Se demostró que el bioconservante comienza a actuar rápidamente y mantiene una actividad óptima durante períodos de tiempo más prolongados mediante el uso de estas fuentes de energía como agentes activadores.

El solicitante ha descubierto que para la preparación de una composición bioconservante, los tipos de almidón que pueden usarse tienen un contenido de amilosa mayor o igual al 10 % (p/p) o un contenido de amilopectina menor o igual al 90 % (p/p). En las modalidades, la relación de amilosa: amilopectina en el almidón es de al menos 15:85, pero no excede una relación de 30:70 (p/p). Preferentemente, el almidón tiene un contenido de amilosa mayor o igual al 17 % (p/p) y un contenido de amilopectina menor o igual al 83 % (p/p). En modalidades más preferidas, la relación de amilosa: amilopectina en el almidón es de al menos 17:83 pero no excede una relación de 24:76.

El uso de almidón parece prolongar las fases de adaptación y crecimiento exponencial, de esta manera se extiende el período durante el cual el bioconservante permanece activo contra bacterias patógenas. Se cree que esto se debe a la naturaleza más compleja del almidón, lo que dificulta su digestión por parte de las bacterias del consorcio. Por tanto, la fuente de energía se digiere de forma más lenta y constante.

Tabla 3: Ejemplos no limitantes de fuentes de almidón que pueden usarse como agente activador para el consorcio de bacterias de la presente invención.

Tipo de almidón	Contenido de amilosa (%)	Contenido de amilopectina (%)
Almidón de patata	20	80
Almidón de ñame	19	80
Almidón de plátano	24	76
Almidón de trigo	25	75
Almidón de maíz	25	75
Almidón de arroz	19	81
Almidón de yuca	17	83

Además, también se ha demostrado que ciertos carbohidratos que tienen en su estructura entre 3 y 5 carbonos, tales como FOS, constituyen una buena fuente de energía para el consorcio de bacterias y pueden incluirse en el bioconservante de la presente invención. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, es sin embargo que en presencia de fuentes de energía que comprenden un bajo contenido de carbono (es decir, carbohidratos que comprenden 5 átomos de carbono o menos), el consumo de la fuente de energía sigue siendo relativamente lento, posiblemente porque las bacterias en el consorcio sienten que la fuente de energía es escasa.

Tabla 4: Ejemplos no limitantes de carbohidratos y FOS que pueden usarse como agente activador para el consorcio de bacterias de la presente invención.

Carbohidrato	Número de carbonos
D-Ribosa	5
D-Arabinosa	5
D-Lixosa	5
D-Xilosa	5
D-Treosa	4
D-Eritrosa	4
D-Ribulosa	5
D-Xilulosa	5
D-Eritrulosa	4
<b>Fructooligosacáridos</b>	

(continuación)

	<b>Carbohidrato</b>	<b>Número de carbonos</b>
5	fructanos	5
	inulina	5

10 Los FOS son compuestos cuya estructura se forma mediante la repetición de unidades de disacáridos como sacarosa, inulobiosa y levanobiosa. La inulina (que pertenece a la clase de FOS) es una mezcla polidispersa muy heterogénea de carbohidratos y polímeros cuya estructura consiste esencialmente en unidades de restos glucosilo que terminan la cadena y un resto fructosilo repetitivo, que están unidos por enlaces  $\beta$  (2,1) con un grado de polimerización que varía de 3 a 70 monómeros.

15 El agente activador está presente en el bioconservante de la invención ya sea en forma sólida, en solución o dispersión en concentraciones entre 0,001 % y 20,0 % (p/p), con mayor preferencia entre 0,05 % y 15,0 % (por ejemplo, entre 0,1 % y 15 (p/p); entre 0,2 % y 10 % (p/p); entre 0,05 % y 5 % (p/p); entre 0,05 % y 2,5 % (p/p), etc.).

20 En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón (por ejemplo, papa, ñame, trigo, maíz, arroz, plátano, yuca, etc.) en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 0,5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 0,3 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 0,4 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 1 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 0,5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 0,3 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 0,4 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración del 1,0 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de 0,1 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón en agua a una concentración de 0,3 % (p/v).

40 En las modalidades, el almidón comprende almidón de patata, almidón de yuca, almidón de arroz, almidón de trigo, almidón de maíz, almidón de ñame y/o almidón de plátano.

45 En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más (al menos uno) carbohidratos de 3-5 carbonos (por ejemplo, xilitol o un carbohidrato enumerado en la Tabla 4 anterior) en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 3 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 1,5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 5 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 3 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v). En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de uno o más carbohidratos de 3-5 carbonos en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 1,5 % (p/v).

65 En las modalidades de la invención, el agente activador del bioconservante es una dispersión de xilitol en agua a una concentración del 1,5 % (p/v). En las modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón de yuca en agua a una concentración de 0,1 % (p/v). En las modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de cáscaras de plátano en agua a una concentración de 15 % (p/v). En las

modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón de ñame en agua a una concentración entre 0,1 % y 2 % (p/v). En las modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón de ñame en agua a una concentración de 2 % (p/v). En las modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de almidón de ñame en agua a una concentración de 0,3 % (p/v).

En las modalidades, el agente activador del bioconservante es una dispersión de una combinación de cualquiera de (i) almidón (por ejemplo, yuca, ñame, patata, arroz, cáscaras de plátano, etc.); (ii) carbohidratos que tienen en su estructura entre 3 y 5 carbonos; y (iii) un fructooligosacárido (FOS) (por ejemplo, fructanos, inulina).

Adicionalmente, la composición bioconservante de alimentos de la presente invención puede incluir un vehículo aceptable, que consiste de diferentes excipientes con funciones específicas para dar forma o proporcionar características adecuadas (por ejemplo, formar soluciones o dispersiones, resaltar propiedades organolépticas, aumentar su estabilidad) y asegurar que el consorcio de bacterias y el agente activador no pierde su capacidad para realizar su función.

Entre los excipientes se incluyen solventes, agentes viscosificantes, agentes aromatizantes, conservantes, reguladores de pH, colorantes y en general todos los comúnmente usados y conocidos por un experto en la técnica. La concentración del vehículo en la composición bioconservante de la invención está preferentemente entre 0,01 % y 99,99 % (p/p), con mayor preferencia entre 0,1 % y 60,0 % (p/p). En una modalidad preferida, la composición bioconservante de alimentos tiene la siguiente composición (Tabla 1):

Tabla: 5: componentes básicos en la composición bioconservante de la presente invención

Componente	Intervalo de Concentración
consorcio de bacterias	1 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml
agente activador	0,01 % - 20,0 % (p/p)
Vehículo (opcional)	0,1 % - 99,9 % (p/p)

La composición bioconservante puede incluir otros agentes como ácido ascórbico, ácido acético o etanol en concentraciones entre 0,01 y 10,0 %.

En otras modalidades, la composición bioconservante tiene la siguiente composición (Tablas 2, 3 y 4):

Tabla 6: Primer ejemplo no limitante de una composición bioconservante de la presente invención

Componente	Concentración
consorcio de bacterias ( <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> 1:1)	9,9 x 10 <sup>6</sup> UFC/ml
Almidón de yuca disperso en agua	0,3 % (p/v)
Vehículo (opcional)	qs 100,0 %

Tabla 7: Segundo ejemplo no limitante de una composición bioconservante de la presente invención

Componente	Concentración
consorcio de bacterias ( <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> 1:2:1)	7,9 x 10 <sup>6</sup> UFC/ml
Almidón de yuca disperso en agua	0,5 % (p/v)
Vehículo (opcional)	qs 100,0 %

Tabla 8: Tercer ejemplo no limitante de una composición bioconservante de la presente invención

Componente	Concentración
consorcio de bacterias ( <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> 2:1)	9,9 x 10 <sup>6</sup> UFC/ml
Almidón de yuca disperso en agua	0,7 % (p/v)
Vehículo (opcional)	qs 100,0 %

Se demostró que la adición del bioconservante de la invención reduce el número de bacterias patógenas (bajo número de *Salmonella*, *E. coli*, bacterias mesófilas aeróbicas), así como también para mantener o mejorar las características organolépticas, como el color y la textura de los alimentos procesados (por ejemplo, carne de hamburguesa), dentro de las 48 horas. La composición bioconservante de la invención también permitió inhibir patógenos resistentes al calor como *Listeria* y enterobacterias.

De manera similar, se obtuvieron buenos resultados en embutidos cocidos o escaldados contaminados con *E. coli* O 157: H7, en donde la reducción de patógenos fue superior al 99,0 % durante las primeras 100 horas y adicionalmente, en algunos alimentos, la composición bioconservante puede potenciar el comportamiento organoléptico. También se demostró que la composición bioconservante de la presente invención es efectiva cuando se aplica cíclicamente sobre frutas y verduras (por ejemplo, cultivos de aguacate y maíz), de esta manera se obtienen frutos libres de hongos.

La composición bioconservante puede usarse en la industria alimentaria en una variedad de productos alimenticios como carne cruda (fresca o seca), procesada o enlatada (por ejemplo, aves, pescado, cerdo, ternera, carne de vaca, mariscos, presa y carne de animales silvestres); frutas y verduras frescas, secas, procesadas o enlatadas, comidas preparadas (cocidas o crudas) y comida seca o húmeda para mascotas, que incluye las golosinas. Otros ejemplos no limitantes incluyen paté envasado al vacío, carne de hamburguesa y carne molida.

Definiciones:

Para proporcionar una comprensión clara y coherente de los términos de la presente solicitud, se proporcionan las siguientes definiciones.

Los artículos "un," "una" y "el/la," se usan en la presente descripción para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo.

Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como, "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye tal como "incluye" o "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene tal como "contiene" y "contener"), son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas del método no mencionados y se usan de manera intercambiable con las frases "que incluyen pero sin limitarse a" y "que comprenden pero sin limitarse a".

Para la lectura de los intervalos numéricos en la presente descripción, cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión se contempla explícitamente. Por ejemplo, para el intervalo de 18-20, los números 18, 19 y 20 se contemplan explícitamente, y para el intervalo 6,0–7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se contemplan explícitamente. Los términos "tal como" se usan en la presente descripción para significar, y se usan de manera intercambiable con, la frase "tal como, pero sin limitarse a".

A menos que se defina de cualquier otra manera en la presente descripción, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente descripción tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cualquier nomenclatura usada en relación con, y técnicas de, cultivo de células (que incluye células bacterianas) y tejidos, biología molecular, bacteriología, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente descripción son aquellas que se conocen bien y comúnmente usadas en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros; sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente descripción tienen precedencia sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que de cualquier otra manera se requiera por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

La práctica de los métodos, así como también la preparación y el uso de los productos y composiciones descritos en la presente descripción emplean, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica y microbiología y campos relacionados que estén dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; las series Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego; y Methods in Molecular Biology, vol. 119, "Chromatin Protocols" (PB Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Como se usa en la presente descripción, el término "bacteria" no se refiere a una sola bacteria sino a una población de bacterias (por ejemplo, una especie bacteriana). Por ejemplo, el término "bacteria homofermentativa de ácido láctico" se refiere a una población de "bacteria homofermentativa de ácido láctico" y mutatis mutandis para "bacteria heterofermentativa de ácido láctico", etc. Cuando se proporciona una relación entre dos bacterias (es decir, población bacteriana), la relación se refiere a la cantidad relativa (por ejemplo, UFC/ml) de cada población bacteriana.

Como se usa en la presente descripción, el término "LAB homofermentativa" se refiere a LAB que produce ácido láctico como metabolito primario por la acción de la fermentación de una fuente de glucosa.

Como se usa en la presente descripción, los términos "LAB heterofermentativa" "bacteria heterofermentativa", "bacteria de ácido láctico heterofermentativa" y similares, se refieren a LAB que produce ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> como resultado de la fermentación de una fuente de glucosa. Algunas especies LAB se consideran "facultativamente" heterofermentativas, lo que significa que producirán CO<sub>2</sub> y otros subproductos solo bajo ciertas condiciones o de sustratos específicos. Estas cepas incluirían, por ejemplo, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* y *Lb. curvatus*. En el contexto de la presente invención, *Streptococcus thermophilus* es heterofermentativa. *Lactobacillus* y *Streptococcus* son bacterias usadas para los procesos de fermentación, que, en su mayor parte, se elaboran en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, en presencia de oxígeno, el consorcio se comporta como una bacteria aerotolerante. En estas condiciones de estrés, *Lactobacillus* estimula en *Streptococcus* la formación de ácido fórmico, que es un metabolito secundario característico de las bacterias heterofermentativas. Driessen y otros, encontraron que *Streptococcus* produce dióxido de carbono, que es necesario para el crecimiento de *Lactobacillus*. Este efecto se provoca por la presencia de oxígeno disuelto, que cambia las condiciones de crecimiento del consorcio de bacterias, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Esta es la razón por la que en el contexto de la presente invención *Streptococcus* se comporta como heterofermentativa, mediante la producción de CO<sub>2</sub>, ácido fórmico y ácido láctico (ver, por ejemplo, comunicación breve: Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, H. Horiuchi y Huich. Sasaki) American Dairy Science Association. 2012).

El término "agente activador" para los propósitos de la presente invención se define como un compuesto o mezcla de compuestos que le dan al consorcio de bacterias del bioconservante de la presente invención, la energía necesaria para activar su complejo enzimático y comenzar su crecimiento de manera controlada y cooperativa (mediante la regulación del tiempo en cada una de las fases) y para mantener su actividad metabólica. El agente activador debe permitir la expresión de proteasas y enzimas (lactato deshidrogenasa (LDH), fructosa fosfato quinasa (PFK), piruvato quinasa (PK) y pirúvica deshidrogenasa (PDH)) por bacterias homofermentativas de ácido láctico en el consorcio de bacterias y la producción de ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y ácido pirúvico por las bacterias heterofermentativas de ácido láctico del consorcio. En las modalidades, el consorcio de bacterias en el bioconservante debe permanecer metabólicamente activo durante al menos 60 h, preferentemente 72 h, con mayor preferencia 96 h y aún con mayor preferencia 144 h. Los términos "metabólicamente activo" en el contexto de la presente invención significa que las bacterias del consorcio de bacterias se encuentran en una de las fases de crecimiento exponencial o estacionaria durante el tiempo indicado (es decir, producen y secretan en el medio ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido pirúvico y/o ácido fórmico y otras sustancias que inhiben el crecimiento o matan patógenos bacterianos y fúngicos tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Staphylococcus aureus* y/o *Listeria monocytogenes*). En las modalidades particulares, el agente activador conduce a (i) una fase adaptativa de entre aproximadamente 1 y 5 h, (ii) una fase de crecimiento exponencial de entre aproximadamente 36-96 h (preferentemente entre 48-96 h); y una fase estacionaria de entre aproximadamente 72-144 h con mayor (preferencia entre 96-144 h o más).

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

#### **Ejemplo 1: Elaboración de un consorcio de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* de yogur**

A partir de un yogur original, sabor natural, marca Alpina, se elaboraron 3 alícuotas de muestra de 25 ml cada una. Se tomó cada alícuota y se depositó en tubos que contienen una solución tampón que consiste de 90 ml de agua de peptona estéril al 0,1 % (pH 5,7, Difco, Merck KGaA, Alemania). Luego, se realizaron movimientos circulares con el fin de homogeneizar el contenido.

Se realizó un primer control morfológico, para lo cual se realizaron observaciones microscópicas, tomando una gota de cada una de las alícuotas diluidas en la solución tampón de agua de peptona y realizando una tinción de Gram con ella. Bacilos largos, simples y en filamentos, de color púrpura intenso y no esporulados (Gram positivos), confirmaron las características morfológicas microscópicas de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, y cocos morados agrupados en hileras (Gram positivos), confirmaron las características morfológicas microscópicas de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*.

Aislamiento de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El aislamiento de *Lactobacillus* y *Streptococcus* fue desarrollado de acuerdo con el método descrito por Viloche y otros en 1995, con modificaciones en las condiciones de microaerofilia, temperatura y tiempo de incubación. De cada una de las muestras preparadas a partir de yogur, se realizaron diluciones decimales por duplicado de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> mediante el uso del mismo diluyente. Luego, se prepararon y esterilizaron en autoclave 10 placas de Petri con agar MRS (MAN, ROGOSA y SHARPE, Merck KGaA, Alemania).

En las placas de Petri con agar MRS se vertieron y sembraron 100 µL de las diluciones previamente elaboradas mediante el uso de la técnica de agotamiento y estriación. Las placas de Petri se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se analizaron las colonias y se observó el crecimiento típico de BAL, colonias blancas de contornos lisos y aspecto lechoso. Para confirmar se realizó una verificación morfológica con tinción de Gram, se observaron cocos y bacilos grampositivos.

Vitalidad de la cepa aislada del yogur. De las cepas aisladas se extrajeron 5 colonias de cada una de las placas Petri y se sembraron en tubos con 10 ml de leche pasteurizada, con el fin de verificar la actividad bacteriana y su adaptación a este medio.

5 Los tubos con leche se incubaron durante 48 horas. Pasado este período, se realizó una prueba de gram, se observaron cocos y bacilos grampositivos, en una relación de 30:10. Al probar la viabilidad del consorcio de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en leche, se reflejó que estos mantenían una relación de cooperación para desarrollarse en el medio. *Lactobacillus* crece primero y promueve el crecimiento de *Streptococcus*.

10 Almacenamiento y conservación del consorcio de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Las colonias aisladas se sembraron en tubos que contienen agua esterilizada. Se agregaron colonias a los tubos hasta obtener  $9,9 \times 10^6$  UFC, correspondiente a 0,28 unidades nefelométricas de turbidez (NTU). Para este proceso se usó una báscula MacFarland, luego las bacterias se refrigeraron a 4 °C para su almacenamiento y posterior liofilización.

15 **Ejemplo 2: Preparación de una composición bioconservante que comprende *L. bulgaricus* y *S. thermophilus***

Inicialmente se dispersaron 0,75 g de almidón de yuca en 250 ml de agua esterilizada (solución al 0,3 %) y la dispersión que se obtuvo se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 76 °C +/- 2. Subsecuentemente, 0,62 g (aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC) de bacterias de ácido láctico liofilizadas de una mezcla de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en una relación de 1:1, que se obtuvieron de acuerdo con el Ejemplo 1 se tomaron y se agregaron en 10 ml de dispersión estéril que comprende almidón de yuca para obtener una composición bioconservante.

**Ejemplo 3: Cooperación entre *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus***

25 La relación de cooperación entre *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* se estudió de la siguiente manera.

Obtención de la equivalencia en UFC a partir del cultivo comercial. Se obtuvieron cepas de microorganismos de fuentes disponibles comercialmente (SACCO Lyofast Y 450 B x 5 UC). El cultivo comercial viene en una presentación de 5 gramos. Para obtener una concentración en UFC del cultivo comercial, se tomaron 2,5 gramos y 5 gramos y se prepararon diluciones de  $10^5$  y  $10^6$  en agua destilada estéril. Estas diluciones se sembraron mediante el uso de la técnica de vertido en placa en agar MRS, por triplicado, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de cada una de las placas de Petri y se promediaron los resultados para conocer la relación entre gramos de cultivo comercialmente disponible y la cantidad de UFC. Después de la adaptación, siembra e incubación del cultivo comercial, se realizaron diluciones.

Después de la incubación, se realizó un recuento de las UFC que crecieron en cada una de las concentraciones probadas. Los resultados se informan en la siguiente tabla.

Tabla 9: Equivalencia de UFC de un cultivo disponible comercialmente

Dilución	Cantidad de cultivo comercial	Promedio de recuento de UFC de LAB
$10^5$	2,5 g de cultivo comercial	$9,9 \times 10^5$ UFC
$10^6$	2,5 g de cultivo comercial	$28,1 \times 10^6$ UFC
$10^5$	5 g de cultivo comercial	$56 \times 10^5$ UFC
$10^6$	5 g de cultivo comercial	$56,2 \times 10^6$ UFC

Formulación de concentraciones del bioconservantes, determinación del crecimiento y utilización del sustrato. Se inocularon  $3,9 \times 10^6$  UFC/ml en 10 ml de solución de almidón al 0,1 % (que se preparó mediante el uso de 0,2 g de almidón de yuca en 200 ml de agua destilada estéril, en lo sucesivo bioconservante B). Además, se inocularon  $9,9 \times 10^6$  UFC en 10 ml de solución de almidón al 1 % (en adelante, bioconservante A). Los bioconservantes A y B se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

A continuación, se realizaron análisis de las características de viabilidad y crecimiento (cooperación) en un bioconservante de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Después de 24 horas de incubación de un consorcio de bacterias que comprende *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (en una relación de 1:1), se realizaron pruebas para determinar las características de crecimiento del consorcio, el uso del almidón como sustrato y la morfología de las bacterias presentes en el bioconservante. Las pruebas realizadas incluyeron determinación de pH, de acuerdo con el método 981,12 de la AOAC (Asociación de químicos analíticos oficiales - AOAC) (1990), recuento bacteriano, (de acuerdo con el método de

recuento en placa), consumo de sustrato mediante determinación de azúcares reductores (método DNS del ácido 3,5 dinitrosalicílico), producción de ácido láctico de acuerdo con el método 947,05 de A.O.A.C. (1990) y tinción de Gram.

Tabla 10: UFC en el cultivo comercial

Bioconservante	Cantidad de cultivo comercial	UFC de LAB	Cantidad de solución de almidón al 0,1 %	DNS	pH
Bioconservante A	0,62 g de cultivo comercial	$9,9 \times 10^6$ UFC	10 ml	43.23	5,78
Bioconservante B	0,35 g de cultivo comercial	$3,9 \times 10^6$ UFC	10 ml	22.65	5,49

5

10

15 Después de la tinción de Gram, se observaron bacilos grampositivos y cocos agrupados en hileras, en una relación de 1:1. El bioconservante A fue capaz de adaptarse eficientemente al sustrato, pudiendo desplegarlo y asimilarlo como fuente de carbono. Este resultado se refleja en la mayor concentración de azúcares reducidos en la prueba de DNS. Los hallazgos anteriores indican que el bioconservante A tiene una formulación óptima.

20 *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* se usan tradicionalmente en alimentos fermentados. Estas dos especies interactúan en un crecimiento que promueve el beneficio mutuo a través del intercambio de metabolitos, un proceso conocido como cooperación.

25 El agente activador seleccionado para su uso en el bioconservante de la presente invención soporta la sinergia entre las bacterias heterofermentativas y homofermentativas en el consorcio de bacterias. El consorcio de bacterias en el bioconservante de la presente invención generalmente tiene las siguientes fases de crecimiento. Primero, hay una fase adaptativa (fase estacionaria) durante la cual no se producen ácido láctico, ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y exopolisacáridos (o se producen en cantidades insignificantes). Después de la fase adaptativa, hay una fase de crecimiento, donde el ácido láctico, ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y los exopolisacáridos se producen por el consorcio de bacterias. Es durante la fase de crecimiento que se produce la mayor parte del ácido láctico, principalmente por las bacterias homofermentativas (por ejemplo, *Lactobacillus*). El número de bacterias en el consorcio aumenta rápidamente durante esta fase (por ejemplo, de  $8 \times 10^2$  hasta  $1,6 \times 10^6$ ). La Tabla 11 más abajo muestra las cantidades de ácido láctico, ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y exopolisacáridos que se producen por el consorcio de bacterias durante la fase de crecimiento. La última fase es la fase estacionaria durante la cual el crecimiento bacteriano se ralentiza o se estanca significativamente. Durante esta fase, el ácido láctico, el ácido fórmico, el CO<sub>2</sub> y los exopolisacáridos que se producen por el consorcio de bacterias continúan acumulándose en el medio.

35

40 La Tabla 11 más abajo muestra un ejemplo de cinética de crecimiento bacteriano (fases de crecimiento) mediante el uso del bioconservante A descrito anteriormente.

Tabla 11: Cinética de crecimiento bacteriano del bioconservante A

Fases de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i>	Tiempo (h)		Ácido láctico (%)		Ácido fórmico (%)		CO <sub>2</sub> (%)		pH		EPS* (%)		UFC	
	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx
<b>Adaptación</b>	1	5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	5,3	5,4	NO	NO	8,00E + 00	9,00E + 01
<b>Crecimiento</b>	48	96	0,3	0,4	0,2	0,3	1	2	5,5	5,7	2	3	8,00E + 02	1,60E + 06
<b>Estacionario</b>	96	144	0,7	0,12	0,3	0,5	3	5	5,19	5,22	4	7	1,80E + 06	2,60E + 07

\* exopolisacáridos

*Streptococcus* (una LAB heterofermentativa) crece primero en el medio de crecimiento y produce ácido fórmico, ácido pirúvico y dióxido de carbono (Figura 2), los cuales son metabolitos necesarios para el crecimiento de *Lactobacillus*. *Lactobacillus*, a su vez expresa proteasas extracelulares en presencia de alimentos (fuentes de energía) que contienen aminoácidos y proteínas. En este proceso se liberan pequeños péptidos que se metabolizan de péptidos a aminoácidos, lo que permite que *Streptococcus* continúe su crecimiento en el medio. La expresión de: lactato deshidrogenasa (LDH), fructosa fosfato quinasa (PFK), piruvato quinasa (PK) y pirúvica deshidrogenasa (PDH) por *Lactobacillus*, le permite transformar múltiples sustratos en una fuente de energía para *Streptococcus*.

Esta relación de cooperación produce una competencia por el uso de fuentes de nitrógeno y carbono disponibles en el medio, lo que estimula la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Como resultado de este consorcio, sustancias bactericidas como el ácido láctico, ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y ácido pirúvico, los cuales inhiben efectivamente las bacterias patógenas presentes en materiales proteicos complejos tales como cerdo, pollo y embutidos, como se muestra en los Ejemplos 4 y 6 más abajo.

#### 15 **Ejemplo 4: Inhibición de E. coli O157: H7 en muestras de cerdo**

A una composición bioconservante que se obtuvo de acuerdo con el Ejemplo 2 se le realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de microorganismos en muestras de cerdo contaminadas con *E. coli* O157: H7. Los experimentos se realizaron de la siguiente manera. Preparación, aislamiento y verificación de *E. coli* O157: Cepa H7. La cepa de *E. coli* O157: H7 se suministra por el grupo de biotransformación de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). Para el control de la cepa se realizaron análisis bioquímicos, que se describen en el manual de procedimientos, diagnósticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 H: 7 producción de toxina Shiga a partir de alimentos Rivas y otros. (2008) También se realizó una prueba inmunocromatográfica comercial (NEOGEN Corporation) para confirmar el serotipo del microorganismo.

Preparación de una composición bioconservante. Se tomaron  $9,9 \times 10^6$  UFC del consorcio de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y se agregaron en tres tubos que contienen 10 ml de solución de almidón de yuca al 0,1 %. Los tubos que contienen el bioconservante se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Preparación de *E. coli* O157: H7. Cuatro colonias de *E. coli* O157: H7 se tomaron y se suspendieron en tres tubos que contienen 10 ml de solución salina normal al 0,85 %. Esta solución contenía  $1 \times 10^8$  UFC de *E. coli* O157: H7. La concentración de *E. coli* se confirmó con un turbidímetro serie 100Q/2100QIS de Hach™. Los tubos que comprenden la suspensión del patógeno se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Preparación de las muestras de cerdo. Se prepararon tres contenedores de vidrio completamente estériles. En cada contenedor se agregaron 45 g de carne de cerdo molida y 190 ml de agua destilada.

Adición de microorganismos patógenos. Las muestras de cerdo se contaminaron al agregar el contenido de tubos previamente preparados con la cepa patógena de *E. coli* O157: H7, a cada contenedor (un tubo por contenedor). Los contenedores que comprenden las muestras de cerdo contaminadas (así como también las muestras de control) se llevaron a refrigeración a 4 °C durante 1 hora.

Adición de bioconservante. Los contenedores contaminados se retiraron del frigorífico, tras lo cual se agregaron dos tubos que contienen el bioconservante previamente formulado, un tubo por contenedor. A continuación, los contenedores se refrigeraron a 4 °C durante 144 horas. Se usó una muestra contaminada que no comprende bioconservantes como referencia para el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en la muestra de cerdo.

Mediciones. Se tomaron muestras cada hora para determinación de pH, de acuerdo con el método 981,12 de la AOAC (1990), recuento de BAL (de acuerdo con el método de recuento en placa), consumo de sustrato mediante determinación de azúcares reductores (método DNS ácido 3,5-dinitrosalicílico) y prueba inmunocromatográfica comercial para *E. coli* O157: H7.

La composición bioconservante inhibió el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en muestras de carne de cerdo con una concentración de  $1 \times 10^2$  UFC de dosis infecciosa del agente patógeno. Como se ilustra en la Figura 9, una disminución en el número de células de *E. coli* se observa dentro de las 24 a 72 horas. Después de 72 horas, la disminución en la concentración de patógeno es notoria gracias a un aumento en la producción de sustancias antimicrobianas expuestas en los alimentos por el bioconservante durante su fase de crecimiento exponencial.

#### 60 **Ejemplo 5: Inhibición de Aspergillus flavus y Aspergillus niger en frutas y verduras**

También se probó el bioconservante A (ver Ejemplo 4) para determinar la inhibición de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* en maíz y aguacate.

El aguacate y el maíz se recolectaron en el municipio de Carmen de Bolívar, ubicado en el departamento de Bolívar, Colombia. En granjas productoras de aguacate y maíz, se recolectaron productos que tenían la siguiente apariencia

macroscópica: Aguacates con presencia de manchas negras, zonas suaves y mal olor. Maíz, con presencia de manchas verdes, textura terrosa, con o sin mal olor.

Después de haber seleccionado los aguacates, se realizó el aislamiento microbiológico retirando el tejido afectado de los aguacates y agregándolo en una solución de etanol al 70 % durante 5 minutos. A continuación, las muestras se dejaron secar sobre papel absorbente durante 2 minutos. Subsecuentemente, cada una de las muestras de tejido se colocaron en placas de Petri con Sabouraud Agar (Merck, Millipore) y se incubaron a temperatura ambiente. Transcurridas 48 horas, se realizó la lectura con el fin de obtener el estudio microscópico y macroscópico de *Aspergillus niger*.

Después de haber seleccionado el maíz afectado, se eliminó la mazorca y se rayaba cada maíz con ayuda de cuchillos esterilizados. Se depositaron diez gramos de estas muestras en bolsas Ziploc® etiquetadas como Muestra 1 a Muestra 12. Luego se maceraron en un mezclador de laboratorio Stomacher (BagMixer™, interscience) durante 60 segundos. Subsecuentemente, cada una de las muestras se colocó en tubos con tapón de rosca que contienen 90 ml de agua de peptona y luego se hicieron diluciones seriadas de 10<sup>1</sup> a 10<sup>8</sup>. Estas diluciones se sembraron en placas de Petri con agar patata (Merck, Millipore) y subsecuentemente se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Pasado este tiempo, se encontraron las cepas micóticas con características de crecimiento de *Aspergillus flavus*. A partir del crecimiento obtenido se realizó una tinción con azul de lactofenol para la identificación microscópica del hongo. Se observó que las estructuras compatibles con *Aspergillus flavus* estuvieron presentes.

Preparación de suspensión de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. Este paso fue necesario para determinar la concentración de hongos. Brevemente, se tomaron ocho (8) tubos de ensayo estériles con 9 ml de agua destilada, cada uno se marcó con su respectiva dilución de 10<sup>1</sup>- 10<sup>8</sup>. Una pequeña parte del cultivo de *Aspergillus niger* luego se tomó y se introdujo en el primer tubo de ensayo. Inmediatamente se homogeneizó y de cada tubo se extrajo 1 ml hasta obtener una dilución de 10<sup>8</sup>. Con esta dilución, se realizó la siembra en 10 placas petri de agar Sabouraud. Este mismo procedimiento se realizó con las muestras de maíz para *Aspergillus flavus* en agar patata. Todas las muestras tenían una concentración inicial de 1 x 10<sup>8</sup> UFC. Las placas de Petri se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas.

Se tomaron por separado, 10 placas de Petri de *Aspergillus niger* a 1 x 10<sup>8</sup> UFC y 10 placas de Petri de *Aspergillus flavus* a 1 x 10<sup>8</sup> UFC y se incubaron en las mismas condiciones que las anteriores como control para el crecimiento del hongo.

Aplicación del bioconservante.

Primero, se hicieron tiras de papel secante. Subsecuentemente, cada tira se sumergió en tubos que comprendían el bioconservante como se describe en el Ejemplo 4. Las tiras se depositaron en placas de Petri de Agar Sabouraud previamente sembradas con el hongo. En cada placa de Petri, se depositaron dos bandas en el sentido de las manecillas del reloj, marcando las 6 en punto. Este método fue descrito por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, también conocido como Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), Estándares. 1997. Método de referencia para la dilución en caldo de prueba de susceptibilidad antifúngica de levaduras. M-27A. Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico, Villanova, Pensilvania).

Se contó el número de colonias presentes en cada una de las placas de Petri, en las que se aplicó el bioconservante. A partir de estos datos, se calculó un promedio.

El bioconservante logró la inhibición de hongos que contaminan aguacates y maíz como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. Los hallazgos de la invención confirman que el bioconservante puede detener el crecimiento de los hongos antes mencionados, después de 24 horas de aplicación del bioconservante.

Tabla 12: Inhibición de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* en maíz y aguacate (variedad Haas) mediante el uso de una composición bioconservante como se describe en el Ejemplo 4. Por favor, consulte la tabla.

Hongos	con bioconservante		Sin bioconservantes	
	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)
<i>Aspergillus flavus</i> en maíz	1,00E + 08	1,00E + 05	1,00E + 08	1,00E + 11
<i>Aspergillus niger</i> en aguacate	1,00E + 08	1,00E + 06	1,00E + 08	1,00E + 09

Se demostró que el bioconservante inhibe eficientemente el crecimiento de los hongos (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*) que contaminan frutas y verduras como el maíz y el aguacate. El bioconservante detuvo el crecimiento de hongos, después de 24 horas de aplicación del bioconservante.

**Ejemplo 6: Inhibición de microorganismos patógenos en muestras de cerdo, pollo y embutidos**

Los ensayos de inhibición del crecimiento en muestras de cerdo, pollo y embutidos se realizaron mediante el uso de una composición bioconservante que se obtuvo de acuerdo con el Ejemplo 2 (1:1 *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*: *S. thermophilus*). Las muestras estaban contaminadas con  $1 \times 10^8$  UFC de *E. coli* O157: H7 o  $1 \times 10^3$  UFC de *E. coli* (*Enteropatógeno*, extraído de carne de vaca contaminada),  $1 \times 10^5$  UFC de *Staphylococcus aureus*,  $1 \times 10^6$  UFC de *Salmonella* o  $1 \times 10^9$  UFC de *Listeria monocytogenes*.

Preparación del bioconservante. Para esta prueba se prepararon tres tubos con bioconservante, que comprendían 10 ml de solución de almidón al 0,1 % y 0,62 g de cultivo comercial (SACCO Lyofast™ Y 450B x 5 UC). Cada uno de los tubos se selló y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Después de 24 horas se realizó una tinción de Gram para verificar la presencia de las dos características morfológicas del consorcio (Cocci y bacilos Gram positivos), en una relación de 1:1. Los tubos con bioconservantes se sumergieron en un tanque con nitrógeno líquido, con el fin de congelar todo el contenido de los tubos. Después de la etapa de congelación, se liofilizaron los tubos con bioconservante, mediante el uso de un liofilizador LABCONCO con las siguientes condiciones; Temperatura -45 °C, vac: 0,021, tiempo 27 horas. Como resultado de este proceso, se obtuvo el bioconservante en polvo y se mantuvo a -1 °C, hasta su uso.

Preparación de microorganismos patógenos. Las cepas patógenas se suministraron por el grupo de investigación en biotransformación de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). Se probó la inhibición del crecimiento de los siguientes patógenos: *E. coli* enterotoxigénica, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157H: 7. Para la preparación de los microorganismos se realizó la siembra en medios selectivos para cada género. Luego se tomaron colonias representativas de tamaño medio y se sumergieron en tubos con solución salina al 0,85 %. Para cada microorganismo se prepararon cuatro (4) tubos. Para cada microorganismo, la concentración seleccionada fue la dosis mínima a la que el patógeno puede causar una enfermedad en el huésped. Las concentraciones fueron las siguientes; *E. coli* enterotoxigénica  $1 \times 10^3$  UFC, *Staphylococcus aureus*  $1 \times 10^5$  UFC, *Salmonella spp*  $1 \times 10^6$  UFC, *Listeria monocytogenes*  $1 \times 10^9$  UFC y *E. coli* O157H: 7  $1 \times 10^8$  UFC. La concentración de cada patógeno se midió por turbidimetría mediante el uso de un turbidímetro serie 100Q/2100QIS de Hach™. Todas las preparaciones de microorganismos patógenos se mantuvieron a -1 °C, hasta su uso.

Fuentes cárnicas. Las matrices de carne seleccionadas para este ensayo fueron cerdo, pollo y embutidos. Se compraron en un supermercado certificado. Con cada una de las matrices se realizaron formulaciones alimentarias adaptadas. Como sigue:

Cerdo. Se tomaron dos lomos de cerdo de 2 kg cada uno, se cortaron en piezas de 2 a 3 cm y se colocaron en bolsas Ziploc® galón/grandes. Posteriormente se maceraron hasta alcanzar un tamaño de grano de unos 4 a 5 milímetros. La maceración se realizó mediante el uso de un equipo stomacher de la marca (BagMixer™, Interscience) durante 15 minutos. Para obtener una pasta de cerdo más manejable, se agregaron 150 ml de agua estéril, luego de lo cual se inoculó una de las bolsas con el bioconservante y cada una de las bacterias patógenas. Después de esto, la bolsa se selló y se homogeneizó manualmente. En la segunda bolsa no se agregaron bacterias patógenas ni bioconservantes, como control. Las bolsas se dejaron refrigeradas en un frigorífico (Distrinordico) a 3,5 °C, durante 144 horas.

Pollo. Se cortaron dos pechugas de pollo deshuesadas, cada una con un peso de 2 kg, en piezas de 2 a 3 cm y se colocaron en bolsas Ziploc® galón/grandes. Posteriormente se maceraron hasta alcanzar un tamaño de grano de unos 4 a 5 milímetros. La maceración se realizó mediante el uso de un mezclador de laboratorio Stomacher (BagMixer™, Interscience) durante 15 minutos. Una de las bolsas se inoculó con el bioconservante y cada una de las bacterias patógenas. Después de esto, la bolsa se selló y se homogeneizó manualmente. En la segunda bolsa no se agregaron bacterias patógenas ni bioconservantes, como control. Las dos bolsas se dejaron refrigeradas en frigorífico (Distrinordico) a 3,5 °C durante 144 horas.

Embutidos. Se prepararon dos lotes de embutidos de 2 kg cada uno. Se sustituyó el uso de sal de nitro por la aplicación del bioconservante, que representa el 0,4 % de los ingredientes en cada una de las fórmulas. Se inoculó un lote con el bioconservante y cada una de las especies bacterianas patógenas, este proceso se realizó en la etapa de mezclado. Otro lote se dejó sin bioconservantes y sin bacterias patógenas como control. Para la producción de embutidos se siguieron las etapas básicas para la elaboración de un embutido crudo. Los embutidos se dejaron refrigerados en un frigorífico (Distrinordico) a 3,5 °C durante 144 horas.

Evaluación de microorganismos presentes en cerdo, pollo y embutidos. Se tomaron muestras cada hora de las diferentes formulaciones cárnicas durante 144 horas. En cada una de las muestras se evaluó la presencia de microorganismos patógenos inoculados, de acuerdo con el método descrito en el Manual of Analytical Bacteriology of the Food and Drug Administration (FDA) (Hitchins, 1995), con variaciones en la detección de *E. coli* O157: H7, el cual se realizó con la prueba inmunocromatográfica (NEOGEN Corporation) descrita en el Ejemplo 4.

Las bacterias de ácido láctico presentes en el bioconservante se midieron mediante el uso del método de evaluación de viabilidad de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* como bioconservante descrito en el Ejemplo 1. Ver los resultados en la Figura 3.

Como se muestra en la Tabla 13 más abajo, el bioconservante inhibió efectivamente el crecimiento de bacterias patógenas en todas las muestras analizadas. Como en el Ejemplo 5, se observa una disminución de bacterias patógenas dentro de unas horas. Después de 48 horas, se logró la descontaminación completa de los patógenos, gracias a un aumento en la producción de sustancias antimicrobianas expuestas en los alimentos por el bioconservante durante su fase de crecimiento exponencial.

Tabla 13: Inhibición de bacterias patógenas mediante el uso de una composición bioconservante que comprende *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (1:1) en una solución de almidón al 0,1 %.

Bacteria patógena	24 h		48 h	
	Sin bioconservantes	Con bioconservante	Sin bioconservantes	Con bioconservante
<i>E. coli</i> ( <i>Enteropatógena</i> , extraído de carne de vaca contaminada)	75 %	0 %	75 %	0 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 %	0 %	0 %	0 %
<i>Salmonella</i>	50 %	12 %	40 %	0 %
<i>Listeria monocytogenes</i>	100 %	20 %	100 %	0 %
<i>E. coli</i> O157 H: 7	30 %	10 %	40 %	0 %

#### Ejemplo 7: Fuentes de carbono como agentes activadores

Se probaron varios sustratos (almidón de yuca, xilitol, glucosa y peptona) como fuentes de carbono para un consorcio de bacterias que comprende *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (en una relación de 1:1) se prepararon en Erlenmeyers de la siguiente manera: soluciones de xilitol al 1,5 % (p/v), glucosa al 1,0 % (p/v), 0,1 % (p/v) de almidón de yuca y 1,2 % (p/v) de peptona en 250 ml de agua estéril. A continuación, se agregaron a cada Erlenmeyer 10 ml del bioconservante líquido descrito en el Ejemplo 4. Se tomaron muestras cada hora para analizar el crecimiento del bioconservante en las fuentes de carbono, mediante la aplicación del método de recuento en placa. Los resultados se presentan en la Figura 4A y B.

Xilitol, C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>OR<sub>5</sub>, es un alcohol de azúcar de cinco carbonos. Puede usarse por ciertas bacterias homofermentativas como *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus*, gracias al empaque enzimático que posee, el cual es capaz de reducir el xilitol a D-xilulosa (una D-cetosa que pertenece a la serie de monosacáridos de 5 átomos de carbono). Como se muestra en la Figura 4A, la activación metabólica del consorcio es posible mediante el uso de xilitol como fuente de carbono. De hecho, el consorcio de bacterias demostró tener un desarrollo óptimo en cada una de sus etapas de crecimiento (Figura 4A).

El almidón de yuca es una molécula compleja y cerrada, compuesta por dos monómeros de glucosa: amilosa y amilopectina. Se caracteriza por una estructura de pando helicoidal tridimensional del polímero en el enlace β (1-4). La amilopectina tiene en su estructura entre 2000 y 200 000 unidades de glucosa (ver la estructura en la Figura 5). La amilosa tiene entre 300 y 350 unidades de glucosa.

Como se muestra en la Figura 4A, la adaptación del consorcio de bacterias al almidón de yuca fue muy efectiva. El almidón de yuca se reconoció rápidamente como una fuente primaria de energía y promovió la activación metabólica, mediante el uso de la glucosa requerida para cada una de las fases de crecimiento. El uso de almidón de yuca condujo a un aumento en la velocidad de adaptación del consorcio en el alimento y a la expresión de metabolitos primarios y secundarios, de esta manera se mantiene la actividad metabólica del consorcio de forma rápida y durante un período de tiempo más prolongado.

Como se muestra en la Figura 4A, la primera fase de crecimiento es más lenta cuando se usa almidón como fuente de carbono que cuando se usa xilitol. Tal efecto puede deberse al hecho de que, para acceder a la glucosa disponible en el almidón, el consorcio de bacterias debe primero abrir la estructura mediante la escisión de los enlaces (dejando disponible la fuente de carbono para su metabolismo). Sin embargo, una vez que se accede a la glucosa, la activación metabólica se vuelve muy efectiva.

Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>OR<sub>6</sub>) es una molécula abierta de 6 carbonos, la cual es directamente accesible y rápidamente metabolizada por el consorcio de bacterias en la primera fase de crecimiento. Como se muestra en la Figura 4B, el consorcio metaboliza rápidamente la glucosa y no puede mantener su crecimiento en una segunda fase de crecimiento (no se produce cooperación entre las bacterias del consorcio). La cantidad de células bacterianas en el consorcio comenzó a disminuir rápidamente dentro de 10-12 horas y llegó a la muerte dentro de las 48 horas. Estos resultados muestran que la glucosa no soporta el comportamiento sinérgico del consorcio ya que no puede sostener una segunda fase de crecimiento como se muestra, por ejemplo, para el almidón.

Se esperan resultados que corresponden con la dextrosa ( $C_6H_{12}OR_6$ , el isómero D o glucosa) porque, al igual que la glucosa, tiene una estructura completamente abierta, lo que la hace fácilmente disponible para un uso rápido por parte de las bacterias.

- 5 La peptona es rica en proteínas y, por lo tanto, comprende menos carbohidratos que el almidón u otras fuentes de carbono. Como consecuencia, el crecimiento del consorcio de bacterias mediante el uso de dicha fuente de energía fue lento, retrasando a 16 horas la etapa de adaptación del consorcio (Figura 4B). De ello se deduce que la producción de metabolitos primarios comenzó aproximadamente 24 horas después de la aplicación del bioconservante. Estos resultados indican que la peptona no es un buen sustrato para el consorcio, porque las bacterias patógenas tendrían  
10 demasiado tiempo para crecer antes de ser destruidas por los metabolitos secundarios en la segunda fase de crecimiento.

### Ejemplo 8: Cáscaras de ñame y plátano como agentes activadores

- 15 También se ensayaron cáscaras de ñame y plátano como agentes activadores para el consorcio de la presente invención.

Brevemente, se pelaron 1,34 kg de la variedad de ñame *D. rotundata.*, luego se lavaron con una solución de amoníaco 1 M para eliminar el residuo mucilaginoso del tubérculo. Luego se cortaron en piezas de 3 a 5 cm, para  
20 subsecuentemente ser procesados en un procesador de alimentos (black and decker), durante 5 a 10 minutos. Seguido a esto, se llevó a cabo el secado en un horno BRINDER a 300 °C, durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se trituraron (molino manual IMUSA), para obtener partículas más pequeñas y una textura de polvo. El almidón de ñame se empacó en bolsas Ziploc™ (Método descrito por Azturizaga y otros 2008).

- 25 Se prepararon tres soluciones de ñame, mediante el uso de una enzima amiloglucosidasa comercial, que se agregó a tres Erlenmeyer que contienen 3 g de almidón de ñame en 250 ml de agua estéril (una solución al 0,3 %). El volumen de enzima que se aplicó es como sigue: 10,5 ml, 13,5 ml y 15 ml.

30 Antes de esto, cada Erlenmeyer se inoculó con el bioconservante, que se preparó como se indica en el Ejemplo 4 y se analizó el crecimiento del consorcio de bacterias en presencia de almidón de ñame.

Además, se prepararon y probaron extractos de cáscaras de plátano (plátano verde) como fuente de carbono para el consorcio de la siguiente manera.

- 35 Brevemente, se usaron 4 kg de cáscaras de plátano (cáscaras) contenidas en bolsas Ziploc™ con fines de conservación y se almacenaron en refrigeración mediante el uso de un frigorífero Samsung a una temperatura de 18 °C. Las cáscaras de plátano se lavaron con solución desinfectante Pursue™ y se cocinaron a una temperatura de 100 °C durante 45 minutos. Luego se cortaron en piezas pequeñas de aproximadamente 2 x 2 cm y se trituraron en  
40 un procesador Black and Decker durante 5 minutos. De lo anterior se obtuvo un sustrato de cáscara de plátano, del cual se pesaron 45 gramos y se agregaron a tres (3) contenedores de 300 ml de agua destilada estéril para obtener una concentración del 15 % (p/v).

45 Estos contenedores con sustratos se esterilizaron en autoclave. A los sustratos preparados y estériles se agregaron 6 ml de enzima xilanasa. Los sustratos se dejaron reposar durante un tiempo de 3 horas. (Procedimiento descrito por Green Vineyards M y otros, 2012). En la Figura se muestra una descripción general del proceso usado para preparar almidón a partir de cáscaras de plátano (también denominadas cáscaras). 8.

- 50 Se estudió el efecto del extracto de cáscara de plátano (15 %) sobre el crecimiento de un consorcio de bacterias que comprende *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (1:1,  $9,9 \times 10^6$  UFC). Se tomaron muestras durante 84 horas y se contaron las bacterias de ácido láctico. La tinción de Gram confirmó la presencia de bacilos y cocos gram positivos en una relación de 1:1.

55 Los resultados para el uso de ñame como fuente de carbono se presentan en la Figura 6. Los resultados para el uso de un extracto de cáscara de plátano como fuente de carbono se presentan en la Figura 7.

- Tomados en conjunto, los estudios de los solicitantes han demostrado que los tipos de almidón que usa preferentemente el consorcio de bacterias de la presente invención tienen un contenido de amilosa superior o igual al 17 % (p/p) o un contenido de amilopectina inferior o igual al 83 % (p/p) en una relación de 17:83 de amilosa: amilopectina, pero que preferentemente no excede una relación de 24:76 de amilosa: amilopectina.  
60

### Ejemplo 9: Características organolépticas de los productos alimenticios

- 65 Para determinar el efecto del bioconservante sobre el sabor de los embutidos, se realizó una prueba de aceptación con un panel de 50 individuos no entrenados. Luego de 144 horas de incubación de los embutidos con o sin bioconservante, los embutidos se cocinaron durante 7 minutos en una sartén a 37 °C +/- 2, (ver Anzaldúa, 1998, León y otros, 2006).

Los probadores primero probaron los embutidos que no contenían el bioconservante, después de lo cual tomaron 10 ml de agua, antes de continuar con los embutidos que contenían el bioconservante.

5 Cada persona evaluó los atributos de color, sabor y textura mediante el uso de una escala hedónica de nueve puntos con los extremos 9 "muy agradables" y 1 "muy desagradables". Todos los resultados se registraron en un formato de respuestas que luego se tabularon para su análisis.

Tabla 14: Impresión del consumidor de productos alimenticios que comprenden un bioconservante como se describe en el Ejemplo 6

	con bioconservante	Sin bioconservantes
10 <b>COLOR</b>	72 %	72 %
<b>TEXTURA</b>	87 %	75 %
15 <b>SABOR</b>	98 %	77 %

Se cree que las mejoras en la textura y el sabor informadas después de las pruebas con consumidores se deben a la secreción por *Lactobacillus* de concentraciones moderadas de acetaldehídos, debido a la acción de *Streptococcus*. Los acetaldehídos mejoraron las características organolépticas de los alimentos, como el sabor y el aroma. Como se muestra anteriormente, en productos cárnicos tratados con un bioconservante como se describe en el Ejemplo 6, la aceptación del consumidor fue cercana al 100 %.

Referencias

25 1. Ricardo Adolfo Parra Huertas. Revisar. Lactic acid bacteria: functional role in food. Facultad de Ciencias Agrarias. Vol. 8 No 1. Enero- Julio de 2010.

30 2. Samaniego Fernández, Sosa del Castillo. Lactobacillus spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservante. Centro de estudios biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba;

35 3. Meneses, Corrales y Valencia. 2007. Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir de almidón de yuca. Escuela de Ingeniería. Revista EIA ISSN 1794-1237 No 8 p57-57 diciembre 2007.

40 4. Comunicación corta: Effect of oxygen on symbiosis between Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus, H. Horiuchi and Y. Sasaki) American Dairy Science Association (2012).

45 5. Asturizaga Avilez, Yajaira y Bocanegra Amaya, Carmen. Evaluation of yields in the process of obtaining alcohol from yam flour (*Dioscorea Bulbifera*, Trífida) by enzymatic route. Sincelejo. Universidad de Sucre. Facultad de Ciencias y Educación. Programa de Biología, 2008. p. 108.

50 6. Green Vineyards M, Bell García A, Michelena Alvarez G, Ramil Mesa M. Obtaining Bioethanol from Lignocellulosic Biomass ICIDCA. About Sugar Cane Derivatives [en línea] 2012, 46 (enero-abril).

55 7. Anzaldúa, A. (1998). Evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Editorial. Acibia SA Zaragoza, España. P. 214. Sensory evaluation of food in theory and practice. Editorial. Acibia SA Zaragoza España.

8. León V, Totosaus A, Guerrero, I, Pérez, M (2006). Efecto de bacterias ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria. 5: (002)135-141.

9. Viloche Bazán Juan, Tito Vargas. (2007). Aislamiento de Lactobacillus nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. Revista Ciencia y Desarrollo, COIN-UNJBG. No 11. Pág. 61-66. [online] Isolation of native Lactobacillus from fermentation products in the city of Tacna. Science and Development Magazine.

60 10. Rivas, Marta. Leotta, Gerardo. (2008) Manual de Procedimientos. Diagnóstico y caracterización de Escherichia coli 0157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Chinen, Isabel. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia de la OMS Global Salm Surv para América del Sur. P147.

65 11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997 (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M-27A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

12. Official Methods of analysis. (1990). edición 15 Editado por Kenneth Helrich, publicado por la Asociación de químicos analíticos oficiales, Inc. Suite 400 2200 Wilso Boulevard, Arlington. Virginia 2201, Estados Unidos.

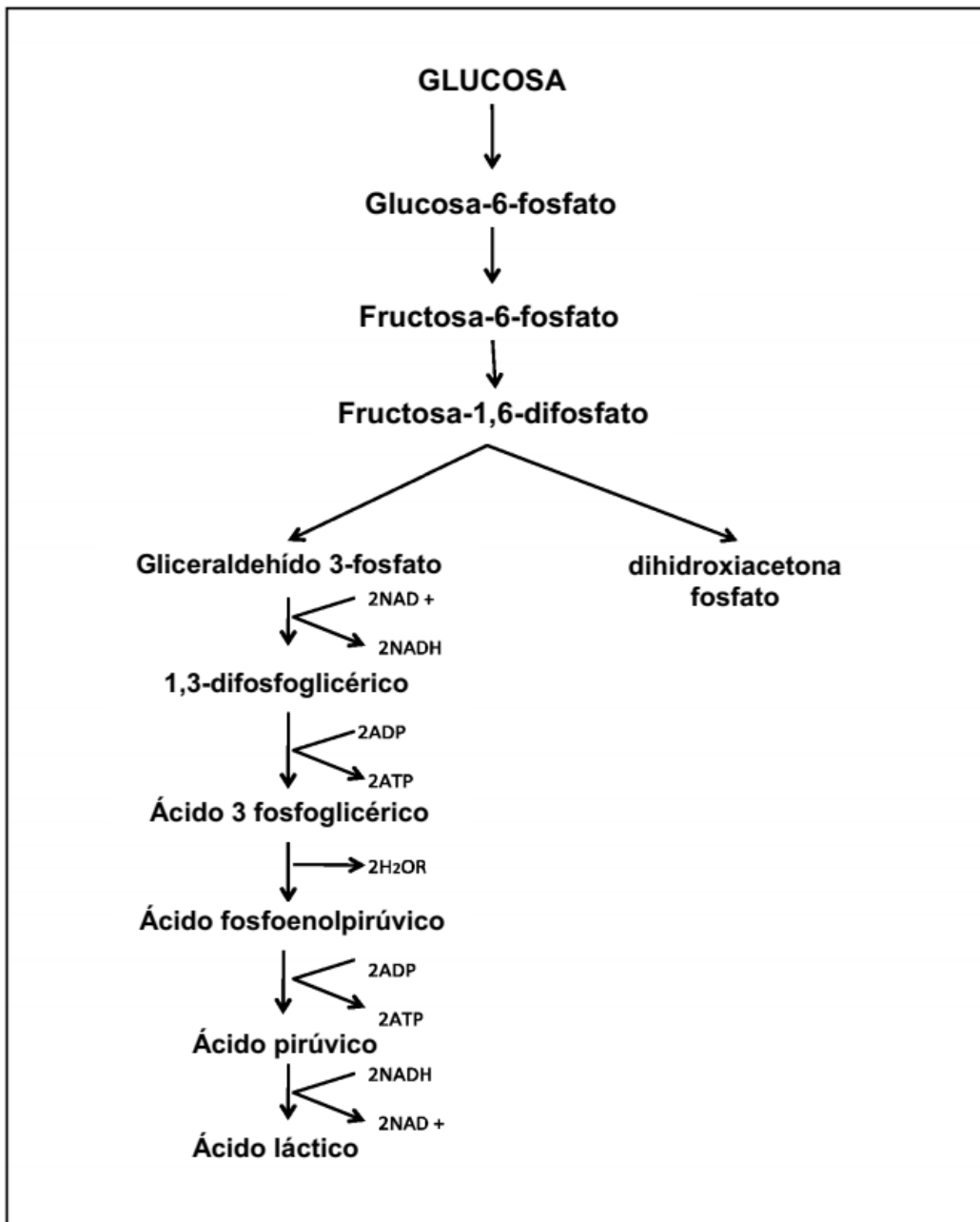
## REIVINDICACIONES

1. Una composición bioconservante de alimentos que comprende (i) un consorcio de bacterias de ácido láctico que comprende al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico; y (ii) un agente activador, en donde el agente activador es almidón, un carbohidrato que tiene de 3 a 5 átomos de carbono o comprende un fructooligosacárido y está tanto en forma sólida, en solución o dispersión en una concentración de entre 0,001 % y 20,0 % (p/p) en la composición, y en donde
- (a) la bacteria homofermentativa de ácido láctico es *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *leichmannii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus yamanashiensis* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas; y/o
- (b) la bacteria heterofermentativa es *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas.
2. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- (i) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:1);
- (ii) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (2:1);
- (iii) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:2);
- (iv) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico es una bacteria probiótica de ácido láctico; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico están en una relación (1:3).
3. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende además al menos una bacteria probiótica de ácido láctico, y en donde:
- (i) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico comprende al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria probiótica de ácido láctico están en una relación (1:1:1);
- (ii) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico comprende al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y al menos una bacteria probiótica de ácido láctico están en una relación (1:2:1); o
- (iii) la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico comprende al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas; y la al menos una bacteria homofermentativa de ácido láctico que produce proteasas, la al menos una bacteria heterofermentativa de ácido láctico y la al menos una bacteria probiótica de ácido láctico están en una relación (1:3:1).
4. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la al menos una bacteria probiótica de ácido láctico es una bacteria homofermentativa de ácido láctico; o en donde la bacteria probiótica de ácido láctico es *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sake*, *Carnobacterium fish*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas, o es en particular *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sake*, *Carnobacterium fish*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas.
5. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde (a) la bacteria homofermentativa de ácido láctico es *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *leichmannii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus yamanashiensis* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas; y (b) la bacteria heterofermentativa es *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* o cualquier combinación de al menos dos de las mismas; y/o (c) el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende *Lactobacillus delbrueckii* subesp.

*bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y en particular el consorcio de bacterias de ácido láctico comprende además *Bifidobacteria*; o el consorcio de bacterias de ácido láctico consiste en *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, en donde más particularmente el consorcio de bacterias de ácido láctico consiste en *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una relación de 1:1.

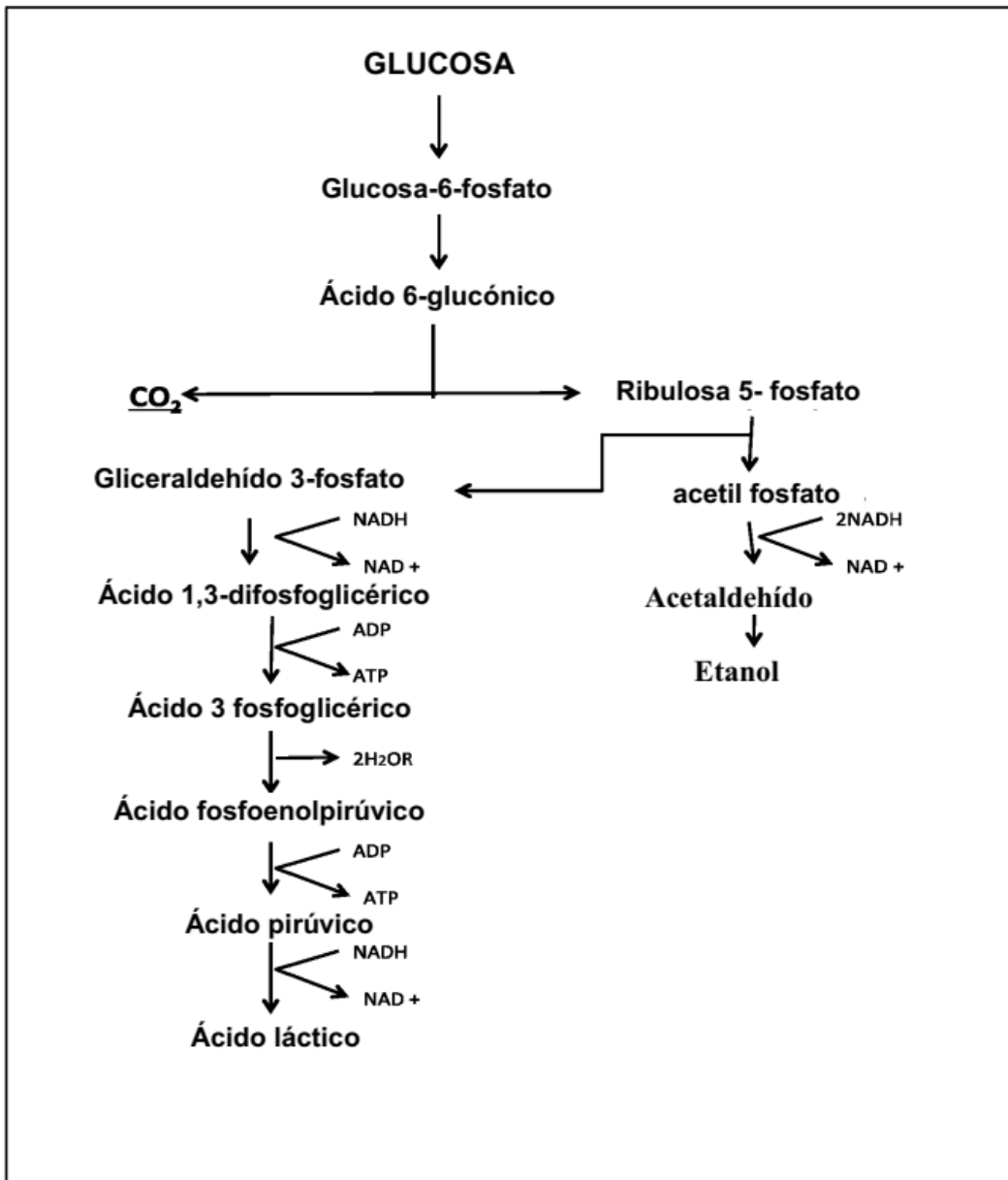
- 5
6. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la concentración de cada especie bacteriana del consorcio de bacterias de ácido láctico en la composición está entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml; y/o en donde la concentración total de bacterias del consorcio de bacterias de ácido láctico en la composición está entre aproximadamente  $2 \times 10^4$  y aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/ml o entre aproximadamente  $3,9 \times 10^6$  y aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC/ml o es aproximadamente  $9,9 \times 10^6$  UFC/ml.
- 10
7. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente activador comprende almidón, en particular en donde el almidón
- 15
- (i) es almidón de patata, almidón de ñame, almidón de yuca, almidón de arroz, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de plátano o cualquier combinación de al menos dos de los mismos, y en particular es almidón de yuca, almidón de ñame o una combinación de los mismos; y/o
- 20
- (ii) (a) tiene un contenido de amilosa mayor o igual al 10 % (p/p); (b) tiene un contenido de amilopectina menor o igual al 90 % (p/p); o (c) tiene una relación de amilosa: amilopectina entre aproximadamente 17:83 y aproximadamente 24:76 (p/p).
8. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el almidón es (a) almidón de yuca y en donde la concentración del almidón de yuca en la composición está entre aproximadamente 0,05 % (p/v) y aproximadamente 1 % (p/v), en particular en donde la concentración del almidón de yuca en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 0,3 % (p/v); o
- 25
- (b) almidón de ñame y en donde la concentración del almidón de ñame en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v), en particular en donde la concentración del almidón de ñame en la composición es aproximadamente 0,3 % (p/v).
- 30
9. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente activador es un extracto de cáscaras de plátano y en donde la concentración del extracto en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 20 % (p/v), y en particular aproximadamente 15 % (p/v).
- 35
10. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente activador comprende (i) un carbohidrato que tiene de 3 a 5 átomos de carbono, en particular en donde el carbohidrato es xilitol, D-ribosa, D-arabinosa, D-lixosa, D-xilosa, D-treosa, D-eritrosa, D-ribulosa, D-xilulosa, D-eritrolulosa o cualquier combinación de al menos dos de los mismos; o (ii) un fructooligosacárido.
- 40
11. La composición bioconservante de alimentos 10, en donde la concentración de carbohidratos en la composición está entre aproximadamente 0,1 % (p/v) y aproximadamente 2 % (p/v), en particular en donde el carbohidrato es xilitol y la concentración de xilitol es aproximadamente 1,5 % (p/v).
- 45
12. La composición bioconservante de alimentos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición está en forma líquida o en forma liofilizada y, que, en particular, comprende además un vehículo.
- 50
13. Un kit para la preparación de una composición bioconservante de alimentos que comprende (i) el consorcio de bacterias de ácido láctico definido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y (ii) el agente activador definido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en particular, en donde el consorcio de bacterias de ácido láctico se proporciona en forma liofilizada.
- 55
14. Uso de la composición definida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o el kit definido en la reivindicación 13 (i) para aumentar la vida útil de alimentos o para tratar una superficie inanimada que entra en contacto con alimentos; o (ii) para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno en los alimentos o en una superficie inanimada que entra en contacto con los alimentos, en donde el microorganismo patógeno es en particular *E. coli*, *Salmonella spp*, *Listeria spp*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* o cualquier combinación de al menos dos de los mismos.
- 60
15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el kit de acuerdo con la reivindicación 13 o el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el alimento es (a) alimento fresco, en particular carne cruda, verdura o fruta fresca; (b) alimentos procesados y/o cocidos; o (iii) comida seca o húmeda para mascotas.

**Metabolismo de *Lactobacillus bulgaricus***



**Figura 1**

**Metabolismo de *Streptococcus thermophilus***



**Figura 2**

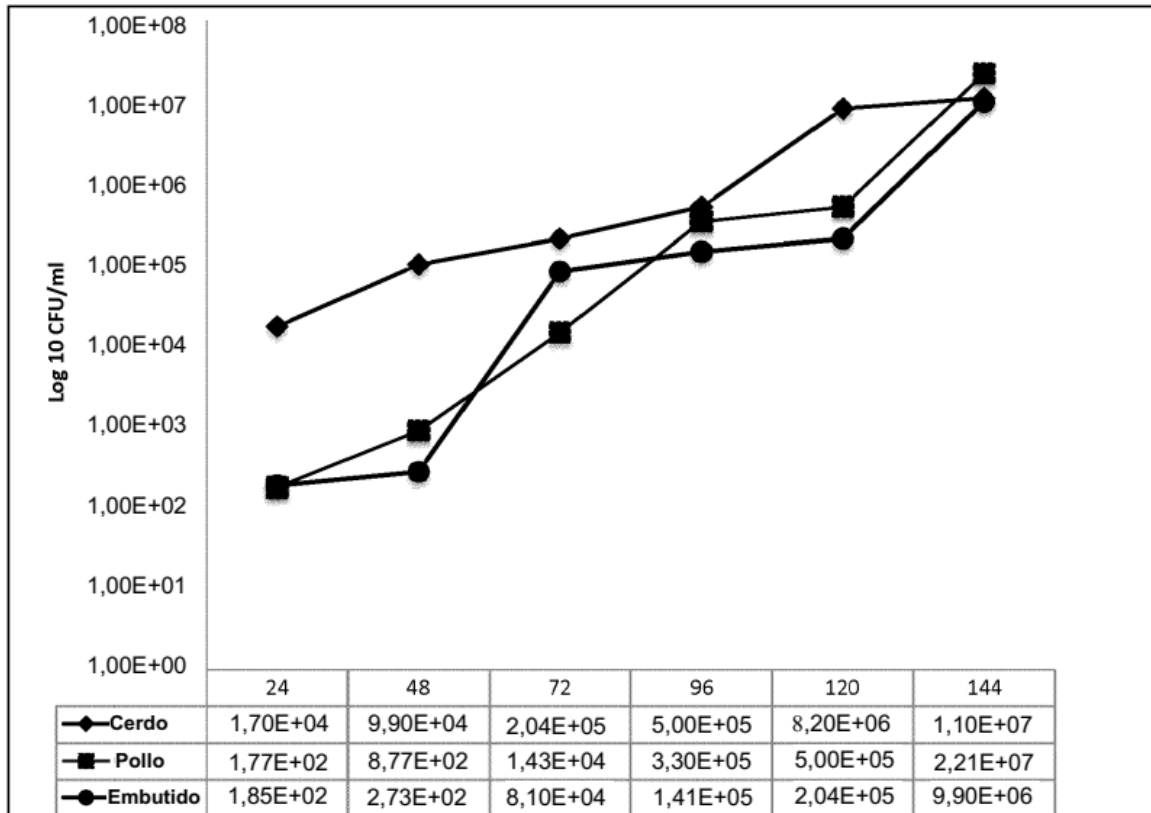


Figura 3

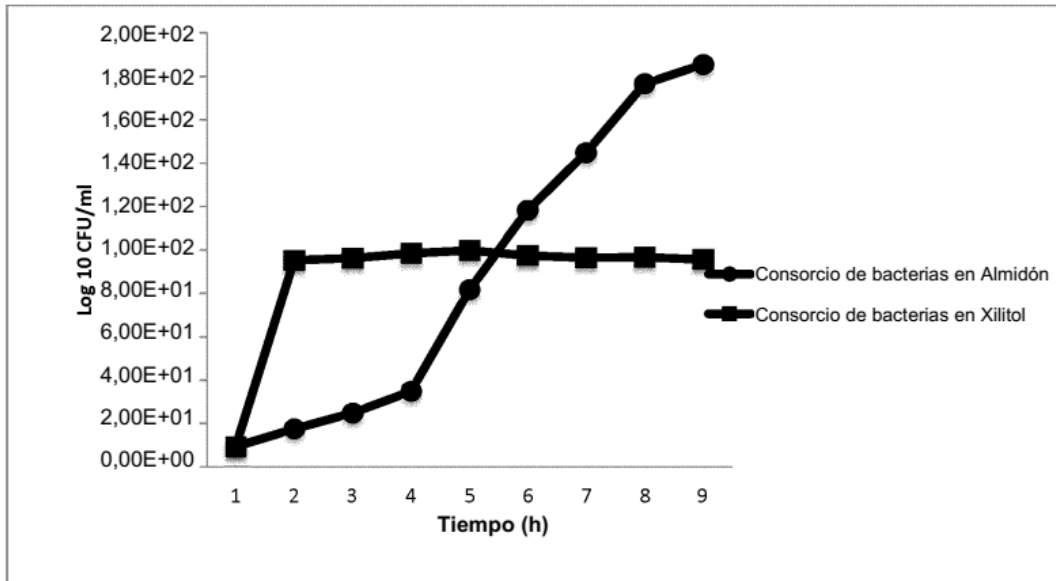


Figura 4A

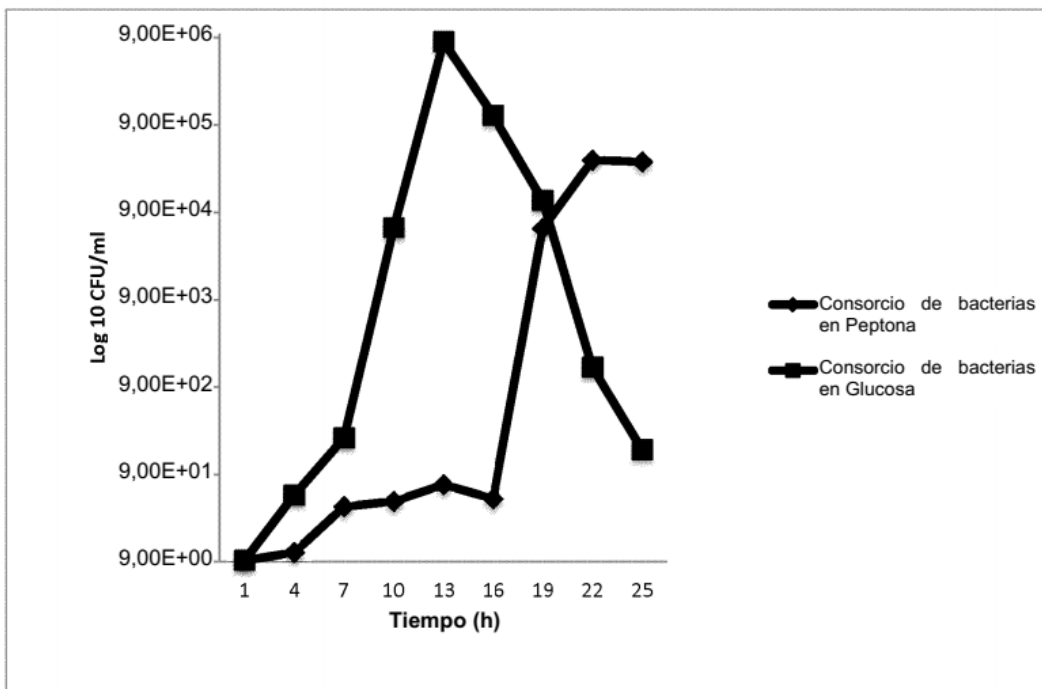


Figura 4B

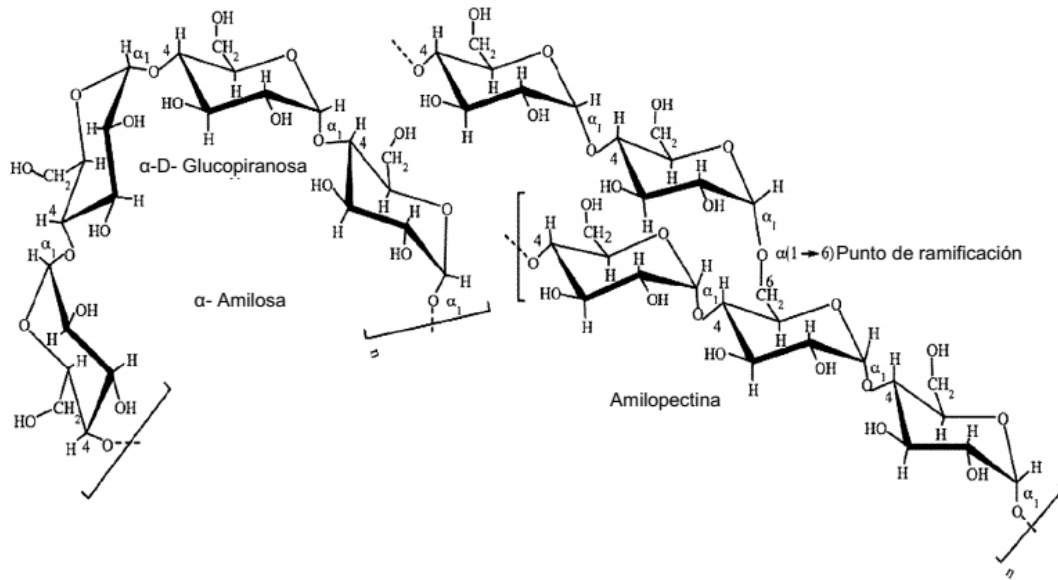


Figura 5

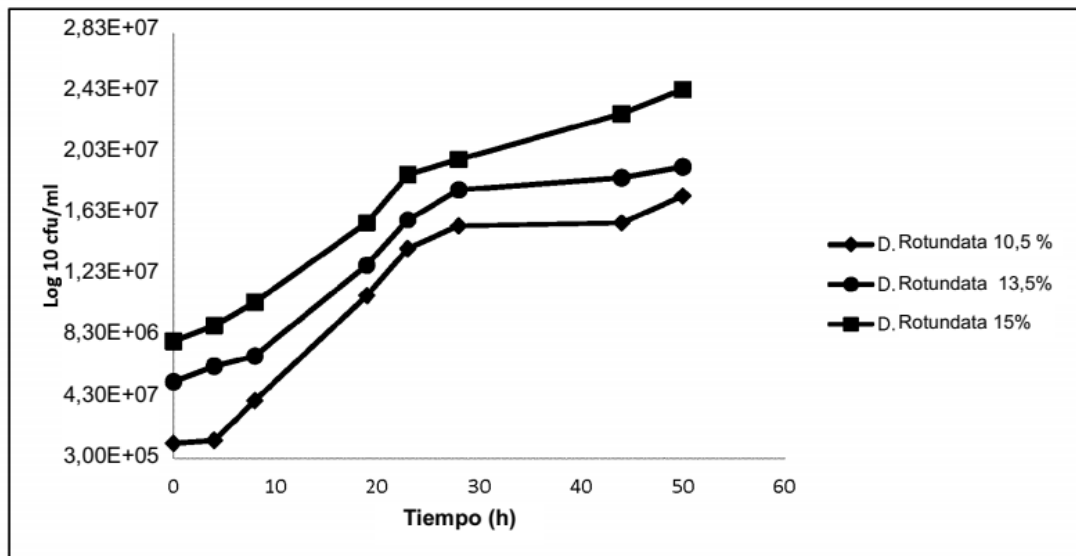


Figura 6

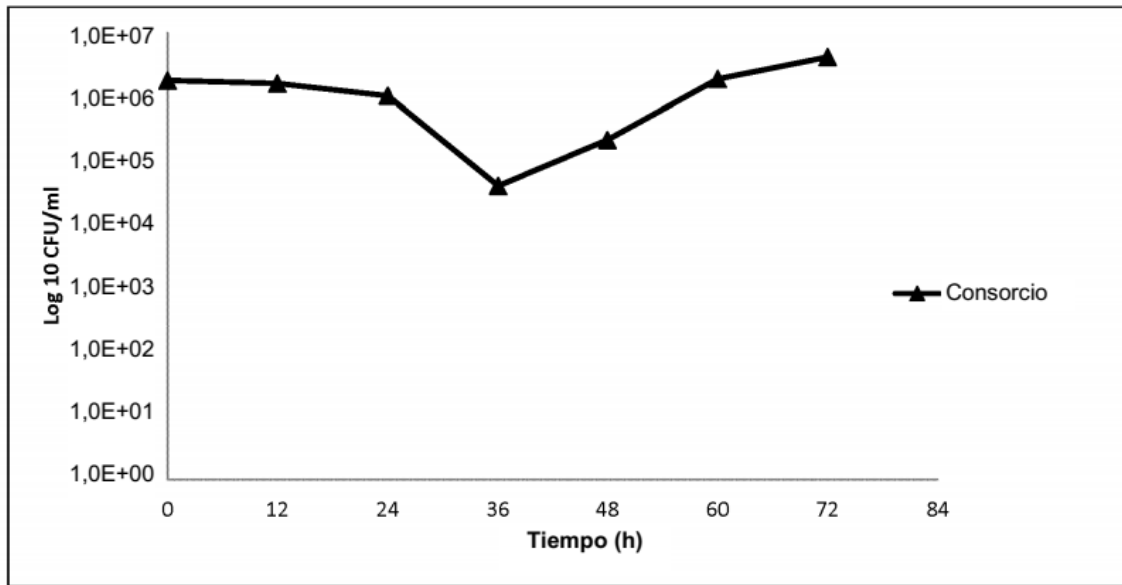


Figura 7

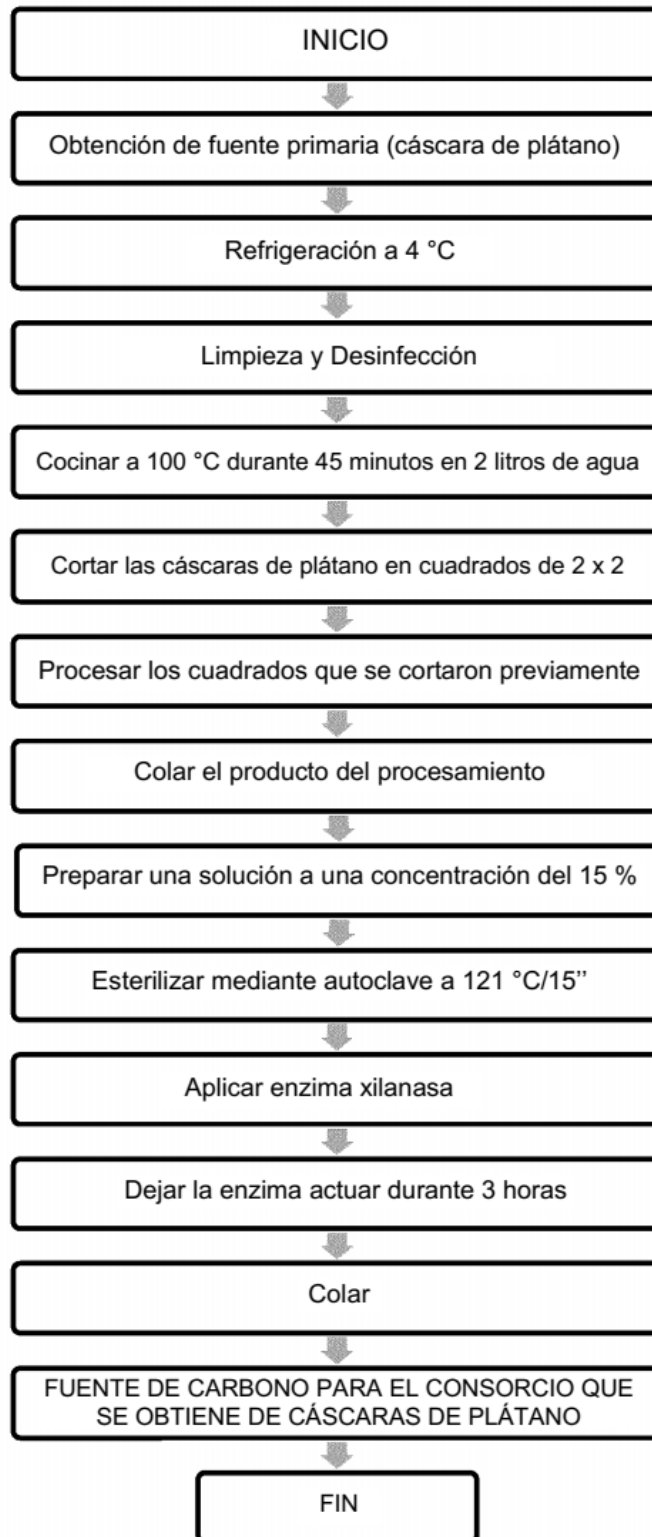


Figura 8

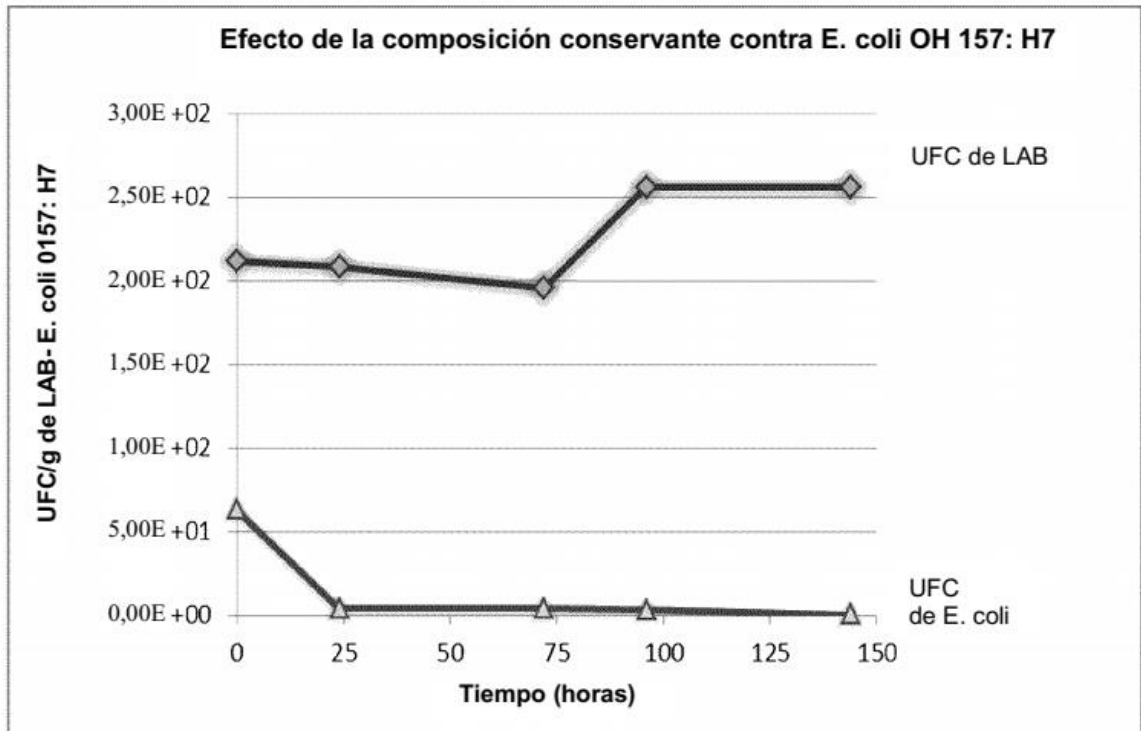


Figura 9