

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 985 779**

(51) Int. Cl.:

**A23L 2/44** (2006.01)  
**A23L 3/3571** (2006.01)  
**A23B 4/20** (2006.01)  
**A23L 3/358** (2006.01)  
**A23B 4/22** (2006.01)  
**A23B 4/24** (2006.01)  
**A01N 63/20** (2010.01)  
**A01N 37/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2016 PCT/US2016/027520**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168454**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016 E 16780740 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3282849**

---

(54) Título: **Método para controlar el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de descomposición en sistemas con alta humedad y bajo contenido en sodio**

(30) Prioridad:

**17.04.2015 US 201562149365 P**  
**13.04.2016 US 201615097922**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2024**

(73) Titular/es:

**KERRY GROUP SERVICES INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)**  
Prince's Street  
TraleeCo. Kerry, IE

(72) Inventor/es:

**PERUMALLA, AMARA VENKATA SUNIL;**  
**SHEEHAN, VIVIEN;**  
**COOPER, RENETTA y**  
**JONES, BETH**

(74) Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

**ES 2 985 779 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

- Método para controlar el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de descomposición en sistemas con alta humedad y bajo contenido en sodio
- 5 Campo de la invención  
Esta invención se relaciona en general con composiciones y métodos para inhibir patógenos y microorganismos causantes de la descomposición.
- 10 Antecedentes de la invención  
Un número cada vez mayor de consumidores cree que los alimentos libres de aditivos sintéticos o químicos son más saludables. En respuesta a estas tendencias y preferencias de los consumidores, la industria alimentaria ha centrado sus esfuerzos en ofrecer diversas alternativas como productos de etiqueta limpia y/o naturales, libres de conservantes artificiales y que conservan características de seguridad microbiana similares a los productos preparados de forma convencional.
- 15 Los agentes de curado tales como las sales de nitrato de sodio y nitrito de sodio ("curados") tienen una larga historia de preservación de la seguridad microbiana de las formulaciones de carne procesada, ya que proporcionan beneficios funcionales de actividades antimicrobianas y antioxidantes además de proporcionar atributos de color y sabor deseables característicos de tales productos (ver, por ejemplo, Pegg, RB y F. Shahidi. 2000. Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, CT.)
- 20 25 Sin embargo, el consumo de carnes procesadas formuladas con dichos agentes de curado se ha relacionado recientemente con un mayor riesgo de cáncer colorrectal debido a la formación de compuestos N-nitrosos causantes de cáncer e hidrocarburos aromáticos policíclicos (véase, por ejemplo, Santarelli, RL, Pierre, F. y Corpet, D. E. 2008. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. Nutrition and Cancer, 60(2), 131-144). Además, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, una subsidiaria de la OMS) y el Instituto Americano de Investigación sobre el Cáncer (AICR) clasificaron recientemente las carnes procesadas como agentes cancerígenos del Grupo 1 para los humanos (Véase, por ejemplo, Bouvard, et al. 2015, en nombre del on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, The Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. The Lancet Oncology. Publicado en línea: 26 de octubre de 2015).
- 30 35 Los productos cárnicos preparados sin agentes de curado, ya sea a partir de fuentes sintéticas o naturales ("sin curar" o "libres de nitratos o nitritos") son más susceptibles al crecimiento de patógenos debido a su naturaleza antimicrobiana. Las especies *Listeria monocytogenes* y *Clostridium* son dos patógenos que causan especial preocupación en productos "sin curar" o "libres de nitratos o nitritos". *Listeria monocytogenes* es un psicrótrofo que puede crecer incluso a temperaturas de refrigeración y, por lo tanto, plantea un riesgo para la seguridad alimentaria en productos cárnicos y avícolas listos para el consumo (RTE) con una vida útil prolongada. Las especies enterotoxigénicas formadoras de esporas de *Clostridia* tales como *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* asociadas con carnes y aves de corral procesadas, también son motivo de especial preocupación. Si bien el calor aplicado en la fabricación de productos cárnicos procesados RTE es suficiente para inhibir las células vegetativas, las esporas no se inactivarán, sino que pueden germinar y convertirse en células vegetativas.
- 40 45 Los organismos causantes de la descomposición también juegan un papel importante en la reducción de la vida útil de la carne y las aves de corral refrigeradas RTE sin curar. Por ejemplo, las especies de *Pseudomonas* y *Lactobacillus* son predominantemente responsables de defectos indeseables como sabores desagradables, decoloración, gases y limo, etc.
- 50 55 Además, en los últimos tiempos ha habido un movimiento para reducir el contenido de sodio en los alimentos (véase, por ejemplo, el Informe científico del Comité Asesor de Guías Alimentarias de 2015. Informe consultivo del Secretario de Salud y Servicios Humanos y del Secretario de Agricultura). El sodio es un conservante eficaz y su reducción hace que las formulaciones sean más vulnerables a un mayor riesgo de crecimiento y descomposición de patógenos, lo que da como resultado una vida útil más corta del producto (Véase, por ejemplo, Desmond, E. 2006. Reducing salt: A challenge for the meat industry, Meat Science, 74 (2006), pp. 188- 196).
- 60 65 En productos curados, niveles bajos de nitrito de sodio, aproximadamente 50 ppm, son suficientes para la inhibición de especies de *Clostridium* en formulaciones de carne procesada (Véase, por ejemplo, Hustad, GO, JG Cerveny, H. Trenk, RH Deibel, DA Kautter, T. Fazio, RW Johnston y OE Kolari. 1973. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. Appl. Microbiol. 26 22-26).
- Sin embargo, el nivel máximo permitido de 156 ppm de nitrito de sodio cuando se usa sin la adición de antimicrobianos adjuntos es insuficiente para la inhibición de *Listeria monocytogenes* (Véase, por ejemplo, Farber, J. M., R. C. McKellar, y W. H. Ross. 1995. Modelling the effects of various parameters on the growth of *Listeria*

monocytogenes on liver pate. Food Microbiol. 12:447-453).

Se esperan resultados similares o comparables en la inhibición de *Listeria* y *Clostridia* sps. cuando se usan fuentes alternativas de nitrato o nitrito (derivadas ya sea por métodos sintéticos o de fermentación) para suministrar 5 concentraciones similares equivalentes al nitrito de sodio como se describe en los ejemplos enumerados anteriormente.

Estudios previos han investigado los ácidos orgánicos o sus sales para la inhibición de estos patógenos en 10 aplicaciones de carne procesada RTE. En particular, los estudios sugieren que el ácido acético o su sal solo, cuando se usa en concentraciones (< 1 %) que se espera que proporcionen atributos sensoriales aceptables en productos cárnicos y avícolas RTE, no logró inhibir *C. perfringens* la carne de pechuga de pavo (Véase, por ejemplo, Juneja, VK y H. Thippareddi, 2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. Int. J. Food Microbiol. 93:155-163).

15 Estudios adicionales demostraron que el diacetato de sodio al 0,3-0,5 % cuando se usa solo o en combinación con antimicrobianos adicionales fue eficaz para controlar la *Listeria monocytogenes* en pasta de pavo formulados con y libre de nitrito de sodio (Véase, por ejemplo, Schlyter, JH, Glass, KA, Loeffelholz, J., Degnan, AJ, Luchansky, JB, 1993. The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey 20 slurries. Int. J. Food Microbiol. 19, 271-281). Sin embargo, los niveles sugeridos fueron más altos que los niveles máximos permitidos (0,25 % de la formulación del producto; lista FSIS 7120) en productos de carne y aves de corral en los EE. UU. y se espera que aporten un sabor inaceptable al producto terminado. Además, otros intentos 25 han demostrado el uso de ácido propiónico o su sal en combinación con pediocina para controlar la *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, hasta la fecha los métodos conocidos no han logrado abordar el control de las especies de *Clostridia*, uno de los riesgos de patógenos predominantes en los productos de carne y aves de corral sin curar.

Si bien se sabe que la nisin se usa en combinación con ácidos orgánicos, la eficacia de estos sistemas requería 30 emulsionantes y dependía de la adición secuencial de estos componentes individuales. Además, estas composiciones no demostraron eficacia para inhibir patógenos y la descomposición preocupante en las condiciones especificadas en este documento que representan carnes procesadas sin curar, con alto contenido de humedad y bajo contenido de sodio (Véase, por ejemplo, Publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2013/0012428 A1 de Jacobus et al.). Otras divulgaciones de técnica anterior son los documentos US 5 219 35 603 y US 2011/053832, por ejemplo.

35 La patente de EE. UU. n.º 6509050 B1 de Henson et al demostró el uso de polifosfatos en combinación con un ácido orgánico o sus sales para controlar la *Listeria monocytogenes* en un modelo de caldo y microorganismos de descomposición en un sistema de carne curada. Como se sabe en la técnica, los fosfatos se usan normalmente 40 en aplicaciones cárnicas para retener la humedad y mejorar el rendimiento. Sin embargo, no hubo evidencia de la eficacia de este enfoque para la inhibición de patógenos en un sistema de carne no curada con bajo contenido de sodio. Además, los niveles de fosfatos descritos en el presente documento son más altos que los permitidos actualmente en EE. UU. (0,5 %; lista FSIS 7120).

45 Hasta la fecha, no se ha informado de la inhibición simultánea de especies de *Listeria* y *Clostridia* en carnes refrigeradas RTE formuladas sin nitrito de sodio. Es deseable tener un método que pueda demostrar eficacia contra patógenos transmitidos por alimentos y microorganismos causantes de descomposición en sistemas "sin curar" o "libres de nitritos" con sabor aceptable que sean altos en humedad (65-80 % en peso), bajos en sal (<2 % en peso) y en un intervalo de pH de 5,5 a 8,5.

50 Por lo tanto, los efectos acumulativos de reemplazar los conservantes químicos con opciones de etiqueta limpia además de reducir los niveles de sodio en los alimentos han obligado a los fabricantes de alimentos a comprometer la vida útil. Particularmente, corren riesgo los productos alimenticios con alto contenido de humedad y bajo contenido de sodio, lo que favorece el crecimiento microbiano, tal como la aplicación de carne no curada mencionada anteriormente. Si bien existen varias formas (métodos y antimicrobianos) para controlar los patógenos 55 transmitidos por los alimentos y la descomposición productos cárnicos y avícolas procesados tradicionales formulados con nitrito de sodio, existe una necesidad en la técnica de métodos para eliminar dicho compromiso y mejorar la seguridad de los productos de etiqueta limpia formulados sin nitrito de sodio (sin curar o libres de nitrito de sodio). También se prefiere demostrar un método para inhibir los patógenos y la descomposición con una solución que tenga amplias propiedades antimicrobianas en diversas matrices y aplicaciones.

60 La presente invención proporciona un método de inhibición de este tipo. Estas y otras ventajas de la invención, así como características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

## Breve sumario de la invención

La invención descrita en el presente documento, que se define por las reivindicaciones, se refiere a un método para inhibir el crecimiento de patógenos y organismos causantes de la descomposición en un medio de humedad característicamente alta de 65 a 80 % en peso, baja sal (< 2,0 % en peso) que está en un intervalo de pH de 5,5 a 8,5, mediante la aplicación de una cantidad eficaz de una composición antimicrobiana y ofrece una alternativa

5 robusta a los conservantes convencionales. La composición antimicrobiana comprende un ácido orgánico o su sal y un péptido antimicrobiano derivado de la fermentación. De acuerdo con el método de la invención, el producto alimenticio o bebida está libre de nitrato y nitrito que se derivan ya sea de un proceso sintético o de fermentación, y dicho alimento o bebida no está envasado al vacío. La composición antimicrobiana se puede aplicar en todas las etapas del procesamiento, pero no se limita a la premezcla y la precocción cuando se aplica a carnes procesadas.

10 También se puede aplicar mediante pulverización, adición directa, inyección, bombeo, masaje, etc.

El método propuesto puede suprimir el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de descomposición en sistemas que incluyen, pero no se limitan a, productos alimenticios listos para comer, en particular carne y aves de corral, así como agentes de limpieza, alimentos para animales, cosméticos y productos farmacéuticos.

15 El ácido orgánico se selecciona entre ácido acético, cítrico o propiónico, o la sal del mismo. Por sal de un ácido orgánico se entiende generalmente una sal metálica monovalente o divalente del ácido orgánico, que incluye, pero no se limita a, sal de sodio, potasio, calcio y magnesio del ácido orgánico. El antimicrobiano derivado de la fermentación se comprende de una bacteriocina o sus análogos o derivados, siendo la bacteriocina un péptido antimicrobiano sintetizado ribosómicamente producido por ciertas bacterias que matan o inhiben el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas.

20 Esta intervención antimicrobiana se aplica a sistemas alimentarios y no alimentarios en donde las condiciones de envasado son condiciones sin vacío.

25 También se describe, pero no forma parte de la invención, una composición antimicrobiana para controlar el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de la descomposición en productos alimenticios o bebidas que tienen un contenido de humedad de aproximadamente 65 % en peso a aproximadamente 80 % en peso, un contenido de sal de menos de aproximadamente 2,0 % en peso y que tienen un rango de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5. La composición incluye un ácido orgánico o su sal y un péptido antimicrobiano derivado de la fermentación. Los patógenos antes mencionados pueden ser especies de *Listeria* y/o pueden ser especies de una clase de formadores de esporas que comprende especies de *Clostridia*. Los microorganismos causantes de la descomposición pueden ser especies de *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* y *Brochothrix*.

30 35

35 El producto alimenticio, que se describe pero no es parte de la invención, puede seleccionarse del grupo que consiste en carne animal, bebidas, piensos o productos agrícolas. Las condiciones de envasado de los productos alimenticios o bebidas pueden ser al vacío, sin vacío y en condiciones atmosféricas modificadas.

40 En una realización subsidiaria de acuerdo con este aspecto, que se describe pero no forma parte de la invención, el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido cítrico o una sal del mismo. Como ejemplo específico no limitativo, el ácido orgánico es ácido acético o su sal en una concentración de al menos aproximadamente 0,275 % en peso. El pH del ácido acético o de su sal es de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0.

45 50

50 En otra realización subsidiaria de acuerdo con este aspecto, que se describe pero no forma parte de la invención, el antimicrobiano derivado de la fermentación es una bacteriocina. La bacteriocina es un péptido antimicrobiano sintetizado ribosómicamente producido por ciertas bacterias que mata o inhibe el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas, por ejemplo, nisin, sakacina, pediocina, lactocina y derivados o análogos de las mismas. Como ejemplo específico no limitativo, la bacteriocina es nisin en el intervalo de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm. El pH de la nisin varía entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,5.

55 En otro aspecto secundario, que se divulga pero no forma parte de la invención, una actividad antimicrobiana de la composición es bacteriostática o bactericida. La composición puede estar en forma de polvo o líquido. Cuando está en solución, la composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

60 65

65 En otra realización ejemplar de la invención, se proporciona un método para controlar el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de la descomposición en productos alimenticios o bebidas. El método incluye proporcionar un producto alimenticio o bebida que tiene un contenido de humedad de aproximadamente 65 % en peso a aproximadamente 80 % en peso, un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5 y un contenido de sal inferior a aproximadamente 2,0 % en peso. El método también incluye poner en contacto el producto alimenticio o bebida con una composición antimicrobiana que comprende un ácido orgánico o su sal y un péptido antimicrobiano derivado de la fermentación para controlar el crecimiento de patógenos y el crecimiento de microorganismos causantes de la descomposición.

En una realización subsidiaria de la invención, la etapa de proporcionar el producto alimenticio o bebida incluye

proporcionar un producto alimenticio o bebida que esté libre de nitrato y nitrito que se deriva de un proceso sintético o de fermentación. Los patógenos pueden ser especies de *Listeria*. Los patógenos también pueden ser especies de una clase de formadores de esporas que comprende especies de *Clostridia*. Los microorganismos causantes de la descomposición pueden ser especies de *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* y *Brochothrix*. El producto alimenticio o bebida se selecciona del grupo que consiste en carne animal, bebidas, piensos o productos agrícolas. Las condiciones de envasado de los productos alimenticios o bebidas son condiciones sin vacío.

5 También se describe pero no forma parte de la presente invención, un sistema antimicrobiano que comprende un producto alimenticio o bebida que comprende las siguientes condiciones: 1) un contenido de humedad de aproximadamente 65 % en peso a aproximadamente 80 % en peso, 2) pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, y 3) un contenido de sal de menos de aproximadamente 2,0 % en peso, incluyendo también el sistema un ácido orgánico o su sal, un péptido derivado de la fermentación, en donde, el ácido orgánico o su sal y el péptido derivado de la fermentación se aplican para controlar el crecimiento microbiano del producto alimenticio o bebida en dichas condiciones.

10 15 Otros aspectos, objetivos y ventajas resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se toman conjuntamente con los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

20 25 Los dibujos adjuntos incorporados y que forman parte de la especificación ilustran varios aspectos de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La FIG. 1 ilustra la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de pavo estilo delicatessen sin curar inoculadas en la superficie y almacenadas en envases al vacío a 4 °C durante 14 semanas;

30 La FIG. 2 demuestra la eficacia antimicrobiana del componente peptídico solo y en combinación con ácido orgánico o su sal contra *L. monocytogenes* después de la inoculación superficial en rodajas de pavo estilo delicatessen sin curar, en condiciones de envasado al vacío a 4 °C durante 13 semanas;

35 La FIG. 3 ilustra el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de pavo estilo delicatessen sin curar inoculadas en la superficie y almacenadas en envases de no vacío a 4 °C durante 11 semanas;

40 La FIG. 4 revela la eficacia de la aplicación antimicrobiana contra bacterias de ácido láctico en rodajas de pavo estilo delicatessen sin curar almacenadas en condiciones de envasado al vacío a 4 °C durante 7 semanas;

45 La FIG. 5 demuestra la eficacia de la aplicación de antimicrobianos contra *L. monocytogenes* después de la inoculación superficial en una rodaja de pavo curado estilo delicatessen en condiciones de envasado al vacío a 4 °C durante 8 semanas;

50 La FIG. 6 demuestra la eficacia antimicrobiana del ácido orgánico o su sal y péptido antimicrobiano contra microorganismos causantes de descomposición (recuento total en placa) en filetes de pechuga de pollo frescos a 4 °C durante 35 días;

55 La FIG. 7 demuestra la eficacia antimicrobiana del ácido orgánico o su sal y péptido antimicrobiano contra el crecimiento de especies de *Pseudomonas* en filetes de pechuga de pollo frescos a 4°C durante 35 días;

Si bien la invención se describirá en relación con ciertas realizaciones preferidas, no existe la intención de limitarla a esas realizaciones.

#### 50 Descripción detallada de la invención

Los sistemas no curados, con alto contenido de humedad y sodio reducido son sustratos más favorables para el crecimiento de patógenos y bacterias causantes de la descomposición y, por lo tanto, deben formularse con antimicrobianos eficientes para minimizar los riesgos para la salud pública, así como las pérdidas económicas para los procesadores.

60 La formulación antimicrobiana en los métodos descritos se compone de un ácido orgánico o su sal y un péptido antimicrobiano, donde el ácido orgánico es preferiblemente ácido acético a un nivel de inclusión de al menos 0,275 % en peso y el péptido antimicrobiano es nisin, usado en una cantidad para proporcionar actividad en el intervalo de 1-50 ppm, preferiblemente 7-30 ppm. Además de retrasar la producción de toxinas de los formadores de esporas, la composición antimicrobiana es bacteriostática y en algunos casos bactericida para controlar patógenos vegetativos así como bacterias causantes de la descomposición. En consecuencia, puede mejorar la seguridad del producto y prolongar su vida útil.

65 Los niveles de nisin necesarios para lograr la eficacia antimicrobiana se calcularon realizando una modificación

del ensayo de difusión en agar descrito previamente con el uso de *Pediococcus pentosaceus* FBB63 como cepa indicadora (Véase, por ejemplo, Jozala, AF, Silva, DP, Vicente, A, A, Teixeira, JA, Junior, AP y Penna, T.C.V. 2011. Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*. Afr.J Biotech 10:14920-14925) Se comparó la actividad de la nisin derivada de la fermentación con una muestra estándar comercialmente conocida

5 de Nisaplin. Se usó un factor de conversión así derivado [1 unidad arbitraria (UA)/g = 1,04 x unidad internacional (UI)/g] para calcular los niveles en partes por millón (ppm) necesarios para los efectos antimicrobianos (1 ppm = 40 UI).

10 Las composiciones que comprenden diversas proporciones de cada uno de los componentes dentro de los intervalos preferidos delineados se denominan composiciones A-J en adelante. En dichas composiciones, la referencia a porcentaje en peso significa el porcentaje en peso teniendo en cuenta el producto alimenticio en el que se introducen las composiciones.

15 Ejemplo 1 - Métodos para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en una carne no curada con alta humedad y bajo contenido de sodio en el sistema.

Este ejemplo, que incluye realizaciones ambas de acuerdo con y no de acuerdo con el método de la presente invención, describe la composición antimicrobiana para controlar el crecimiento de patógenos tales como *L. monocytogenes* en sistemas de alta humedad y sodio reducido, por ejemplo, un producto de pavo estilo delicatessen sin curar listo para comer.

20 Se preparó pavo estilo delicatessen sin curar (70 % pechuga de pavo, 25,6 % de agua, 2 % de almidón, 1 % de azúcar, 1 % de sal, 0,4 % de fosfato de sodio, 0 % de nitrito de sodio) de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. Se añadieron niveles adecuados de antimicrobianos para cada tratamiento junto con ingredientes no cárnicos, se embutieron en trozos y se cocinaron a una temperatura final de 73,8 °C. La humedad de las composiciones del producto terminado estuvo en el intervalo de 72 % - 76 %, con niveles de sodio reducidos de 350 - 450 mg por 56 g de porción y un valor de pH de 6,1 - 6,4.

25 30 En un método no de acuerdo con la invención, el producto se cortó en rodajas (22-28 g/rodaja usando una cortadora desinfectada para evitar la contaminación con microbios causantes de la descomposición) y se almacenó a 4 °C hasta su uso en los estudios mencionados en este documento. Las rodajas cocidas se inocularon en la superficie con 3 log UFC/g de una mezcla de cinco cepas de *L. monocytogenes*, incluyendo las cepas FSL-C1-109 (serotipo 4b), LM101M (4b), LM310 (4b), LM132 (1/2 a) y LM108M (1/2b), envasadas al vacío (100 g/paquete), y almacenadas a 4 °C durante el estudio. Las poblaciones de *L. monocytogenes* se enumeraron a partir de muestras inoculadas por triplicado. En cada momento, los tratamientos inoculados se homogeneizaron en tampón Butterfield estéril y se sembraron en agar Oxford modificado (35 °C, 48 h). Los tratamientos que soportaron más de 2,0 log UFC/ml desde el día cero se consideraron defectuosos y se suspendieron del estudio.

35 40 En un método no de acuerdo con la invención, la aplicación del antimicrobiano demostró la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* durante 14 semanas de almacenamiento a 4°C. Los tratamientos incluyeron: (i) control sin antimicrobianos, (ii) composición B al 2,0 % en peso, (iii) composición C al 2,7 % en peso y (iv) un control formulado con 156 ppm de nitrito de sodio entrante y 3,8 % de lactato-diacetato de potasio en peso, una mezcla que se usa normalmente en la industria. Los resultados se presentan en la FIG. 1.

45 50 Se sometieron rodajas de pavo delicatessen no inoculadas a una evaluación sensorial para determinar la aceptabilidad general de acuerdo con la percepción de cinco panelistas capacitados. Las muestras de prueba se compararon con un control que no contenía antimicrobianos ni nitrito de sodio y los panelistas las consideraron aceptables con descriptores similares a los del control (sal, dulce, agrio, sabor a pavo).

55 60 En otro método no de acuerdo con la presente invención, el vinagre tamponado y el péptido antimicrobiano A demostraron una mayor eficacia que el péptido antimicrobiano solo para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de pavo estilo delicatessen sin curar, en envasado al vacío a 4 °C durante 13 semanas. Los tratamientos incluyeron: (i) control sin antimicrobianos, (ii) composición A al 1,2 % en peso que contenía solo péptido antimicrobiano, (iii) composición B al 3,2 % en peso y (iv) composición C al 3,9 % en peso. Los resultados se presentan en la FIG. 2.

65 70 En una realización preferida de la presente invención, una formulación de pavo estilo delicatessen sin curar no favoreció el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas envasadas en condiciones sin vacío y almacenadas a 4 °C durante 11 semanas. Los tratamientos incluyeron: (i) control sin antimicrobianos, (ii) composición D al 1,85 % en peso, (iii) composición E al 2,95 % en peso y (iv) composición F al 3,15 % en peso. Los resultados se presentan en la FIG. 3.

Ejemplo 2 - Métodos para inhibir el crecimiento de microorganismos causantes de la descomposición, tales como bacterias de ácido láctico, en una carne sin curar con alta humedad y bajo contenido de sodio en el sistema.

75 Este ejemplo, que no está de acuerdo con el método de la presente invención, describe la eficacia del método de

combinar la composición antimicrobiana para controlar bacterias de descomposición, especialmente bacterias de ácido láctico. Este experimento se llevó a cabo en un modelo de carne sin curar con altas condiciones de humedad y bajo contenido de sodio como se describe en el ejemplo 1 y se sometió a un estudio de vida útil a 4 °C durante 7 semanas. Se prepararon tres formulaciones del pavo estilo delicatessen sin curar de acuerdo con la receta mencionada en el ejemplo 1. Los tratamientos incluyeron: (i) control sin antimicrobianos, (ii) composición B al 2,0 % en peso y (iii) composición G al 2,36 % en peso. Los recuentos iniciales de microflora de fondo en el producto posterior a la cocción descritos en el presente documento reflejan el escenario de contaminación durante la manipulación y el corte. Los recuentos de placas de bacterias de ácido láctico se determinaron sembrando muestras duplicadas no inoculadas en agar APT con indicador púrpura de bromocresol. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 horas. Los resultados se presentan en la FIG. 4.

Estos resultados indican que una combinación de vinagre tamponado y péptido antimicrobiano es más eficaz para controlar las bacterias de deterioro en las condiciones específicas desafiadas que una combinación de ácido láctico y péptido antimicrobiano.

#### Ejemplo 3 - Métodos para controlar el crecimiento de *Clostridium sporogenes*

La actividad antimicrobiana contra *C. sporogenes* PA 3679 se demostró en un estudio de caldo usando un medio de carne cocida modificada, ya que el primero ha demostrado ser un sustituto anontoxigénico para *C. botulinum*. Los tratamientos incluyeron: (i) control sin antimicrobianos, (ii) composición B al 2,0 % en peso y (iii) composición C al 2,7 % en peso. Todas las variables se inocularon con esporas que habían sido sometidas a un choque térmico de 85 °C durante 5 minutos con un objetivo de 2,0 log UFC/g e incubadas anaeróbicamente a 25 °C durante 3-4 días. El crecimiento de *C. sporogenes* se controló sembrando diluciones apropiadas en agar Mc Lung modificado e incubando a 35-37 °C durante 3 días. Cada tratamiento se analizó por duplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Método de inhibición de *C. sporogenes* por la composición antimicrobiana en medio de carne cocida modificada a 25°C.

Tratamiento	Registro inicial UFC/ml (tiempo cero)	Registro final de UFC/ml (después de 72 horas)
Control	2,0	7,23
Composición B 2,0 % en peso	2,0	0
Composición C 2,7 % en peso	2,0	0

Como podrán apreciar fácilmente los expertos en la materia basándose en los datos presentados en la Tabla 1, la aplicación de vinagre tamponado en combinación con péptido antimicrobiano es eficaz para prevenir el crecimiento de *C. sporogenes*.

#### Ejemplo 4 - Métodos para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en un modelo de carne curada (con niveles más bajos de agentes de curado que los niveles de uso tradicionales) con alta humedad y bajo sodio en el sistema.

Este ejemplo, que no está de acuerdo con el método de la presente invención, describe el método de uso de la composición antimicrobiana para controlar el crecimiento de patógenos tales como *L. monocytogenes* en un modelo de carne formulado con la cantidad mínima de agente de curado requerida para contribuir con los atributos de color y sabor en los sistemas. Por ejemplo, en la formulación de carne procesada comercial, se usa un máximo de 156 ppm de nitrito de sodio entrante junto con un antimicrobiano para lograr una vida útil típica de 90 días en almacenamiento refrigerado. En una realización preferida, el nivel de nitrito de sodio entrante se reduce significativamente a tan solo 20 ppm de nitrito de sodio en combinación con la composición antimicrobiana descrita y se logra la misma extensión de la vida útil.

Se preparó pavo estilo delicatessen sin curar (70 % pechuga de pavo, 25,6 % de agua, 2 % de almidón, 1 % de azúcar, 1 % de sal, 0,4 % de fosfato de sodio) de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. Se añadieron niveles adecuados de antimicrobianos para cada tratamiento junto con ingredientes no cárnicos, se embutieron en trozos y se cocinaron a una temperatura final de 73,8 °C. Se encontró que la composición del producto terminado tenía un alto contenido de humedad (76 % de humedad), sodio reducido (340 mg de sodio/56 g de porción) y un pH casi neutro (6,1 - 6,3). Las rodajas cocidas se inocularon, se envasaron al vacío y se almacenaron a 4 °C para evaluar la eficacia para el control de *L. monocytogenes* como se describe en el ejemplo 1. Los tratamientos incluyeron: (i) 80 ppm de nitrito de sodio en peso, (ii) 40 ppm de nitrito de sodio en peso + composición H al 2,0 % en peso, y (iii) 20 ppm de nitrito de sodio en peso + composición I al 2,7 % en peso. Los resultados se presentan en la FIG. 5.

Se sometieron rodajas de pavo delicatessen no inoculadas a una evaluación sensorial para determinar la aceptabilidad general de acuerdo con la percepción de cinco panelistas capacitados. Las muestras se compararon con una muestra de control que contenía 80 ppm de nitrito de sodio entrante (por peso) sin antimicrobianos adicionales y los panelistas las consideraron aceptables con descripciones similares a las del control (curado, sabroso, dulce, agrio, sabor a pavo).

Los resultados que se muestran en la FIG. 5 demuestran que una mezcla de vinagre tamponado y péptido antimicrobiano en combinación con cura (nitrito de sodio) es más eficaz que la cura sola. Además, la composición antimicrobiana tiene el potencial de reducir los niveles de curado (nitrito de sodio) en las formulaciones de carne sin comprometer la calidad microbiana.

Se esperan beneficios similares en la inhibición de patógenos y organismos de descomposición cuando se usan nitratos o nitritos de sodio, ya sean de fuente sintética o natural, en la formulación.

15 **Ejemplo 5: Método para prevenir o retrasar la producción de toxina por *Clostridium botulinum* en masa de pollo sin curar.**

Esta realización describe el método para prevenir o retrasar la producción de toxina por *Clostridium botulinum* en una masa de carne de pollo sin curar inoculada (100 ufc/g). La masa de carne de pollo sin curar (libre de nitrito de sodio) se preparó de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. La formulación se preparó con carne de pollo (70 %), agua (23 %), almidón de maíz modificado (2,1 %), sal (1,5 %), carragenina (0,2 %) y fosfato de sodio (0,4 %). Tratamientos incluidos en este estudio (i) control sin antimicrobianos, (ii), composición B al 2,0 % en peso, (iii) composición C al 2,7 % en peso. La carne previamente molida (1/8") se mezcló con ingredientes no cárnicos en una picadora para preparar una masa de carne, se envasó, se aplano y se mantuvo congelada hasta su uso.

25 Para la prueba, la masa congelada se descongela y se inocula con esporas de *C. botulinum* que se habían sometido a un choque térmico a 80 °C durante 10 min. Se inocularon dos lotes individuales de masa de carne con cepas proteolíticas (33A, 36A, 62A, 77A, 53B, 113B, 213B, ACC1B) o no proteolíticas (K85, K86, K87, K88, K89), cocidas en una bolsa usando un baño de agua a una temperatura interna de 73,8 °C. Las muestras se enfriaron y se incubaron durante 2 días a 26,6 °C. Para examinar la producción de toxina, se extrajeron muestras a las 24 y 48 horas, se tomaron extractos y se administraron a los ratones para verificar la presencia de toxina. Otro lote de rebozado de carne inoculado únicamente con cepas no proteolíticas se incubó durante hasta 8 semanas a 7 °C. A intervalos semanales, se tomaron muestras, se tripsinizaron para la activación de la toxina y se administraron extractos a ratones para el bioensayo de la toxina.

35 Se siguieron protocolos estándar para el crecimiento y la cosecha de cultivos de *Clostridia* y para la realización de bioensayos de toxina en ratones (véase el Manual de análisis bacteriológico de alimentos de la FDA, capítulo 17, 2015). Brevemente, en cada observación se pesaron las muestras inoculadas y se añadió un volumen igual de tampón de gel-fosfato (ajustando a pH 6,2) y se centrifugaron bajo refrigeración para recoger el líquido sobrenadante acuoso para el ensayo de toxina. Esta mezcla se filtró a través de un filtro millipore para evitar la muerte no específica de los ratones. Para las muestras inoculadas no proteolíticas, se realizó tripsinización después de la filtración para activar la toxina. El filtrado de extracto de carne así recogido por cada muestra de prueba en cada punto de observación se diluyó y se administró (0,5 ml) a un par de ratones mediante inyección intraperitoneal. Los ratones fueron observados durante 48 horas y examinados para detectar síntomas y muertes 40 características de la intoxicación por *C. botulinum*. Las muertes posteriores a la administración de extracto de carne son evidencia presuntiva de producción de toxinas. Se logró una confirmación adicional al desafiar a dos ratones adicionales con una preparación de antitoxina preincubada (37 °C durante 30 minutos) (control protegido). Se descartó la muerte por razones no específicas, tales como la presencia de sustancias químicas en el líquido inyectado o un traumatismo y se repitió la prueba para confirmar la presencia de toxinas en las muestras de carne.

45 Los resultados del estudio se muestran en las Tablas 2 y 3. Los resultados demuestran que las formulaciones preparadas con la composición antimicrobiana fueron efectivas para retrasar la formación de toxina en muestras inoculadas con un cóctel de cepas proteolíticas o no proteolíticas de *C. botulinum* hasta 24 h de incubación a 30 °C. Además, las composiciones antimicrobianas también fueron eficaces para retrasar la formación de toxinas en muestras inoculadas con muestras no proteolíticas incubadas durante 9 semanas a 7 °C.

Tabla 2: Presencia de toxinas de *Clostridium botulinum* en rebozados de carne no curada inoculados con cócteles de esporas proteínicas y no proteínicas e incubados a 26,6 °C durante 48 horas.

Tratamiento	Inoculado con cóctel proteínico e incubado durante 48 horas. Inoculado con cóctel no-proteínico e incubado durante 48 horas.							
	0 horas	24 horas	36 horas	48 hours	0 horas	24 horas	36 horas	48 hours
Control (sin antimicrobianos)	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Composición B - 2,0 % en peso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Composición C - 2,7 % en peso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Tabla 3: Presencia de toxina de *Clostridium botulinum* en reforzados de carne no curada inoculadas con cocteles de esperas no proteolíticos y se incubaron a 7 °C durante 9 semanas.

Tratamiento	Cóctel no proteolítico incubado durante 9 semanas.								
	Semana-1	Semana-2	Semana-3	Semana-4	Semana-5	Semana-6	Semana-7	Semana-8	Semana-9
Control (sin antimicrobianos)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado
Composición B - 2,0 % en peso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Composición C - 2,7 % en peso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

\*No se analizaron muestras posteriores porque los resultados fueron positivos en 2 puntos tempranos consecutivos anteriores.

Ejemplo 6: Eficacia de la composición antimicrobiana contra microorganismos causantes de la descomposición en filetes de pechuga de pollo frescos.

5 Los filetes de pechuga de pollo deshuesados, sin piel y sin curar se secaron al vacío para lograr un objetivo de absorción de adobo del 12 % en base al bloque de carne. Los filetes de pechuga de pollo marinados se almacenaron en bolsas de plástico (selladas sin vacío) a 4 °C hasta su descomposición ( $\geq 6,0 \log \text{ufc/g}$ ). Las muestras se sembraron por duplicado los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. Se tomaron veinticinco gramos de muestra de cada bolsa de tratamiento en condiciones asépticas y se diluyeron (1:2) en agua de peptona al 0,1 % y se homogeneizaron durante 1 minuto. Las muestras se sembraron en agar tripsídico de soja y agar base de *Pseudomonas*. Tratamientos incluidos en este estudio (i) control sin antimicrobianos, (ii), composición B al 2,0 % en peso, (iii) composición J al 1,6 % en peso.

10 Los resultados presentados en las FIGS. 6 y 7 demuestran que los filetes de pechuga de pollo marinados sin antimicrobianos se echaron a perder el día 14 (recuento total en placa  $> 6,0 \log \text{ufc/g}$ ), mientras que los filetes de pechuga de pollo formulados con la composición B (1,6 % en peso) o J (2,0 % en peso) extendieron la vida útil a 35 días en almacenamiento refrigerado.

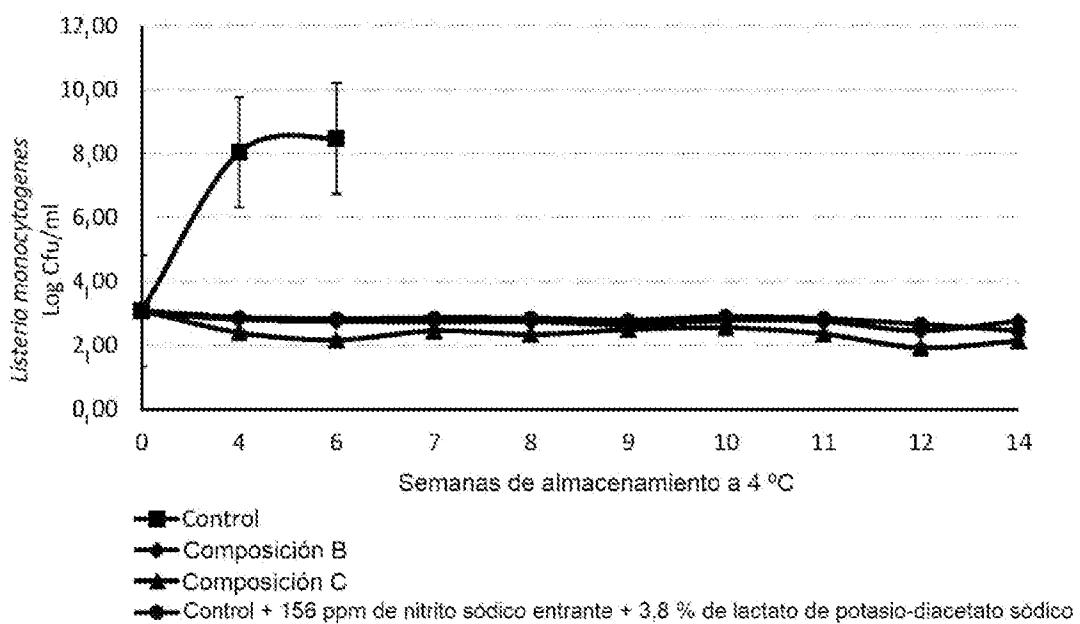
15 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe interpretarse que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Se debe considerar que los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" son expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento tiene como único objetivo servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario.

20 Las modalidades preferidas de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden volverse evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción que antecede.

REIVINDICACIONES

1. Un método que usa una composición antimicrobiana para controlar el crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de descomposición que comprende:
  - 5 (a) proporcionar un producto alimenticio o bebida que tenga un contenido de humedad de 65 % en peso a 80 % en peso, un pH en el intervalo de 5,5 a 8,5 y un contenido de sal inferior a 2,0 % en peso; y
  - (b) poner en contacto el producto alimenticio o bebida con una composición antimicrobiana que comprenda un ácido orgánico o su sal y un péptido antimicrobiano derivado de la fermentación para controlar el crecimiento de patógenos y el crecimiento de microorganismos causantes de descomposición;
- 10 en donde la condición del envasado del producto alimenticio o bebida no es envasado al vacío; en donde el producto alimenticio o bebida está libre de nitrato y nitrito que se derivan de un proceso sintético o de fermentación.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde los patógenos son las especies de *Listeria*.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde los patógenos son las especies de una clase de formadores de esporas que comprende especies de *Clostridia*.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde los microorganismos causantes de descomposición son cualquiera de las especies de *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* y *Brochothrix*.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el producto alimenticio o bebida se selecciona del grupo que consiste en carne animal, bebidas, piensos o productos agrícolas.
- 30 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido cítrico o una sal del mismo.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el ácido orgánico es ácido acético o su sal en una concentración de al menos 0,275 % en peso de la composición antimicrobiana,
8. El método de la reivindicación 7, en donde el pH del ácido acético o su sal es de 5,0 a 8,0.
- 35 9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el péptido antimicrobiano derivado de la fermentación es una bacteriocina.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la bacteriocina es un péptido antimicrobiano sintetizado ribosómicamente producido por ciertas bacterias que mata o inhibe el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas, por ejemplo, nisin, sakacina, pediocina, lactocina y derivados o análogos de las mismas.

# ES 2 985 779 T3



**FIG. 1**

# ES 2 985 779 T3

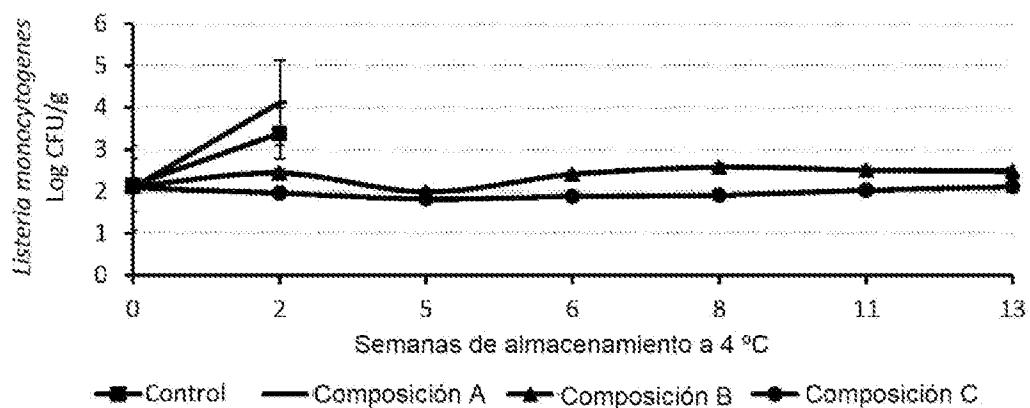


FIG. 2

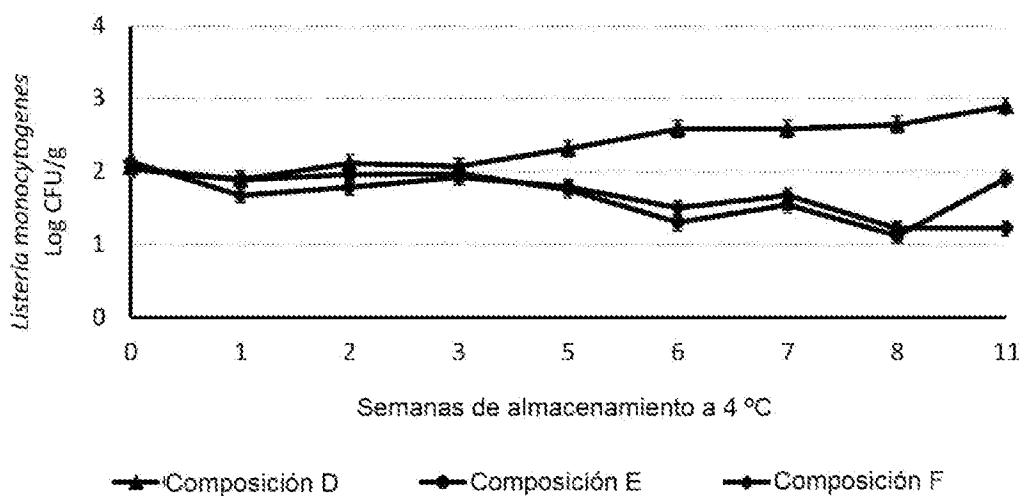


FIG. 3

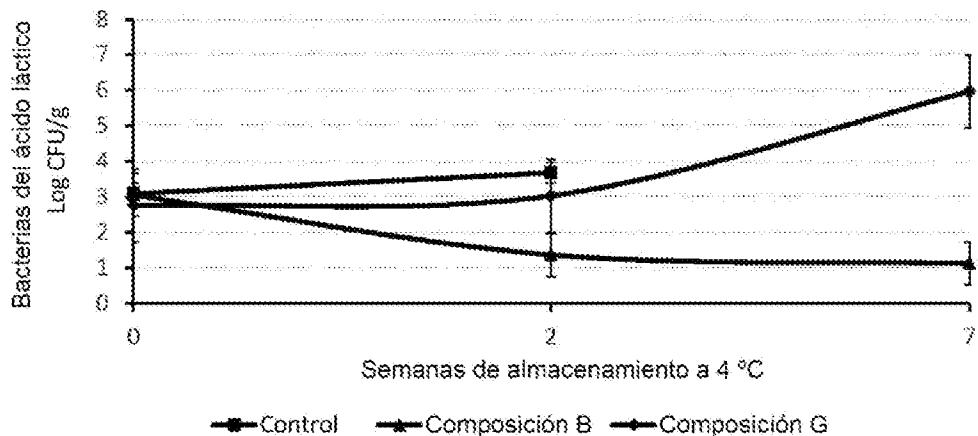


FIG. 4

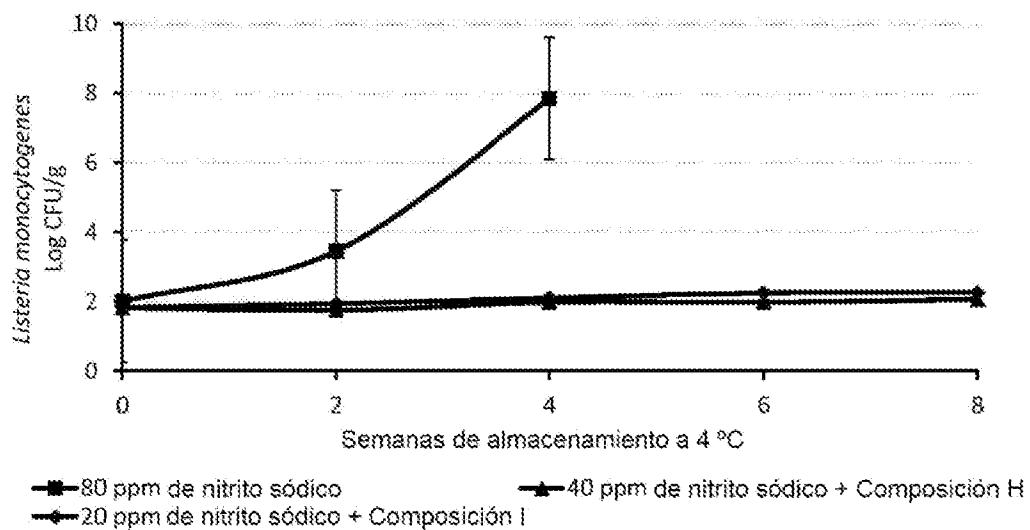


FIG. 5

# ES 2 985 779 T3

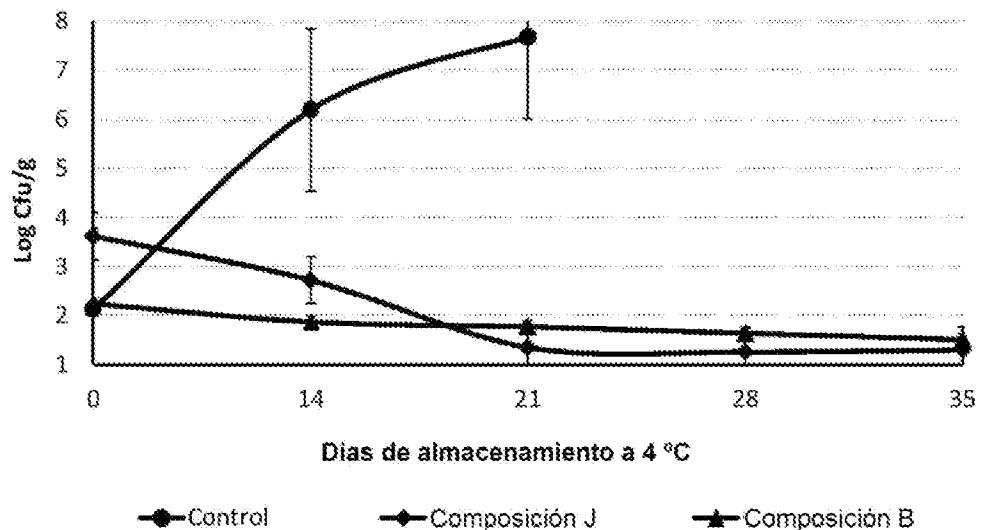


FIG. 6

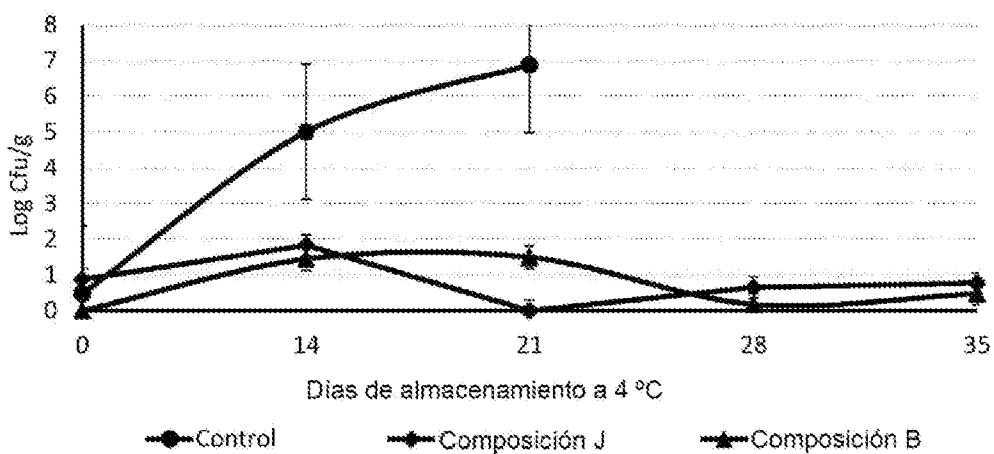


FIG. 7