



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0709361-6 A2**

(22) Data de Depósito: 23/03/2007
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



(51) Int.Cl.:
A23L 3/3571 2006.01
A01N 63/00 2006.01
A23B 4/20 2006.01
A23B 4/22 2006.01
A23L 3/3463 2006.01
A23L 3/3508 2006.01
A23L 3/3526 2006.01
C12N 1/20 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA A PRAPARAÇÃO DE UM ALIMENTO E MÉTODOD PARA O TRATAMENTO DE LISTERIA**

(30) Prioridade Unionista: 23/03/2006 US 60/785,119

(73) Titular(es): CANBIOCIN INC.

(72) Inventor(es): DAVID C. SMITH, LYNN MCMULLEN,
MICHAEL E. STILES

(74) Procurador(es): Ana Paula Santos Celidonio

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007000444 de 23/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/106993de 27/09/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM ALIMENTO E MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE LISTERIA A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento de Listeria em alimentos. As composições e métodos incluem pelo menos um primeiro conservante e um segundo conservante selecionado a partir do grupo que consiste em uma espécie de Carnobacterium, a Carnobacterium maltaromaticum, um fermentado, contendo pelo menos uma bacteriocina e suas combinações.



**“COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM ALIMENTO E
MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE LISTERIA”**

REFERÊNCIA CRUZADA DO PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

A presente invenção reivindica a prioridade do documento US
5 60/785.119, depositado em 23 de março de 2006, e é uma continuação em
parte do documento US 11/013.929, depositado em 17 de dezembro de 2004.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos métodos e às composições
para a preservação do alimento e dos produtos alimentícios, em particular, das
10 carnes processadas, da contaminação de microorganismos ou da deterioração,
especificamente para evitar o crescimento da *Listeria monocytogenes*. A
presente invenção também se refere a novas cepas de *Carnobacterium*
maltaromaticum que produzem moléculas de bacteriocinas possuindo atividade
antimicrobiana. A bactéria da presente invenção e a(s) bacteriocina(s)
15 produzida(s) pela bactéria ou outra bactéria pode(m) ser utilizada(s) para tratar
alimento e como conservante de alimentos. Em uma aplicação específica da
presente invenção, a bacteriocina e a cepa bacteriana que produz a
bacteriocina são utilizadas para controlar a bactéria patogênica, incluindo, mas
não limitado a, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) em produtos de
20 carne, sem prejudicar o tempo de armazenagem das carnes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Nos Estados Unidos da América, uma mistura de lactato de sódio
(NaL) e/ou lactato de potássio e diacetato de sódio (NaAc) é conhecida como
um método para evitar o crescimento de *Listeria monocytogenes* em carnes
25 processadas. Também é conhecido por tratar alimentos processados,
utilizando NaL ou NaL/ NaAc em conjunto com Nisin (uma bacteriocina
derivada do *Lactococcus lactis*), Microgard (um *Propionii*) e Alta 2341 (um
produto de fermentação disponível comercialmente do *Pediococcus*

acidilactici).

A *Carnobacterium maltaromaticum* é uma das espécies de um grupo diverso de bactérias que são classificadas como Bactéria do Ácido Lático (LAB). O LAB tem sido utilizado por séculos nas indústrias de alimento e laticínios para a produção de alimentos fermentados. É importante nesta capacidade produtiva sua habilidade de produzir compostos intensificadores do sabor e aromáticos (Stiles e Holzapfel, 1997; Carr et al., 2002). O LAB tem sido caracterizado por sua capacidade de produzir uma variedade de isômeros do ácido láctico a partir da fermentação dos carboidratos. As *Carnobacterium* são distintas dos lactobacilos devido à sua incapacidade de crescer em ágar acetato em pH 5,6, embora seja capaz de produzir virtualmente ácido láctico L(+) puro a partir da glicose, e sua capacidade de fermentar ambos o glicerol e o manitol, propriedades que não incomuns em lactobacilos (Holzapfel e Gerber, 1983; Shaw e Harding, 1984).

Um dos métodos em que o *C. maltaromaticum* pode inibir a bactéria potencialmente patogênica é através da produção de bacteriocinas. As bacteriocinas são sintetizadas por ribossomos e são materiais proteínáceos antibacterianos de baixo peso molecular que são capazes de matar bactérias intimamente relacionadas (Klaenhammer, 1993). Foi demonstrado que as bacteriocinas são produzidas por LAB isolados da carne bovina, presunto deteriorado, bem como de bolor desenvolvido em queijo em pasta francês (Jack et al., 1996; Herbin et al., 1997). Pelo fato das bacteriocinas serem isoladas do LAB de alimentos tais como a carne e produtos lácteos, ambos o LAB e as bacteriocinas foram consumidas por séculos. Foi demonstrado que as substâncias inibitórias produzidas pela *C. maltaromaticum* são bacteriocinas por sua susceptibilidade a enzimas proteolíticas.

Há uma necessidade contínua por novos conservantes alimentícios que contém propriedades novas e úteis. Além disso, há um

interesse crescente na substituição dos conservantes alimentícios “químicos” tradicionais com conservantes “naturais” eficazes, em especial, aqueles que inibem os microorganismos patogênicos. Com relação a isto, têm sido realizadas pesquisas consideráveis em peptídeos bacterianos, por exemplo, bacteriocinas, que são freqüentemente estáveis e possuem atividade antimicrobiana.

Apesar da utilidade dos métodos descritos acima, ainda existe uma necessidade por uma conservação aprimorada do produto processado para controlar o crescimento e/ou para eliminar a contaminação bacteriana, em particular, de *L. monocytogenes*.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à utilização de novas cepas de *Carnobacterium maltaromaticum* (*C. maltaromaticum*) produtoras de bacteriocinas, anteriormente conhecida como *Carnobacterium piscicola* (*C. piscicola*), possuindo atividades antimicrobianas excepcionais, em combinação com outros conservantes alimentícios. As novas cepas da presente invenção, CB1, CB2 e CB3 produzem múltiplas bacteriocinas, incluindo a carnobacteriocina BM1 e piscicolina 126. Estas bacteriocinas possuem um amplo espectro de atividade anti-Listeriana e as cepas produtoras crescem em temperaturas de refrigeração e não causam deterioração do alimento com relação aos outros microorganismos de deterioração relacionados de maneira similar ou dentro da vida de prateleira típica do alimento. Em combinação, estes dois tipos de conservantes fornecem atividade antibacteriana inesperada e sem precedentes.

A presente invenção compreende o método de combinação de um conservante da presente invenção com técnicas de conservação existentes ou compostos conforme identificados acima para os produtos alimentícios. Alguns métodos incluem a adição de dois conservantes aos ingredientes

alimentícios antes do cozimento, por exemplo, a uma massa alimentícia; alguns métodos incluem a aplicação do conservante da presente invenção ao alimento após o cozimento, por exemplo, pela pulverização. Foi demonstrado que estes métodos melhoram a eficácia na inibição de *L. monocytogenes* em alimentos processados inesperadamente além da utilização somente do tratamento.

Uma vantagem da presente invenção é a atividade anti-listeriana sem precedentes. Tal atividade é excepcional. Outra vantagem da presente invenção é que há ambos um potencial bactericida e bacteriostático. Ainda, outra vantagem da presente invenção é que esta bactéria cresce em temperaturas tão baixas quanto 0°C, indicando que elas crescem e são eficazes em temperaturas de refrigeração que são essenciais para a conservação das carnes. Ainda, uma vantagem adicional da presente invenção é que estas cepas, em e por elas mesmas, não causam deterioração significativa das carnes.

A presente invenção apresenta a adição de um primeiro conservante e um segundo conservante para um alimento ou ingrediente(s) alimentício(s), dito segundo conservante compreende uma preparação seca de *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 e seu fermentado seco, ou o fermentado seco sozinho (isto é, sem células vivas). De acordo com a presente invenção, a combinação destas duas técnicas de conservação apresenta uma inibição aprimorada de *L. monocytogenes*. Também foi determinado que em combinação com um segundo conservante de acordo com a presente invenção, a *L. monocytogenes* poderia ser inibida em um nível comercial de NaL + NaAc, ou metade daquele nível. A utilização de NaL + NaAc em combinação com seu segundo conservante possui um efeito notadamente aprimorado de redução dos números de *Listeria monocytogenes* que poderiam ser detectados em um produto alimentício processado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 compara a eficácia do lactato de sódio (GalafloTM) a

um segundo conservante da presente invenção.

A Figura 2 compara a eficácia da mistura de lactato de sódio/acetato de sódio (Optiform™) a um segundo conservante da presente invenção.

5 A Figura 3 compara a eficácia da pediocina (Alta™ 2341) a um segundo conservante da presente invenção.

A Figura 4 mostra os resultados dos experimentos descritos no Exemplo 2.

10 A Figura 5 mostra os resultados dos experimentos descritos no Exemplo 5.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende métodos e composições para melhorar a conservação de bebidas e alimentos pela aplicação ao alimento de um primeiro conservante e um segundo conservante. O primeiro conservante é um conservante químico convencional, tal como um ou mais acidulantes; o
15 segundo conservante compreende um ou mais do seguinte: pelo menos uma espécie de Carnobacterium; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de Carnobacterium; um fermentado derivado de espécies de Carnobacterium; uma ou mais bacteriocinas
20 parcialmente ou totalmente purificadas; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas produzidas por uma ou mais espécies de Carnobacterium; e suas combinações.(REIV 1 e 6)

A presente invenção inclui as composições e métodos para a inibição de Listeria, em que o primeiro conservante é combinado com uma
25 quantidade eficaz de um segundo conservante, dito segundo conservante compreende uma composição contendo pelo menos um ingrediente do grupo que consiste em uma bacteriocina(s), bacteriocina(s) produzida(s) por uma Carnobacterium, uma ou mais cepas de espécies de Carnobacterium, um

fermentado contendo bacteriocina(s), um fermentado contendo uma bacteriocina produzida por uma *Carnobacterium*; e suas combinações. Nas realizações preferidas da presente invenção, o segundo conservante inclui pelo menos uma espécie de *Carnobacterium* e um fermentado produzido por ditas espécies de *Carnobacterium* ou o fermentado sozinho.

A presente invenção inclui as composições e os métodos que compreendem uma mistura de (a) um primeiro conservante; e (2) um segundo conservante que compreende uma *Carnobacterium* e/ou seus fermentados, dito fermentado compreende pelo menos uma bacteriocina que evita efetivamente o crescimento de *Listeria monocytogenes*. As composições e métodos da presente invenção podem ser utilizados em conjunto com a produção, embalagem e armazenamento do alimento e produtos alimentícios, e a limpeza do equipamento então utilizado. As composições e os métodos da presente invenção podem ser utilizados em conjunto com a produção, preservação, tratamento e armazenamento do alimento e produtos alimentícios.

As composições e os métodos da presente invenção podem ser utilizados na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* no alimento e nos produtos alimentícios.

De acordo com algumas realizações da presente invenção, pode ser desejável adicionar um primeiro conservante e um segundo conservante e um alimento ou um de seus ingredientes antes do cozimento. Nestas realizações da presente invenção, o segundo conservante compreende tipicamente pelo menos um fermentado (e opcionalmente pelo menos uma cepa de *Carnobacterium*).

De acordo com outras realizações da presente invenção, pode ser desejável colocar a superfície em contato com um alimento após o processamento ou o cozimento. Nestas realizações da presente invenção, o

segundo conservante compreende, tipicamente, pelo menos uma cepa de *Carnobacterium* e pelo menos um fermentado.

Conforme utilizado no presente, um primeiro conservante se refere a qualquer conservante, tipicamente, um conservante apropriado para a utilização em um alimento, produto alimentício ou ingrediente de um produto alimentício. Os conservantes exemplares incluem, mas não estão limitados a, um lactato e/ou um diacetato contendo o conservante, e suas misturas. Os conservantes de lactato típicos incluem, mas não estão limitados a, lactato de sódio e potássio. Os conservantes de acetato típicos incluem, mas não estão limitados a diacetato de sódio. Os exemplos de tais primeiros conservantes estão disponíveis comercialmente com os nomes comerciais de Galaflow (um lactato de sódio), Optiform (um lactato de sódio e uma mistura de diacetato de sódio) e Purasal (lactatos disponíveis pela Purac). Estes conservantes podem ser utilizados em qualquer quantidade conhecida pelos técnicos no assunto, tipicamente, em uma quantidade ensinada pelos fornecedores de tais produtos.

Conforme utilizado no presente, um segundo conservante se refere a qualquer conservante que contém pelo menos uma cepa de bactéria produtora de bacteriocina e/ou uma composição que compreende um fermentado contendo uma ou mais bacteriocinas. Os segundos conservantes exemplares incluem, mas não estão limitados a, pelo menos uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado derivado de uma espécie de *Carnobacterium*; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas produzidas ou obtidas a partir de uma espécie de *Carnobacterium*; e suas combinações.

Conforme utilizado no presente, *Carnobacterium* se refere a

qualquer espécie de *Carnobacterium* que produz uma ou mais bacteriocinas. A bacteriocina pode ser produzida naturalmente ou pode ser um produto de modificação genética. Nas realizações preferidas da presente invenção, a espécie de *Carnobacterium* é a *Carnobacterium maltaromaticum*. Em algumas

5 realizações da presente invenção, a espécie de *Carnobacterium maltaromaticum* é o isolado de CB1. Nas realizações de maior preferência da presente invenção, a espécie de *Carnobacterium maltaromaticum* é o CB1, depositado no American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA 20118) em 9 de julho de 2003, e recebeu o número de

10 acesso PTA-5313. Em outra realização exemplar, a presente invenção compreende uma cultura de cepas bacterianas CB2. O CB2 foi depositado no American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA 201 18) em 9 de julho de 2003, e recebeu o número de acesso PTA- 5314. Em outra realização exemplar, a presente invenção compreende

15 uma cultura de cepas bacterianas CB3. CB3 foi depositado na American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA 20118) em 9 de julho de 2003, e recebeu o número de acesso PTA-5315.

Em outra realização exemplar, a presente invenção compreende a utilização de um primeiro conservante e um segundo conservante para o

20 tratamento do alimento, para o tratamento da bactéria de degradação no alimento, para o tratamento da bactéria patogênica no alimento e/ou estabilizar uma vida de prateleira previsível para um alimento ou produto alimentício. As cepas CB1, CB2 e/ou CB3 podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação; podem ser utilizadas com ou sem suas respectivas bacteriocinas; podem ser

25 utilizadas com ou sem um fermentado que compreende suas respectivas bacteriocinas; podem ser utilizadas em combinação com uma ou mais bactérias produtoras de bacteriocinas incluindo, mas não limitadas a, bactéria do ácido láctico; e/ou podem ser utilizadas com uma ou mais bacteriocinas

produzidas a partir de diferentes bactérias; e/ou podem ser utilizadas com ou sem um fermentado que compreende uma ou mais bacteriocinas produzidas a partir de uma bactéria diferente.

Outra realização exemplar da presente invenção inclui uma
5 mistura de (1) um primeiro conservante; e (2) um segundo conservante que compreende uma *Carnobacterium* e seu fermentado, dito fermentado compreende pelo menos uma bacteriocina que evita efetivamente o crescimento de *Listeria monocytogenes*, em que a mistura é adicionada à “massa de carne” do produto alimentício antes do processamento.(REIV 12)

10 Conforme utilizado no presente, a quantidade efetiva se refere a qualquer dosagem ou quantidade apropriada para inibir a bactéria, de preferência, uma espécie de *Listeria*, de maior preferência, a *Listeria monocytogenes*. Esta quantidade pode ser bacteriostática ou bactericida. Um técnico no assunto irá reconhecer prontamente ou pode determinar facilmente
15 uma quantidade efetiva. Para o segundo conservante, o Depositante constatou descobriu que uma quantidade de 10^2 , ou menos, de unidades formadoras de colônia (“cfu”) por grama ou por cm^2 , tipicamente, não é suficiente para completar com a população microbiana adventícia existente. O Depositante constatou descobriu que 10 vezes maior do que a microflora microbiana de
20 fundo inicial, tipicamente, cerca de 10^3 cfu por grama ou por cm^2 ou maior é suficiente para superar o crescimento da população de bactéria adventícia existente (por exemplo, microflora de fundo). Um técnico no assunto irá reconhecer que a quantidade de bactéria adventícia em um produto alimentício é variável. De acordo com a presente invenção, a quantidade da composição
25 deve ser de cerca de 10 vezes ou maior do que a quantidade de bactéria adventícia.

Uma quantidade eficaz de um segundo conservante se refere a uma quantidade suficiente para ser bacteriostático ou bactericida. Um técnico

no assunto irá reconhecer que a quantidade ou concentração pode variar com o tipo de alimento e quando ele é aplicado ao alimento, entre outras considerações. Por exemplo, os Depositantes constataram descobriram que até cerca de 10% em peso pode ser adicionado aos ingredientes previamente processados, por exemplo, a uma massa de alimento. Por exemplo, um intervalo de cerca de 0,05% a cerca de 5% em peso foi constatado descoberto com sendo eficaz como um conservante sem afetar indevidamente outras características do alimento, tais como o sabor.

Um técnico no assunto também irá reconhecer que a concentração de cada conservante individual não precisa ser bacteriostática ou bactericida. De acordo com a presente invenção, uma mistura ou efeito combinado dos dois conservantes deve ser suficiente para inibir uma bactéria, tal como a *Listeria*. A quantidade efetiva bacteriostaticamente ou bactericidamente ótima a ser utilizada irá depender da composição do produto alimentício particular a ser tratado e do método utilizado para aplicar a composição à superfície do alimento, mas pode ser determinado por simples experimentação.

Uma realização da presente invenção compreende intervalos de concentração da mistura antes do processamento apropriado para inibir as espécies de *Listeria*, notadamente a *Listeria monocytogenes*. Esta quantidade pode ser bacteriostática ou bactericida. Os intervalos podem diferir com base na combinação das misturas, isto é, CB1 e fermentado, CB1, outro bacteriocina, e fermentado, etc. Um técnico no assunto irá prontamente reconhecer ou pode facilmente determinar uma quantidade eficaz.

Conforme utilizado no presente, fermentado se refere à utilização de um produto de fermentação de uma ou mais culturas de bactérias naturais, fermentado pasteurizado ou não pasteurizado homólogo, fermentado pasteurizado ou não pasteurizado heterólogo ou suas combinações. As

culturas de bactérias naturais da presente invenção estão descritas acima. Um fermentado homólogo se refere à cultura do sobrenadante de uma única cultura bacteriana preparada de acordo com as técnicas de preparação padrão. Um fermentado heterólogo se refere à cultura de sobrenadante derivada de uma cultura de bactéria diferente preparada de acordo com as técnicas de preparação padrão. O fermentado homólogo ou heterólogo pode ser (i) pasteurizado ou não pasteurizado; (ii) liofilizado; ou (iii) seco de outra forma. Duas ou mais culturas de bactérias podem ser misturadas ou adicionadas separadamente. Dois ou mais fermentados podem ser misturados ou adicionados separadamente. Uma cultura de bactéria combinada com um ou mais fermentados pode ser misturada ou adicionada seqüencialmente. O fermentado também inclui um ou mais ingredientes ativos parcialmente ou totalmente purificados produzidos a partir de uma bactéria, por exemplo, as bacteriocinas.

Conforme utilizado no presente, a bacteriocina é utilizada em sua definição convencional, tipicamente, se referindo a uma ou mais substâncias produzidas por uma primeira bactéria e eficazes contra uma ou mais segunda bactéria. As bacteriocinas, que são peptídeos antibacterianos e proteínas produzidas pela bactéria incluindo LAB como subprodutos normais de seu metabolismo, são conservantes naturais potencialmente muito atrativos. Muitos LAB são bactérias industrialmente importantes, bem estabilizadas, que incluem o *Streptococcus thermophilus* e as espécies do gênero *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*. Eles têm sido utilizados para a produção dos alimentos fermentados que foram consumidos de modo seguro por milhares de anos. Pelo fato de eles terem obtido uma posição de microorganismos "seguros", eles são uma fonte particularmente apropriada de antimicrobianos naturais, tais como as bacteriocinas, e para a utilização em alimentos.

As bacteriocinas podem possuir um amplo ou reduzido espectro de atividade antibacteriana, e não são letais às células que as produzem. As bactérias se protegem dos efeitos letais de suas próprias bacteriocinas pela produção de proteínas de imunidade.

5 Um aspecto importante da presente invenção compreende a utilização do fermentado bacteriano na preparação, preservação e tratamento de um alimento, de preferência, um alimento processado. De acordo com os ensinamentos da presente invenção, as bacteriocinas produzidas pelas cepas CB1, CB2 ou CB3 parecem agir de modo favorável (possivelmente
10 sinergicamente) para fornecer maior proteção e eficácia do que a utilização das bacteriocinas individuais sozinhas.

Os conservantes antimicrobianos da presente invenção podem ser utilizados em conjunto com qualquer produto alimentício que é suscetível à degradação microbiana, ou em qualquer estágio do processamento que resulta
15 em um alimento ou produto alimentício.

“Alimento”, “produto alimentício”, “ingrediente(s)”, “massa”, “fresco” e “processado” pretendem ser utilizados em seu significado comum, conforme conhecido pelos técnicos no assunto.

Os conservantes da presente invenção podem ser adicionados
20 sozinhos ou em combinação, de modo serial ou seqüencial, a qualquer receita, ingrediente(s) alimentício(s)(REIV 17), ou substância alimentícia para a qual é desejável a inibição da degradação alimentícia e/ou patógenos de origem alimentar, incluindo os alimentos crus e alimentos que são parcialmente ou totalmente processados, curados ou fermentados antes da adição dos
25 conservantes da presente invenção.

Por exemplo, os conservantes podem ser adicionados a uma substância alimentícia comestível não processada incluindo os vegetais crus, tais como a alface, couve ou cenoura, carne bovina, peixe, frutos do mar e

outros alimento crus; uma substância alimentícia processada não fermentada, incluindo os produtos de carne, tais como cachorro quente ou salsicha alemã, salsicha de Bolonha e outras carnes moídas; uma substância alimentícia processada fermentada, tal como a salsicha ou o chucrute; ou uma substância alimentícia processada curada, tal como o presunto. A substância alimentícia também pode ser um alimento com base em leite ou creme, tal como o sorvete ou o creme cottage.

A utilização do termo “superfície alimentar” é definida incluindo qualquer e todas as superfícies internas e externas do produto alimentício sendo tratadas. Uma composição de acordo com a presente invenção é mais prontamente utilizada pela aplicação da mesma na superfície externa de um produto alimentício misturado, tal como um cachorro quente ou salsicha Bologna, ou de um alimento sólido, tal como um pedaço de rosbife, de modo a minimizar a perda da atividade na fase graxa do alimento. Uma composição pode ser alternativamente incluída na emulsão ou nos ingredientes crus de um alimento, tal como massa, molhos ou molho picante, ou no interior de produtos sólidos, tais como presunto, pela pulverização, injeção ou tamboração. Ainda em outras realizações, a composição pode ser aplicada como uma marinada, empanado, um tempero esfregado, um revestimento, uma mistura de colorantes e similares, sendo o critério chave que a composição antimicrobiana esteja disponível na superfície sujeita a degradação bacteriana.

Uma composição pode ser colocada indiretamente em contato com a superfície alimentar pela aplicação da composição nos materiais de embalagem alimentícia ou nos invólucros e, portanto, aplicando a embalagem na superfície alimentícia.

Os conservantes podem ser adicionados à substância alimentícia por qualquer método apropriado, como por exemplo, pela combinação ou mistura, pela pulverização ou névoa de uma suspensão da bactéria e um

veículo apropriado sobre a superfície do alimento e similares. Por exemplo, os conservantes poderiam ser incorporados em uma emulsão contendo a massa e uma mistura de carne, antes do processamento adicional, tal como o recheio e/ou cozimento.

5 É pretendido que a presente invenção não deva ser limitada a um tipo de alimento, o estágio do processamento do alimento ou seus ingredientes, ou o método ou tempo de aplicação dos conservantes.

 Conforme utilizado no presente, os produtos de carne frescos se referem à carne crua ou não cozida (armazenadas em condições de
10 refrigeração) que podem ou não conter as misturas de temperos adicionais, e inclui a carne integral ou moída. Os produtos de carne processados se referem às carnes que foram (i) formuladas e cozidas; (ii) curadas; ou (iii) não curadas para produzir um produto comercializável.

 Conforme utilizado no presente, a vida de armazenamento
15 previsível se refere à capacidade de controle da degradação por um período de tempo distinto, em que o ponto de degradação se torna evidente. Por exemplo, a bactéria pode ser aplicada a um produto alimentício para alcançar uma vida de armazenamento de cerca de 10 semanas ou maior, em que o ponto de degradação pode ser detectável. Em um período de armazenamento de 10
20 semanas, a composição da presente invenção controla a degradação por uma ou mais das seguintes maneiras: (i) pela aplicação da bactéria possuindo um tempo conhecido para a degradação; (ii) pela aplicação da bactéria que produz uma ou mais proteínas ou bacteriocinas que matam ou controlam a bactéria de degradação; ou (iii) pelas suas combinações.

25 A presente invenção ensina que a combinação dos tratamentos, mesmo com um nível reduzido de NaL/ NaAc do que o comum no uso comercial, possui melhor inibição da *Listeria* comparado ao método utilizado sozinho.

Por exemplo, os Depositantes contataram descobriram que para uma massa alimentícia, um segundo conservante que compreende uma preparação seca das espécies de *Carnobacterium* *Cranobacterium* e seu fermentado seco possui certos benefícios na produção de um produto alimentício. Vide o Exemplo 5.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Um experimento foi iniciado em que um segundo conservante que compreende uma preparação seca congelada de CB1 e seu fermentado seco foi comparado com outras tecnologias inibitórias para a inibição de *Listeria monocytogenes* em salsicha vienense embalada a vácuo.

O objetivo deste estudo era comparar a eficácia do segundo conservante com o lactato de sódio (Galaflow concentração final de 4,8%), mistura de NaL/NaAc (Optiform com concentração final de 3,0%) e Alta 2341 (Kerry concentração final de 3,0%). Com base nesta formulação de salsicha vienense, parece que o segundo conservante desempenhou tão bem quanto o Galaflow e desempenhou melhor do que o Optiform e o Alta™2341. No nível de utilização do NaL (Galaflow), é esperado que a qualidade sensorial das salsichas vienenses sejam prejudicadas. Vide os dados anexados. A formulação de salsicha vienense utilizada foi baseada nos produtos fabricados no Canadá. Os resultados estão mostrados graficamente nas Figuras de 1 a 3.

EXEMPLO 2

Pelo fato do segundo conservante ser aprovado para a utilização nos Estados Unidos, o estudo foi modificado e repetido com uma formulação de salsicha vienense que representou um produto norte-americano. Ao mesmo tempo, também foi testada a eficácia de metade do nível de NaL/NaAc.

Porque NaL/NaAc é a norma como um conservante para as salsichas vienenses produzidas nos EUA, foi decidido comparar sua eficácia

em um nível utilizado comercialmente de lactato a 2,0% e diacetato de sódio a 0,1% e em metade destes níveis.

Um experimento foi iniciado em que três replicatas do estudo foram realizadas com o produto produzido na fábrica piloto Griffith Laboratories em Toronto - Ontário, Canadá.

Eles foram inoculados na superfície com um coquetel de quatro sorotipos de *L. monocytogenes* e, onde requerido pelo projeto experimental, com um nível de segundo conservante identificado como 3 AU (unidades arbitrárias) que é de 4,26 g de segundo conservante por 100 mL de água estéril.

O produto inoculado e o controle foram embalados a vácuo, armazenados a 4° C e testados por técnicas de enumeração e detecção bacterianas de enriquecimento e padrão durante um período de tempo de um mínimo de 71 dias.

Para o estudo de desafio, duas salsichas vienenses foram colocadas assepticamente em sacos de filme com barreira ao alto teor de oxigênio (UniPac, Edmonton).

O coquetel de *Listeria* consistia em uma cepa compatível de cada um dos seguintes sorotipos: 1/2a, 1/2b, 3a e 4b foram preparados pela subcultura de cada uma das cepas em duas ocasiões a 37° C das culturas de linhagem congeladas em TSBYE (caldo de soja Difco Tryptic com 6% de extrato de levedura) e 1 mL de cada cepa de *Listeria* foi colocada em um tubo Falcon estéril de 15 mL, misturado vigorosamente em um vórtex e centrifugado a 5.000x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas novamente em 4 mL de solução salina a 0,85% estéril e diluída com salina a 0,85% de cerca de 10⁵ cfu de cepas de *Listeria* por mL. Dois volumes de 50 µL de volumes foram inoculados em cada lado das salsichas vienenses e as salsichas vienenses na embalagem foram massageadas vigorosamente

com a mão por 15 segundos.

Os tratamentos inoculados com o segundo conservante foram preparados pela dissolução de 4,26 g por 100 mL (3 AU) de água estéril temperada a 4° C e 0,132 µL da segunda suspensão de conservante foi adicionada em cada lado das salsichas vienenses e massageadas vigorosamente. As salsichas vienenses inoculadas foram embaladas a vácuo sem atraso e armazenadas a 4° C.

As amostras foram retiradas do armazenamento em intervalos de amostragem especificados e testadas quanto à carga bacteriana total (APT), contagem de *Listeria* (Palcam) e *Carnobacteria* (CTSI) por diluições de banho de superfície de 100 mL de peptona a 0,1% estéril adicionadas a cada uma das 3 embalagens após a mistura dos conteúdos das embalagens.

Se a contagem de *L. monocytogenes* for indetectável em PALCAM, então no próximo período de amostragem, um mL da amostra será inoculado em 9 mL de caldo de enriquecimento de *Listeria* modificada UVM. Os tubos inoculados foram colocados a 37° C e corridos sobre ágar PALCAM para detectar sobreviventes de *Listeria spp.* após 24 e 48 horas.

Os resultados são mostrados graficamente na Figura 4.

EXEMPLO 3

Com estas combinações, um coquetel de *L. monocytogenes* aplicado na superfície de salsichas vienenses em cerca de 80.000 cfu/embalagem foi reduzido a um nível excepcional comparado ao tratamento sozinho, logo após a fabricação e até 70 dias de armazenamento a 4° C. Os resultados são mostrados na Figura 4.

EXEMPLO 4

Os experimentos nos Exemplos de 1 a 3 foram tão bem sucedidos no tratamento de *Listeria* com os conservantes combinados da presente invenção que a *Listeria* não poderia ser detectada pelas técnicas de

10

TECNOLOGIA COMPETITIVA # 1 – ½ LACTATO – DIACETATO (DADOS DE ENRIQUECIMENTO)

[illegible]

Dias																						
Tratamento		7			14			21			35			50			56			71		
Listeria	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	na	na	na	-	-	-
Lactato	-																					
Diacetato																						
(total)	+																					
micocina	II																					
(3 AU)																						
Listeria	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lactato	-																					
Diacetato																						
(metade)	+																					
micocina	II																					
(3 AU)																						

EXEMPLO 5

As duas combinações de conservantes da presente invenção também foram testadas pela adição das mesmas a uma massa de carne que foi processada em uma formulação de salsicha vienense. Nos resultados experimentais ilustrados na Figura 5, a Listeria sozinha, uma mistura de célula/fermentado de Carnobacterium sozinha, e o Optiform sozinho foram comparados às composições que continham uma quantidade constante de Optiform misturado com diversas concentrações de mistura de célula/fermentado.

Todos os experimentos que incluíam a combinação dos dois conservantes produziram reduções estatisticamente significantes no nível detectado de Listeria quando comparado a sem conservantes ou cada um dos conservantes sozinhos. Na Figura 5, A corresponde a 0,05% de célula/fermentado e Optiform; B corresponde a 0,1% de célula/ fermentado; C

corresponde a 0,5% de célula/ fermentado e Optiform; D corresponde a 1% de célula/ fermentado e Optiform; e E corresponde a 5% de célula/ fermentado e Optiform. Conforme notado acima, a mesma quantidade de Optiform foi utilizada em cada um dos experimentos.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro conservante e um segundo conservante, em que dito segundo conservante compreende uma quantidade eficaz de uma composição selecionada a partir do grupo que consiste em pelo menos uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado derivado de uma espécie de *Carnobacterium*; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas e suas combinações.

2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dito primeiro conservante é um conservante selecionado a partir do grupo que consiste em um lactato, um diacetato e suas combinações.

3. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o lactato é o lactato de sódio e o diacetato é o diacetato de sódio.

4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o segundo conservante compreende a *Carnobacterium maltaromaticum*.

5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a *Carnobacterium maltaromaticum* está depositada no ATCC com o número de acesso número PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315.

6. MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ALIMENTO, caracterizado pelo fato de que compreende o contato de um alimento com uma quantidade eficaz de um primeiro conservante e um segundo conservante, em que dito segundo conservante compreende uma quantidade eficaz de uma

composição selecionada a partir do grupo que consiste em pelo menos uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado derivado de uma espécie de *Carnobacterium*; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas e suas combinações.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o contato com um alimento compreende a adição da composição a uma massa alimentícia antes do cozimento.

10 8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o contato com um alimento compreende a aplicação da composição a uma superfície alimentícia após o processamento.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que dito primeiro conservante é um conservante selecionado a partir do grupo que consiste em um lactato, diacetato e suas combinações.

15 10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o segundo conservante compreende a *Carnobacterium maltaromaticum*.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a *Carnobacterium maltaromaticum* é selecionada a partir daquelas depositadas no ATCC com os números de acesso número PTA-5313, PTA-5314, e PTA-5315.

12. MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE LISTERIA, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um primeiro conservante e um segundo conservante, em que dito segundo conservante compreende uma quantidade eficaz de pelo menos uma *Carnobacterium*; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de *Carnobacterium*;

um fermentado derivado de uma espécie de *Carnobacterium*; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas e suas combinações.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que dito primeiro conservante é um conservante selecionado a partir do grupo que consiste em um lactato, diacetato e suas combinações.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o lactato é o lactato de sódio e o diacetato é o diacetato de sódio.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o segundo conservante compreende a *Carnobacterium maltaromaticum*.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o *Carnobacterium maltaromaticum* é depositado no ATCC com o número de acesso número PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315.

17. MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ALIMENTO, caracterizada pelo fato de que compreende a adição a um primeiro conservante e um segundo conservante em uma receita para um alimento, em que dito segundo conservante compreende uma quantidade eficaz de pelo menos uma *Carnobacterium*; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina; um fermentado contendo pelo menos uma bacteriocina produzida por uma espécie de *Carnobacterium*; um fermentado derivado de uma espécie de *Carnobacterium*; uma ou mais bacteriocinas parcialmente ou totalmente purificadas e suas combinações; e o processamento de dita receita em um alimento ou produto alimentício.

Tecnologias competitivas – contagens PALCAN de Galaflow (Lactato de sódio)

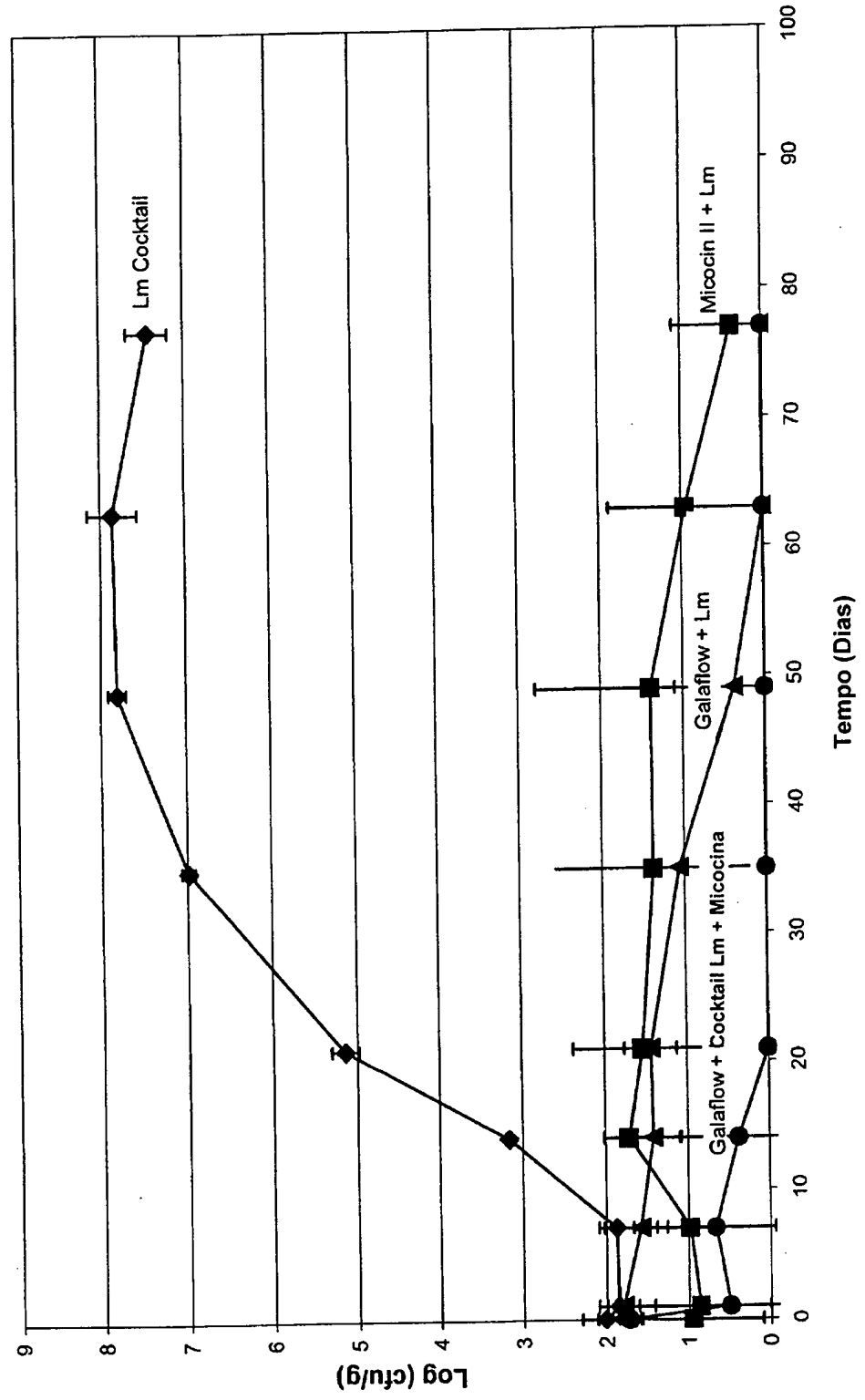


Fig. 1

Tecnologias competitivas – contagens PALCAN de Optiform SD 4

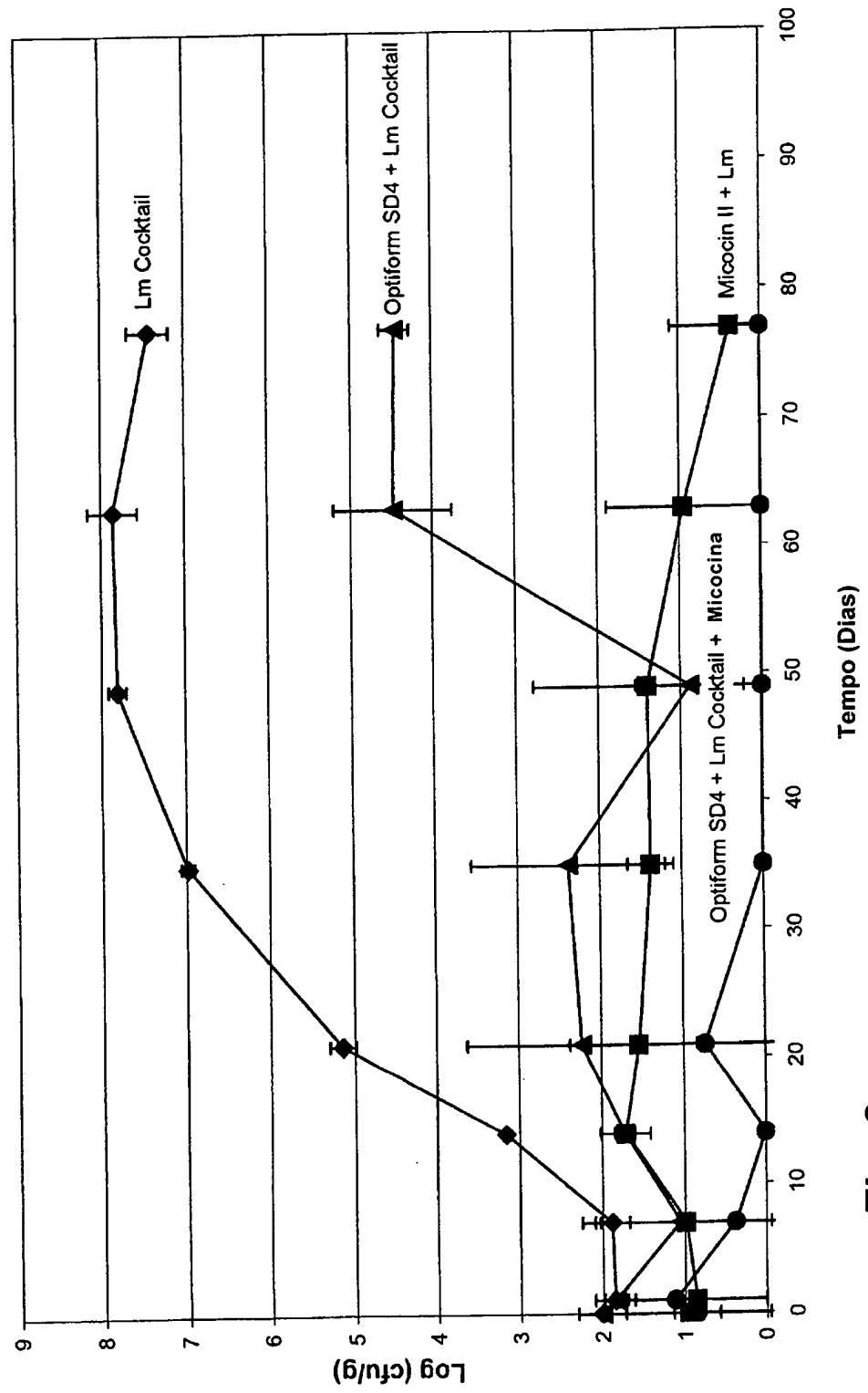


Fig. 2

Tecnologias competitivas – contagens PALCAN de ALTA 2341

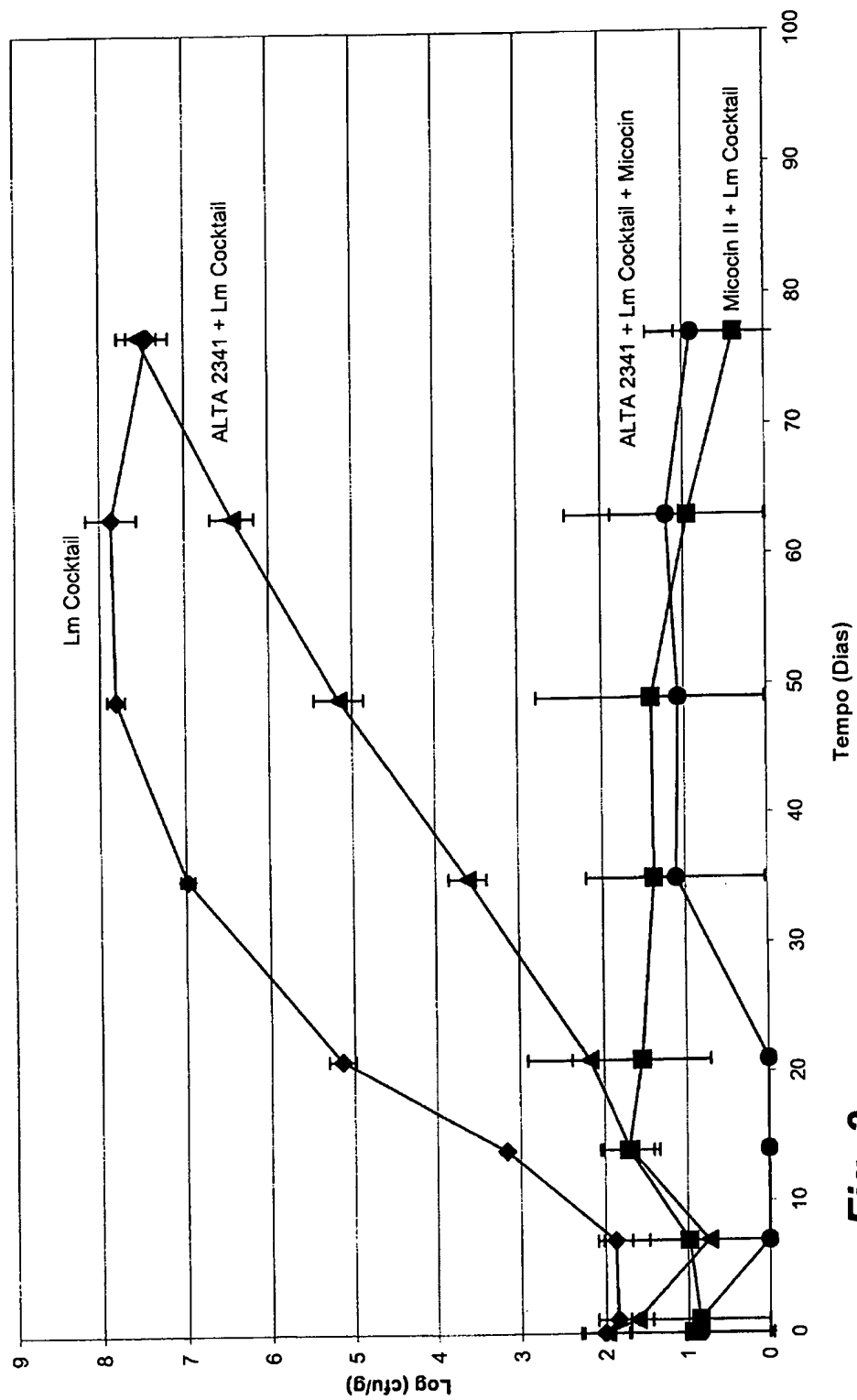


Fig. 3

Tecnologia competitiva # 1 (1/2 Lactato-Diacetato)
 Micocina II 3 AU – Contagens de placas em Palcan
 CanBiocin Inc. – 25 de outubro de 2005

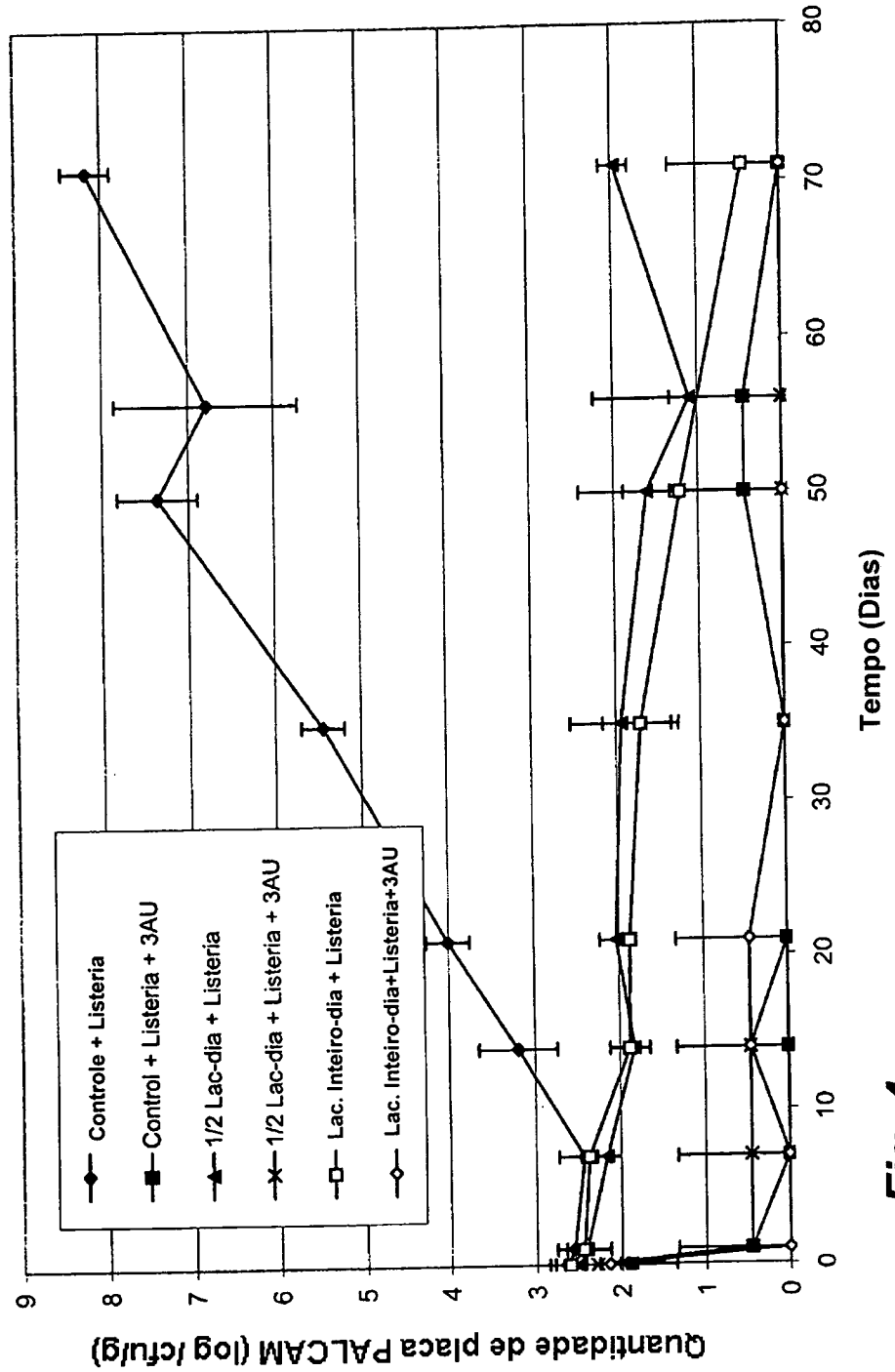


Fig. 4

Várias concentrações de micocina em combinação com Lactato de Sódio e Diacetato de Sódio em um produto de carne processada

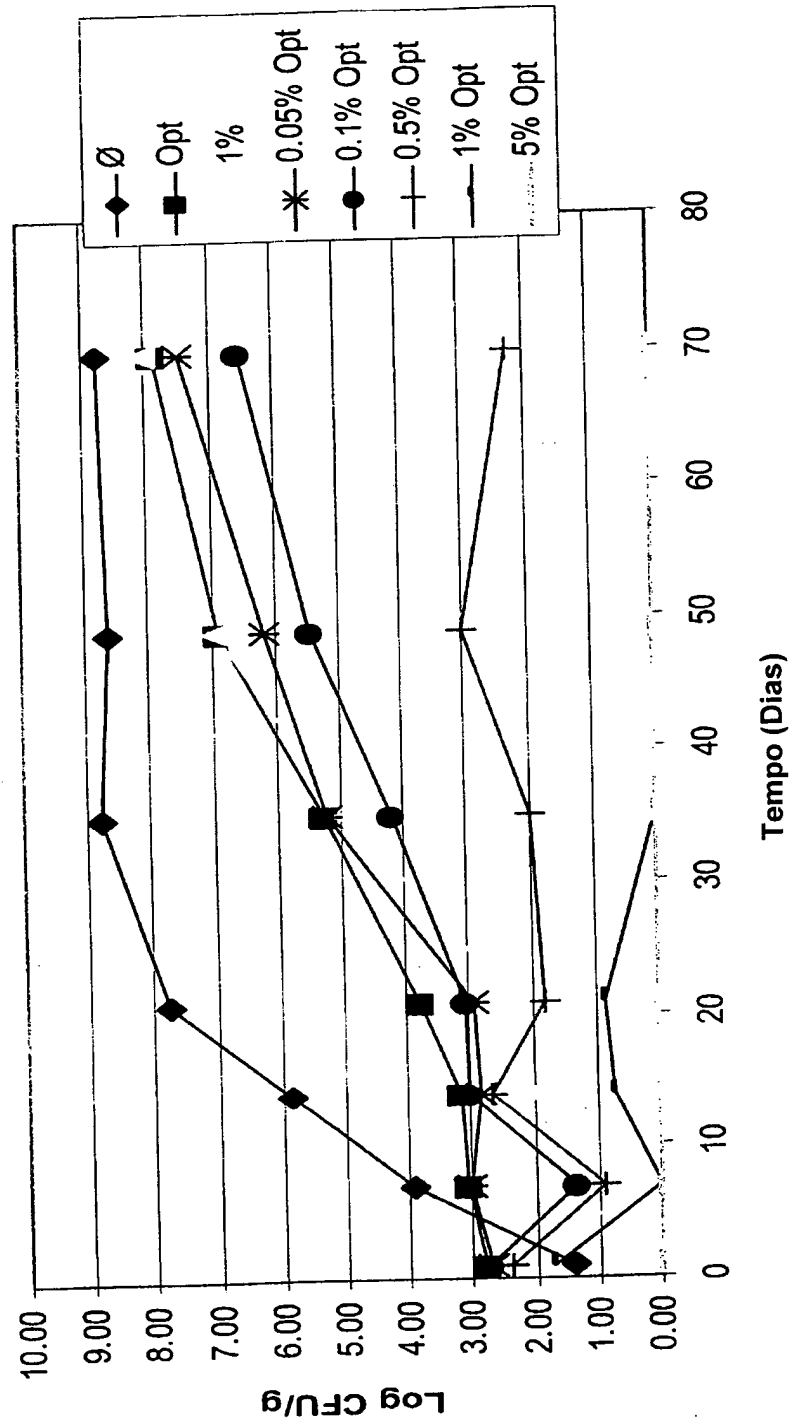


Fig. 5

RESUMO**“COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM ALIMENTO E
MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE LISTERIA”**

5 A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento de Listeria em alimentos. As composições e métodos incluem pelo menos um primeiro conservante e um segundo conservante selecionado a partir do grupo que consiste em uma espécie de Carnobacterium, a *Carnobacterium maltaromaticum*, um fermentado, contendo pelo menos uma bacteriocina e suas combinações.