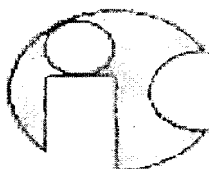




No. 13-236385- 00000-0000

Fecha: 2013-10-04 16:17:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 34**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA
PRESERVACIÓN MEJORADA DE ALIMENTOS PROCESAROS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE CANBIOCIN INC.DOMICILIO Alberta – CANADA74. APODERADO: Juan Pablo Reyes Villamizar

22. BOGOTÁ, D.C., _____

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
2	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)			3	CIP Clasificación Internacional de Patentes
"METODOS Y COMPOSICIONES PARA LA PRESERVACION MEJORADA DE ALIMENTOS PROCESADOS"					
4	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE		IDENTIFICACIÓN	
CANBIOCIN INC.					
5	DATOS DEL SOLICITANTE				
DIRECCIÓN		Suite 1015, 8308-114 Street, Edmonton, Alberta T6G 2E1 (CA)		No. TELÉFONO	
CIUDAD		Alberta, Canadá		CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO				NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA		Canada		Canadá	
6	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS		NOMBRES		NACIONALIDAD	
1. STILES		MICHAEL, E.		Canadiense	
2. MCMULLEN		LYNN		Canadiense	
3. SMITH		DAVID, C.		Canadiense	
4.					
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:					
7	DATOS INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO		CIUDAD	
1 CANADA				ALBERTA	
2 CANADA				ALBERTA	
3 CANADA				TORONTO	
4					
DIRECCIÓN		1039 – 109 Street, Edmonton, Alberta T6J 5G2 (CA)			
		12323-51ª Street, Edmonton, Alberta T6H ON3 (CA)			
		51 Winners Circle, Toronto, Ontario M4L 3Y7 (CA)			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)					
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.					
8	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO				
APELLIDOS		NOMBRES		IDENTIFICACIÓN	
REYES VILLAMIZAR		JUAN PABLO		C.C .80.419.709 T.P .92189	
DIRECCIÓN		Carrera 17 No. 88 – 23 Of. 205		No. TELÉFONO	
CIUDAD		Bogotá D.C.		6557795	
PAÍS		Colombia		CORREO ELECTRÓNICO	
				info@reyes-abogados.com	
				No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
9	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☒ NO				
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS		(31) NÚMERO	
1.				(32) FECHA (AAAA/MM/DD)	
2.					
3.					

10	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, expedido por la Autoridad competente.			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o numero de registro.			
12	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
13	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
14	PARA PUBLICAR A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN O DE LA PRIORIDAD INVOCADA:		15 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO
☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses		☐ 6 meses ☐ 12 meses	N°
☐ Otro Cual:		☐ Otro Cual:	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
			
JUAN PABLO REYES VILLAMIZAR (Apoderado)			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios:		11. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		12. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios:		13. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		14. ☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Documento de Prioridad.		15. Reducción de tasas	
6. ☐ Traducción del documento de prioridad.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
9. ☐ Arte final 12 x 12.		Universidades públicas o privadas	
10. ☐ Anexo formato digital.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		18. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	

19. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

3

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención		FECHA DE PRESENTACIÓN		
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE (S) CANBIOCIN INC.			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. CANBIOCIN INC.				
3.				
4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. CANADA			Alberta	Suite 1015, 8308-114 Street, Edmonton, Alberta T6G 2E1 (CA)
3.				
4.				
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				CANADIENSE
3.				
4.				
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. STILES		MICHAEL, E.	Canadiense	
2. MCMULLEN		LYNN	Canadiense	
3. SMITH		DAVID, C.	Canadiense	
10.				
11.				
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA PRESERVACIÓN MEJORADA DE ALIMENTOS PROCESADOS

I. Campo de la invención

5

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la conservación de alimentos y productos alimenticios, especialmente carnes procesadas, por contaminación de microorganismos o descomposición, específicamente para prevenir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Esta invención también se

10 refiere a nuevas cepas de *Carnobacterium maltaromaticum* que producen moléculas de bacteriocina con actividad antimicrobiana del grupo que comprende *Carnobacterium maltaromaticum* como el depositado en la ATCC bajo los números de acceso PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315; y/o un fermentado que contiene al menos una bacteriocina producida por *Carnobacterium*; y al menos un aditivo

15 seleccionado del grupo que consiste de un agente anti-microbial, un emulsificante, un secuestrante, un tercer preservante, un acidulante, un anti-oxidante y un complemento. Las bacterias de la presente invención, y la(s) bacteriocina(s) producida(s) por las bacterias u otras bacterias, se pueden utilizar para tratar alimentos y como conservante de alimentos. En una aplicación particular de la

20 invención, la bacteriocina y la cepa bacteriana que produce la bacteriocina se utilizan para controlar bacterias patógenas, incluidas pero no limitadas a, *Listeria monocytogenes* ("*L. monocytogenes*") en productos cárnicos, sin poner en peligro el tiempo de almacenamiento de las carnes.

II. Arte previo de la invención

En los Estados Unidos una mezcla de lactato de sodio (NaL) y/o lactato de potasio y diacetato de sodio (NaAc) se conoce como un método para prevenir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en carnes procesadas. También se conoce para el tratamiento de alimentos procesados, utilizar NaL o NaL/ NaAc en combinación con Nisina (una bacteriocina obtenida a partir de *Lactococcus lactis*), Microgard (de una *Propionibacteria*), y Alta 2341 (un producto de fermentación disponible comercialmente de *Pediococcus acidilactici*).

Carnobacterium maltaromaticum es una especie de un grupo diverso de bacterias que son clasificadas como Bacterias Ácido Lácticas (LAB). Las LAB se han utilizado durante siglos en las industrias lechera y de alimentos en la producción de alimentos fermentados. Importante en este aspecto, es su capacidad para producir compuestos aromáticos y mejoradores del sabor (Stiles y Holzapfel, 1997; Carr *et al*, 2002). Las LAB se han caracterizado por su capacidad de producir una variedad de isómeros de ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono. Las Carnobacterias son distintas de los Lactobacilos debido a su incapacidad para crecer en agar acetato a pH 5,6, mientras que son capaces de producir ácido L (+)-láctico prácticamente puro a partir de glucosa, y en su capacidad para fermentar tanto glicerol como manitol, propiedades que son inusuales en lactobacilos (Holzapfel y Gerber, 1983; Shaw y Harding, 1984).

Uno de los métodos por los que *C. maltaromaticum* puede inhibir bacterias potencialmente patógenas es a través de la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas son materiales proteicos antibacterianos sintetizadas ribosómicamente y de bajo peso molecular, capaces de matar bacterias estrechamente relacionadas

(Klaenhammer, 1993). Se han demostrado que las bacteriocinas son producidas por LAB aisladas a partir de carne, jamón echado a perder, así como de queso francés de pasta blanda madurado con moho (Jack et al, 1996;. Herbin et al, 1997). Debido a que las bacteriocinas son aisladas de LAB de alimentos como carnes y lácteos, tanto las LAB como las bacteriocinas han sido consumidas por siglos. Las sustancias inhibidoras producidas a partir de *C. maltaromaticum* han demostrado ser bacteriocinas por su susceptibilidad a enzimas proteolíticas.

Otros métodos para el tratamiento de *Listeria* en alimentos han sido descritos mediante el empleo de conservantes en la solicitud PCTCA2007/000444, los cuales han sido necesarios para obtener los desarrollos de la presente invención.

Existe una necesidad continua sin embargo, de nuevos preservativos de alimentos que aporten propiedades nuevas y útiles. Además, hay un creciente interés en la sustitución de los tradicionales preservantes "químicos" de alimentos con preservantes "naturales" efectivos, especialmente aquellos que inhiben microorganismos patógenos. En este sentido, una considerable investigación se ha llevado a cabo en péptidos bacterianos, por ejemplo, bacteriocinas, que a menudo son estables al calor y tienen actividad antimicrobiana.

A pesar de la utilidad de los métodos descritos anteriormente, todavía existe una necesidad de mejorar la conservación de los alimentos procesados para controlar el crecimiento y/o eliminar la contaminación bacteriana, particularmente por *L. monocytogenes*.

III. Resumen de la Invención

Esta invención se refiere a la utilización de cepas de *Carnobacterium*
5 *maltaromaticum* ("*C. maltaromaticum*") productoras de bacteriocina, anteriormente
conocida como *Carnobacterium piscicola* ("*C. piscicola*"), con actividades
antimicrobianas excepcionales, en combinación con otros conservantes de
alimentos, emulsificantes, secuestrantes, acidulantes, antioxidantes y un
complemento. Las nuevas cepas de la presente invención, CB1, CB2 y CB3
10 producen diferentes bacteriocinas, incluyendo carnobacteriocina BM1 y piscicolina
126. Estas bacteriocinas son de amplio espectro de actividad anti-*Listeria*, y las
cepas productoras crecen a temperaturas de refrigeración y no causan deterioro de
los alimentos en relación con otros microorganismos dañinos similares o dentro de
la vida útil típica del alimento. En combinación, estos dos tipos de conservantes
15 proporcionan una actividad anti-bacteriana inesperada y sin precedentes.

Esta invención comprende el método de combinación de un preservante de la
presente invención con los compuestos o técnicas de preservación existentes como
se identifica anteriormente a los productos alimenticios. Algunos métodos incluyen la
adición de los dos conservantes a los ingredientes antes de la cocción, por ejemplo,
20 a una pasta alimentaria; algunos métodos incluyen la aplicación del conservante de
la presente invención a la comida después de la cocción, por ejemplo, por
pulverización.

En particular la invención esta dirigida al método de preparación un alimento
al poner en contacto una cantidad efectiva de un primer preservativo y un Segundo
25 preservativo, donde dicho Segundo preservativo comprende una cantidad efectiva

de una composición seleccionada del grupo que comprende *Carnobacterium maltaromaticum* como el depositado en la ATCC bajo los números de acceso PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315; y/o un fermentado que contiene al menos una bacteriocina producida por *Carnobacterium*; y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste de un agente anti-microbial, un emulsificante, un secuestrante, un tercer preservante, un acidulante, un anti-oxidante y un complemento.

Estos métodos han mostrado que mejoran la efectividad en la inhibición de *L. monocytogenes* en alimentos procesados de forma inesperada más allá de la utilización de cualquiera de los tratamientos por separado.

Una ventaja de la invención es la actividad anti-listeriana sin precedentes, la inhibición de crecimiento microbiano en general, y agentes que extienden o mejoran la vida útil. Tal actividad es excepcional. Otra ventaja de la invención es que brinda un potencial tanto bactericida como bacteriostático. Una ventaja adicional de la invención es que estas bacterias crecen a temperaturas tan bajas como 0° C, lo que indica que crecen y son eficaces a temperaturas de refrigeración que son esenciales para la conservación de carnes. Adicionalmente, una ventaja de la invención es que estas cepas, en y en sí mismas, no causan el deterioro significativo de las carnes.

Esta invención proporciona la adición de una preparación seca de *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 y su fermentado seco, o el solo fermentado seco, (es decir, sin células vivas); en combinación con otros aditivos alimentarios. El uso de NaL/NaAc en combinación con este aditivo tiene un notable efecto mejorado de reducir el número de microbios (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*) que podrían ser detectados en un producto de carne procesada, en combinación con el aumento de la vida útil.

IV. Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 compara la eficacia de lactato de sodio (Galaflow™) contra un segundo conservante de la presente invención.

5 La Figura 2 compara la eficacia de una mezcla de lactato de sodio/mezcla de acetato de sodio (Optiform™) contra un segundo conservante de la presente invención.

La Figura 3 compara la eficacia de la pediocina (Alta™ 2341) contra un segundo conservante de la presente invención.

10 La Figura 4 muestra los resultados de los experimentos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos descritos en el Ejemplo 5.

15 V. Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con composiciones de alimentos y métodos de aplicación a los alimentos: un primer conservante; un segundo conservante que comprende una o más cepas de *Carnobacterium* depositado en la ATCC, y/o un fermentado obtenido a partir de una o más cepas de *Carnobacterium* como las depositadas en la ATCC, uno o más de los aditivos para reducir la carga microbiana, y uno o más aditivos para aumentar la vida útil de la comida.

La presente invención incluye composiciones y métodos para inhibir *Listeria*, donde un primer conservante se combina con una cantidad eficaz de un segundo conservante, dicho segundo conservante que comprende una composición que

contiene al menos un ingrediente del grupo que consiste de una bacteriocina, bacteriocina(s) producida(s) por un *Carnobacterium*, una o más cepas de *Carnobacterium*, un fermentado que contiene bacteriocina(s), un fermentado que contiene una bacteriocina producida por un *Carnobacterium*, y combinaciones de los mismos. En formas de realización preferidas de la invención, el segundo conservante incluye al menos una especie de *Carnobacterium* y un fermentado producido por dicha especie de *Carnobacterium*, o el fermentado solo.

La presente invención incluye composiciones y métodos que comprenden una mezcla de 1) un primer conservante, y 2) un segundo conservante que comprende un *Carnobacterium* y/o su fermentado, dicho fermentado comprende al menos una bacteriocina que impide efectivamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizadas en conexión con la producción, envasado, y almacenamiento de alimentos y productos alimenticios, y la limpieza de los equipos utilizados por lo tanto. Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser utilizadas en conexión con la producción, protección, tratamiento y almacenamiento de alimentos y productos alimenticios.

Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos y productos alimenticios.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, puede ser deseable añadir una composición de la presente invención a un alimento o uno de sus ingredientes antes de la cocción. En estas formas de realización de la invención, el segundo conservante comprende típicamente al menos un fermentado (y, opcionalmente, al menos una cepa de *Carnobacterium*).

De acuerdo con otras realizaciones de la invención, puede ser deseable para poner en contacto en la superficie de un alimento después de procesar o cocinar. En estas formas de realización de la invención, el segundo conservante comprende típicamente al menos una cepa de *Carnobacterium* y al menos un fermentado.

5 Como se usa en la presente invención, un primer conservante se refiere a cualquier conservante o preservante, típicamente un conservante adecuado para su uso con un alimento, producto alimenticio o ingrediente de un producto alimenticio. Conservantes ejemplares incluyen pero no se limitan a un conservante que contenga lactato y/o diacetato, y mezclas de los mismos. Los conservantes de
10 lactato típicos incluyen, pero no se limitan a sodio y lactato de potasio. Los conservantes de acetato típicos incluyen, pero no se limitan a diacetato de sodio. Los ejemplos de dicho primer conservante están disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales Galaflow (un lactato de sodio), Optiform (un lactato de sodio y la mezcla de diacetato de sodio), y Purasal (lactatos disponibles de Purac).
15 Estos conservantes se pueden usar en cualquier cantidad conocida por los expertos en la técnica, típicamente en una cantidad enseñada por los proveedores de dichos productos.

 Como se usa en este documento, un segundo conservante se refiere a cualquier conservante que contiene al menos una cepa de bacterias productoras de
20 bacteriocina y/o una composición que comprende un fermentado que contiene una o más bacteriocinas. Ejemplos de segundos conservantes incluyen, pero no están limitados a al menos una especie de *Carnobacterium*; un fermentado que contiene por lo menos un bacteriocina; un fermentado que contiene por lo menos un bacteriocina producida por una especie de *Carnobacterium*; un fermentado derivado
25 de una especie de *Carnobacterium*, uno o más bacteriocinas parcial o totalmente

purificadas; una o más bacteriocinas purificadas parcial o totalmente producidas por u obtenidas de una especie de *Carnobacterium*, y combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, *Carnobacterium* se refiere a cualquier especie de *Carnobacterium* que produce una o más bacteriocinas. La bacteriocina se puede producir de forma natural o puede ser un producto de modificación genética. En formas de realización preferidas de la invención, la especie *Carnobacterium* es *Carnobacterium maltaromaticum*. En algunas formas de realización de la invención, la especie *maltaromaticum Carnobacterium* es la CB1 aislada. En las realizaciones más preferidas de la invención, la especie *Carnobacterium maltaromaticum* es CB1, depositada en la *American Type Culture Collection* (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20118 EE.UU.) el 9 de julio de 2003, y recibió el número de acceso PTA-5313. En otro ejemplo de realización, la presente invención comprende un cultivo de la cepa bacteriana CB2. CB2 se depositó en la *American Type Culture Collection* (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20118 EE.UU.) el 9 de julio de 2003, y recibió el número de acceso PTA-5314. En otro ejemplo de realización, la presente invención comprende una cepa del cultivo bacteriano CB3. La CB3 fue depositada en la *American Type Culture Collection* (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA 20118) el 9 de Julio de 2003, y recibió el número de acceso PTA-5315.

Como se usa en la presente memoria, aditivo se refiere a uno o más aditivos seleccionados de entre el grupo que consiste en agentes anti-microbianos, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes secuestrantes, un tercer conservante, un acidulante, un antioxidante, y un complemento.

En otro ejemplo de realización, la presente invención comprende el uso de un primero y un segundo conservantes para el tratamiento de alimentos, para el

tratamiento de bacterias descomponedoras en la comida, para el tratamiento de bacterias patógenas en los alimentos, y/o establece un tiempo de almacenamiento predecible de un alimento o producto alimenticio. Las cepas CB1, CB2, y/o CB3 se pueden usar solas o en combinación, pueden ser usadas con o sin sus respectivas bacteriocinas; se pueden utilizar con o sin un fermentado que comprende sus respectivas bacteriocinas; se pueden usar en combinación con una o más bacterias productoras de bacteriocina, incluyendo pero no limitado a una bacteria ácidoláctica, y/o se puede usar con una o más bacteriocinas producidas a partir de una bacteria diferente, y/o pueden ser utilizadas con o sin un fermentado, que comprenden una o más bacteriocinas producidas a partir de una bacteria diferente.

Otra forma de realización a modo de ejemplo de la presente invención incluye una mezcla de 1) un primer conservante, y 2) un segundo conservante que comprende un *Carnobacterium* y su fermentado, dicho fermentado comprende al menos una bacteriocina que impide efectivamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, donde la mezcla se añade al producto alimenticio "pasta de carne" antes de procesar.

Como se usa en este documento, agente anti-microbiano se refiere a uno o más de los agentes anti-microbianos que tienen actividad contra uno o más microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras). Por ejemplo, agentes anti-microbianos incluyen pero no se limitan a los benzoatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); sorbatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); acetatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); diacetatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); lactatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); citratos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); propionatos (por ejemplo, sodio, potasio, y calcio); parabenos (por ejemplo, metil y propil); 4 Hexilresorcinol; Arginato Láurico Etil Ester (LAE); Citricida;

nisina, extracto de jugo de limón, extracto de pomelo, beta ácidos de lúpulo; polisorbato (monoestearato de sorbitán), lisozima (normalmente utilizado en la producción de queso, para evitar la producción de gas por bacterias de la putrefacción); clorito, cloruro de cetilpiridinio; Lauril Sulfato; extracto de oliva, óxido de zinc, acetato de zinc, sulfato de zinc, succinato disódico y Xtend II.

Los agentes antimicrobianos preferidos son los benzoatos, sorbato, acetatos, lactatos, citratos, y propionatos. Además, los inventores han encontrado que los benzoatos funcionan mejor en los alimentos ácidos; que los sorbato funcionan mejor en los alimentos ácidos y son eficaces contra los hongos y los formadores de esporas; que el uso principal de los acetatos y diacetatos es contra la Listeria, y que los lactatos reducen la actividad del agua, y por lo tanto retardan el crecimiento de todos los microbios.

Como se emplea aquí, emulsionante se refiere a uno o más emulsionantes o agentes dispersantes, cuyo uso es bien conocido para los expertos en la técnica.

Ejemplos de emulsionantes incluyen, pero no se limitan a monoglicérido acetilado; Oleato de aluminio; árabigo; glicanos de levadura de Baker; estearato de calcio, ácido cólico; diacetil ésteres del ácido tartárico de mono y diglicéridos; diglicéridos, fosfato dipotásico, fosfato disódico, Duohydrate; monoglicérido destilado; Yema de huevo; Mono y diglicéridos etoxilados; ácidos grasos; Estearato de Lacto gliceril; monolaurato de glicerilo; lecitina hidroxilada; ésteres de ácidos grasos de glicerol y propilenglicol lactilados, ésteres lactílicos de ácidos grasos; lecitina; laurato de magnesio; miristato de magnesio; oleato de magnesio; palmitato de magnesio; estearato de magnesio; Celulosa microcristalina; mono y diglicéridos; monoglicérido; mostaza; polioxietileno (20) sorbitan; polioxietileno (20) monoestearato de sorbitán, polioxietileno (20) Triestearato de sorbitán; polioxil (40) estearato, oleato potásico;

5/16

palmitato de potasio ; estearato de potasio; alginato de Propilenglicol; mono y diésteres de propilen glicol; monoestearato de propilenglicol, aceite de colza, Superglicerinato totalmente hidrogenado; sodio fosfato de aluminio, básico; caprato sódico; caprilato de sodio; hipofosfito de sodio, laurato de sodio; sodio Lauril Sulfato; 5 miristato de sodio; oleato de sodio; palmitato de sodio, polifosfato de sodio, estearato de sodio, estearoil lactilato de sodio; tetrametafosfato de sodio; Ester de sorbitán; monoestearato de sorbitán; estearoil lactilato; Succistearin (estearoil Propilenglicol hidrógeno succinato); glicerina sintético producido por hidrogenólisis de hidratos de carbono, pirofosfato tetrasódico, fosfato trisódico, y cristales de 10 fosfato trisódico.

De los emulsionantes, polioxietileno (20) sorbitán y monooleato de polioxietileno (20) monoestearato de sorbitán se prefieren por su efecto sinérgico con anti-microbianos; caprilato de sodio es un potente anti-microbiano, potente potenciador de sabor, y se utiliza típicamente en la producción de queso; y lauril 15 sulfato de sodio es un potente antimicrobiano utilizado normalmente en pasta dental y los cosméticos.

Como se usa aquí por secuestrantes se refiere a uno o más agentes secuestrantes o quelantes, el uso de los cuales es bien conocido para los expertos en la técnica. Los agentes secuestrantes ejemplificados incluyen pero no se limitan 20 a acetato de calcio, citrato de calcio; Diacetato de calcio; Gluconato de Calcio, Fosfato dipotásico; disódico de calcio EDTA, EDTA disódico dihidrógeno; EDTA; citrato de monoglicérido; Citrato de monoisopropilo; Fosfato monopotásico; Fosfato monosódico; Citrato de Potasio, monohidrato; Pirofosfato ácido de sodio, carbonato de sodio, citrato de sodio, diacetato de sodio, hexametafosfato de sodio, polifosfato 25 de sodio, tartrato sódico potásico, tartrato de sodio; tetrametafosfato sodio, tiosulfato

de sodio, tripolifosfato de sodio, ácido tánico, taninos, pirofosfato tetrasódico, citrato de trietilo, citrato tripotásico; y citrato trisódico.

18
19

De los secuestrantes, el Gluconato de Calcio forma ácido glucónico y es un potente anti-microbial - usado típicamente en productos salami; el carbonato de sodio también se puede utilizar como un lava carcasas debido a su pH alcalino.

Como conservantes utilizados en este documento se refiere a uno o más agentes conservantes, el uso de los cuales es bien conocido para los expertos en la técnica. Ejemplos de conservantes incluyen pero no se limitan a: ácido acético; acidulantes; alumbre; palmitato de ascorbilo, ácido benzoico; ascorbato de calcio; Diacetato de calcio; propionato de calcio, sorbato de calcio, ácido deshidroacético (DHA), ácido eritórbico, ácido acético glacial; heptil paraben; ácido láctico, vinagre de malta; natamicina, bisulfito de potasio, metabisulfito de potasio, nitrato de potasio, sorbato de potasio, ácido propiónico, sal, pirofosfato ácido de sodio, benzoato de sodio, bisulfito de sodio, diacetato de sodio, metabisulfito de sodio, nitrato de sodio, nitrito de sodio, silicato de sodio; sorbato de sodio, ácido sórbico, cloruro de estaño, y dióxido de azufre.

Como es usado en este documento, acidulante se refiere a uno o más agentes acidulantes, el uso de los cuales es bien conocido para los expertos en la técnica. Los acidulantes ejemplares incluyen pero no se limitan a: ácido acético, ácido adípico, fosfato de calcio, ácido cítrico; maíz Vinagre Azúcar; crema de tártaro, ácido fumárico, ácido acético glacial, ácido glucónico; glucono-delta-lactona; vinagre de grano; ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido málico, vinagre de malta; fosfato monocálcico, fosfato monosódico, ácido fosfórico, diacetato de sodio, Malato de sodio hidrógeno, vinagre de alcohol, ácido succínico, anhídrido succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, y Vinagre.

17
18

De los acidulantes, todos son también anti-microbianos, pero la mayoría no se utilizan normalmente en carnes. Las sales de sodio se utilizan típicamente en aplicaciones de carne.

Como se utiliza en este documento antioxidante se refiere a uno o más
5 agentes antioxidantes, el uso de los cuales es bien conocido para los expertos en la técnica. Antioxidantes ejemplares incluyen pero no se limitan a: ácido ascórbico; palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT); ascorbato de calcio, ácido cítrico; tiodipropionato de dilaurilo (DLTDP); galato de dodecilo, ácido eritórico; etoxiquina;
10 Ácido fumárico, ácido glucónico, 4-hidroximetil-2,6-di-terc-butilfenol; Citrato de isopropilo; limoneno; citrato de monoglicérido; nitrato, nitrito, ácido nordihidroguaiaarético (NDGA), ácido fosfórico; bisulfito de potasio; metabisulfito de potasio, galato de propilo; El ascorbato de sodio, carbonato de sodio, eritorbato de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, cloruro de estaño, citrato de
15 estearilo; terbutilhidroquinona (TBHQ); THBP, ácido tiodipropiónico, tocoferol, y trihidroxibutirofenona (THBP).

De los antioxidantes, el nitrato y el nitrito son eficaces contra *Clostridium*, y trabajan sinérgicamente con acetatos y diacetatos; el carbonato de sodio puede ser usado como un corrosivo de lavar debido a su alcalinidad.

20 Como se utiliza en este documento complemento se refiere a uno o más agentes adicionales y opcionales, el uso de los cuales es bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un posible efecto sinérgico con antimicrobianos. Complementos ejemplares incluyen pero no se limitan a: extracto de romero, extracto de especias, té verde / té extractivos; polifenoles, humo y humo extractivos;
25 quillay, y extracto de raíz de rábano.

18
14

Como se usa en este documento, cantidad eficaz se refiere a cualquier dosis o cantidad adecuada para inhibir bacterias, preferiblemente de la especie *Listeria*, más preferiblemente *Listeria monocytogenes*. Esta cantidad puede ser bacteriostática o bactericida. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente o determinará fácilmente una cantidad eficaz. Para el segundo conservante, los inventores han encontrado que una cantidad de 10^2 , o menos, de unidades formadoras de colonias ("ufc") por gramo o por cm^2 no es normalmente suficiente para competir con la población microbiana accidental existente. Los inventores han encontrado que 10 veces mas de la microflora inicial base, típicamente de aproximadamente 10^3 ufc por gramo o por cm^2 o mayor, es suficiente para superar el crecimiento de la población bacteriana accidental existente (por ejemplo, la microflora fondo). Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de bacterias adventicias en un producto alimenticio es variable. De acuerdo con la presente invención, la cantidad de la composición debe ser de aproximadamente diez veces o más mayor que la cantidad de bacterias adventicias.

Una cantidad efectiva de un segundo conservante se refiere a una cantidad suficiente para ser bacteriostático o bactericida. Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad o la concentración puede variar con el tipo de comida y el momento en que se aplica a los alimentos, entre otras consideraciones. Por ejemplo, los inventores han encontrado que hasta aproximadamente 10% en peso se puede añadir a los ingredientes pre-procesados, por ejemplo, a una pasta alimentaria. Por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% en peso se ha encontrado efectivo como conservante sin afectar indebidamente otras características de los alimentos, tales como el sabor.

19
20

Un experto en la técnica también reconocerá que la concentración de cada conservante individual no necesita ser bacteriostático o bactericida. De acuerdo con la presente invención, la mezcla o el efecto combinado de los dos conservantes debería ser suficiente para inhibir una bacteria tal como *Listeria*. La cantidad bacteriostática o efectivamente óptima bacteriocida a ser utilizada dependerá de la composición del producto alimenticio particular a tratar y el método utilizado para aplicar la composición a la superficie del alimento, pero puede ser determinada por experimentación simple.

Una forma de realización de la presente invención comprende intervalos de concentración de la mezcla antes del procesamiento adecuado para especies inhibidoras de *Listeria*, en particular *Listeria monocytogenes*. Esta cantidad puede ser bacteriostática o bactericida. Los rangos pueden diferir basados en la combinación de mezclas, es decir, CB1 y fermentado, CB1, otra bacteriocina, y fermentado, etc. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente o podrá fácilmente determinar una cantidad efectiva.

Como se usa en este documento, fermentado, se refiere al uso de un producto de fermentación de uno o más cultivos bacterianos naturales, pasteurizados homológamente o fermentado no pasteurizado, pasteurizado heterólogo o fermentado no pasteurizado o combinaciones de los mismos. Los cultivos bacterianos naturales de la presente invención se han descrito anteriormente. Un fermentado homólogo se refiere al sobrenadante de cultivo de un solo cultivo bacteriano preparado de acuerdo con técnicas de preparación estándar. Un fermentado heterólogo se refiere al sobrenadante de cultivo derivado de diferentes cultivos bacterianos preparados de acuerdo con técnicas de preparación estándar. El fermentado homólogo o heterólogo puede ser i) pasteurizado o no

70
21

pasteurizado; ii) liofilizado, o iii) secado de otra forma. Dos o más cultivos bacterianos se pueden mezclar o añadir por separado. Dos o más fermentados se pueden mezclar o añadir por separado. Un cultivo bacteriano combinado con uno o varios fermentos puede ser mezclado, o añadido secuencialmente. El fermentado también incluye uno o más ingredientes activos parcial o totalmente purificados producidos por una bacteria, por ejemplo, bacteriocinas.

Como se usa en este documento, bacteriocina se utiliza en su definición convencional, refiriéndose típicamente a una o más sustancias producidas por una primera bacteria y efectiva contra una o más bacterias secundarias. Las bacteriocinas, las cuales son péptidos antibacterianos y proteínas producidas por bacterias como las LAB como subproductos normales de su metabolismo, son preservantes naturales potencialmente muy atractivos. Muchas LAB son bacterias industrialmente importantes y bien conocidas, que incluyen *Streptococcus thermophilus* y especies de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacteriu*. Éstas se han utilizado para la producción de alimentos fermentados consumidos de forma segura durante miles de años. Debido a que han alcanzado un estatus de microorganismos "seguros", son una fuente particularmente adecuada de antimicrobianos naturales, tales como bacteriocinas, y para uso en alimentos.

Las bacteriocinas pueden tener un espectro amplio o estrecho de actividad antibacteriana, y no son letales para las células que las producen. Las bacterias se protegen de los efectos letales de sus bacteriocinas por la producción de proteínas inmunitarias.

Un aspecto importante de la presente invención comprende el uso de el fermentado bacteriano en la preparación, la conservación, y el tratamiento de un alimento, preferiblemente un alimento procesado. De acuerdo con las enseñanzas

28
22

de la presente invención, las bacteriocinas producidas por cepas CB1, CB2, o CB3 parecen actuar favorablemente (posiblemente de forma sinérgica) para proporcionar una mayor protección y efectividad que el uso de las bacteriocinas individuales por si solas.

5 Los conservantes antimicrobianos de la presente invención se pueden usar en conexión con cualquier producto alimenticio que es susceptible a la degradación microbiana, o en cualquier etapa de procesamiento que se traduce en un producto alimenticio o alimento.

"Alimento", "producto alimenticio", "ingrediente(s)", "pasta", "fresco", y
10 "procesado" están destinados a ser utilizados en su significado ordinario tal como es conocido por los expertos en la técnica.

Los conservantes de la presente invención pueden ser añadidos, solos o en combinación, en serie o de forma secuencial, en cualquier receta, ingrediente o ingredientes alimenticios, o sustancia alimenticia para el que se desee la inhibición
15 del deterioro de alimentos y/o de los patógenos en los alimentos, incluyendo alimentos crudos y alimentos parcial o totalmente elaborados, curados o fermentados antes de la adición de los conservantes de la presente invención.

Por ejemplo, los conservantes pueden ser añadidos a sustancias alimenticias comestibles sin procesar que incluyen verduras crudas, como lechuga, repollo o
20 zanahorias, carne de res, pescado, mariscos y otros alimentos crudos; una sustancia alimenticia procesada no fermentada que incluye productos cárnicos como perros calientes o salchichas, mortadela y otros embutidos; una sustancia alimenticia fermentada procesada como salchicha o chucrut; o una sustancia alimenticia procesada como jamón curado. La sustancia alimenticia puede ser

también un alimento a base de leche o a base de crema, tal como helado o requesón.

El uso del término "superficie de los alimentos" se define para incluir cualquier y todas las superficies internas o externas del producto alimenticio que son tratadas.

- 5 Una composición de acuerdo con la presente invención se utiliza más fácilmente aplicándola en la superficie exterior de un producto alimenticio mezclado, tal como un perro caliente o salchichas tipo Bolonia, o de un alimento sólido, tal como un pedazo de carne asada, a fin de minimizar la pérdida de la actividad en la fase grasa de la comida. Una composición puede, alternativamente, estar incluida en la
- 10 emulsión o en ingredientes crudos de un alimento, tales como pastas, aditivos o salsas, o al interior de productos sólidos, tales como jamones, por pulverización, inyección, o volteo. En aún otras realizaciones, la composición se puede aplicar como un adobo, apanado, condimento frotado, glaseado, mezcla colorante, y similares, siendo criterios clave que la composición antimicrobiana esté disponible a
- 15 la superficie sujeta a degradación bacteriana.

Una composición puede ser ubicada indirectamente en contacto con la superficie del alimento mediante la aplicación de la composición a materiales de empackado de alimentos o envolturas y entonces aplicando el empaque a la superficie de los alimentos.

- 20 Los conservantes pueden añadirse a la sustancia alimenticia mediante cualquier método adecuado, como por ejemplo, mediante la agitación o mezcla, pulverizando o nebulizando una suspensión de la bacteria y un vehículo adecuado sobre la superficie de la comida, y similares. Por ejemplo, los conservantes pueden incorporarse en una pasta que contiene la emulsión y una mezcla de carne, antes
- 25 de su ulterior procesamiento, tales como relleno y/o cocción.

23
74

Se pretende que la invención no debe limitarse a un tipo de alimento, la etapa de procesamiento de los alimentos o sus ingredientes, o al método o momento de aplicación de los conservantes.

5 En la presente memoria, los productos cárnicos frescos se refieren a la carne cruda o no cocida (almacenados en condiciones de refrigeración) que puede o no contener mezclas de especias adicionales, e incluyen carne integral o de tierra. Los productos cárnicos procesados se refieren a las carnes que han sido i) formuladas y preparadas, ii) curadas, o iii) sin curar para producir un producto comercializable.

10 Como se usa en este documento, el tiempo de almacenamiento predicho se refiere a la capacidad de controlar la putrefacción durante un período discreto, momento en el que el deterioro se hace evidente. Por ejemplo, las bacterias se pueden aplicar a un producto alimenticio para alcanzar una vida de almacenamiento de aproximadamente 10 semanas o más, momento en el que el deterioro puede ser detectable. Dentro del período de almacenamiento de 10 semanas, la composición
15 de la presente invención controla el deterioro por una o más de las siguientes maneras: i) mediante la aplicación de bacterias con un tiempo determinado al deterioro; ii) mediante la aplicación de bacterias que producen una o más proteínas o bacteriocinas que matan o controlan bacterias de descomposición, o iii) por combinaciones de las mismas.

20 Esta invención enseña que mediante la combinación de tratamientos, incluso con un nivel reducido de NaL/NaAc habitualmente de uso comercial, existe una mayor inhibición de Listeria en comparación con cualquiera de los métodos empleados solos.

25 Por ejemplo, los inventores han encontrado que para una masa de alimentos, un segundo conservante que comprende una preparación seca de una especie de

24
28

Carnobacterium y su fermentado seco tiene ciertos beneficios en la producción de un producto alimenticio. Véase el Ejemplo 5.

VI. Ejemplos

5 Ejemplo 1.

Se inició un experimento en el que un segundo conservante que comprende una preparación congelada seca de CB1 y su fermentado seco fue comparado con otras tecnologías para la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salchichas de Frankfurt envasadas al vacío.

10 [0001] El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia del segundo conservante con lactato Na (Galaflow 4,8% conc. final), Mezcla NaL / NaAc (Optiform 3,0% conc. final) y Alta 2341 (Kerry 3,0% conc. final). Sobre la base de esta formulación de la salchicha de Frankfurt, el segundo conservante al parecer tuvo una actividad similar a la de Galaflow y superó la de Optiform y Alta™ 2341.

15 En el nivel de uso de NaL (Galaflow) se espera que la calidad sensorial de las salchichas de Frankfurt se vea afectada. Ver datos adjuntos. La formulación de las salchichas se basó en productos fabricados en Canadá. Los resultados se muestran gráficamente en las Figuras 1-3.

20 Ejemplo 2.

Debido a que el segundo conservante está aprobado para su uso en los Estados Unidos los estudios fueron modificados y repetidos con una formulación de la salchicha de Frankfurt que representa un producto de EE.UU.. Al mismo tiempo, también pusimos a prueba la eficacia de la mitad del nivel de NaL/NaAc.

25
70

Debido a que NaL/NaAc es la norma como conservante para salchichas de Frankfurt producidas en los EE.UU., se decidió comparar su eficacia a un nivel utilizado comercialmente de 2.0% de lactato y 0,1% de diacetato de Na y a la mitad de esos mismos niveles.

5 Se inició un experimento en el que se llevaron a cabo tres réplicas del estudio con el producto obtenido en la planta piloto de Griffith Laboratories en Toronto Ontario Canadá.

Se inoculó superficialmente un coctel de cuatro *serotipos* de *L. monocytogenes* y, cuando fue requerido por el diseño experimental, un nivel del
10 segundo conservante identificado como 3 UA (unidades arbitrarias) que es de 4,26g del segundo conservante por cada 100 ml de agua estéril.

El inoculado y el producto control fueron envasados al vacío, almacenados a 4°C y se tomaron muestras por medio de técnicas de enumeración bacteriana de enriquecimiento y de detección en la norma durante un período de tiempo de un
15 mínimo de 71 días.

Para el desafío en estudio, dos salchichas fueron ubicadas asépticamente en bolsas de película de barrera de alto oxígeno (Unipac, Edmonton).

El cóctel de *Listeria* consistió en una cepa compatible de cada uno de los siguientes serotipos: 1/2a, 1/2b, 3a y 4b se prepararon mediante subcultivo de cada
20 una de las cepas en dos ocasiones, a 37°C a partir de cultivos stock congelados en TSBYE (caldo de soya triptona Difco con 6% de extracto de levadura) y 1 ml de cada cepa de *Listeria* se colocó en un tubo Falcon estéril de 15 ml, mezclados vigorosamente en un vórtex y centrifugados a 5.000 X g durante 15 min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 4 ml de solución al
25 0,85% de solución salina estéril y se diluyó con 0,85% salina a aproximadamente

28
77

10⁵ cfu de las cepas de *Listeria* por ml. Se inocularon dos volúmenes de 50 µl a cada lado de las salchichas de Frankfurt y fueron masajeadas enérgicamente las salchichas de Frankfurt en el empaque a mano durante 15 s.

5 Los tratamientos inoculados con el segundo conservante se prepararon por disolución de 4,26 g por 100 ml (3 UA) de agua estéril atemperada a 4°C y 0.132 µl de la segunda suspensión conservante se añadió a cada lado de las salchichas de Frankfurt y fueron masajeadas vigorosamente. Las salchichas inoculadas se empacaron al vacío sin demora y se almacenaron a 4°C.

10 Las muestras fueron retiradas del almacenamiento a intervalos de muestreo especificados y probados por carga bacteriana total (APT), recuentos de *Listeria* (PALCAM) y *Carnobacteria* (CTSI) por diluciones en superficie de placas de 100 ml de 0,1% de peptona estéril estéril añadida a cada uno de 3 empaques después de la mezcla de contenido del paquete.

15 Si el recuento de *L. monocytogenes* fuese indetectable en PALCAM, entonces, en el siguiente período de muestreo, se inoculará un ml de la muestra en 9 ml de UVM Caldo de enriquecimiento Modificado de *Listeria*. Los tubos inoculados se colocaron a 37°C y se sembraron en agar PALCAM para detectar los sobrevivientes de *Listeria* spp. después de 24 y 48 h.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4.

20

Ejemplo 3.

Con estas combinaciones, un cóctel de aprox. 80.000 ufc/envase de *L. monocytogenes* aplicado a la superficie de las salchichas de Frankfurt fue reducido a un nivel excepcional en comparación con cualquiera de los tratamientos

individuales, poco después de la fabricación y hasta 70 días de almacenamiento a 4°C. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 4.

- 5 Los experimentos en los ejemplos 1-3 fueron tan exitosos en el tratamiento de *Listeria* con los conservantes combinados de la presente invención que no fue posible detectar *Listeria* por las técnicas microbiológicas estándar de plaqueo. Por lo tanto, en este ejemplo se añadió una etapa de enriquecimiento para determinar si cualquier *Listeria* estaba presente. La tabla 1 muestra que incluso con el
- 10 enriquecimiento, un número estadísticamente significativo de muestras de ensayo no contenía células de *Listeria* detectables. La tabla también muestra que no se encontraron niveles detectables de *Listeria* durante 71 días, un período que excede la vida útil de muchos productos alimenticios.

28
29

TABLA 1

Tecnología Competitiva #1 – 1/2 Lactato – Diacetato (Datos de Enriquecimiento)																							
Días																							
Treatment	7			14			21			35			50			56			71				
Control Negativo	-			-			-			-			-			-			-			-	
Control <i>Listeria</i>	+			+			+			+			+			+			+			+	
<i>Listeria</i>	+																						
Micocin (3AU)	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria</i>	+																						
Lactato- Diacetato (Completo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria</i>	+																						
Lactato- Diacetato (Mitad)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria</i>	+																						
Lactato- Diacetato (completo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	na	na	na	-	-	-	-

29
50

Mlcocin	II																			
(3AU)																				
Listeria	+																			
Lactato-																				
Diacetato																				
(mitad)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Mlcocin	II																			
(3AU)																				

Ejemplo 5.

La combinación de dos conservante de la presente invención también fue
5 ensayada mediante su adición a un batido de carne, que fue procesado en una
formulación de la salchicha de Frankfurt. En los resultados experimentales ilustrados
en la Figura 5, *Listeria* sola, una mezcla de *Carnobacterium* celular/fermentado sola,
y Optiform solo se compararon con composiciones que contenían una cantidad
constante de Optiform mezclado con diversas concentraciones de la mezcla
10 célula/fermentado.

Todos los experimentos que incluyeron la combinación de los dos
conservantes produjo reducciones estadísticamente significativas en el nivel
detectado de *Listeria* en comparación con ausencia de conservante o cada uno de
los conservantes solos. En la Figura 5, A corresponde a 0,05% de
15 células/fermentado y Optiform; B corresponde a 0,1% de células/fermentado y
Optiform; C corresponde a 0,5% de células/fermentado y Optiform; D corresponde a
1% de células/fermentado y Optiform; y E corresponde a 5% de células/fermentado

y Optiform. Como se señaló anteriormente, se utilizó la misma cantidad de Optiform en cada uno de los experimentos.

30/31

Reivindicaciones:

31
172

Se reivindica:

1. Una composición que comprende un primer conservante; al menos un
5 segundo conservante, donde dicho segundo conservante comprende una cantidad efectiva de *Carnobacterium maltaromaticum* como el depositado en la ATCC con el N° de acceso PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315, y/o un fermentado que contiene al menos una bacteriocina producida por *Carnobacterium*, y al menos un aditivo.
2. La composición de la reivindicación 1 donde el aditivo se selecciona
10 del grupo que consiste de un agente anti-microbiano; un emulsificante; un secuestrante; un tercer conservante; un acidulante; un anti-oxidante, y un complemento.
3. La composición de la reivindicación 1 donde dicho primer conservante
es un conservante seleccionado del grupo que consiste de lactato, diacetato, y
15 combinaciones de los mismos.
4. La composición de la reivindicación donde el agente antimicrobiano se
selecciona del grupo que consiste de benzoatos, sorbatos, acetatos, lactatos,
citratos, y propionatos.
- 20 5. Una composición que comprende un primero y un segundo conservante, donde dicho segundo conservante comprende una cantidad efectiva de *Carnobacterium maltaromaticum* como el depositado en la ATCC con el N° de acceso PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315, y/o un fermentado que contiene por lo

323

menos una bacteriocina producida por el *Carnobacterium*; un agente anti-microbiano; un emulsionante; un secuestrante; un tercer conservante; un acidulante; un anti-oxidante, y un complemento.

5 6. Un método de preparación de un alimento que comprende poner en contacto una alimento con una cantidad efectiva de un primero y un segundo conservante, donde dicho segundo conservante comprende una cantidad efectiva de una composición seleccionada del grupo que consiste de *Carnobacterium maltaromaticum* como el depositado en la ATCC con los números PTA-5313, PTA-5314, PTA-5315, y/o un fermentado que contiene al menos una bacteriocina
10 producida por el *Carnobacterium*, y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste de un agente anti-microbiano; un emulsionante; un secuestrante; un tercer conservante; un acidulante; un anti-oxidante, y un complemento.

7. El método de la reivindicación 6 donde dicho primer conservante es un conservante seleccionado del grupo que consiste de lactato, diacetato, y
15 combinaciones de los mismos.

8. El método de la reivindicación 6 donde el agente antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste de benzoatos, sorbatos, acetatos, lactatos, citratos, y propionatos.

20

8334

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención incluye composiciones y métodos para el tratamiento
5 de *Listeria* en alimentos. Las composiciones y métodos incluyen al menos un primer
conservante; al menos un segundo conservante seleccionado del grupo que
consiste de una especie *Carnobacterium*, *Carnobacterium maltaromaticum*, un
fermentado, conteniendo al menos una bacteriocina, y combinaciones de los
mismos, y un complemento.

10

3455

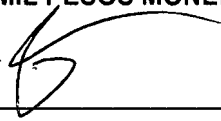
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 100384
		Bogotá D.C., Octubre 04 de 2013 - 16:08:47

RECIBIDO DE : REYES Y REYES ABOGADOS NI 900.048.328

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	559933544	04/10/2013	325.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	559933555	04/10/2013	500.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-236385- -00000-0000
Fecha: 2013-10-04 16:17:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 34 **35**



No. 13-236385-00000-0000

Fecha: 2013-10-04 16:17:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 34 35

PATENTE DE INVENCION



MODELO



Indicación que se solicita una patente.



Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud



Descripción de la invención



Dibujos de ser estos pertinentes



Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa



Incompleta



PATENTE DE INVENCION PCT



MODELO DE UTILIDAD PCT



Art.33 Decisión 486/00, Circular Única



Indicación que se solicita una PCT



Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)



Dibujos de ser estos pertinentes



Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa



Incompleta



DISEÑO INDUSTRIAL



(Art. 119 Decisión 486/00)



Indicación que se solicita Diseño industrial



Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud



Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño



Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa



Incompleta



ESQUEMA DE TRAZADO



(Art. 92 Decisión 486/00)



Indicación que se solicita un esquema de trazado



Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud



Representación gráfica de un esquema de trazado



Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa



Incompleta

