



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 837**

51 Int. Cl.:

A23L 2/02 (2006.01)

A23L 2/42 (2006.01)

A23L 2/44 (2006.01)

A23L 2/66 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08804302 .1**

96 Fecha de presentación : **17.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2200456**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Conservación de bebidas ácidas.**

30 Prioridad: **17.09.2007 EP 07116554**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2011

73 Titular/es: **PURAC BIOCHEM B.V.**
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL

72 Inventor/es: **Kremer, Diderik Reinder;**
Ramirez, Aldana Mariel;
Otto, Roel y
Bontenbal, Elize Willem

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 363 837 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conservación de bebidas ácidas

[0001] La presente invención se refiere a un método de conservación de bebidas ácidas contra el crecimiento y la presencia de microorganismos tales como levaduras, hongos y las bacterias.

5 [0002] Las bebidas ácidas son bebidas que tienen un valor de pH de 1 a aproximadamente 4.8. Pueden ser ácidas por naturaleza o se pueden acidificar mediante la adición de acidulantes. Ejemplos de bebidas ácidas incluyen un tipo de bebidas envasadas en caliente tales como por ejemplo varios tipos de bebidas que contienen zumos de fruta y/o de hortalizas y un tipo de bebidas envasadas en frío como por ejemplo bebidas gaseosas. Especialmente las bebidas a base de frutas y/o de hortalizas son propensas al desarrollo de crecimiento microbiano de hongos, levaduras y bacterias. No obstante, las bebidas ácidas son difíciles de conservar ya que las posibilidades de uso de agentes conservantes son limitadas. Sólo estos agentes son adecuados y pueden resistir a tal entorno ácido en la medida en que

1. no pierden su actividad antimicrobiana y/o
- 15 2. dichos agentes así como las bebidas a las que se aplican se mantienen químicamente estables (por ejemplo sin desnaturalizar las proteínas o la formación de precipitado)
3. no se degradan, lo cual impide la formación de subproductos con un impacto negativo del sabor, color, olor y/o del aspecto del producto.

Por lo que por ejemplo, muchas proteínas, aminoácidos y enzimas no se pueden usar de forma apropiada como agentes conservantes de bebidas ácidas. En consecuencia, en la mayoría de los casos, los ácidos de uso alimentario y/o sus sales se usan por lo tanto como agentes conservantes en dichas bebidas ácidas.

Un ejemplo es el uso de ácido benzoico y/o de sus sales de benzoato. El benzoato sódico se usa preferiblemente como uno de los principales conservantes antimicrobianos para alimentos y bebidas. No obstante, el uso de ácido benzoico y/o de sus sales es limitado y normalmente no superior al 0.1 % (para la sal sódica) debido al carácter venenoso de estos componentes. En combinación con el ácido ascórbico, en ciertas condiciones, el sodio y el benzoato de potasio incluso pueden producir niveles detectables de benceno.

El ácido sórbico y/o las sales de sorbato también son agentes conservantes ampliamente aplicados en alimentos y bebidas ácidas. No obstante estos componentes presentan también un uso limitado: cuando se trata de conservar productos alimenticios contra mohos desarrollados por especies de *Penicillium* por ejemplo, el ácido sórbico es degradado por dichas especies de *Penicillium* para producir 1,3-pentadieno que posee un queroseno inodoro. Unos niveles de uso aceptados de sorbato de potasio pueden estar en el rango de aproximadamente 200 a aproximadamente 3000 ppm. Típicamente, el sorbato de potasio se incluye en bebidas con niveles muy superiores al mínimo eficaz para asegurar una actividad antimicrobiana. No obstante, en el extremo más elevado de este rango de uso aceptado, el sorbato de potasio puede proporcionar un mal sabor a las bebidas con zumo.

Los sorbatos y benzoatos son agentes conservantes que se añaden típicamente a bebidas que se exponen a métodos de envasado de llenado en frío. Estos también se utilizan frecuentemente en combinación con fosfatos.

Un tercer ejemplo de un agente conservante ácido son el ácido propiónico y/o propionatos que se conocen principalmente por sus efectos antimicrobianos contra mohos formados por hongos y no contra levaduras. Además, el ácido propiónico y la mayor parte de las sales de propionato tienen como desventaja el hecho de tener un uso limitado debido a su olor y sabor desagradables y bien definidos.

40 [0003] La presente invención provee un medio mejorado de conservación de bebidas del tipo PH bajo. La presente invención tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana y puede reducir o incluso prevenir la incidencia de hongos y levaduras y posee presenta una actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, la presente invención provee un medio de conservación de bebidas ácidas al mismo tiempo que se mantiene una calidad aceptable con respecto a la seguridad para el consumo humano y de las propiedades organolépticas incluyendo sabor, color y/u olor.

Adicionalmente, la invención provee una solución para bebidas donde los agentes conservantes comunes, tales como aquellos mencionados anteriormente, causan problemas tales como por ejemplo los que se deben a la aparición de un precipitado o de turbidez. Y segundo lugar, por aplicación de la presente invención, el uso de agentes conservantes aplicados normalmente se puede reducir de tal manera que dichos agentes conservantes se puedan usar sin exponerse a sus defectos mientras que obtenemos sus beneficios.

Además, la presente invención utiliza un tratamiento térmico para la inactivación de microorganismos de deterioro de alimentos tales como levaduras, hongos y ciertas bacterias superfluas y por lo tanto opcionales. De esta manera, se puede utilizar métodos de llenado en frío o de envasado en frío sencillos y menos costosos. Además, en bebidas que requieren aún un tratamiento térmico, la aplicación de la presente invención prevendrá el crecimiento de esporas microbianas. Las bebidas tratadas térmicamente que contienen los agentes conservantes normalmente aplicados, tales como por ejemplo benzoatos y sorbatos, siguen expuestas a este problema ya que se puede ser evitar la formación de esporas de algunos organismos pero no el crecimiento de esporas ya presentes en las bebidas.

[0004] Aquí, la presente invención se refiere a un método de conservación de bebidas ácidas con un valor pH de 1 a 4.8 contra hongos, levaduras y bacterias donde dicho método de conservación comprende la aplicación de una composición comprendiendo polilisina y/o una sal de ésta y al menos un

- éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico y/o una sal del mismo, o un

5 - éster de ácido graso de glicerol.

El método de conservación según la presente invención incluye el hecho de acabar con, prevenir y/o inhibir el crecimiento y/o la presencia de microorganismos que ya están presentes o que se han introducido en las bebidas por los otros ingredientes o por fuentes medioambientales por ejemplo durante la preparación, manipulación y/o almacenamiento de las bebidas.

10 [0005] La polilisina es conocida por su efecto antimicrobiano contra hongos, levaduras y bacterias. La mayoría de las técnicas anteriores, tal y como está descrito en varios documentos, se refiere a la polilisina y en particular a ϵ -polilisina con una actividad antimicrobiana en valores pH de 5 a 9 (Hiraki, J. *Antibact. Antifungal Agents*, vol. 23 n° 6: 349-354 (1995) y Hiraki, *Fine chemicals*, 29: 18-25 2000). Además, muchas técnicas anteriores tales como US2001/033884 por Yamada et al. y FR2634627 por Masahiro et al. se refieren a productos alimenticios sólidos y no a bebidas. Es bien conocido por el experto en la materia que las bebidas tienen estándares y requisitos muy distintos por ejemplo con respecto al aspecto, al gusto, al olor y al sabor. Muchos agentes conservantes aplicados comúnmente a productos alimenticios no se pueden aplicar a bebidas ya que causan problemas tales como por ejemplo la aparición de una turbidez o precipitado en la bebida. En el grupo de las bebidas, existe otra variedad importante que incluye por ejemplo bebidas lácteas, bebidas a base de zumo, bebidas de pH neutro, bebidas ácidas y ligeramente ácidas, bebidas carbonatadas o no carbonatadas etcétera. Todas estas bebidas tienen sus propios estándares y requisitos.

La patente EP1832182 de Zheng et al. describe la aplicación de ϵ -polilisina en combinación con un tratamiento térmico a bebidas ácidas con un contenido de zumo de fruta. La producción de bebidas no percederas con un contenido de zumo de fruta requiere siempre este tratamiento térmico, más frecuentemente un tratamiento de temperatura ultra alta (UHT), para inactivar las esporas de bacterias de formación de esporas. La patente EP1832182 divulga la posibilidad de aplicar ϵ -polilisina en este tipo de bebidas pero su actividad antimicrobiana no es suficiente para proporcionar una fecha de caducidad aceptable. La aplicación de ϵ -polilisina no es suficiente para inactivar esporas bacterianas, menos aún para prevenir la presencia entera de estas esporas en primer lugar, y por consiguiente un tratamiento adicional por ejemplo en forma de UHT o de una fase de pasteurización sigue siendo necesario en la producción de estas bebidas ácidas con un contenido de zumo de frutas.

30 [0006] Se ha descubierto recientemente que, de manera sorprendente la polilisina y/o una sal de la misma se puede aplicar de forma adecuada a bebidas ácidas con valores pH de 1 a 4.8 y preferiblemente de 2 a 4.6 en combinación con un segundo agente conservante seleccionado que puede ser el éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico (o la sal del mismo) o bien el éster de ácido graso de glicerol o una combinación de ambos.

La combinación de polilisina con un éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico o de glicerol genera sorprendentemente una actividad antimicrobiana suficiente para reducir, inhibir o prevenir la presencia y/o actividad de levaduras, hongos y bacterias. Con esta combinación se obtiene una composición antimicrobiana muy eficaz y muy adecuada para la aplicación a bebidas ácidas ya que no se precipita fácilmente en bebidas ácidas o afecta el aspecto y las propiedades organolépticas de estas bebidas. La actividad antimicrobiana obtenida no es sólo la suma de la contribución a la actividad antimicrobiana de la polilisina y del éster de ácido graso sino que es significativamente mayor a la suma ya que el éster de ácido graso demostró tener una actividad en sinergia con la polilisina. Esto resulta inesperado dado que tales ésteres de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos (por ejemplo lactilatos) y también glicéridos son conocidos por su efecto emulsionante y definitivamente no por su actividad antimicrobiana ya que carecen de una actividad antimicrobiana propia suficiente.

El resultado del efecto sinérgico es que se puede reducir la cantidad necesaria de ambos agentes conservantes para conseguir una actividad antimicrobiana satisfactoria para inhibir y/o prevenir la presencia y/o actividad de las levaduras, hongos y bacterias. Además, otros tratamientos como los tratamientos térmicos se vuelven superfluos u opcionales y, en caso de aplicarse, éstos se pueden aplicar a temperaturas muy inferiores.

Además, la sinergia de polilisina - mezcla de ácidos grasos tal y como se usa en el método según la presente invención proporciona la posibilidad de crear una mezcla o cóctel de conservantes donde, tal como otros agentes conservantes, unos compuestos muy adecuados se pueden usar para aplicaciones en bebidas ácidas o ligeramente ácidas por varias razones pero que normalmente tienen un uso limitado debido a las razones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los agentes conservantes ácidos tales como sorbatos y benzoatos se pueden usar en la actualidad en cantidades muy inferiores en las que no van a formar precipitados o subproductos ni tener un efecto negativo sobre el sabor y el olor de las bebidas ácidas.

55 [0007] La polilisina se puede utilizar en forma de α -polilisina y en forma de ϵ -polilisina o en una mezcla de éstas. Se prefiere la ϵ -polilisina ya que tiene una actividad antimicrobiana superior y por lo tanto se puede utilizar cantidades inferiores en las aplicaciones. La ϵ -polilisina es un homopolímero que contiene de 25 a 35 residuos de L-lisina. El nombre sistemático de la ϵ -polilisina es poli(imino(2-amino-1-oxo-1,6-hexanedil)). La fórmula empírica para el homopolímero típico de ϵ -polilisina es C180H362N60O31 con un peso molecular de aproximadamente 4700 (correspondiente a aproximadamente 30 residuos de L-lisina).

[0008] La polilisina también se puede usar en la presente invención en forma de una o más sales de polilisina. Ejemplos de éstas son las sales de ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etcétera, o las sales de un ácido orgánico tales como el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico etcétera.

5 Aunque no exista diferencia sustancial en el efecto antibacteriano, a veces la polilisina se usa preferiblemente en una forma libre debido a la solubilidad limitada de la polilisina en forma de sal.

[0009] El éster de ácido graso que se debe usar en combinación con la polilisina o una sal de la misma según el método de la presente invención incluye

- éster de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos y/o sales de estos ácidos hidroxicarboxílicos y

10 - éster de ácido graso de glicerol también referido como glicérido.

[0010] Dicho ácido hidroxicarboxílico puede comprender un monómero de ácido hidroxicarboxílico o varios monómeros de ácido hidroxicarboxílico unidos entre sí por enlaces polimerizados; un ejemplo del primero es un éster de ácido graso de ácido láctico. Un ejemplo del último conteniendo varios monómeros polimerizados es el grupo de los lactilatos bien conocidos. Estos lactilatos son muy conocidos por sus propiedades emulsionantes y se usan en forma de emulsionantes en la producción de varios productos alimenticios y bebidas. En estos lactilatos, incluyendo ambos mono- y di-lactilatos, el ácido hidroxicarboxílico comprende varios monómeros de ácido láctico. El monómero de dicho ácido hidroxicarboxílico en general puede comprender de 1 a 6 átomos de carbono tales como por ejemplo el monómero de ácido láctico como mencionado anteriormente, pero el monómero también puede comprender ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico o tartárico. Además, el ácido hidroxicarboxílico también puede estar en la sal o en forma de éster. Estas sales y/o ésteres de dicho ácido hidroxicarboxílico también tienen un uso muy apropiado en el método según la presente invención. Como ejemplo de derivado de sal de lactilato que actúa de manera muy eficaz están las sales de sodio, de potasio y de calcio de ésteres de mono- y/o di-lactilato de ácido octanoico (referido como C8), o ácido decanoico (C10), o ácido dodecanoico (C12) o ácido tetradecanoico (C14), o ácido palmítico (C16), o de ácido oleico (C18:1).

25 [0011] La polilisina también se puede usar en el método según la presente invención en combinación con éster de ácido graso de glicerol también referido como glicérido. El glicérido puede comprender un monoéster, un di-éster o un tri-éster de glicerol o mezclas de éstos. La forma en la que estos ésteres se producen produce a menudo la mezcla de varios mono-, di y/o tri-ésteres posibles tales como se conocen habitualmente. Los ésteres se pueden separar de estas mezclas por técnicas diferentes conocidas por el experto en la técnica. Asimismo, cuando se hace referencia a mono-ésteres, estos mono-ésteres de glicerol comprenden componentes puros así como mezclas que comprenden principalmente mono-ésteres pero comprenden también di- y tri-ésteres en forma de componentes adicionales de dicha mezcla.

35 Se obtuvieron muy buenos resultados con la aplicación de una combinación de polilisina con los mono- y di-ésteres de glicerol. Una sinergia elevada y por lo tanto actividades antibacterianas elevadas se observan con combinaciones de polilisina y éster de ácido graso de glicerol y ácidos grasos comprendiendo ácidos grasos saturados tales como por ejemplo y sin limitarse a éstos, el ácido propiónico (C3) ácido hexanoico (C6) ácido octanoico (C8) ácido decanoico (C10) ácido dodecanoico (C12) ácido tetradecanoico (C14) ácido hexadecanoico (C16) ácido octadecanoico (C18) y mezclas de los mismos.

40 Cuando en esta solicitud se hace referencia por ejemplo a C8-glicérido o C10-glicérido, se incluye el éster de ácido graso de glicerol y respectivamente el ácido octanoico y el ácido decanoico.

[0012] El tercer u otro agente conservante es preferiblemente uno o más agentes seleccionados a partir de ácido benzoico y sales de benzoato, ácido sórbico y sales de sorbato, ácido láctico y sales de lactato, ácido glucónico y sales de gluconato, ácido cítrico y sales de citrato, ácido acético y sales de acetato, ácido málico y sales de malato, ácido fumárico y sales del mismo, ácido tartárico y sales del mismo, ácido ascórbico y ascorbatos, EDTA, fosfato y sales basadas en fosfato, ácido fítico y fitatos, ácido propiónico y/o propionatos, ácido hexanoico y/o, ésteres hexanoatos de ácidos hexanoicos y/o propiónicos con glicerol, ácido láctico, arginina, ácido octanoico y/o sales de octanoato y/o ésteres formados a partir de éstos con glicerol, ácido láctico, arginina y ácido decanoico y sales de decanoato y/o ésteres formados a partir de éstos con glicerol, ácido láctico o arginina, ácido cinámico y/o sales del mismo.

50 Las combinaciones mencionadas más arriba de componentes con polilisina y éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico y/o de glicerol se pueden aplicar de manera muy apropiada en bebidas ácidas a ligeramente ácidas y demostraron tener una actividad antimicrobiana notablemente elevada.

[0013] Además, cuando en particular, el ácido sórbico, ácido cinámico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico o cualquier combinación de éstos, incluyendo las sales de estos ácidos, se añade a la composición comprendiendo polilisina y glicérido o a una composición comprendiendo polilisina y lactilato opcionalmente en combinación con glicérido, unos resultados muy buenos se obtienen con respecto al efecto de conservación y al mantenimiento de las propiedades organolépticas deseadas de las bebidas a las que se ha añadido.

[0014] La polilisina se puede añadir directamente a las bebidas pero también se puede introducir junto con otros ingredientes en forma de cóctel a las bebidas. Una composición adecuada para la producción de bebidas comprende por ejemplo

- de 0.0001 % en peso a 50 % en peso, más preferiblemente de 0.1 % en peso a 45 % en peso, y aún más preferiblemente de 1 a 35% en peso de polilisina y/o una sal de la misma

y como segundo conservante

5 - de 0.0001 % en peso a 45 % en peso y más preferiblemente hasta 40 % en peso, e incluso más preferiblemente hasta 35 % en peso de glicérido

o bien

- de 0.0001 % en peso a 45 % en peso y más preferiblemente desde 5 hasta 35 % en peso de lactilato

y además

10 - de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 30 % en peso de ácido orgánico o una sal o éster de mezcla de éstos.

Si se usa ácido cinámico y/o ácido sórbico, estos componentes y/o sales de éstos se pueden aplicar a una composición comprendiendo de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 30 % en peso de dichos componentes.

15 [0015] La composición puede estar disponible en forma sólida o líquida. Si la composición está en forma líquida, generalmente está en forma de composición acuosa, puede ser una solución o dispersión y puede comprender un portador. En varios portadores conocidos, se descubrió que el polietileno glicol y/o el lactato funcionaban muy bien como portadores. El portador puede estar presente en concentraciones de aproximadamente 50 a 98 % en peso. Además, se puede añadir varios emulsionantes conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente emulsionantes tales como polisorbatos (por ejemplo polisorbato 60 u 80) y lecitina se aplican en concentraciones de por ejemplo 0.1 a 25%, más preferiblemente de 1-10% e incluso más preferiblemente de 2 a 4% basados en 100% de derivado de ácido 20 graso, tal como glicérido y/o lactilato.

Si la composición está en forma sólida, generalmente tendrá la forma de un polvo comprendiendo partículas de los componentes relevantes. Se puede utilizar portadores. Se demostró que el sílice y/o la maltodextrina son portadores muy adecuados y que pueden estar presentes en concentraciones de hasta 50 a 98 % en peso.

25 [0016] La polilisina está presente normalmente en una bebida en una cantidad de hasta 1 % en peso del producto, preferiblemente de 0.0001 % a 1 % o de 0.0001 % a 0.1%, más preferiblemente de 0.0001 % a 0.01%, incluso más preferiblemente de 0.0001 % a 0.001 %.

30 [0017] El lactilato normalmente está presente en dicho producto en una cantidad de hasta 1 % en peso del producto, preferiblemente de 0.0001 % a 1%, o incluso de 0.0001 % a 0.1 % e incluso más preferiblemente de 0.0001 % a 0.01 %. El glicérido normalmente está presente en una bebida en una cantidad de hasta 5 % en peso del producto, preferiblemente de 0.0001 % a 5%, más preferiblemente de 0.0001 % a 2%, incluso más preferiblemente de 0.0001 % a 1 %. Los ácidos orgánicos o sus sales tales como por ejemplo el ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido glicólico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido hexanoico octanoico, ácido málico y adipico pueden estar presentes en productos alimenticios o bebidas en una cantidad de hasta 10 % en peso del producto, preferiblemente de 0.0001 % a 10%, preferiblemente de 0.0001 % a 5 %. Las mismas 35 gamas de concentraciones se aplican para la presencia de ácido cinámico y/o ácido sórbico en productos finales.

40 [0018] El método según la presente invención es especialmente eficaz con respecto al hecho de acabar con, inhibir y/o prevenir el crecimiento o la presencia de levaduras de deterioro de alimentos tales como preferiblemente pero sin limitarse a éstas, por ejemplo levaduras de la familia de las Candida (por ejemplo *Candida albicans* o *fermentati* o *parapsilosis* o *tropicalis*), Debariomicetes (por ejemplo *Debariomicetes hansenii*), Dekkera (por ejemplo *Dekkera bruxellensis*), Hanseniaspora (por ejemplo *Hanseniaspora uvarum*), Issatchenkia (por ejemplo *Issatchenkia orientalis*), Kluyveromyces (por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*), Metschnikowia (por ejemplo *Metschnikowia pulcherrima*), Pichia (por ejemplo *Pichia anomala*), Rhodotorula (por ejemplo *Rhodotorula glutinis* o *mucilaginoso*), Saccharomyces (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), Schizosaccharomyces (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*), Torulospira (por ejemplo *Torulospira delbrueckii*), Yarrowia (por ejemplo *Yarrowia lipolytica*) y de la familia de 45 Zygosaccharomyces (por ejemplo *Zygosaccharomyces bailii* o *rouxii*).

También se puede reducir y/o evitar eficazmente la presencia y/o actividad de bacterias en bebidas ácidas mediante el uso de polilisina combinada con éster de ácido graso de glicerol o de ácido de hidroxicarboxílico según la presente invención. Especialmente bacterias tales como pero sin limitarse a éstas, por ejemplo bacterias de la familia de Aliciclobacilos, Acetobacter, Gluconobacter, gluconoacetobacter Lactobacillus y otras familias de bacterias relacionadas han demostrado ser sensibles en ambientes ácidos a la presencia de los componentes de la presente invención. 50

Las combinaciones de polilisina con éster de ácido graso de glicerol y/o de ácido hidrocarboxílico según el método de la presente invención también ha demostrado ser eficaz en bebidas ácidas contra la presencia y/o crecimiento de hongos tales como por ejemplo hongos de la familia de Fusarium (por ejemplo *Fusarium oxysporum*), Mucor (por ejemplo *Mucor plumbeus*), Byssochlamys (por ejemplo *Byssochlamys fulva*), Neosartorya (por ejemplo *Neosartorya spinosa*), Talaromyces (por ejemplo *Talaromyces trachyspermus* o *macrosporus*), Geotrichum (por ejemplo *Geotrichum candidum*), Paecilomyces (por ejemplo *Paecilomyces variotii*), Penicillium (por ejemplo *Penicillium roqueforti* o *chrysogenum*), Aspergillus (por ejemplo *Aspergillus flavus*), Botrytis (por ejemplo *Botrytis cinerea*), Rhizopus (por ejemplo *Rhizopus stolonifer*), Cladosporium (por ejemplo *Cladosporium herbarum*) y Eurotium (por ejemplo *Eurotium* 55

herbariorum).

5 [0019] La presente invención resultó ser muy adecuada para una aplicación tanto en tipos de bebidas envasadas por llenado en caliente o en frío. El envasado de llenado en caliente y en frío son técnicas de procesos bien conocidas. El experto en la técnica conoce las condiciones específicas usadas en estas técnicas. El envasado de llenado en frío se aplica muy a menudo a temperaturas inferiores a 50 grados Celsius y preferiblemente a temperatura ambiente. Como se explicó anteriormente, con la presente invención el tratamiento térmico se vuelve superfluo u opcional y si se requiere el tratamiento térmico, se puede aplicar a temperaturas inferiores mucho más favorables.

La presente invención es muy adecuada para tipos de bebidas envasadas en frío, es decir bebidas que pueden ser envasadas mediante la aplicación de un método de envasado de llenado en frío.

10 Las bebidas como los zumos de fruta o incluso los zumos de hortalizas se pueden conservar muy bien con el método según la presente invención. Los zumos puede ser carbonatados o no. Además, los zumos puede estar en forma concentrada o presentes como zumos listos para beber e incluyen zumos naturales y zumos procesados/reformulados.

El método según la presente invención ha demostrado también ser muy eficaz para la conservación de bebidas carbonatadas.

15 [0020] Los siguientes experimentos no limitativos ilustran también la presente invención.

Experimentos

Experimento 1:

20 [0021] La eficacia de las mezclas de ácido sórbico o cinámico y de ϵ -polilisina con algunos derivados de ácido graso se evaluó con un pH 3.5 en caldo GPY (polvo de levadura, peptona, glucosa) contra una colección de levaduras de deterioro de los alimentos. La concentración de ϵ -polilisina y de ciertos derivados de ácido graso de cadena mediana se puede reducir en gran medida por combinaciones de estos dos compuestos si el ácido sórbico o cinámico está presente.

Cultivos y condiciones de cultivo.

25 [0022] Los cultivos estudiados se registran en la Tabla 1. Los cultivos crecieron en caldo GPY que contenía por litro de agua desmineralizada: 40 g de glucosa, 5 g de peptona y 5 g de extracto de levadura, el pH del medio de 3.5 con 2 N HCl. Los cultivos crecieron en tubos de tapón roscado durante al menos 48 horas a 25 °C. *Pichia membranifaciens* MUCL 27794, CBS 8427 y CBS 5567, *Rhodotorula glutinis* CBS 2367, *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 8054 y CBS 2401 y *Zygosaccharomyces bailii* MUCL 27812 fueron cultivados en frascos de agitación.

Tabla 1: Cultivos de CBS y MUCL sometidos a prueba

Organismo de prueba	Cultivo	Origen	Incubación
<i>Candida ferment</i>	CBS 6319	Zumo de uva	De tapón roscado
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 1954	Aceitunas	De tapón roscado
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 2215	Encurtidos	De tapón roscado
<i>Candida parapsilosis</i>	C-S	Bebidas	De tapón roscado
<i>Candida tropicalis</i>	MUCL 29893		De tapón roscado
<i>Candida tropicalis</i>	MUCL 28180		De tapón roscado
<i>Debariomices hansenii</i>	CBS 791	Carne de vaca	De tapón roscado
<i>Debariomices hansenii</i>	CBS 5230	Arroz triturado	De tapón roscado
<i>Debariomices hansenii</i>	MUCL 30003	Queso	De tapón roscado
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MUCL 27706		De tapón roscado
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MUCL 27707		De tapón roscado
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 31705		De tapón roscado
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 30628		De tapón roscado
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 30626		De tapón roscado
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CBS 2050	Jengibre	De tapón roscado
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CBS 5147	Zumo de frutas	De tapón roscado
<i>Kluyveromices marxianus</i>	MUCL 30063		De tapón roscado

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MUCL 30092		De tapón roscado
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MUCL 29874		De tapón roscado
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MUCL 31701		De tapón roscado
<i>Pichia anomala</i>			De tapón roscado
	CBS 1683	Naranjada	De tapón roscado
			De tapón roscado
<i>Pichia anomala</i>	CBS 1979	Chucrut	De tapón roscado
<i>Pichia anomala</i>	MUCL 27777		De tapón roscado
<i>Pichia membranifaciens</i>	MUCL 27794	Olmo	Frasco de agitación
<i>Pichia membranifaciens</i>	CBS 8427	Tomate	Frasco de agitación
<i>Pichia membranifaciens</i>	CBS 5567	Limonada	Frasco de agitación
<i>Pichia membranifaciens</i>	MUCL 30004	Olmo	De tapón roscado
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 2367	Zumo de frutas	Frasco de agitación
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 8054	Pimiento Rojo	Frasco de agitación
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 2401	Jarabe de malta	Frasco de agitación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MUCL 30115	Destilería	De tapón roscado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 6710	Naranja	De tapón roscado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 2190	Zumo de frutas	De tapón roscado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MUCL 30006	Cerveza	De tapón roscado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C-S	Bebidas	De tapón roscado
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	C-S	Bebidas	De tapón roscado
<i>Torulospora delbruecki</i>	CBS 7443	Limonada	De tapón roscado
<i>Torulospora delbruecki</i>	CBS 705	Acidificación	De tapón roscado
<i>Yarrowia lipolítica</i>	CBS 7033	Suelo	De tapón roscado
<i>Yarrowia lipolítica</i>	MUCL 29439	Queso	De tapón roscado
<i>Yarrowia lipolítica</i>	MUCL 29853	Molienda húmeda	De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 6708	Naranja	De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 38486	Pepinillo	De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 28823	Zumo de manzana	De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 27812	Zumo de frutas	Frasco de agitación
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 38950		De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MUCL 43236		De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MUCL 30008		De tapón roscado
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C-S	Bebida	De tapón roscado

Ensayos de inhibición

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (selección unidimensional).

- 5 [0023] Las pruebas de inhibición se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96-pocillos. Cantidades en aumento (0 a 100 μ L en 10 etapas de 10 μ L) de una solución en almacenamiento estéril de cada compuesto se transfirieron a placas de microtitulación estériles. Los siguientes 100 μ L de caldo YPG de resistencia doble de filtro esterilizado se añadieron y el volumen de cada pocillo se ajustó a 200 μ L con agua desmineralizada estéril. Las placas

se inocularon con 2 μ L de cultivos de dos días y se incubaron durante 96 horas a 25 °C. El crecimiento se cuantificó midiendo la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se consideró como la concentración mínima donde el aumento de absorción no excedía el valor umbral, que se definía como el aumento medio del valor de absorción de los ensayos en blanco más tres veces la desviación estándar.

Selección de combinaciones de dos inhibidores.

[0024] Estas pruebas de combinaciones se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. El caldo YPG estéril se preparó con cantidades en aumento de dos inhibidores diferentes. Las concentraciones de cada inhibidor se presentaron en 8 etapas de concentraciones iguales que variaban de 0 a 1 - 2 veces el valor de CMI de una levadura particular para un inhibidor particular produciendo 64 medios diferentes. 200 ml de cada medio se transfirieron a un panel de una placa de microtitulación de 96 pocillos estériles. Las placas de pocillos completadas se almacenaron a 4°C hasta su uso ulterior.

Las placas se inocularon con 2 μ L de cultivos de dos días y se incubaron durante 96 horas a 25 °C. El crecimiento se cuantificó por medición de la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas y se expresó en forma de porcentaje del crecimiento durante el control, sin contenido de inhibidor. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Selección de combinaciones de tres ingredientes.

[0025] Estas pruebas de combinaciones se realizaron también en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. El caldo YPG estéril se preparó con cantidades en aumento de inhibidores. Para la primera dimensión, las concentraciones del primer inhibidor se presentaron en 8 etapas de concentraciones iguales. Para la segunda dimensión se seleccionó una proporción fija de otros dos inhibidores. Esta mezcla se presentó en 8 etapas de concentraciones iguales produciendo 64 medios diferentes. 200 ml de cada medio se transfirieron a un panel de placa de microtitulación estéril de 96 pocillos. Las placas de pocillos completadas se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. Las placas se inocularon con 2 μ L de cultivos de dos días y se incubaron durante 96 horas a 25 °C. El crecimiento se cuantificó midiendo la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas y se expresó en forma de porcentaje del crecimiento durante el control, sin contenido de inhibidor. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Agentes conservantes/antibacterianos sometidos a prueba

[0026] Mono/di-octanoil-glicerol, Mono/di-decanoil-glicerol, MCE 8060® (es decir, una mezcla de Mono/di-octanoil-glicerol y Mono/di-decanoil-glicerol), octanoillactato de sodio, decanoillactato de sodio y Pationic 122A® (una mezcla de sodio de decanoillactato de sodio y dodecanoillactato) fueron adquiridos en Caravan ingredients. Lenexa, Kansas, EEUU). El ácido sórbico y ácido cinámico fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) y ϵ -polilisina en Chisso Corp (Japón)

Resultados

[0027] La tabla 2a enumera los valores de CMI de un número de levaduras para ϵ -polilisina con pH 3.5.

Tabla 2a: Concentraciones Inhibitorias Mínimas para ϵ -polilisina de varias levaduras con pH 3.5

Organismo de prueba	Cultivo	CMI(%)
[mínimo]		0
[máximo]		0.03
<i>Candida Albicans</i>	DSM 1386	0.024
<i>Candida Albicans</i>	ATCC 2091	> 0.03
<i>Candida fermentati</i>	CBS 6319	> 0.03
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 1954	0.030
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 2215	> 0.03
<i>Candida parapsilosis</i>	C-S	> 0.021
<i>Candida tropicalis</i>	MUCL 29893	0.003
<i>Candida tropicalis</i>	MUCL 28180	0.003
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 791	0.003
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 5230	0.006
<i>Debaryomyces hansenii</i>	MUCL 30003	0.006
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MUCL 27706	0.006
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MUCL 27707	0.003

<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 31705	0.003
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 30628	0.006
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MUCL 30626	0.003
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CBS 2050	0.003
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CBS 5147	0.003
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MUCL 30063	0.006
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MUCL 30092	0.003
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MUCL 29874	0.015
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MUCL 31701	0.027
<i>Pichia anomala</i>		
	CBS 1683	0.03
<i>Pichia anomala</i>	CBS 1979	> 0.03
<i>Pichia anomala</i>	MUCL 27777	> 0.03
<i>Pichia membranifaciens</i>	MUCL 27794	ND
<i>Pichia membranifaciens</i>	CBS 8427	ND
<i>Pichia membranifaciens</i>	CBS 5567	ND
<i>Pichia membranifaciens</i>	MUCL 30004	ND
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 2367	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 8054	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 2401	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MUCL 30115	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 6710	0.003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 2190	0.003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MUCL 30006	0.003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C-S	0.002
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	C-S	0.006
<i>Torulospora delbruecki</i>	CBS 7443	0.003
<i>Torulospora delbruecki</i>	CBS 705	0.003
<i>Yarrowia lipolítica</i>	CBS 7033	0.018
<i>Yarrowia lipolítica</i>	MUCL 29439	0.012
<i>Yarrowia lipolítica</i>	MUCL 29853	0.006
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 6708	0.006
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 38486	0.006
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 28823	0.003
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 27812	0.003
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MUCL 38950	0.003
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MUCL 43236	0.003
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MUCL 30008	0.003
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C-S	0.001

[0028] La tabla 2b proporciona un resumen de los valores CMI de varias levaduras (tales como por ejemplo las levaduras mostradas en la tabla 1) para algunos derivados de ácidos grasos de cadena media, ácido sórbico, ácido

cinámico y ϵ -polilisina con pH 3.5. Los datos muestran que los derivados de ácido decanoico son inhibidores mucho más potentes que los derivados de ácido octanoico. El ácido cinámico también es más efectivo que el ácido sórbico.

5 Tabla 2: Promedio de concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC_{avg}), CMI máximas (MIC_{max}) de una colección de levaduras para glicérido C8 (mono/di-octanoil glicerol), glicérido C10 (mono/di-decanoil glicerol), MCE 8060®, lactilato C8 (lactato de sodio octanoil), lactilato C10 (lactato de sodio decanoil), Pationic 122A, polilisina, ácido sórbico y ácido cinámico (pH 3.5)

Compuesto	MIC _{avg} (% w/v)	MIC _{max} (% w/v)	MIC _{max} / MIC _{avg}
Glicerol mono/di-octanoil	0.100 ± 0.050	0.25	2.5
Glicerol mono/di-decanoil	0.030 ± 0.020	0.08	2.7
MCE 8060	0.020 ± 0.010	0.05	2.5
Lactato de sodio octanoil	0.070 ± 0.040	0.20	2.9
Lactato de sodio decanoil	0.010 ± 0.003	0.02	2.0
Pationic 122 A	0.020 ± 0.009	0.05	2.5
Ácido sórbico	0.030 ± 0.020	0.07	2.5
Ácido cinámico	0.009 ± 0.007	0.03	3.0
E-polilisina	0.010 ± 0.010	0.04	4.0

Combinaciones binarias y ternarias de agentes conservantes

10 [0029] Las siguientes tablas muestran los efectos de la ϵ -polilisina combinada con varios otros agentes conservantes en distintas levaduras.

Tabla 3: Excrecencia de Schizosaccharomyces pombe en caldo YPG con pH 3.5 en concentraciones diferentes de ϵ -polilisina y sorbato de potasio. La excrecencia se expresó en forma de porcentaje de la excrecencia en un inhibidor de concentración cero establecido al 100 %.

Potasio-sorbato (% p/v)	ϵ - polilisina (% p/v)								
	0	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	
0	100	98	97	97	95	95	88	35	
0.007	81	73	10	4	3	1	1	1	
0.014	69	15	2	1	0	2	2	0	
0.021	56	3	3	3	1	3	3	1	
0.028	44	1	0	0	0	1	0	1	
0.035	30	0	2	2	0	0	1	1	
0.042	20	1	0	2	1	0	2	3	
0.049	7	0	0	3	1	4	1	0	

Tabla 4: Excrecencia de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo YPG con pH 3.5 en distintas concentraciones de ϵ -polilisisina y MCE 8060 (una mezcla de Mono-di-octanoil-glicerol y Mono-di-decanoil-glicerol. La excrecencia se expresó en forma de porcentaje de la excrecencia en inhibidor de concentración cero establecido al 100%

5

		ϵ - polilisisina (% p/v)							
		0	0.0003	0.0006	0.0009	0.0012	0.0015	0.0018	0.0021
MCE 8060 (% p/v)	0	100	99	9	6	6	6	4	3
	0.003	88	14	5	3	2	4	2	2
	0.006	73	3	2	1	2	2	1	1
	0.009	32	2	1	2	0	0	0	0
	0.012	4	0	0	0	0	0	0	0
	0.015	2	1	1	1	1	0	0	0
	0.018	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.021	0	0	0	1	0	0	0	0

Tabla 5: Excrecencia de *Torulaspora delbrueckii* en el caldo YPG con pH 3.5 en concentraciones diferentes de ϵ -polilisisina y decanoilactato de sodio. La excrecencia se expresó en forma de porcentaje de la excrecencia en inhibidor de concentración cero se estableció al 100 %.

		ϵ - polilisisina (%p/v)							
		0	0.0003	0.0006	0.0009	0.0012	0.0015	0.0018	0.0021
C10 Lactilato (%p/v)	0	100	98	103	108	111	112	113	115
	0.0015	80	98	106	114	117	95	15	19
	0.003	76	4	3	2	1	0	0	2
	0.0045	23	0	1	0	1	2	0	2
	0.006	6	1	1	0	0	0	2	1
	0.0075	2	3	1	2	1	2	1	2
	0.009	3	2	0	0	2	2	1	1
	0.0105	2	1	3	1	2	0	0	0

10

Tabla 6: Excrecencia de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo YPG con pH 3.5 en una concentración distinta de ϵ -polilisina, MCE 8060 (una mezcla de Mono-di-octanoil-glicerol y Mono-di-decanoil-glicerol) y sorbato de potasio. La excrecencia se expresó en forma de porcentaje de la excrecencia en inhibidor de concentración cero que se estableció al 100 %. La proporción de sorbato-MCE 8060 se estableció en 2.33

5

		Mezcla de sorbato de potasio - MCE 8060 (% p/v)							
		0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
ϵ -polilisina	0	100	83	40	2	1	0	1	1
	0.0003	101	6	1	0	0	0	0	0
	0.0006	4	3	1	1	1	2	0	0
	0.0009	3	3	1	2	1	0	1	0
	0.0012	2	2	1	1	1	2	0	0
	0.0015	2	2	2	3	3	2	1	1
	0.0018	2	2	0	0	0	0	0	0
	0.0021	2	1	1	1	0	0	0	0

Tabla 7: Excrecencia de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo YPG con pH 3.5 en concentraciones diferentes de ϵ -polilisina, MCE 8060 (una mezcla de Mono-di-octanoil-glicerol y Mono-di-decanoil-glicerol) y ácido cinámico. La excrecencia se expresó en forma de porcentaje de la excrecencia en inhibidor de concentración cero que se estableció al 100 %. La proporción MCE 8060- ϵ -polilisina se estableció en 18.9

10

		Mezcla de MCE 8060- ϵ -polilisina (%p/v)							
		0	0.00179	0.00358	0.00537	0.00716	0.00895	0.01074	0.01253
Ácido cinámico (%p/v)	0	100	96	100	95	33	0	1	0
	0.002	76	75	3	1	1	0	0	1
	0.004	44	18	6	5	0	4	0	0
	0.006	1	0	7	0	0	1	0	0
	0.008	0	1	0	0	0	0	0	0
	0.01	2	3	2	2	1	2	2	2
	0.012	1	0	0	1	0	0	1	0
	0.014	0	1	2	1	0	0	0	0

Experimento 2: Zumo de frutas carbonatado

15

[0030] En este experimento el método de conservación según la presente invención se aplica a zumos de frutas carbonatados mediante el uso de varias formulaciones antimicrobianas. La actividad antimicrobiana de estas formulaciones se mide por medio de un recuento en placa en muestras del zumo de frutas cogidas en diferentes momentos.

20

[0031] El zumo de frutas usado contenía agua, aproximadamente 10 a 15 % en peso de edulcorante, aproximadamente 1 % en peso de un concentrado de zumo de frutas, aproximadamente 0.3 % en peso de saborizante y algún ácido

cítrico y citrato. El pH inicial era de aproximadamente 3.15. El zumo de frutas se carbonizó dando como resultado una concentración de CO₂ de aproximadamente 5.2 g/l.

[0032] Se inocularon las muestras de zumo de frutas con un cultivo mezclado de 4 levaduras diferentes (*Candida parapsilosis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*), por lo que el nivel del inóculo era de aproximadamente 100 células o esporas por ml.

Las levaduras se precultivaron en YPG estéril de pH 3.5 (polvo de levadura glucosa peptona de pH 3.5). Se incubó el medio a 25°C durante 24 horas. Antes de la inoculación se contó el número de células mediante el uso de un hemocitómetro (de tipo Bürker-Türk).

[0033] Se utilizaron formulaciones antimicrobianas diferentes. Las formulaciones contienen sal sódica de ácido benzoico (99+% de Acros), sorbato de potasio (99% de Acros), cinamato de potasio, hexametafosfato de sodio (a continuación denominado "SHMP"), ϵ -polilisina (25 % en peso de Chisso) y MCE 8060® (Caravan Ingredients). Estos componentes se usaron también en el experimento 3 destinado al té helado no carbonatado descrito a continuación.

MCE8060® es un producto comercial de Caravan Ingredients que contiene una mezcla de mono-di-octanoil-glicerol y mono-di-decanoil-glicerol mediante la cual el total de monoglicéridos es al mínimo de 58 %. La tabla 8 provee las composiciones de las formulaciones antimicrobianas usadas en las muestras de zumo de frutas.

Tabla 8: Composiciones de las formulaciones antimicrobianas usadas en el método de conservación según la presente invención en un zumo de frutas carbonatado

Muestra	% en peso benzoato de socio	% en peso sorbato de potasio	% en peso cinamato de potasio	% en peso ϵ -polilisina (al 100%)	% en peso MCE 8060	% en peso SHMP
Control 2+	0.0277	0.0225				0.0009
Control -						
1		0.0225		0.003	0.015	0.0009
1a		0.0225		0.00225	0.01125	0.0009
3				0.004	0.02	0.0009
4			0.015	0.003	0.015	0.0009
4a			0.01125	0.00225	0.01125	0.0009

La ϵ -polilisina disponible comercialmente es una solución que contiene 25% en peso de ϵ -polilisina.

El contenido de ϵ -polilisina de la tabla anterior es del 100 % en peso.

[0034] La tabla 9 presenta los resultados de un recuento en placa en muestras de zumo de frutas tomadas en distintos momentos.

Tabla 9: Recuento total en placa (log ufc/ml) de levaduras en muestras de zumo de frutas en distintos momentos.

Log ufc/ml	Tiempo (días)								
	0	7	15	28	42	56	70	84	98
Muestra									
Control 2+	2.50	2.28	4.00	6.21	5.69	5.17	3.23	2.77	1.72
Control -	2.52	5.59	6.68	6.45	6.18	6.12	5.69	5.77	5.95
1	2.59	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
1a	2.59	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
3	2.59	0.65	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4	2.33	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4a	2.16	1.54	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

[0035] Los resultados de la tabla anterior muestran que el método de conservación de bebidas ácidas según la presente

5 invención es muy adecuado para conservar zumos de fruta carbonatados ácidos. Una mezcla de ϵ -polilisina y glicéridos C8/C10 (muestra 3) es capaz de conservar dicho zumo de frutas durante al menos 98 días, lo cual no se había demostrando anteriormente. Las otras muestras demuestran por el recuento tomado después de 7 días que mediante la adición de otros conservantes, el efecto antimicrobiano de la combinación polilisina/glicérido tal y como usada en el método de la presente invención es aún mejor y que se puede reducir las concentraciones de todos los conservantes usados y al mismo tiempo obtener los mismos resultados de conservación.

10 [0036] Se obtuvieron resultados similares cuando el glicérido era sustituido por octanoilactato de sodio o decanoilactato de sodio o Patonic 122A® (una mezcla comercialmente disponible de decanoilactato de sodio y dodecanoilactato de sodio y de Caravan Ingredients) o cuando se usaba una mezcla de glicérido con uno de los lactolilatos mencionados anteriormente.

Experimento 3: Té helado no carbonatado

[0037] En este experimento, el método de conservación según la presente invención se aplica al té helado usando varias formulaciones antimicrobianas. La actividad antimicrobiana de estas formulaciones se mide mediante un recuenta en placa en muestras de té helado tomadas en distintos momentos.

15 [0038] Una formulación estándar para el té helado se hizo con un pH inicial de aproximadamente 2.65. Las muestras de té helado no carbonatado se inocularon con un cultivo mezclado de 4 levaduras distintas (Candida parapsilosis, Schizosaccharomyces pombe, Zygosaccharomyces bailii y Saccharomyces cerevisiae) o con una mezcla de zigo- o conidiosporas de tres mohos de degradación diferentes (Mucor plumbeus, Paecilomices variotii y una especie de Penicillium). En todos los casos el nivel del inóculo era de aproximadamente 100 células c.q. esporas por ml.

20 [0039] Los mohos fueron precultivados en agar extracto de malta. El medio se incubó a 25°C durante 7 días. Se recogieron las conidiosporas de mohos mediante inundación y raspado de placas de agar totalmente propias con 5 -10 ml 0.05 % (p/v) Tween 80. El líquido conteniendo las conidiosporas se transfirió luego a una tubo de prueba estéril de 50 ml conteniendo 10 - 20 perlas de vidrio estériles (5 mm de diámetro). El contenido del tubo se agitó brevemente con un agitador para soltar las esporas. El contenido del tubo se transfirió posteriormente a una jeringa estéril con un tapón de lana de vidrio en el fondo. Cualquier micelio restante fue retirado por filtración.

25 Antes de la inoculación se contó el número de células o conidiosporas usando un hemocitómetro (tipo Bürker-Türk).

[0040] Se utilizaron diferentes formulaciones antimicrobianas. Las formulaciones contenían los mismos componentes tal y como se menciona en el Experimento 2.

30 [0041] La tabla 10 provee las composiciones de las formulaciones antimicrobianas usadas en las muestras de té helado no carbonatado.

Tabla 10: Composiciones de las formulaciones antimicrobianas usadas en el método de conservación según la presente invención en té helado no carbonatado

Muestra	% en peso benzoato de socio	% en peso sorbato de potasio	% en peso cinamato de potasio	% en peso ϵ -polilisina (en 100%)	% en peso MCE 8060	% en peso SHMP
Control -						
1		0.023		0.003	0.015	0.08
3				0.004	0.02	0.08
4			0.015	0.003	0.015	0.08

La ϵ -polilisina comercialmente disponible es una solución que contiene 25% en peso de ϵ -polilisina .

35 El contenido de ϵ -polilisina de la tabla anterior es de 100 % en peso.

[0042] Las tablas 11 y 12 presentan los resultados de un recuento en placa en muestras de té helado tomadas en distintos momentos.

Tabla 11: Recuento total en placa (log ufc/ml) de mohos en muestras de té helado en distintos momentos

Log ufc/ml	Tiempo (días)				
	Muestra	0	7	20	34
Control -	2.97	2.88	5.57	4.98	4.85
1	2.53	1.83	1.00	<1	<1
3	2.75	1.84	2.08	2.51	3.03
4	2.63	1.51	2.05	2.05	1.31

5 [0043] Los resultados de la Tabla anterior muestran que el método de conservación de bebidas ácidas según la presente invención es muy adecuado para conservar bebidas ácidas a base de té helado no carbonatadas que contienen mohos. Una mezcla de ϵ -polilisina y glicéridos C8/C10 (muestra 3) tiene un efecto inhibitor en el crecimiento de mohos y se vuelve significativamente más efectivos cuando se añade un tercer conservante tal como el cinamato de potasio o sorbato de potasio.

Tabla 12: Recuento total en placa: (log ufc/ml) de levaduras en muestras de té helado en distintos momentos

Log ufc/ml	Tiempo (días)				
	Muestra	0	7	20	34
Control -	2.64	2.15	2.54	1.90	0.97
1	1.94	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
3	1.67	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4	1.09	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

10

[0044] Los resultados de la tabla anterior demuestran que el método de conservación de bebidas ácidas según la presente invención es muy adecuado para conservar bebidas ácidas no carbonatadas tales como el té helado. Una mezcla de ϵ -polilisina y glicéridos C8/C10 (muestra 3) es capaz de conservar dicha bebida durante al menos 62 días, lo cual no se ha demostrado anteriormente.

15 Las otras muestras demuestran que mediante la adición de otros conservantes el efecto antimicrobiano de la combinación polilisina/glicérido tal y como se usa en el método según la presente invención permanece igual aunque se haya utilizado concentraciones inferiores de conservantes.

20 [0045] Se obtuvieron resultados similares con respecto al efecto antimicrobiano contra mohos y levaduras en el té helado no carbonatado cuando el glicérido era sustituido por octanoilactato de sodio o decanoilactato de sodio o Pationic 122A® (una mezcla comercialmente disponible de decanoilactato de sodio y dodecanoilactato de Caravan Ingredients) o cuando se utilizó una mezcla de glicérido con uno de los lactilatos mencionados anteriormente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de conservación de una bebida ácida con un valor de pH de 1 a 4.8 comprendiendo la aplicación de una composición comprendiendo polilisina y/o una sal de la misma y en forma de segundo conservante al menos un éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico y/o una sal del mismo, o de éster de ácido graso de glicerol.
2. Método según la reivindicación 1 donde la bebida tiene un valor de pH de 2 a 4.6
3. Método según la reivindicación 1 o 2 donde la bebida se somete a un método de envasado de llenado en frío.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicho éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico comprende lactilato.
- 10 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicha composición comprende otro agente conservante.
6. Método según la reivindicación 5 donde dicho agente conservante es uno o más componentes seleccionados a partir de ácido sórbico y su sal, ácido cinámico y su sal, ácido láctico y su sal, ácido acético y su sal, ácido cítrico y su sal, y ácido propiónico y su sal.
- 15 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la polilisina es ϵ -polilisina.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición comprende de 0.0001 % en peso hasta 50 % en peso de polilisina y/o una sal de ésta y o de 0.0001 % en peso hasta 45% en peso de glicérido o de 0.0001 % en peso hasta 45 % en peso de lactilato, y también de 0 a 45 % en peso de ácido orgánico o una sal o éster de mezcla de éstos, de 0 a 45 % en peso de ácido cinámico o una sal de éste de 0 a 45 % en peso de ácido sórbico o una sal de éste.
- 20 9. Método según la reivindicación 8 donde el ácido orgánico comprende ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido propiónico o cualquier combinación de éstos.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicha composición se aplica contra levaduras, hongos o bacterias.
- 25 11. Método según la reivindicación precedente donde dichos hongos comprende hongos de la familia de Fusarium, Mucor, Byssoschlamys, Neosartorya, Talaromyces, Geotrichum, Paecilomyces, Penicillium, Aspergillus, Botrytis, Rhizopus, Cladosporium y Eurotium.
12. Método según la reivindicación 10 donde dicha levadura comprende levaduras de la familia de Candida, Debaryomyces, Dekkera, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Torulospira, Yarrowia y de la familia de Zygosaccharomyces.
- 30 13. Producto de tipo bebida ácida con un valor de pH de 1 a 4.8 comprendiendo polilisina y un segundo conservante seleccionado a partir de lactilato o bien glicérido o bien ambos y un tercer conservante seleccionado a partir de ácido sórbico, ácido cinámico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico y/o ácido propiónico, cualesquiera sales y combinaciones de estos ácidos.
- 35 14. Uso de éster de ácido graso de glicerol como agente antimicrobiano en una composición comprendiendo polilisina y/o una sal de ésta para la conservación de productos de tipo bebida ácida con un pH de 1 a 4.8.
15. Uso de éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico en su forma ácida, sal o éster en forma de agente antimicrobiano en una composición comprendiendo polilisina y/o una sal de ésta para la conservación de productos de tipo bebida ácida con un pH de 1 a 4.8