

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 506**

51 Int. Cl.:
A01N 65/00 (2009.01)
A23L 1/068 (2006.01)
A23L 2/02 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04820298 .0**
96 Fecha de presentación: **10.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1692940**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático que utiliza una sustancia derivada del fruto de acerola**

30 Prioridad:
12.12.2003 JP 2003415127

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:
**NICHIREI FOODS INC.
6-19-20, TSUKIJI, CHUO-KU
TOKYO 104-8402, JP**

72 Inventor/es:
**TANADA, Shozo;
TAJIMA, Rie;
KOIZUMI, Takeshi;
YAMAMOTO, Satoshi;
AOKI, Hitoshi;
HANAMURA, Takayuki y
MAYAMA, Chisato**

74 Agente/Representante:
García-Cabrerizo y del Santo, Pedro

ES 2 383 506 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

Inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático que utiliza una sustancia derivada del fruto de acerola.

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a una función inhibidora del crecimiento bacteriano o bacteriostática de sustancias de origen natural.

TÉCNICA ANTECEDENTE

10 Convencionalmente, las bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus* se conocen como bacterias simultáneamente termorresistentes y resistentes al ácido (BTA: bacilos termoacidófilos). Además, se sabe que las esporas de bacterias pertenecientes al género *Alicyclobacillus* son resistentes a la pasteurización general para el zumo de fruta y similares.

15 En particular, se supone que las bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*, tales como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Alicyclobacillus herbarius*, no son tóxicas para los seres humanos por sí mismas. Sin embargo, producen una sustancia olorosa (mal olor a producto químico) llamada guayacol, metabolizando vanilina y similares contenidos en alimentos y aditivos alimentarios. Además, un olor de un grado que puede ser detectado por seres humanos es emitido por una cantidad muy pequeña de bacterias. Por lo tanto, recientemente, *Alicyclobacillus acidoterrestris* ha sido un problema como causa de reducción de la calidad de alimentos, principalmente entre los fabricantes de bebidas. Para inhibir/bloquear el crecimiento de estas bacterias en zumo de fruta y bebidas de fruta, son eficaces conservantes artificiales tales como ácido benzoico.

20 Sin embargo, como sustancia para inhibir/bloquear el crecimiento bacteriano, existe una demanda por parte del cliente de una sustancia derivada de sustancias de origen natural con eficacia a una baja concentración.

25 Ya existen varios ejemplos de sustancias que satisfacen dicha demanda. Por ejemplo, en el caso de la conservación de zumo de fruta, bebidas de fruta o similares, como sustancia derivada de sustancias de origen natural para inhibir/bloquear el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, existe la nisina, que es un péptido derivado de bacterias lácticas (Documento no de Patente 1), tionina de tipo α y tionina de tipo β derivadas de cereales (Documento de Patente 1), 1,5-D-anhidrofructosa derivada de almidón o productos de descomposición de almidón (Documento de Patente 2), concentrado activo derivado de arándano (Documento de Patente 3), y polifenol derivado de uva (Documento no de Patente 2).

[Documento de Patente 1] Solicitud de Patente Japonesa no Examinada, Primera Publicación N° 2002-37705

[Documento de Patente 2] Solicitud de Patente Japonesa no Examinada, Primera Publicación N° 2002-17319

30 [Documento de Patente 3] Traducción Japonesa Publicada N° 2001-516565 de la solicitud PCT

[Documento no de Patente 1] International Journal of Food Science and Technology 1999, 34, 81-85

[Documento no de Patente 2] Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi Vol. 49, No. 8, 555-558 (2002)

35 Los productos alimentarios que tienen un producto de Acerola como ingrediente se muestran en los documentos Shadan Hojin Nippon Kaju Kyokai: 'Saishain Kaju Katitsu inryo Jiten', 01 de octubre de 1997, págs. 182-183, JP-A-5 334 846, JP 2001 128651 A, JP 62 208 236 A, JP 2000 004768 A, WO 01/64041 A, JP 5207865, DE 4111040 C y JP 602272.

El documento DE 100 26 182 A1 describe un producto de calostro lácteo y la función bactericida del calostro. Al producto de calostro lácteo se le puede añadir cereza de acerola.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 [Problemas a resolver por la invención]

Sin embargo, existen respectivos problemas individuales para usar las sustancias anteriores como sustancias derivadas de sustancias de origen natural, para inhibir/bloquear el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Es decir, la nisina contiene aminoácidos únicos tales como deshidroalanina, y actualmente no está aprobada como aditivo alimentario en Japón.

45 Además, en el caso de sustancias diferentes de nisina, existe el problema de un complicado método de preparación. Es decir, la tionina de tipo α y tionina de tipo β son componentes que contienen aproximadamente 45 aminoácidos. Se requiere que se extraigan de gachas de harina de cereales tales como cebada, trigo, avena y centeno. Se requiere que la 1,5-D-anhidrofructosa se prepare a partir de almidón o productos de descomposición de almidón, utilizando la acción de una enzima derivada de un tejido vegetal tal como un microorganismo o algas rojas. Respecto

a la sustancia derivada de arándano, se requiere que el fruto de arándano y similares sean tratados usando una matriz de unión adecuada. Además, se requiere que el polifenol derivado de uva sea extraído hidrotérmicamente de semillas de "Kyoho", y que a continuación se prepare como una fracción de absorción de Sephadex. Estos cuatro tipos de sustancias (o extracciones) son sustancias antibacterianas derivadas de sustancias de origen natural, pero como se ha descrito anteriormente, son tan difíciles de preparar y manipular que no han sido usadas en la práctica como sustancias que inhiben o bloquean el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*, en particular, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Alicyclobacillus herbarius* que pueden producir guayacol, siendo el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático derivado de sustancias de origen natural y siendo fácil de obtener, preparar y manejar.

[Medios para resolver el problema]

Los inventores de la presente invención han estudiado diligentemente para resolver los problemas anteriores, dando como resultado el descubrimiento de que el zumo de fruta derivado del fruto de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y similares es capaz de inhibir o bloquear el crecimiento de bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*, y han completado la presente invención, tal como se define en la reivindicación 1.

Un inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA), puede contener puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola, como ingrediente activo.

Dicho inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA) puede contener un puré o zumo de fruta deshidratado obtenido del fruto de acerola, como ingrediente activo.

En dicho inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA) el puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola puede ser sin azúcar.

En un aspecto de la presente invención, los bacilos termoacidófilos (BTA) son bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*.

En un aspecto adicional de la presente invención, las bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus* son *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidiphilus* o *Alicyclobacillus herbarius*.

Un inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático puede añadirse a un alimento o una bebida.

Un alimento o una bebida puede contener el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático.

En un aspecto de la presente invención, un puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola, una sustancia sin azúcar de los mismos, o un **puré o zumo de fruta** deshidratado obtenido del fruto de acerola está inhibiendo o bloqueando el crecimiento bacteriano.

Un método para fabricar un alimento o una bebida, puede incluir una etapa de añadir el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático.

Inhibir o bloquear el crecimiento bacteriano en un alimento o una bebida, puede incluir una etapa de añadir el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático al alimento o bebida.

[Efectos de la invención]

El inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático que utiliza zumo de fruta derivado del fruto de acerola se deriva de sustancias de origen natural. Usado de acuerdo con la invención, como se define en la reivindicación 1, tiene un efecto superior de inhibición o bloqueo del crecimiento de bacilos termoacidófilos (BTA). Además, durante su preparación, no se requieren sustancialmente ni dispositivos ni operaciones especiales, así que esto es ventajoso desde el punto de vista de la facilidad de fabricación y los costes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola.

La figura 2 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola con respecto a *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

La figura 3 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola con respecto a *Alicyclobacillus cycloheptanicus*.

La figura 4 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola con respecto a *Alicyclobacillus herbarius*.

La figura 5 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola con respecto a *Alicyclobacillus hesperidum*.

La figura 6 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola con respecto a *Alicyclobacillus acidiphilus*.

5 La figura 7 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del contenido sólido del zumo del fruto de acerola.

La figura 8 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del contenido sólido del zumo del fruto de acerola en un zumo de manzana.

10 La figura 9 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del contenido sólido del zumo del fruto de acerola en diversos zumos de fruta.

La figura 10 es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición o de bloqueo del crecimiento bacteriano del contenido sólido del zumo del fruto de acerola sin azúcar.

MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

15 La acerola usada en la presente invención es una planta de Malpighiaceae *Malpighia* originaria de la América tropical, que también se denomina cereza de Barbados y cereza de la India Occidental. La variedad de la acerola usada en la presente invención no está limitada específicamente y, por ejemplo, puede usarse adecuadamente fruto de acerola del Sudeste asiático y de Brasil. Además, el nombre científico de la acerola es *Malpighia emarginata* DC., pero una de Puerto Rico puede denominarse como *M. puniceifolia* L. y una de Cuba, Florida o Centroamérica puede denominarse como *M. glabra* L. en algunos casos. Sin embargo, actualmente estos dos nombres científicos se consideran sinónimos. Por consiguiente, la acerola usada en la presente invención no está limitada a ninguno de estos nombres científicos.

20 El puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola usado como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático en la presente invención puede prepararse a partir del fruto de acerola como materia prima, usando un método de preparación general para puré/zumo de fruta. Por ejemplo, el puré puede obtenerse exprimiendo o colando directamente la parte comestible del fruto de acerola, con un paño tal como un paño de algodón blanqueado o un colador. Además, también puede obtenerse aplastando la parte comestible del fruto de acerola con las semillas retiradas. El zumo de fruta puede obtenerse usando el puré como materia prima que se somete a un tratamiento de purificación tal como centrifugado. Como alternativa, el fruto puede exprimirse mecánicamente usando un exprimidor. El puré y el zumo de fruta obtenido de esta manera puede contener sustancias insolubles, o puede someterse a tratamiento enzimático usando pectinasa o similares, o un proceso de clarificación tal como ultrafiltración, según se requiera. Estas preparaciones pueden usarse después de cambiar adecuadamente su concentración mediante concentración o dilución.

25 La sustancia deshidratada de puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola usada como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático en la presente invención es una sustancia sólida obtenida del puré o zumo de fruta que se ha preparado de la manera anterior y a continuación adecuadamente liofilizada, secada por pulverización, secada en tambor o secada de otro modo.

30 En la presente invención, el puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola puede usarse después de haberle sometido a un proceso de eliminación del azúcar. Los ejemplos de métodos de tratamiento de eliminación del azúcar incluyen un método en el que el puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola se concentra o se diluye hasta que su concentración se vuelve apropiada, el concentrado o la dilución se fermenta mediante un microorganismo tal como levadura, la materia fermentada se separa en un sobrenadante y una parte sólida que contiene el microorganismo realizando centrifugado o similares después de la fermentación, y el sobrenadante se liofiliza adecuadamente para darle forma de polvo. Las condiciones de fermentación pueden ser determinadas adecuadamente por un experto en la materia, considerando las propiedades y el estado del puré/zumo de fruta a fermentar, el tipo de microorganismo a usar, y similares. Preferentemente, la fermentación se realiza hasta que la glucosa y la fructosa contenidas en el puré o zumo de fruta lleguen al 0%.

35 El puré o zumo de fruta obtenido del fruto de acerola usado como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático (en lo sucesivo en este documento, denominado zumo del fruto de acerola) puede usarse en bruto (sin calentar), o puede usarse después de esterilización con calor. En la práctica, tanto el zumo del fruto de acerola no calentado como el zumo del fruto de acerola esterilizado con calor son capaces, de forma equivalente, de inhibir o bloquear el crecimiento de bacilos termoacidófilos (BTA).

40 El zumo del fruto de acerola usado como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático en la presente invención se usa normalmente después de calentarlo. El tratamiento con calor puede realizarse, por ejemplo, en agua caliente a de 70 a 120°C durante de 1 segundo a 20 minutos.

Un alimento o bebida a la que se le va a añadir el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático no está específicamente limitada. Sin embargo, sus ejemplos incluyen bebidas tales como refrescos y bebidas refrescantes, y alimentos tales como gelatina, yogur y helado. En el caso de un alimento sólido, si éste se procesa en un estado líquido o semisólido en su proceso de fabricación, el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático se añade al líquido o semisólido. En el caso de un alimento sólido que no asume la forma de un líquido o un estado semisólido, los BTA casi no causan ningún problema.

En el caso de una forma de puré o zumo de fruta, el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático está contenido preferentemente en el alimento o la bebida, de modo que la concentración final en el alimento o la bebida está dentro de un intervalo entre el 0,5 y el 100% en masa. Mientras tanto, en el caso de una forma sólida deshidratada, está contenido preferentemente en el alimento o la bebida, de modo que la concentración final en el alimento o la bebida está dentro de un intervalo entre el 0,05 y el 10% en masa.

En el caso en el que el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático se aplica a una bebida de fruta/bebida refrescante, el contenido del zumo o puré del fruto de acerola es de 0,5 a 100 partes en peso y más preferentemente de 2 a 10 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de la bebida. Mientras tanto, en el caso en el que se aplica a un alimento, el contenido del zumo o puré del fruto de acerola es de 0,1 a 20 partes en peso y más preferentemente de 1 a 10 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del alimento.

En el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático, además de zumo del fruto de acerola, pueden añadirse otras sustancias tales como un vehículo inactivo, un adyuvante, y una sustancia antibacteriana a concentraciones apropiadas, a no ser que el efecto del zumo del fruto de acerola se elimine o se reduzca.

Los ejemplos de vehículos inactivos incluyen: 1) sacáridos tales como almidón, maltodextrina, ciclodextrina, dextrina tostada, sacarosa, glucosa, maltosa y lactosa, 2) espesantes polisacarídicos tales como carboximetilcelulosa, agar, producto de descomposición de agar, carragenano, glucomanano, goma de algarroba y goma xantana, 3) harinas de cereales tales como harina de trigo, harina de arroz y harina de maíz, y 4) proteínas tales como soja desgrasada, leche desnatada y proteínas de maíz. Además, en el caso de un estado líquido o estado en gel, además de las sustancias anteriores, sus ejemplos también incluyen sustancias que son líquidas a temperatura y presión normales, tales como agua, alcohol y ácido acético.

Los ejemplos de adyuvantes incluyen diversos ácidos y sales tales como ácido adípico, ácido propiónico, propionato sódico, propionato cálcico, ácido láctico, lactato sódico, lactato cálcico, ácido cítrico, citrato trisódico, ácido sórbico, sorbato potásico, ácido succínico, succinato monosódico, succinato disódico, ácido fumárico, fumarato monosódico, ácido glucónico, gluconato sódico, gluconato cálcico, ácido DL-tartárico, ácido L-tartárico, tritrato DL-sódico, ácido DL-málico, malato DL-sódico, ácido benzoico, benzoato sódico, glucono-delta-lactona, carbonatos, dióxido de carbono, nitritos, ácido fosfórico, fosfatos, polifosfatos (pirofosfato sódico, tripolifosfato sódico, hexametáfosfato y similares), ácido itacónico y ácido fítico. Además, como adyuvante, pueden añadirse diversos antioxidantes. Sus ejemplos incluyen antioxidantes tales como ácido ascórbico, y sales de sodio, potasio, y calcio y sus ésteres de ácidos grasos, ácido eritórbito, y sales de sodio, potasio y calcio y sus ésteres de ácidos grasos, y α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, β -caroteno, carotenoide, catequinas, tanino, flavonoide, antocianina, polifenol, BHT, 2-BHA, 3-BHA, butilhidroxianisol, ácido úrico, DHA, IPA, EPA, EDTA, resina de guayaco, citrato de isopropilo, dibutilhidroxitolueno, ácido nordihidroguayarático y galato de propilo.

Los ejemplos de sustancias antibacterianas incluyen ácido acético, acetato sódico, éster de ácido graso de glicerina, éster de ácido graso de poliglicerina, éster de azúcar, dilaurilsulfato de tiamina, deshidroxiacetato sódico, glicina, protamina, polilisina, lisozima de clara de huevo, quitosano, etanol, extracto de rábano picante, extracto de mostaza, extracto de clavo, extracto de canela, extracto de salvia, extracto de pimienta, extracto de pimiento, extracto de romero, extracto de orégano, extracto de ajo, extracto de hoja de higuera, extracto de semilla de cítricos, extracto de mora, ácido kójico, extracto de perilla, extracto de jengibre, extracto de centidonia, extracto de lúpulo, extracto de soja en bruto, extracto de pericarpio de uva, extracto de "hokkoshi", extracto de bambú de tronco grueso, extracto de malpica, extracto de propóleos, extracto de aceite de regaliz, extracto de oliva, extracto de espuma de yuca, producto de descomposición de levadura roja (Monascus), producto de descomposición de pectina, tanino de té, hinokitiol, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y otros homólogos del ácido cinámico.

El inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático puede producirse mezclando el zumo del fruto de acerola y otros ingredientes opcionales según se requiera, y además esterilizando, filtrando y concentrando, o similares, según se requiera. El alimento o la bebida que usa el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático puede producirse mediante métodos normales que usan como su materia prima materias primas usadas generalmente para alimentos o bebidas y el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático que utiliza el zumo del fruto de acerola.

El inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA) que utiliza el zumo del fruto de acerola en el presente ejemplo se deriva de sustancias de origen natural. Además, tiene un efecto superior de inhibición o bloqueo del crecimiento de bacilos termoacidófilos (BTA).

Además, cuando se usa el zumo del fruto de acerola como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático, incluso si se realiza esterilización con calor en condiciones de acidez, la capacidad de inhibición o bloqueo del crecimiento bacteriano puede mantenerse. Por lo tanto, esto es conveniente, en la práctica, para impedir la descomposición del alimento y la comida, en particular zumo de fruta, bebidas de fruta, y similares. Además, no se requieren preparación u operaciones especiales, así que también es ventajoso desde el punto de vista de la facilidad de fabricación y los costes.

El inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA) que utiliza el zumo del fruto de acerola puede usarse como conservante para alimentos y bebidas tales como un zumo de fruta.

[Ejemplo 1]

A continuación, se proporciona una descripción específica de la presente invención usando ejemplos.

Efecto inhibidor/bloqueante del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola

843,3 g del fruto de acerola se lavaron con agua estéril, y se retiraron sus cálices. A continuación, se exprimieron usando un paño de algodón blanqueado que se había esterilizado a alta presión a 121°C durante 15 minutos, y se usaron 637,6 g del zumo obtenido como solución del zumo del fruto de acerola. Una parte de la misma se trató térmicamente a 80°C durante 10 minutos, y a continuación se usó como solución tratada térmicamente. Mientras tanto, una cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025) se cultivó en un medio YSG (extracto de levadura al 0,2%, glucosa al 0,1%, almidón soluble al 0,2%, pH 3,7) a 50°C durante de 6 a 8 horas, hasta que el crecimiento bacteriano llegó al periodo medio a tardío en su crecimiento logarítmico (la turbidez a 660 nm era de 0,5 a 0,6), y esta solución bacteriana se usó como suspensión bacteriana. A continuación, una cantidad predeterminada de la solución de zumo del fruto de acerola tratada con calor preparada como anteriormente se añadió al medio YSG (microplaca de 96 pocillos; 250 µl de solución de reacción por pocillo), y la suspensión bacteriana se inoculó, de modo que su contenido llegó a aproximadamente 10³ ufc/ml, y se cultivó a 50°C durante 20 horas. A continuación, el número de bacterias supervivientes en el medio de cultivo se midió contando las colonias que se habían formado después de cultivar a 50°C durante 2 días mediante un método de cultivo por vertido en placa usando un medio de agar YSG (agar al 1,5%).

En los ejemplos de la presente invención, el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se calculó usando la siguiente fórmula.

Porcentaje de inhibición del crecimiento (%) = {1 - (valor logarítmico del número de células supervivientes - valor logarítmico del número inicial de bacterias de inoculación)/(valor logarítmico del número de bacterias de control - valor logarítmico del número inicial de bacterias de inoculación)} x 100

El número inicial de bacterias inoculadas se estableció en 3,4 x 10² ufc/ml, y el número de bacterias de control se estableció en 5,0 x 10⁷ ufc/ml. Los datos se tomaron del valor medio de dos mediciones realizadas al mismo tiempo. Los resultados se muestran en la figura 1.

Como se ve a partir de estos resultados, a medida que aumentaba la adición del zumo del fruto de acerola, el porcentaje de inhibición del crecimiento crecía. Si la cantidad del zumo del fruto de acerola añadida era del 50% (dilución de 2 veces) o más, el número de bacterias supervivientes llegaba casi a cero. Incluso si el zumo del fruto de acerola se trataba con calor a 80°C durante 10 minutos, el efecto era el mismo.

[Ejemplo 2]

Efecto inhibidor/bloqueante del crecimiento bacteriano de zumo del fruto de acerola con respecto a bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*

Se realizó sustancialmente el mismo experimento en las siguientes cepas, y se examinó la capacidad de inhibición/bloqueo del crecimiento bacteriano del zumo del fruto de acerola (tratado con calor y no tratado con calor).

Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 27009)

Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029)

Alicyclobacillus herbarius (DSM 13609)

Alicyclobacillus hesperidum (DSM 12489)

Alicyclobacillus acidiphilus (DSM 14558^T)

Los resultados se muestran en la figura 2 a la figura 6.

Como es evidente a partir de estos gráficos, el zumo del fruto de acerola mostraba capacidad de inhibición/bloqueo del crecimiento bacteriano con respecto a muchos tipos de cepas que pertenecen al género *Alicyclobacillus*.

[Ejemplo 3]

Preparación del contenido sólido del zumo del fruto de acerola

Se exprimíó 1 kg de fruto de acerola originario de Brasil, y se separó en zumo de fruta y residuo. El residuo se lavó con 1 l de agua destilada. Esta solución de lavado y el zumo de fruta se mezclaron, y a continuación se liofilizaron para obtener 80,4 g de polvo. El polvo se denomina "contenido sólido del zumo del fruto de acerola" en lo sucesivo en este documento. Los resultados del análisis de ingredientes del contenido sólido del zumo del fruto de acerola fueron los siguientes.

Glucosa: 26,4%

Fructosa: 29,7%

Vitamina C: 22,3%

Ácido málico: 10,5%

Polifenol total 0,71%

El contenido total de polifenol se midió mediante el método de Folin-Denis.

Experimento con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el contenido sólido del zumo del fruto de acerola

El contenido sólido del zumo del fruto de acerola preparado anteriormente se disolvió en agua destilada para obtener soluciones acuosas que tenían concentraciones del 0,2, el 0,4, el 1,0 y el 2,0%. Se vertieron 3 ml de cada solución acuosa en un tubo para cultivos L (logarítmicos). A continuación, se inoculó *Alicyclobacillus acidoterrestris* (*A. acidoterrestris*; ATCC 49025) en su periodo de crecimiento logarítmico a 2 x concentración de medio líquido YSG, y se agitó. Después de agitarla, 3 ml de esta solución inoculada se añadieron a tubos para cultivos L respectivos que contenían el contenido sólido anterior del zumo del fruto de acerola a las diversas concentraciones para proporcionar 6 ml/tubo. Se realizó un ensayo de exposición sobre estos mediante un método de cultivo estático horizontal a 50°C durante 20 horas. A continuación, se cultivaron mediante el método de cultivo con agar para vertido en placa usando un medio de agar YSG (agar al 1,5% + medio YSG) a 50°C durante 2 días. Después del cultivo, las colonias formadas se contaron, y los resultados se compararon con el control (se añadió agua destilada en lugar de la solución acuosa del contenido sólido del zumo del fruto de acerola), y se muestran en la figura 7. Cuando la concentración final del contenido sólido del zumo del fruto de acerola era del 0,2% (2 mg/ml) o más, el crecimiento bacteriano podía bloquearse completamente. Se descubrió que, cuando la concentración final era del 0,1%, el crecimiento bacteriano se inhibía.

[Ejemplo 4]

Experimento con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el contenido sólido del zumo del fruto de acerola en zumo de fruta de manzana

El contenido sólido del zumo del fruto de acerola se disolvió en agua destilada para obtener soluciones acuosas que tenían concentraciones del 0,02, el 0,04, el 0,08, el 0,12, el 0,16 y el 0,2%. Se vertieron 3 ml de cada solución acuosa en un tubo para cultivos L. A continuación, se realizó un experimento con respecto a la inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* en las mismas condiciones que para el ejemplo 3, excepto que se usó el 70% de la concentración de zumo de fruta de manzana en lugar de 2 x concentración de medio líquido YSG. Los resultados se muestran en la figura 8. Como es evidente a partir de este gráfico, la actividad antibacteriana aumentaba en proporción a la concentración del contenido sólido del zumo del fruto de acerola, y el crecimiento se inhibía cuando la concentración final era del 0,1 % (1 mg/ml).

[Ejemplo 5]

Experimento con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el contenido sólido del zumo del fruto de acerola en diversos zumos de fruta

El experimento de inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* se realizó en las mismas condiciones que para el ejemplo 3, excepto que se usaron concentraciones del 70% de zumo de fruta de manzana, zumo de fruta de piña, zumo de fruta de naranja, zumo de fruta de banana, y zumo de fruta de lichi en lugar de 2 x concentración de medio líquido YSG, y la concentración final del contenido sólido del zumo del fruto de acerola se estableció en 1 mg/ml. Los resultados se muestran en la figura 9. Como es evidente a partir de este gráfico, en cualquier tipo de zumo de fruta, el efecto de inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* se observó cuando la concentración del contenido sólido del zumo del fruto de acerola era de 1 mg/ml.

[Ejemplo 6]

Tratamiento de eliminación de azúcar del zumo del fruto de acerola

5 400 ml de zumo del fruto de acerola se prepararon exprimiendo el fruto de acerola originario de Brasil. Este zumo de fruta se concentró mediante un evaporador, de este modo el valor Brix se volvió del 20 al 30%. A este zumo de fruta concentrado, se le añadió una concentración al 2% de levadura (*S. cerevisiae*), y a continuación el zumo se fermentó a 30°C durante 20 horas. Después de la fermentación, la solución fermentada se centrifugó y se filtró, y a continuación su sobrenadante se liofilizó para obtener 15,9 g de polvo deshidratado. Este polvo se sometió al análisis de ingredientes. Los resultados eran los siguientes.

Glucosa: 0%

Fructosa: 0%

10 Vitamina C: 38,6%

Polifenol total: 1,18%

El contenido total de polifenol se midió mediante el método de Folin-Denis.

[Ejemplo 7]

15 Experimento con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el contenido sólido del zumo del fruto de acerola sin azúcar

20 Se realizó un experimento con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano en las mismas condiciones que para el ejemplo 2, excepto se usaron soluciones acuosas preparadas disolviendo el contenido sólido deshidratado del zumo del fruto de acerola sin azúcar preparado el Ejemplo 6 en agua destilada para hacer que cada concentración fuera del 0,2, el 0,4, el 1,0 o el 2,0%. Los resultados se muestran en la figura 10. De forma similar al caso en el que no se eliminó el azúcar, el contenido sólido de zumo del fruto de acerola sin azúcar bloqueaba completamente el crecimiento bacteriano a una concentración de 2 mg/ml.

[Ejemplo 8]

Producción de una bebida que contiene zumo del fruto de acerola (zumo mezclado)

25 Se introdujeron zumo del fruto de acerola, zumo de fruta de manzana, y zumo de fruta de piña en un tanque de mezclado. A continuación, azúcar líquida de fructosa glucosa, y acidulantes (ácido cítrico, citrato sódico y ácido málico) se disolvieron en agua sometida a intercambio iónico en las siguientes proporciones, y se introdujeron en el tanque de mezclado de la misma manera. A continuación, se añadió agua sometida a intercambio hasta una cantidad predeterminada, y la solución completa se homogeneizó mediante agitación. El producto obtenido de esta manera se esterilizó a alta temperatura durante un corto periodo, en condiciones de aproximadamente 90°C durante 30 5 segundos, mediante un intercambiador de calor de tipo placa o similar, y a continuación se vertió en una botella de PET una vez caliente. A continuación, se enfrió rápidamente, y se produjo el Producto 1. Además, para comparar, se produjo el Producto Comparativo 1 de la misma manera excepto que no se mezcló en él el zumo del fruto de acerola.

(Proporciones)

Zumo del fruto de acerola:	10%
Zumo de fruta de manzana:	20%
Zumo de fruta de piña:	5%
Azúcar líquida de fructosa glucosa:	9%
Ácido cítrico:	0,1%
Citrato sódico:	0,05%
Ácido málico:	0,1 %
Agua sometida a intercambio iónico:	55,75%

(la notación % es toda el % en peso)

Para las respectivas bebidas obtenidas de esta manera, en primer lugar, la evaluación sensorial fue realizada por 10 jurados entrenados para comparar el sabor. Los resultados fueron que el sabor del Producto 1 era mucho mejor que el del Producto Comparativo 1. A continuación, se examinó el porcentaje de crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cada bebida. Es decir, se inoculó *Alicyclobacillus acidoterrestris* respectivamente en el Producto 1 y en el Producto Comparativo 1, y se dejaron reposar a 50°C durante 24 horas, después de las cuales se midió el número de bacterias supervivientes mediante un método de cultivo en agar para vertido en placa usando un medio de agar YSG. Los resultados fueron que el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* se confirmó en el Producto Comparativo 1, mientras que su crecimiento podía inhibirse completamente en el Producto 1. Además, en el Producto 1, no se descubrió precipitación ni separación ni siquiera después de haberle dejado reposar a 10°C durante 4 semanas, y se mantuvo un sabor excelente. Además, el efecto de inhibición del crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* no disminuyó.

[Ejemplo 9]

Producción de gelatina en copas que contiene zumo del fruto de acerola

Una cantidad apropiada de agua sometida a intercambio iónico se introdujo en un tanque de mezclado de tipo amasador encamisado con agitador y se calentó. A continuación, se introdujeron secuencialmente citrato sódico y azúcar granulado disuelto en agua sometida a intercambio iónico, un agente gelificante disponible en el mercado (fabricado por San-Ei Gen F.F.I., Inc.) dispersado uniformemente en agua sometida a intercambio iónico calentada usando un tanque de agitación a alta velocidad, zumo de fruta de manzana, zumo de fruta de piña y zumo del fruto de acerola en el tanque de mezclado. A continuación, se disolvieron acidulantes (ácido cítrico y ácido málico) en agua sometida a intercambio iónico, y a continuación se introdujeron en el tanque de mezclado de la misma manera. A continuación, se añadió agua sometida a intercambio iónico hasta una cantidad predeterminada, y la solución completa se homogeneizó mediante agitación. A continuación, se calentó a 80°C y se agitó durante 10 minutos. El producto preparado de esta manera se envasó en caliente adecuadamente en un recipiente para gelatina, usando una máquina de llenado de copas. Finalmente, el producto envasado en el recipiente se empapó con agua caliente a 80°C durante 30 minutos para esterilizar por calentamiento y, de este modo, se obtuvo el Producto 2. Además, se produjo el Producto Comparativo 2 de la misma manera excepto que no se mezcló en él el zumo del fruto de acerola.

(Proporciones)

Zumo del fruto de acerola:	10%
Zumo de fruta de manzana:	20%
Zumo de fruta de piña:	5%
Azúcar granulado:	15%
Ácido cítrico:	0,1 %
Citrato sódico:	0,05%
Ácido málico:	0,1%
Agente gelificante:	1,2%
Agua sometida a intercambio iónico:	49,15%

(la notación % es toda el % en peso)

Con respecto a las gelatinas en copa obtenidas de esta manera, en primer lugar, la evaluación sensorial fue realizada por 10 jurados entrenados para comparar el sabor. Los resultados fueron que el sabor del Producto 2 era mucho mejor que el del Producto Comparativo 2. A continuación, se examinó el porcentaje de crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cada gelatina en copa. Es decir, se inoculó *Alicyclobacillus acidoterrestris* respectivamente en el Producto 2 y el Producto Comparativo 2, y se dejaron reposar a 50°C durante 24 horas, después de las cuales el número de bacterias supervivientes se midió mediante un método de cultivo en agar para vertido en placa usando un medio de agar YSG. Los resultados fueron que el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* se confirmó en el Producto Comparativo 2, mientras que el crecimiento del mismo podía inhibirse completamente en el Producto 2. Además, en el Producto 2, no se descubrió precipitación ni separación ni siquiera después de haberle dejado reposar a 10°C durante 4 semanas, y se mantuvieron propiedades físicas estables y un sabor excelente. Además, el efecto de inhibición del crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* no disminuyó, análogamente a en el caso de la bebida.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La función inhibidora del crecimiento bacteriano o bacteriostática de la presente invención puede usarse para alimentos, tales como bebidas de fruta.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un puré o un zumo de fruta obtenido de un fruto de acerola, una sustancia sin azúcar del mismo, o un puré o zumo de fruta deshidratado obtenido del fruto de acerola, como inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático contra bacilos termoacidófilos (BTA).
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los bacilos termoacidófilos (BTA) son bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus*.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus* son *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidiphilus* o *Alicyclobacillus herbarius*.
- 10 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el que el inhibidor del crecimiento bacteriano o agente bacteriostático se añadirá a un alimento o una bebida.

FIG. 1

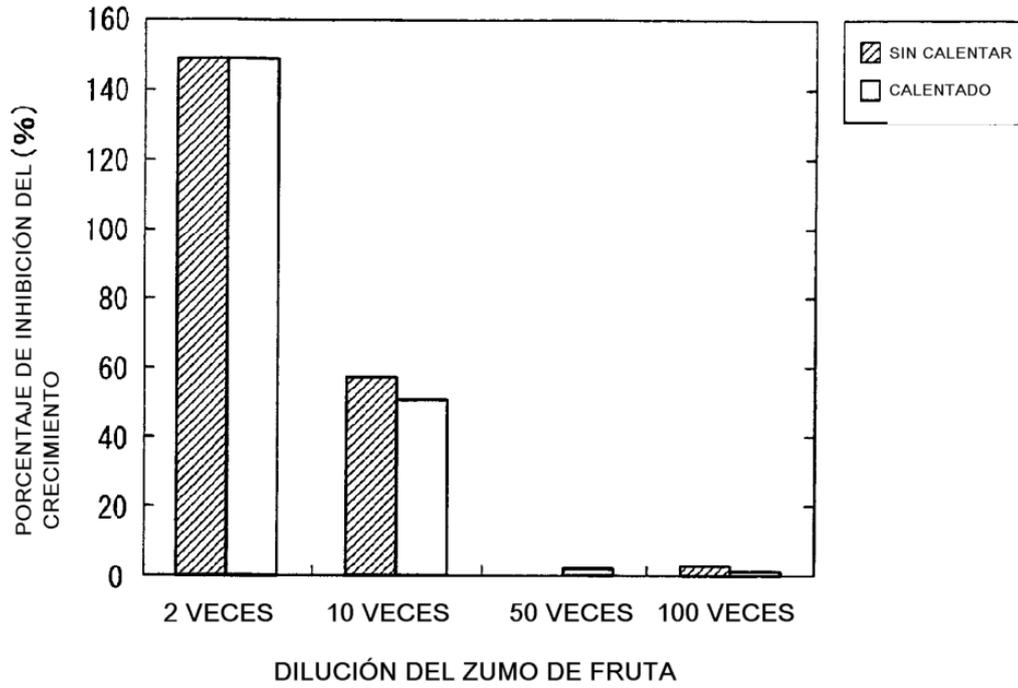


FIG. 2

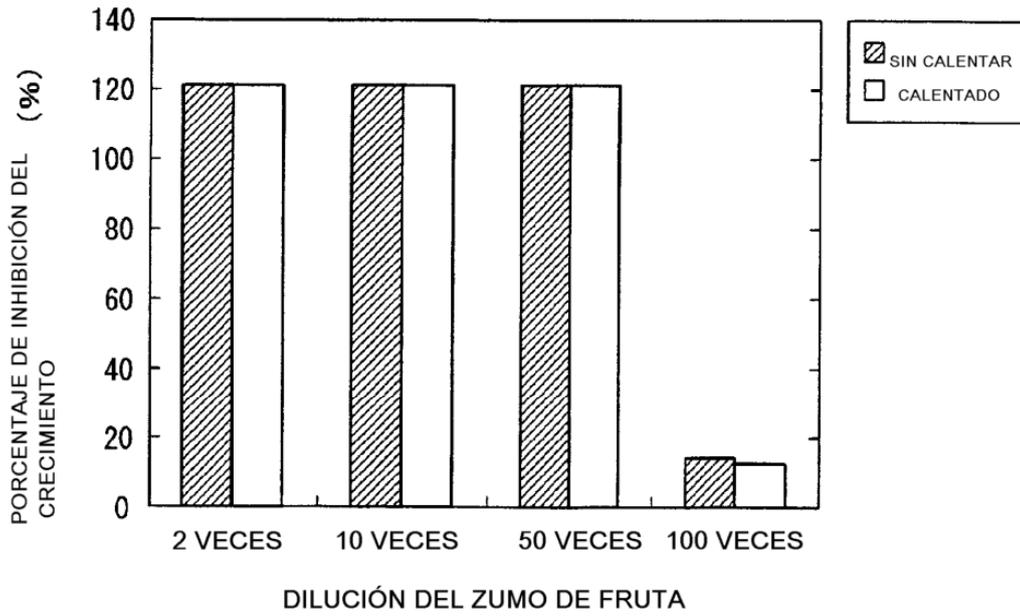


FIG. 3

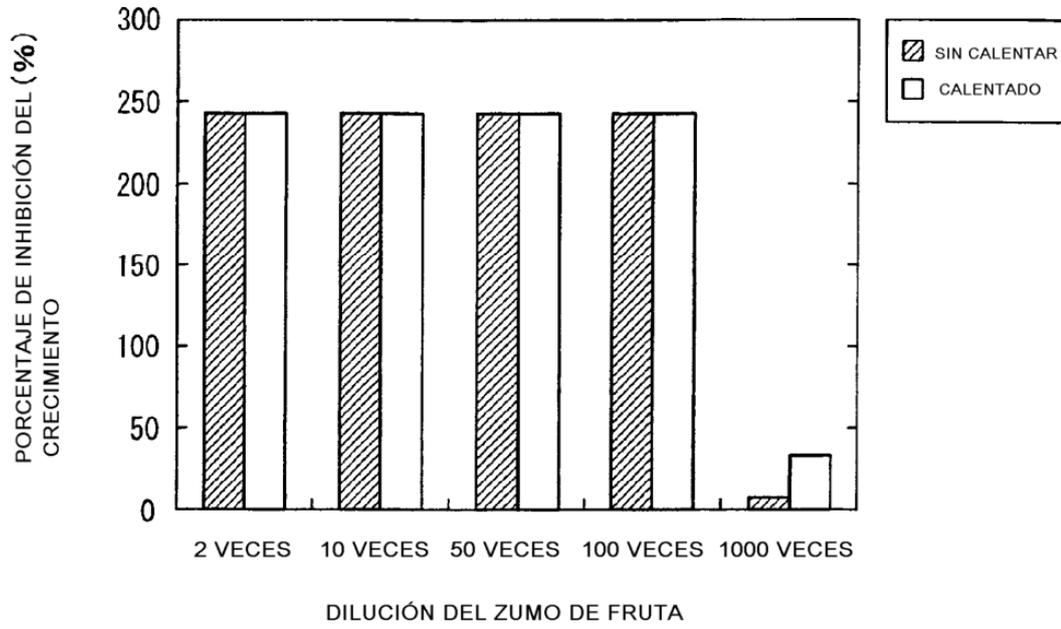


FIG. 4

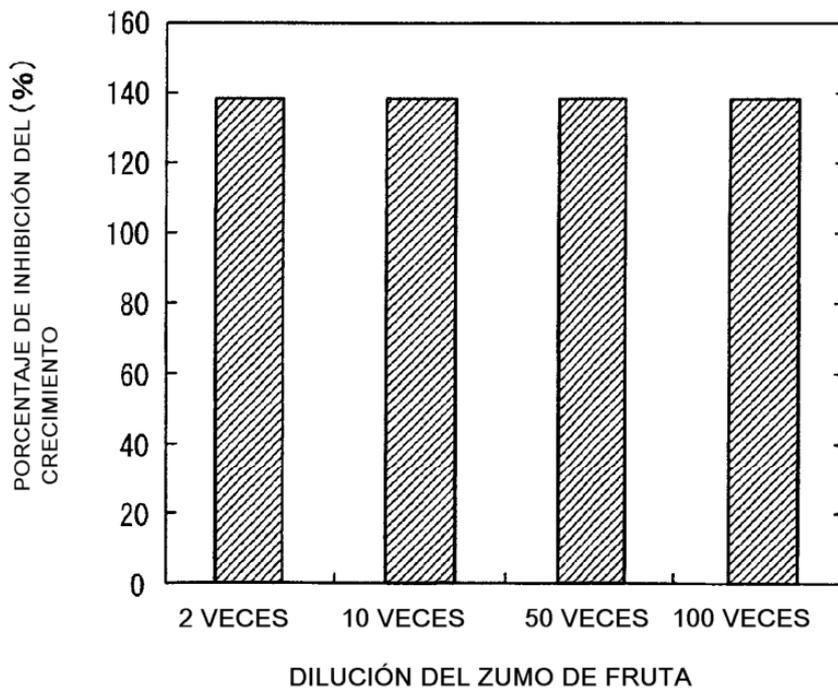


FIG. 5

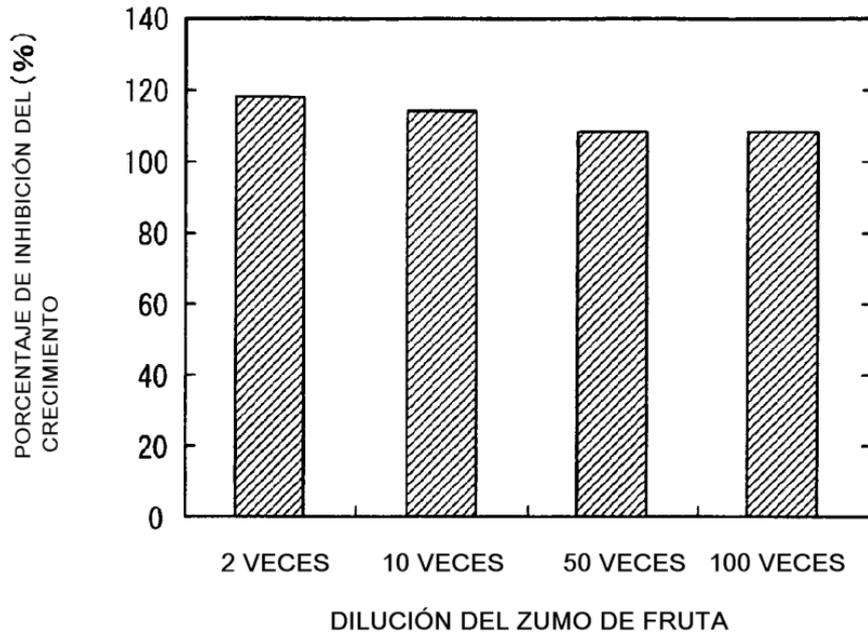


FIG. 6

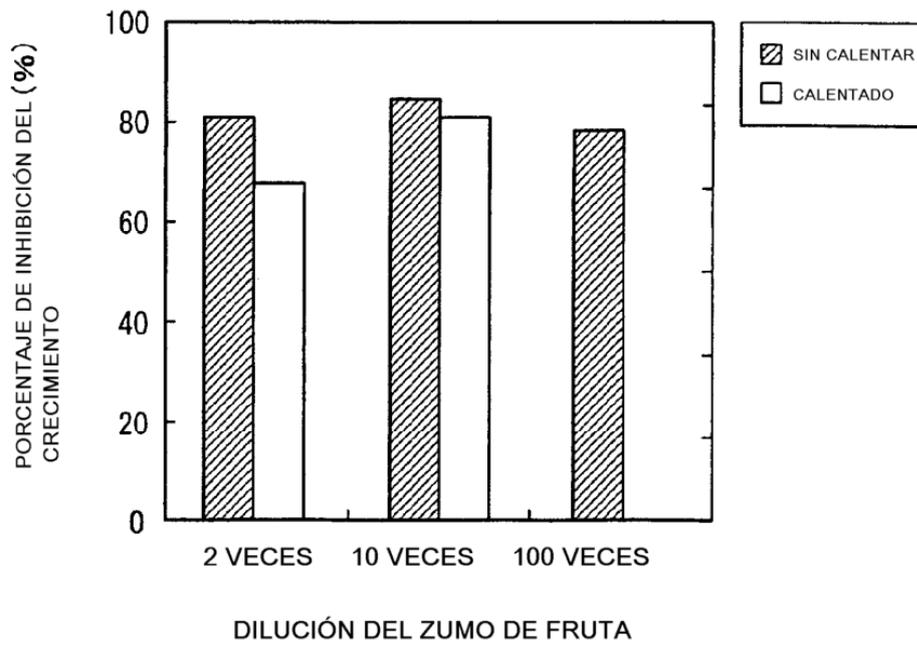


FIG. 7

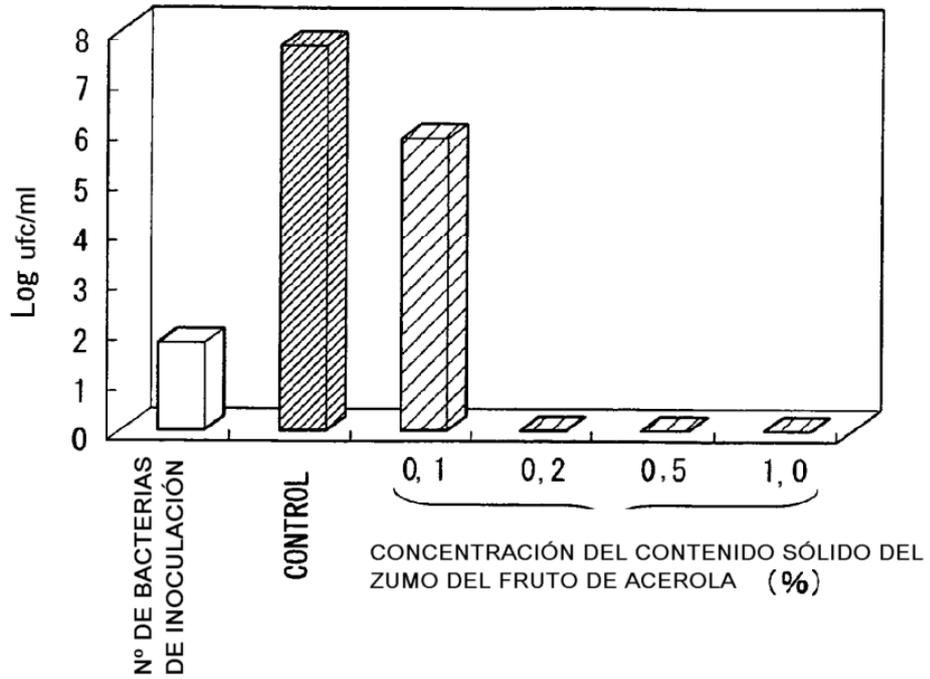


FIG. 8

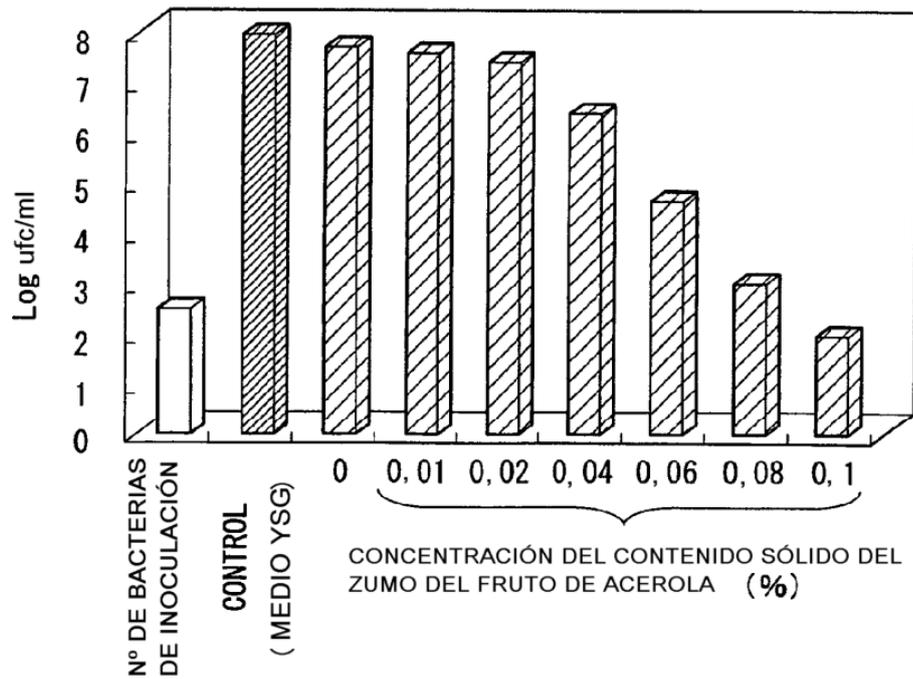


FIG. 9

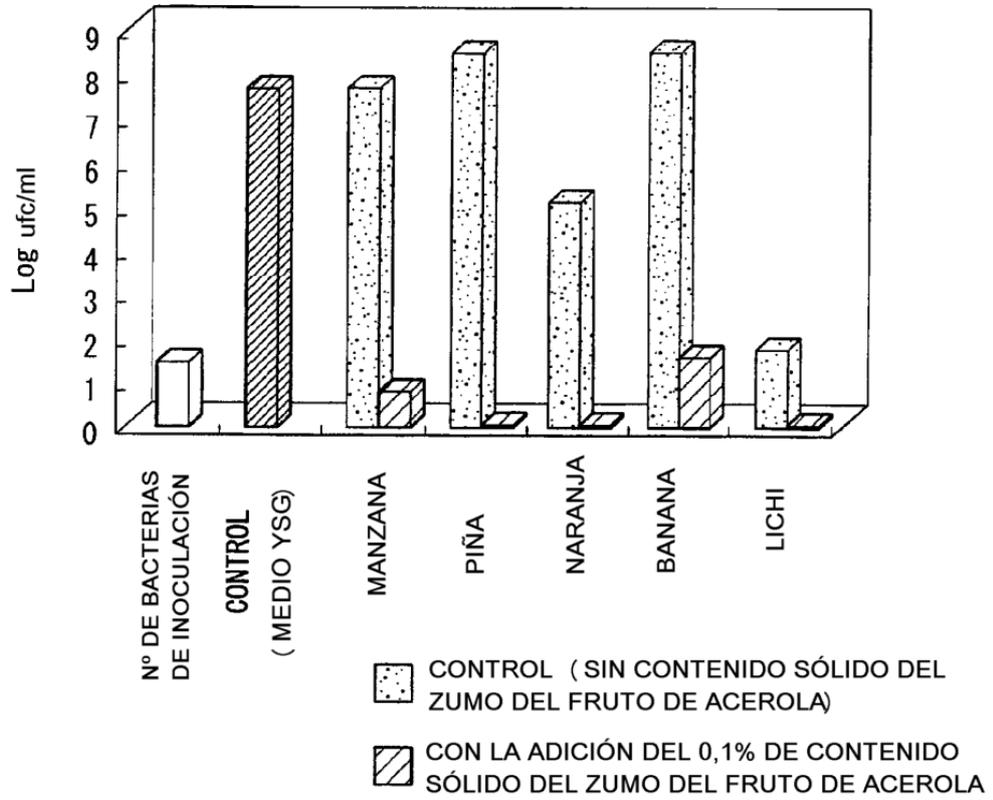


FIG. 10

