

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 927**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2005 E 05787302 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 1793692**

54 Título: **Composición antimicrobiana**

30 Prioridad:

23.09.2004 EP 04104633

08.03.2005 EP 05101792

26.04.2005 EP 05103375

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.03.2013

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

DUTREUX, NICOLE LILIANE;

HAAN, DE, BEN RUDOLF y

STARK, JACOBUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 397 927 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

Composición antimicrobiana

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para prevenir o retardar el crecimiento microbiano en o sobre alimentos. Más específicamente, el método comprende utilizar como ingrediente o aplicar a la superficie de un alimento una composición antimicrobiana que incluye natamicina como agente antifúngico y nisina como agente antibacteriano.

Antecedentes de la invención

10 La necesidad de métodos mejorados de preservación de alimentos es grande. Se ha estimado que aproximadamente una cuarta parte del suministro de alimentos del mundo se pierde como resultado de deterioro microbiano y las infecciones microbianas transportadas por alimentos representan una amenaza constante y grave para la salud humana.

15 Varias especies de bacterias que pueden contaminar los alimentos y desarrollarse en los mismos y en las cosechas son patógenas o producen toxinas y causan una serie de enfermedades por envenenamiento de los alimentos. A pesar de la mejora sustancial en la tecnología y la higiene, los productos alimenticios pueden verse expuestos a deterioro y bacterias patógenas en el ambiente de manipulación de los alimentos, y el número de envenenamientos alimenticios está aumentando todavía en la mayoría de los países.

20 El deterioro fúngico puede conducir a pérdidas económicas graves. Varios productos alimenticios, v.g., los productos agrícolas, los productos lácteos y cárnicos, frutas y hortalizas y productos derivados, productos de panadería u cosméticos son muy sensibles. Ejemplos de productos lácteos son queso, requesón, ricota y yogurt. Los embutidos secos curados son un ejemplo de productos cárnicos. Ejemplos de productos agrícolas son cosechas tales como cereales, frutos secos, frutas, hortalizas y bulbos florales. El deterioro por hongos no solo afecta a la calidad del producto, sino que representa también un riesgo para la salud. Es bien sabido que algunas especies de hongos, que crece sobre, v.g. los productos lácteos y los embutidos, pueden producir micotoxinas. Algunas micotoxinas son extremadamente peligrosas dado que pueden causar enfermedades letales. Por consiguiente, el crecimiento de hongos indeseables en y sobre los productos alimenticios debe evitarse siempre.

25 Las técnicas de preservación de alimentos, v.g. procesamiento térmico, congelación, ultrasonidos, irradiación, y envasado en atmósfera modificada, reducen significativamente la carga microbiana, pero es particularmente preocupante la evidencia de que los alimentos procesados están siendo contaminados con microorganismos después de su procesamiento y antes del envasado. De creciente preocupación en la industria alimentaria es el deterioro microbiano de diversos alimentos tales como los productos lácteos y cárnicos, aliños, pastas para untar, margarinas y mariscos. Se sabe especialmente que los productos alimenticios en el intervalo de pH de 2,0 a 7,0 son susceptibles de deterioro microbiano por levaduras, mohos, bacterias tolerantes a los ácidos y/o bacterias mesófilas o termófilas formadoras de esporas y no formadoras de esporas.

35 En su mayoría, los productos alimenticios procesados no se ingieren inmediatamente después de su procesamiento permitiendo de este modo que las bacterias, levaduras o mohos introducidos por post-contaminación crezcan. Dado que el consumo de alimentos puede tener lugar sin el recalentamiento de los alimentos procesados a temperaturas suficientes y durante suficiente tiempo, existe un riesgo de envenenamiento alimentario o deterioro de los alimentos. Adicionalmente, la reciente tendencia a alimentos procesados mínimamente con las cualidades nutricionales y sensoriales intrínsecas de los alimentos crudos y frescos ha generado un nuevo riesgo de seguridad. Tratamientos de preservación más suaves, tales como presión hidrostática alta y campos eléctricos pulsados han demostrado ser exitosos pero están basados en obstáculos eficaces, es decir cadena fría y adición de antimicrobianos naturales.

40 Se han producidos investigaciones extensas en el campo de la seguridad alimentaria para desarrollar composiciones antimicrobianas eficaces, que funcionen como composiciones antifúngicas y antibacterianas.

45 En el documento US 5.895.680 por Cirigliano et al., se establece el sistema de preservación que incluye natamicina y nisina. La inestabilidad de las soluciones acuosas de natamicina está compensada por concentraciones de natamicina aumentadas. En US 5.895.680 se afirma que natamicina tiene que estar presente en una cantidad de al menos 1,5 veces la solubilidad máxima basada en el contenido de agua presente en el producto alimenticio. La razón que subyace tras esto es que se cree que la natamicina soluble no es estable en entornos acuosos y que por consiguiente tiene que estar presente siempre natamicina sólida (por ejemplo cristalina o amorfa) para la actividad antifúngica.

50 US 6.146.675 describe una composición natural microbicida y/o microbiostática para preservación de productos alimenticios seleccionados en la cual el único agente antibiótico antimicrobicida es natamicina.

55 WO 03/070026 describe un proceso para preservación de líquidos contra el deterioro por los hongos por tratamiento de los líquidos con un método de electroporación y un agente antifúngico.

US 2001/0046538 describe combinaciones antimicrobianas que comprenden un conservante de sorbato, natamicina y un dicarbonato de dialquilo. Las combinaciones antimicrobianas son útiles en el tratamiento, v.g., de bebidas.

US 5.773.062 y US 5.738.888 describen un sistema de preservación que incluye únicamente natamicina o natamicina en combinación con dicarbonato de dimetilo, respectivamente, para preservación v.g. de bebidas.

- 5 EP 0608944 describe una composición antifúngica que comprende un agente antifúngico del tipo polieno, un compuesto antifúngico ácido y un ácido orgánico adicional o su sal alcalina o alcalinotérrica para el tratamiento de alimentos y productos agrícolas.

Descripción de la Invención

10 El objeto de esta invención es proporcionar un método para preservación de productos alimenticios por empleo de una nueva combinación de componentes microbicidas y microbiostáticos en o sobre los productos alimenticios. El objeto anterior puede conseguirse por incorporación de una combinación de natamicina y nisina en productos alimenticios y/o por tratamiento de la superficie de los productos alimenticios con la nueva composición de natamicina y nisina.

15 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un proceso para preservar productos, tales como productos alimenticios, que comprende aplicar en o sobre dicho producto una composición antimicrobiana que incluye natamicina y nisina, de acuerdo con la reivindicación 1.

20 De acuerdo con una primera realización preferida, la invención se refiere a un proceso para preservar un producto que contiene agua tal como un producto alimenticio, que comprende aplicar en el producto una composición antimicrobiana que incluye natamicina y nisina, por el cual al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Preferiblemente, al menos 95% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 5% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Más preferiblemente, al menos 97% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 3% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Muy preferiblemente, casi toda la natamicina está disuelta y casi nada de natamicina está presente en forma sólida.

25 La cantidad total de natamicina presente está o bien disuelta en agua o presente en forma sólida. La forma sólida de natamicina significa 'natamicina no disuelta en agua'. La forma sólida de natamicina puede comprender preferiblemente partículas de natamicina. Las partículas de natamicina son cristales de natamicina, que, por ejemplo, pueden tener las formas siguientes: cristales aciculares, cristales discoideos o análogos. Las partículas de natamicina tienen usualmente diámetros comprendidos entre 0,5 y 20 micrómetros. El diámetro de las partículas de natamicina es la distancia mayor desde una parte de la partícula al otro extremo de la partícula. Se han observado
30 partículas aciculares de natamicina con diámetros mayores que 40 micrómetros. Los diámetros pueden determinarse utilizando un microscopio. Preferiblemente, las partículas de natamicina tienen un diámetro medio de partícula de al menos 2 micrómetros, teniendo más preferiblemente las partículas de natamicina un diámetro medio de partícula de al menos 5 micrómetros y teniendo muy preferiblemente las partículas de natamicina un diámetro medio de partícula de al menos 10 micrómetros. La presencia de forma sólida de natamicina puede determinarse por microscopía.

35 En toda esta solicitud, la concentración de natamicina se mide utilizando el estándar de la Federación Láctea Internacional (IDF) 140A:1992. La concentración de nisina se mide utilizando el bien conocido test de difusión en agar.

40 La nisina es una sustancia antibacteriana de tipo peptídico producida por microorganismos tales como *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Es activa contra bacterias Gram-positivas. La nisina carece de toxicidad y está exenta de efectos secundarios. La nisina es una sustancia Reconocida Generalmente Como Segura y es utilizada ampliamente en una diversidad de alimentos. Ejemplos de tales productos son queso procesado, leche, nata cuajada, postres lácteos, mezclas de helados, huevo líquido, productos de harina horneados calientes, aliños y cerveza. La nisina es termoestable y puede soportar temperaturas de esterilización con pérdida mínima de actividad. El Comité de la Organización Mundial de la Salud acerca de Estandarización Biológica ha establecido una preparación internacional de referencia de nisina, y la Unidad Internacional (en lo sucesivo IU) se define como 0,001 mg de esta preparación.
45 Delvoplus® y Nisaplín®, nombres comerciales para un concentrado de nisina que contiene 1 millón de IU por gramo, son distribuidos por DSM y Danisco, respectivamente. Niveles eficaces de nisina para la preservación de productos alimenticios están comprendidos entre 10 y 800 IU/g o 0,25 a 20 ppm de nisina.

50 La natamicina ha sido utilizada desde hace más de 30 años para impedir el crecimiento de hongos en quesos y embutidos. La natamicina se encuentra en el mercado bajo el nombre comercial de Delvolid® o Natamax®, una composición de polvo que contiene 50% (p/p) de natamicina y 50% (p/p) de lactosa. La natamicina tiene una MIC (Concentración Inhibidora Mínima) menor que 10 ppm para la mayoría de los hongos surgidos en alimentos, mientras que su solubilidad en agua es de 30 a 50 ppm. La natamicina puede aplicarse fácilmente para impedir el deterioro por los hongos en los productos alimenticios. Sin embargo, la baja solubilidad de la natamicina ha limitado su uso al tratamiento superficial de queso y líquidos, v.g., zumos, limonadas, vino y yogur. Sorprendentemente, los
55 autores de la presente invención han encontrado que la natamicina, cuando se introduce en productos alimenticios a concentraciones en las cuales prácticamente no está presente forma cristalina o sólida alguna de natamicina, por

ejemplo en concentraciones comprendidas entre 1 y 20 ppm, basadas en el contenido de agua del producto en el que se utiliza la misma, son extremadamente eficaces contra levaduras y mohos, inhibiendo por completo o retardando significativamente su crecimiento. La natamicina puede añadirse como un sólido, suspensión, o cualquiera de otras formas a un producto que contenga agua en una cantidad tal que se disuelva totalmente la natamicina. Sorprendentemente, se ha encontrado que la natamicina disuelta en un producto que contiene agua, por ejemplo productos alimenticios y preferiblemente productos lácteos, es estable, mientras que en la literatura se menciona que la natamicina disuelta en agua es inestable.

De acuerdo con una realización preferida, el proceso de la invención se aplica a un producto alimenticio, que es un producto acuoso, en el cual la natamicina y la nisina están presentes en el producto y en el que la natamicina está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a 20 ppm de natamicina basada en el contenido de agua del producto, con preferencia aproximadamente 1 a 15 ppm. Preferiblemente, está presente en el producto una cantidad de aproximadamente 0,25 a 20 ppm de nisina, de modo más preferible aproximadamente 1 a 15 ppm de nisina.

De acuerdo con una segunda realización preferida, el proceso de la invención es un proceso para preservar un producto tal como un producto alimenticio, que comprende aplicar al producto una composición antimicrobiana que incluye natamicina y nisina, en la cual la natamicina está presente en una cantidad comprendida entre 0,01 y 10 ppm. Más preferiblemente, la nisina está presente en una cantidad comprendida entre 0,0001 y 1 ppm.

La aplicación de la composición antimicrobiana al producto significa aplicar la misma a la superficie del producto. La superficie de un producto, tal como un producto alimenticio, se define como la capa exterior del producto, que puede estar en contacto con el oxígeno. Por ejemplo, si el producto alimenticio es queso, la superficie del queso es la capa exterior del queso o partes del queso, incluso en la forma de rodajas, desmenuzada o rallada. El término superficie del queso incluye el exterior del queso entero, con indiferencia de si se ha formado una corteza o no.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que la natamicina y la nisina, cuando se aplican a la superficie de un producto tal como un producto alimenticio en concentraciones que van desde 0,01 a 10 ppm para natamicina y desde 0,0001 a 1 ppm para nisina, eran ambas extremadamente eficaces contra levaduras y mohos para natamicina y contra bacterias Gram-positivas para nisina, inhibiendo por completo o retardando significativamente su crecimiento.

La nisina y la natamicina pueden añadirse por separado o al mismo tiempo al producto. Esta adición puede realizarse simultánea o subsiguientemente. De acuerdo con una realización preferida, nisina y natamicina se añaden al producto al mismo tiempo.

Una composición antimicrobiana que comprende natamicina y nisina se añade preferiblemente al producto después que ha tenido lugar la reducción de tamaño al final del procesamiento. Más preferiblemente, la composición antimicrobiana se añade al final del procesamiento antes del envasado.

Las composiciones antimicrobianas de acuerdo con la invención, que pueden utilizarse para el tratamiento del producto alimenticio tal como queso o embutidos pueden ser, por ejemplo, líquidos para tratamiento por inmersión o baño y/o por pulverización, o emulsiones de recubrimiento tales como las del tipo de poli(acetato de vinilo) o del tipo aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o).

La cantidad de fungicida, v.g. natamicina, en una composición líquida para tratamiento por inmersión puede ser desde 0,001% a 2% p/p. Preferiblemente, la cantidad es de 0,01% a 1% p/p. La cantidad de nisina, en una composición líquida para tratamiento por inmersión puede ser de 0,0001 a 1% p/p. Preferiblemente, la cantidad de nisina es de 0,001 a 1% p/p, más preferiblemente de 0,01 a 0,05% p/p. En principio, el líquido de inmersión puede ser de cualquier tipo. Cuando se utiliza un sistema acuoso, la adición de un agente tensioactivo puede ser ventajosa, en particular para tratamiento de objetos que tengan superficie hidrófoba.

En una emulsión de recubrimiento de acuerdo con la invención, la cantidad de fungicida, v.g. natamicina, puede ser de 0,001% a 2% p/p, con preferencia desde 0,01% a 1% p/p, y de modo más preferible desde 0,01% a 0,5% p/p. La cantidad de nisina, en una emulsión de recubrimiento puede ser desde 0,0001 a 1% p/p. Con preferencia, la cantidad de nisina es de 0,001 a 1% p/p, más preferiblemente desde 0,01 a 0,05% p/p. La emulsión de recubrimiento puede ser del tipo o/w o w/o. Se prefieren particularmente las emulsiones preparadas a partir de emulsiones de recubrimiento empleadas comúnmente en la industria alimentaria. Por ejemplo, para el tratamiento de quesos duros se puede utilizar una emulsión acuosa de polímero del tipo poli(acetato de vinilo).

Una composición que comprende natamicina y nisina puede añadirse al producto en cualquier momento o etapa del procesamiento. La natamicina y la nisina pueden añadirse en combinación o por separado en el producto final antes del envasado, durante el procesamiento o en cualesquiera ingredientes utilizados para preparar los productos. La ventaja de la presente invención es que la misma permite la producción de productos alimenticios microbiológicamente estables y seguros con baja concentración de anti-microbianos. La composición puede utilizarse para preservar la seguridad y/o estabilidad microbiológicas en cualquier tipo de productos alimenticios tales como productos lácteos, mezclas de helados, productos harinosos horneados en caliente, pastas para untar, margarinas, salsas, aliños o cualesquiera otros productos alimenticios distribuidos a la temperatura ambiente o a

temperaturas refrigeradas. Los productos alimenticios preferidos tienen un pH comprendido entre pH 2 y pH 7,0. Productos alimenticios preferidos son productos lácteos y más especialmente requesón, ricota, queso cremoso, crema agria y postres lácteos. Adicionalmente, se espera que la adición de natamicina y nisina a los productos alimenticios reduzca o elimine por completo los mohos, las levaduras y el crecimiento bacteriano en los productos alimenticios en el marco de tiempo comprendido entre el final del procesamiento del producto, incluida la reducción de tamaño, y la venta comercial. Este marco de tiempo varía con el tipo de alimento, la distribución y las condiciones de venta. Preferiblemente, el producto a tratar es tal que su superficie estará en contacto con el oxígeno al final de su procesamiento y/o posteriormente si tiene lugar una reducción de tamaño. Preferiblemente, el producto es un producto alimenticio tal como productos lácteos, mezclas de helados, productos de harina horneados en caliente, pastas para untar, margarinas, salsas, aliños o cualquier otro producto alimenticio distribuido a la temperatura ambiente o temperaturas refrigeradas.

De acuerdo con otra realización preferida, la composición antimicrobiana de la invención que comprende natamicina y nisina tiene un pH comprendido entre pH 2 y pH 7,0, más preferiblemente entre 3 y 5. De acuerdo con otra realización preferida, la composición antimicrobiana de la invención comprende adicionalmente agua y/o sal y/o cualquier componente seleccionado del grupo constituido por un disolvente, un agente tensioactivo, un vehículo, un ácido alimentario, un espesante tal como xantano, y cualquier otro compuesto antimicrobiano de grado alimentario. Disolventes, agentes tensioactivos y vehículos preferidos han sido descritos ya en WO 95/08918. Espesantes preferidos fueron descritos en US 5.962.510 y US 5.552.151. Ácidos alimentarios preferidos tales como un agente orgánico ácido antifúngico y/o cualquier ácido adicional se describen en EP 608944 B1. El contenido de las patentes y solicitudes de patente citadas en este párrafo se incorpora totalmente por referencia en este contexto.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un producto acuoso que comprende una composición antimicrobiana que incluye natamicina y nisina, de acuerdo con la reivindicación 7.

De acuerdo con una primera realización preferida, el producto es un producto acuoso tal como un producto alimenticio, que comprende una composición antimicrobiana que incluye natamicina y nisina, por lo cual al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelto y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Preferiblemente, al menos 95% (p/v) de natamicina está disuelto y/o menos de 5% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Más preferiblemente, al menos 97% (p/v) de natamicina está disuelto y/o menos de 3% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida. Muy preferiblemente, prácticamente toda la natamicina está disuelta y prácticamente nada de natamicina está presente en forma sólida.

La natamicina está presente en el producto en una cantidad de 1 a 15 ppm basada en el contenido de agua del producto. El producto comprende 0,25 a 20 ppm de nisina.

De acuerdo con una segunda realización preferida, la natamicina y la nisina están presentes en la superficie del producto. La natamicina está presente en una cantidad comprendida entre 0,01 y 10 ppm. Preferiblemente, la natamicina está presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,05 y 7 ppm, de modo aún más preferible aproximadamente 0,1 y 5 ppm y de modo muy preferible aproximadamente 0,5 ppm y 4 ppm. La nisina está presente en una cantidad comprendida entre 0,0001 y 1 ppm, con preferencia aproximadamente 0,0005 y 0,75 ppm, de modo más preferible aproximadamente 0,001 y 0,5 ppm, de modo aún más preferible aproximadamente 0,005 y 0,5 ppm y de modo muy preferible aproximadamente 0,007 y 0,4 ppm.

Antes, durante o después de la adición de la natamicina y nisina al producto, pueden añadirse también al producto otros ingredientes tales como colorantes, agentes de textura, etc.

La invención se ilustrará a continuación por medio de ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estabilidad de la natamicina en el requesón

Este ejemplo describe la estabilidad de una baja concentración de natamicina en requesón que contiene nisina frente a una estabilidad inferior en agua con pH similar.

Se preparó requesón siguiendo el procedimiento estándar para fabricación de requesón. La cuajada seca se obtuvo por adición de un cultivo iniciador a leche pasteurizada desnatada. Después de acidificación a pH 4,4, la cuajada se pasteurizó y se lavó con agua. La cuajada seca se mezcló con el aliño en la ratio 66% cuajada y 44% aliño. Antes de mezclar la cuajada y el aliño, se le añadieron al aliño los conservantes Delvolid® y Delvoplus®. Las concentraciones de conservantes en los productos finales eran 2,5 y 5 ppm de natamicina (5 y 10 ppm de Delvolid®) y 1,25 y 2,5 ppm de nisina (50 y 100 ppm de Delvoplus®). El contenido de humedad del requesón (cuajada seca mezclada con el aliño) era se utilizó 82%.

Se utilizó el procedimiento descrito en el estándar internacional IDF (International Dairy Federation) 140A:1992 para queso a fin de determinar la concentración de natamicina en las muestras de requesón. En total se analizaron 12 muestras diferentes por triplicado. El porcentaje residual de natamicina se calculó utilizando el valor medio de las

muestras triplicadas. Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran que la natamicina era estable en el requesón. Después de 6 semanas de almacenamiento a temperatura refrigerada, la estabilidad media de la natamicina en el requesón era de 92%.

Tabla 1: Estabilidad de la natamicina en el requesón almacenado a 4-7°C.

	Semana 0	3 semanas	6 semanas	
	100	96	86	
	100	94	89	
	100	88	97	
	100	103	92	
Porcentaje de natamicina residual	100	96	88	
	100	102	91	
	100	98	93	
	100	99	90	
	100	99	93	
	100	100	97	
	100	97	87	
	100	96	98	
	Valor medio	100	98	92

5

Ejemplo 2: Actividad antifúngica de una concentración baja de natamicina en requesón que contiene nisina

Este ejemplo describe la actividad antifúngica de una baja concentración de natamicina (2,5 y 5 ppm) en requesón, en presencia de nisina. El requesón se preparo como se ha descrito arriba. Después de añadir el aliño a la cuajada seca, el requesón se inoculó con levaduras y células fúngicas, *Kluyveromyces marxianus* CBS 1557 y *Penicillium roqueforti* CBS 304.97, respectivamente. Después de la contaminación artificial, se añadieron natamicina y/o nisina al requesón a dos concentraciones diferentes, 2,5 y 5 ppm para natamicina y 1,25 y 2,50 ppm para nisina. La actividad antifúngica de la natamicina contra las células de levadura y moho, se evaluó después de 3 y 6 semanas de incubación a 4°C por la enumeración de las células viables en las muestras inoculadas, en presencia o no de conservantes. El número de células viables de levadura o fúngicas se determinó también en una muestra negativa, de requesón no inoculado sin conservantes y en una muestra de control positivo, contaminada artificialmente con células de levadura y fúngicas sin conservante. Los resultados se presentan en las Tablas 2 y 3. Está claro que la natamicina presente a 2,5 o 5 ppm era eficaz en la prevención del crecimiento de *K. marxianus* y *P. roqueforti* durante hasta 6 semanas a 4-7°C.

10

15

Tabla 2: Actividad antifúngica contra *Kluyveromyces marxianus* CBS 1557 de natamicina en presencia o ausencia de nisina, después de 0, 3 y 6 semanas de incubación a 4-7°C.

20

Concentración (ppm)		Log CFU/g de <i>K. marxianus</i>		
Natamicina	Nisina	Semana 0	3 semanas	6 semanas
0,00	0,00	1,80	3,50	4,50
2,50	0,00	1,70	1,70	<1,00
2,50	1,25	2,00	0,80	<1,00
2,50	2,50	1,90	0,80	<1,00
5,00	0,00	1,30	<1,00	<1,00

5,00	1,25	1,90	1,10	<1,00
5,00	2,50	1,70	<1,00	<1,00

Tabla 3: Actividad antifúngica contra *Penicillium roqueforti* CBS 304.97 de natamicina en presencia o ausencia de nisina, después de 0, 3 y 6 semanas de incubación a 4-7°C.

Concentración (ppm)		Log esporas/g de <i>P. roqueforti</i>		
Natamicina	Nisina	Semana 0	3 semanas	6 semanas
0,00	0,00	1,80	2,70	5,40
2,50	0,00	1,70	1,70	<1,00
2,50	1,25	1,60	<1,00	<1,00
2,50	2,50	1,60	<1,00	<1,00
5,00	0,00	1,60	<1,00	<1,00
5,00	1,25	1,60	<1,00	<1,00
5,00	2,50	1,70	<1,00	<1,00

5 **Ejemplo 3: Actividad antibacteriana de nisina en requesón que contiene una concentración baja de natamicina**

Este ejemplo describe la actividad antibacteriana de nisina (1,25 y 2,5 ppm) en requesón, en presencia de una concentración baja de natamicina. Se preparó el requesón como se ha descrito arriba. Después de añadir el aliño a la cuajada seca, se inoculó el requesón con levaduras, células fúngicas y células de *Listeria innocua* LM35. Después de la contaminación artificial, se añadieron al requesón dos concentraciones de nisina, 1,25 y 2,5 ppm y/o en combinación con natamicina a la concentración de 2,5 o 5 ppm. La actividad antibacteriana de nisina contra *L. innocua* se evaluó después de 3 y 6 semanas de incubación a 4°C por la enumeración de las células viables en las muestras inoculadas, en presencia o no de conservantes. El número de células bacterianas viables se determinó también en una muestra negativa, de requesón no inoculada sin conservantes y en un control positivo, muestra contaminada artificialmente con bacterias.

Los resultados presentados en la Tabla 4 indican que la nisina inhibía el crecimiento de *L. innocua* en presencia o no de natamicina.

Tabla 4: Actividad antifúngica contra *Listeria innocua* LM35 de natamicina en presencia o ausencia de nisina, después de 0, 3 y 6 semanas de incubación a 4-7°C.

Concentración (ppm)		Log CFU/g of <i>L. innocua</i>		
Natamicina	Nisina	Semana 0	3 semanas	6 semanas
0,00	0,00	2,00	3,10	6,30 ²⁵
2,50	0,00	1,90	2,50	4,50
2,50	1,25	2,00	<1,00	<2,00
2,50	2,50	1,90	<1,00	<1,00
5,00	0,00	1,90	1,90	4,70 ₃₀
5,00	1,25	1,60	<1,00	<1,00
5,00	2,50	2,10	<1,00	<1,00

Materiales y métodos utilizados en los ejemplos que siguen

Se obtuvo salmuera no contaminada del Food Innovation Centre de DSM Food Specialties, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, Países Bajos.

5 Se obtuvieron ruedas de 2 kg recién fabricadas y tratadas con salmuera de quesos Gouda del Food Innovation Centre de DSM Food Specialties, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, Países Bajos.

La contaminación de los quesos se testó por evaluación de la presencia de células de levadura del tipo *Debaromyces hansenii* (ATCC 10623) y por la presencia de cepas de *Lactobacillus* resistentes a la sal, que se encuentran ambas normalmente en los baños de salmuera. En este ejemplo, se utilizó *Lactobacillus sakei* ATCC 15521.

10 La fuente de natamicina utilizada en la composición antimicrobiana es Delvolid®, que contiene 50% de natamicina activa (p/p), DSM Food Specialties, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, Países Bajos.

La fuente de nisina utilizada en la composición antimicrobiana es Delvoplus®, que contiene 2,5% de nisina activa (p/p), DSM Food Specialties, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, Países Bajos.

El cloruro de sodio (NaCl) se adquirió de Gaches Chimie France, 31750 Escalquens, Francia.

15 **Ejemplo 4: Preparación de varias composiciones antimicrobianas**

Este ejemplo describe un método para preparar varias composiciones de baño antimicrobianas adecuadas para uso como recubrimiento de alimentos para prevenir el crecimiento microbiano en el queso. Estas composiciones antimicrobianas se prepararon por adición de 1 gramo de Delvolid® y/o 0,5 gramos de Delvoplus® con 100 gramos de NaCl a 800 ml de agua del grifo. Se añadió posteriormente 0,2% de xantano. El pH de la composición se ajustó a 4,5 por adición de ácido cítrico. Los diferentes ingredientes se homogeneizaron utilizando un agitador en cabeza eléctrico (tipo RW 20 DZM, de Janke & Kunkel equipado con un agitador Ruston). Finalmente, se ajustó el peso de la mixtura a 1 kilo por adición de agua del grifo. Las proporciones finales se guardaron a 18°C en la oscuridad.

Se han preparado 3 composiciones antimicrobianas:

- una que contenía 500 ppm de natamicina
- 25 - una que contenía 12,5 ppm de nisina
- una que contenía 500 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina: composición antimicrobiana de la invención

Ejemplo 5: Método para restar la eficacia de las composiciones antimicrobianas

30 Este ejemplo describe el método utilizado para testar la eficacia de las composiciones, descritas en el Ejemplo 4, a fin de proteger quesos contaminados por la salmuera. Una rueda de queso Gouda tratada con salmuera se bañó durante 1 minuto en una solución de salmuera que contenía 10⁶ CFU por ml de la levadura resistente a la sal *Debaromyces hansenii* ATCC 10623 y/o 10⁴ CFU por ml de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 resistente a la sal y se lavó abundantemente de acuerdo con ello con agua del grifo, después de lo cual se sumergió de acuerdo con lo anterior en las composiciones como se describe en el Ejemplo 4.

35 Se utilizaron 5 muestras de queso para cada composición antimicrobiana testada. El queso contenía:

- 2,5 ppm de natamicina o
- 0,06 ppm de nisina o
- 2,5 ppm de natamicina y 0,06 ppm de nisina (composición de la invención) o
- ningún compuesto antimicrobiano en la composición (control).

40 Los quesos se envasaron a vacío de acuerdo con lo anterior en bolsas estándar de polietileno (PE) con una máquina de compact Kramer & Grebe y se guardaron a 18°C en la oscuridad hasta el momento del análisis.

La eficacia de las diferentes composiciones se expresó como la diferencia entre la cantidad de levaduras y *Lactobacilos* encontrada en la superficie de los diferentes quesos testados y la contaminación determinada en la superficie para el queso de control. El queso de control es un queso contaminado recubierto con una composición que no contiene ningún compuesto antimicrobiano.

45 **Ejemplo 6: Determinación de los niveles de contaminación en la superficie del queso después de la retirada de la lámina protectora**

Para cada 5 quesos testados, se tomaron muestras de 20 g de queso de la superficie total del queso y se suspendieron con 180 ml de tampón de citrato a 45°C. Después de la homogeneización, se diluyó ulteriormente 1 ml de la suspensión de queso en solución salina fisiológica y se extendió en placas en agar específico, OGY (extracto de oxitetraciclina de levadura) + 4% NaCl para la levadura y TGV (extracto de carne triptona-glucosa) + 4% NaCl, para los *Lactobacilos*. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C para la levadura y a 37°C para los *Lactobacilos*.

Ejemplo 7: Eficacia antimicrobiana de las diferentes composiciones

Se prepararon composiciones antimicrobianas como se describe en el Ejemplo 4 y se testaron de acuerdo con el Ejemplo 5. Los quesos se guardaron durante 3 meses entre 6 y 10°C y se determinaron los niveles de contaminación para cada queso siguiendo el método del Ejemplo 6. Los resultados se enumeran en la tabla siguiente.

Tabla 5: Niveles medios de contaminación (expresados en CFU/cm²)

Nivel medio de contaminación en CFU's/cm ²	Sin tratamiento antimicrobiano t = 0	Sin tratamiento antimicrobiano t = 3 meses	Tratamiento con Delvocid (2,5 ppm natamicina)	Tratamiento con Delvoplus (0,06 ppm nisina)	Tratamiento con Delvocid y Delvoplus (2,5 ppm natamicina y 0,06 ppm nisina)
Levadura	10 ⁴	10 ⁶	0	10 ⁶	0
<i>Lactobacilli</i>	10 ²	10 ³	10 ⁴	0	0

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preservar un producto acuoso seleccionado del grupo constituido por productos lácteos, mezclas de helados, productos harinosos horneados en caliente, pastas para untar, margarina, salsas, aliños, y embutidos, comprendiendo el proceso el paso de aplicar natamicina y nisina en o sobre el producto, caracterizado porque:
- 5
- (a) si se aplican natamicina y nisina en el producto,
- (i) la natamicina está presente en el producto en una cantidad de 1 a 15 ppm de natamicina basado en el contenido de agua del producto, en donde al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida, y
- 10 (ii) la nisina está presente en el producto en una cantidad de 0,25 a 20 ppm, y
- (b) si se aplican natamicina y nisina sobre el producto,
- (i) la natamicina está presente en el producto en una cantidad de 0,01 a 10 ppm de natamicina, en donde al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida, y
- 15 (ii) la nisina está presente en el producto en una cantidad de 0,0001 a 1 ppm.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se añaden nisina y natamicina al mismo tiempo.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque nisina y natamicina están presentes en una composición antimicrobiana.
- 20 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se aplican nisina y natamicina a la superficie del producto.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se aplican nisina y natamicina por pulverización o inmersión.
- 25 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque la composición antimicrobiana comprende adicionalmente agua y/o una sal y/o un componente seleccionado del grupo constituido por un disolvente, un agente tensioactivo, un vehículo, un ácido alimentario, un espesante, y otro compuesto antimicrobiano de grado alimentario.
7. Un producto acuoso seleccionado del grupo constituido por productos lácteos, mezclas de helados, productos harinosos horneados en caliente, pastas para untar, margarina, salsas, aliños, y embutidos, que comprende natamicina y nisina, caracterizado porque:
- 30
- (i) la natamicina está presente en el producto en una cantidad de 1 a 15 ppm de natamicina basado en el contenido de agua del producto, en donde al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida, y
- 35 (ii) la nisina está presente en el producto en una cantidad de 0,25 a 20 ppm, o
- (i) la natamicina está presente en la superficie del producto en una cantidad de 0,01 a 10 ppm de natamicina, en donde al menos 90% (p/v) de natamicina está disuelta y/o menos de 10% (p/v) de natamicina está presente en forma sólida, y
- (ii) la nisina está presente en la superficie del producto en una cantidad de 0,0001 a 1 ppm.
- 40 8. El producto de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el producto lácteo se selecciona del grupo constituido por requesón, ricota, queso cremoso, nata agria y postres lácteos.