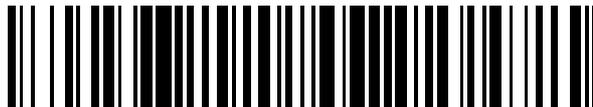


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 815**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/31** (2006.01)

**A23L 1/314** (2006.01)

**A23L 1/226** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2005 E 05705557 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1773136**

54 Título: **Antimicrobianos con bajo aroma derivados de aromas a humo**

30 Prioridad:

**13.01.2004 US 536160 P**

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

**17.10.2013**

73 Titular/es:

**MASTERTASTE (100.0%)  
13797 HIGHWAY 70N  
MONTEREY TN 38574, US**

72 Inventor/es:

**MOELLER, PATRICK W. y  
RAMAKRISHNAN, SREEKUMAR**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 425 815 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

Antimicrobianos con bajo aroma derivados de aromas a humo.

## 5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. nº serie 60/536.160, presentada el 13 de enero de 2004, cuya descripción se incorpora en la presente memoria descriptiva como referencia en su totalidad.

10

## CAMPO TÉCNICO

[0002] La materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva se refiere a procedimientos y composiciones para tratamiento antimicrobiano de productos alimentarios. Más en particular, la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva se refiere a derivados de humo líquido y procedimientos de tratamiento de productos alimentarios con los derivados para inhibir el crecimiento de microorganismos sin impartir aromas a humo al producto alimentario.

15

Tabla de abreviaturas

20

## [0003]

UFC – unidad formadora de colonias

DHL – derivado de humo líquido

25 KSU – Universidad Estatal de Kansas

HL – humo líquido

MEB – caldo de extracto de malta (*malt extract broth*)

MIC – concentración inhibidora mínima (*minimum inhibitory concentration*)

MOX – agar Oxford modificado (*Modified Oxford Agar*)

30 PDA – agar de dextrosa de patata (*potato dextrose agar*)

AP – agua de peptona

RTE – listo para comer (*ready-to-eat*)

RTC – listo para cocinar (*ready-to-cook*)

TSA – agar de soja triptico (*Tryptic Soy agar*)

35 TSB – caldo de soja triptico (*Tryptic Soy broth*)

## ANTECEDENTES

[0004] La presencia de microorganismos en productos alimentarios es una preocupación considerable de salud pública. Por ejemplo, frecuentemente se refieren brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y las muertes asociadas con varias cepas de *Escherichia coli*. De hecho, *E. coli* O157:H7 es un patógeno reconocido transmitido por los alimentos para el que se ha encontrado que contamina productos de vacuno insuficientemente cocinados, especialmente carne picada.

40

[0005] Otro de estos patógenos transmitidos por los alimentos es *Listeria monocytogenes*, que puede causar neumonía, meningitis y sepsis. La incidencia de *Listeria monocytogenes* en la industria procesadora cárnica ha provocado gran preocupación entre los empaquetadores, y según se cree es una amenaza importante actual para la salud. La presencia de bacterias de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos procesados representa un peligro para el público dado que las bacterias pueden desarrollarse en los alimentos y aumentar hasta una dosis infecciosa en condiciones refrigeradas.

45

50

[0006] Dada la importancia de mantener un suministro de alimentos seguro, se han adoptado varios enfoques en un intento de destruir los patógenos que podrían estar presentes en el interior o sobre los alimentos. Un enfoque tradicional consiste en ahumar el producto alimentario en un ahumadero. Este es, sin embargo, un procedimiento largo en el tiempo que requiere grandes cantidades de espacio, y así son deseables enfoques más eficaces.

55

[0007] En la actualidad, el tratamiento de alimentos con humo de leña ha sido sustituido sustancialmente por el uso de "humo líquido", que es una solución que comprende condensados líquidos preparados para impartir un matiz o coloración ahumados y un aroma ahumado a una carne expuesta a una fase líquida o de vapor de la solución. Además de estos atributos de humo líquido, también se conoce actualmente que las preparaciones de humo líquido que se aplican en la fabricación de productos cárnicos tienen actividad antimicrobiana contra bacterias como *Listeria monocytogenes*.

60

[0008] Por desgracia, aunque la aplicación de humo líquido es probablemente bastante eficaz durante el procesamiento de productos cárnicos para destruir bacterias de *Listeria monocytogenes*, recientemente se ha hecho evidente que existe el peligro de que pueda producirse reinoculación o recontaminación por bacterias de *Listeria*

65

*monocytogenes* en algún momento entre el cocinado y el empaquetado final durante la secuencia de procesamiento de productos cárnicos. Por desgracia, incluso niveles muy bajos de contaminación bacteriana debidos a reinoculación pueden provocar niveles peligrosamente elevados de bacterias por el tiempo en que el producto cárnico ha permanecido en el almacén durante un periodo de tiempo.

5  
[0009] En un esfuerzo por abordar este problema, se han realizado investigaciones por parte de la industria procesadora cárnica en el uso de una aplicación de humo líquido directamente en el producto cárnico antes de empaquetarlo con el fin de prevenir la reinoculación y el posterior crecimiento de bacterias de *Listeria monocytogenes* en el producto cárnico empaquetado. Véase la patente de EE. UU. nº 5.043.174 para Lindner. Así,  
10 las bacterias son destruidas y reducidas al mínimo inicialmente por el tratamiento con humo líquido y calor que tiene lugar durante el ciclo de procesamiento de productos cárnicos, y antes del empaquetado, se aplica otro tratamiento de humo líquido directamente a la superficie del producto alimentario procesado para controlar la reinoculación del producto cárnico con bacterias u otros microorganismos.

15 [0010] Aunque sencillo y eficaz, este planteamiento no siempre es aceptable, sin embargo, dado que los productos cárnicos que tienen una aplicación de humo líquido aplicado a los mismos después del procedimiento de empaquetamiento convencional de la carne se ven afectados negativamente en lo que respecta al sabor. El humo líquido adicional produce un sobrepotenciamiento no deseable del aroma ahumado del producto cárnico y en general un producto comercialmente insatisfactorio. Más importante es que el tratamiento de un producto alimentario  
20 con humo líquido sería indeseable en particular con alimentos para los cuales no se pretende en absoluto que tengan un aroma ahumado. Así, ha proseguido la búsqueda de una solución al problema del crecimiento en productos alimentarios de patógenos peligrosos que no haga el producto cárnico sustancialmente incomedible y en consecuencia no comercializable.

25 [0011] El documento WO-98/05.216-A1 desvela un procedimiento de procesamiento de productos cárnicos para reducir e inhibir la infestación por organismos hospedadores de la carne y proporcionar protección a la carne frente a la oxidación por aplicación de un derivado de humo líquido a la carne.

30 [0012] El documento WO-2004/077.965-A1 describe una preparación de productos ahumados como pescado, carne, charcutería y similar, en el que el procedimiento comprende al menos una etapa de aplicación de aroma consistente en proporcionar al producto alimentario un aroma ahumado.

35 [0013] El artículo de S. M. Vitt y col.: "Inhibition of *Listeria innocua* and *L. monocytogenes* in a laboratory medium and cold-smoked salmon containing liquid smoke", en *Journal of Food Safety* 21, 2001, páginas 111-125 se refiere a la prueba de cinco humos líquidos comerciales en el tratamiento de muestras de salmón ahumado para reducir el crecimiento de microorganismos.

40 [0014] Además, R. Estrada-Munoz y col. realizaron experimentos para evaluar las propiedades antibacterianas del humo líquido en sistemas cárnicos que se presentan en "Liquid smoke effects on *Escherichia coli* O157:H7, and its antioxidant properties in beef products", *Journal of Food Science* 63(1), 1998, páginas 150-153.

45 [0015] El documento US-4.657.765-A desvela un humo líquido concentrado sin alquitrán que tiene capacidades superiores de impartición de aroma y color, bajo contenido en productos fenólicos y bajo contenido en ácido.

[0016] Además, el documento US-6.214.395-B1 describe una solución de agente de oscurecimiento del humo líquido que tiene buen oscurecimiento pero un aroma mínimo o inexistente.

50 [0017] El documento US-3.806.609-A se refiere a un procedimiento para producir humo líquido que comprende una etapa de destilación de condensado de humo acuoso preneutralizado con acidez total del 4,0-4,5% según se calcula para el ácido acético en dos fracciones y una etapa de tratamiento de la primera fracción obtenida para recuperación de componentes de curado adsorbidos y mezcla con la segunda fracción.

55 [0018] H. Stankiewicz-Berger y P. Kitzman investigaron la actividad bacteriostática del aroma ahumado en "Investigation of bacteriostatic activity of refined liquid smoke", *Acta Alimentaria Polonica* Vol. V No. 4, 1979, páginas 391-398.

60 [0019] L. A. Brandt describe en "Liquid smokes solve formulation problems", *Prepared Foods* 170 (2), 2001, página 59 que el humo líquido imparte aroma a humo a la carne, el pescado y la carne de ave o siempre que un toque de aroma a humo es necesario, y que los humos líquidos actúan como antimicrobianos, imparten color, reducen el olor a recalentado y añaden textura.

65 [0020] El documento US-4.431.032-A desvela que un humo de leña líquido acuoso que contiene alquitrán es neutralizado al menos parcialmente a temperatura controlada para formar una fracción enriquecida en alquitrán y una fracción de humo líquido sin alquitrán, y que la segunda se usa para tratamiento en embolsado de alimentos para facilitar la impartición de color y aroma a humo de alimentos embolsados durante el procesamiento.

**[0021]** Según el documento WO-01/05.255-A1 los productos alimentarios, como carnes precocinadas, carnes crudas y carne de ave se tratan con una solución descontaminante para eliminar la contaminación de microorganismos superficial.

**[0022]** El documento US-5.637.339-A desvela un humo líquido sin alquitrán que tiene miscibilidad total con agua.

**[0023]** El documento WO-90/12.514-A1 describe adicionalmente composiciones de humo líquido de constituyentes básicos y fenol reducido con alta capacidad de coloración que son útiles para impartir color y aroma a alimentos comestibles.

**[0024]** J. N. Sofos y col. sometieron a detección selectiva humos líquidos de 20 maderas diferentes en cuanto a actividad microbiana, cuyos resultados presentan en "Effect of ether extracts from condensed wood smokes on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*", *Journal of Food Science* 53 (6), 1988, páginas 1840-1843.

**[0025]** El documento US-4.112.133-A describe composiciones mejoradas de humo líquido que no forman sólidos no deseables durante el uso o el almacenamiento.

**[0026]** Además, el documento US-6.541.053-B2 desvela un procedimiento de procesamiento con colágeno para espesar o endurecer el colágeno suficientemente por aplicación de una fracción de humo líquido obtenida de un derivado de humo líquido.

**[0027]** Finalmente, el documento US-5.043.174 se refiere a un producto derivado de humo líquido que contiene un mínimo de carbonilo y fenol y que no tiene índice de tinción y alta acidez.

**[0028]** Lo que se necesita, por tanto, es un derivado de humo líquido que conserve la actividad antimicrobiana pero no imparta aromas ahumados al producto alimentario. Para cumplir esta necesidad, la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva proporciona derivados de humo líquido y procedimientos de tratamiento de productos alimentarios con derivados de humo líquido para inhibir el crecimiento de microorganismos sin alterar el aroma del producto alimentario.

## RESUMEN

**[0029]** La materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento de un microorganismo en un producto alimentario. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende el tratamiento del producto alimentario con un derivado de humo líquido que no imparte aroma a humo al producto alimentario según la reivindicación 1, con lo cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo. En algunas formas de realización, el microorganismo se selecciona entre el grupo que consiste en una bacteria, una levadura y un hongo. En algunas formas de realización, la bacteria se selecciona entre el grupo que consiste en una cepa de *Streptococcus*, *Shigella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella*. En algunas formas de realización, la levadura es una cepa de *Saccharomyces*. En algunas formas de realización, el hongo es una cepa de *Aspergillus*.

**[0030]** En algunas formas de realización de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva, el producto alimentario es un producto alimentario listo para comer (RTE). En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para comer comprende carne de ave, cerdo o vacuno. En algunas formas de realización, los alimentos RTE incluyen fiambres y embutidos (por ejemplo, pavo, rosbif, jamón cocido, pollo, salami, salchicha ahumada, etc.) y perritos calientes.

**[0031]** En algunas formas de realización de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva, el producto alimentario es un producto alimentario listo para cocinar (RTC). En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para cocinar comprende carne de ave, cerdo, vacuno o un producto de masa parcialmente horneada. En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para cocinar comprende carne picada, o productos de masa parcialmente horneada como pan y panecillos.

**[0032]** El derivado de humo líquido comprende: (a) acidez valorable en una concentración del 0 a aproximadamente el 6% en peso por unidad de volumen (p/v); (b) al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v) de carbonilo; (c) compuestos fenólicos en una concentración de menos de aproximadamente el 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v); (d) agua en una concentración de menos de aproximadamente el 97% en peso por unidad de volumen (p/v); y tiene (e) un pH de al menos 3,0. En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido comprende carbonilo en una concentración de aproximadamente el 12,0% en peso por unidad de volumen (p/v), y un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. También de describe que el derivado de humo líquido comprende carbonilo en una concentración de aproximadamente el 3,0 a aproximadamente el 8,0% en peso por unidad de volumen (p/v), fenol en una concentración de aproximadamente el 0,01 al 0,5% en peso por unidad de

volumen (p/v), y un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. El derivado de humo líquido tiene un pH de al menos aproximadamente 3,0. En algunas formas de realización, el pH está comprendido entre aproximadamente 4,5 y 6,5. El derivado de humo líquido comprende carbonilo de al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v).

**[0033]** En algunas formas de realización, un derivado de humo líquido es producido por el procesamiento de humo líquido a través de un evaporador para separar y condensar los elementos de bajo punto de ebullición asociados para producir el derivado de humo líquido. En algunas formas de realización, se deslignifica el serrín antes de pirólisis para producir productos bajos en aroma. Varios de estos productos y derivados pueden combinarse entre sí para producir un intervalo de niveles de carbonilo. Pueden ser tratados con carbono para reducir sustancialmente los fenoles. También pueden ser tratados con agentes de neutralización para ajustar el pH/acidez. En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido se vaporiza sobre el producto alimentario. En algunas formas de realización, el producto alimentario se sumerge en un baño del derivado de humo líquido. En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido comprende un agente de humectación adicional. En algunas formas de realización, el agente de humectación adicional comprende polisorbato.

**[0034]** En algunas formas de realización, la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva comprende además el tratamiento del producto alimentario a al menos 73,9°C (165°F) durante al menos aproximadamente 1 minuto. En algunas formas de realización, la etapa de calentamiento se realiza después de la etapa de tratamiento.

**[0035]** La materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva también proporciona derivados de humo líquido antimicrobianos. El derivado de humo líquido: (i) comprende (a) acidez valorable en una concentración del 0 al 6% en peso por unidad de volumen (p/v); (b) carbonilo de al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v); (c) compuestos fenólicos en una concentración de menos del 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v); (d) agua en una concentración de menos del 97% en peso por unidad de volumen (p/v); y tiene (e) un pH de al menos 3,0; (ii) no imparte aroma de humo líquido a un producto alimentario cuando el producto alimentario es tratado con el derivado de humo líquido; y (iii) inhibe el crecimiento en un producto alimentario de microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Streptococcus*, *Shigella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Saccharomyces* y *Aspergillus* cuando el producto alimentario es tratado con el derivado de humo líquido. El derivado de humo líquido tiene un pH de aproximadamente 3,0 o más. En algunas formas de realización, el pH está comprendido entre aproximadamente 4,5 y 6,5. El derivado de humo líquido comprende carbonilo de al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v).

**[0036]** En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido comprende: (a) acidez valorable en una concentración del 0 a aproximadamente el 6% en peso por unidad de volumen (p/v); (b) al menos aproximadamente el 10% en peso por unidad de volumen (p/v) de carbonilo; (c) fenol en una concentración de menos de aproximadamente el 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v); y (d) agua en una concentración de menos de aproximadamente el 97% en peso por unidad de volumen (p/v). En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido comprende carbonilo en una concentración de aproximadamente el 12,0% en peso por unidad de volumen (p/v) y un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. También se describe un derivado de humo líquido que comprende carbonilo en una concentración de aproximadamente el 5,0 a aproximadamente el 8,0% en peso por unidad de volumen (p/v), compuestos fenólicos en una concentración de aproximadamente el 0,01 al 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v), y un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

**[0037]** En algunas formas de realización de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva, el producto alimentario es un producto alimentario listo para comer.

**[0038]** En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para comer comprende carne de ave, cerdo, vacuno o un producto de masa horneada. En algunas formas de realización, los alimentos RTE incluyen fiambres y embutidos (por ejemplo, pavo, rosbif, jamón cocido, pollo, salami, salchicha ahumada, etc.) o perritos calientes.

**[0039]** En algunas formas de realización, el producto alimentario es un producto alimentario listo para cocinar. En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para cocinar comprende carne de ave, cerdo o vacuno. En algunas formas de realización, el producto alimentario listo para cocinar comprende carne picada. En algunas formas de realización, el alimento RTC comprende productos de masa parcialmente horneada como pan y panecillos.

**[0040]** En algunas formas de realización, el derivado de humo líquido comprende un agente de humectación adicional. En algunas formas de realización, el agente de humectación adicional comprende polisorbato.

**[0041]** Anteriormente se ha enunciado un objeto de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva, otros objetos y ventajas de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva serán evidentes para los expertos en la materia después de un estudio de la siguiente descripción y Ejemplos no limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0042]

- 5 La fig. 1 representa curvas de crecimiento de *Escherichia coli* 8677 en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con diluciones de Humos 1 (0,75%), 2 (1,00%), 3 (1,00%) u 8 (2,00%). Las diluciones se eligieron de manera que fueran inferiores a las Concentraciones Inhibidoras Mínimas (MIC) para cada derivado de humo líquido (DHL) individual.
- 10 La fig. 2 representa curvas de crecimiento de *Escherichia coli* 8677 en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con concentraciones de Humo 1 entre el 0,00% y el 0,75%.
- La fig. 3 representa curvas de crecimiento de *Salmonella seftenberg* en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con diluciones de Humos 1 (0,50%), 2 (1,00%), 3 (1,00%) y 8 (2,00%).
- 15 La fig. 4 representa curvas de crecimiento de *Salmonella seftenberg* en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con concentraciones de Humo 1 entre el 0,00% y el 0,50%.
- La fig. 5 representa curvas de crecimiento de *Listeria innocua* M1 en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con diluciones de Humos 1 (0,50%), 2 (0,40%), 3 (0,50%) y 8 (2,00%).
- 20 La fig. 6 representa curvas de crecimiento de *Listeria innocua* M1 en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con concentraciones de Humo 1 entre el 0,00% y el 0,75%.
- La fig. 7 representa curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de extracto de malta (MEB) suplementado con diluciones al 0,50% de Humos 1, 2, 3 y 8.
- 25 La fig. 8 representa curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de extracto de malta (MEB) suplementado con concentraciones de Humo 1 entre el 0,00% y el 0,75%.
- 30 La fig. 9 representa la circunferencia media de esporas de *Aspergillus niger* cultivadas en agar de dextrosa de patata (PDA) en presencia de diluciones de Humos 1 (0,75%), 2 (1,25%), 3 (1,25%) y 8 (5,00%) en los días 1, 3, 4 y 7.
- La fig. 10 representa los efectos del tratamiento combinado de la superficie de pechuga de pavo reestructurada con derivados de humo líquido (Humo 2 o Humo 3) y la pasteurización superficial basada en vapor saturado (0, 1, 2 y 3 minutos) en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* enumerado en agar de soja tríptico. Los números de colonias se presentan como  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.
- 35 La fig. 11 representa los efectos del tratamiento combinado de la superficie de pechuga de pavo reestructurada con derivados de humo líquido (Humo 2 o Humo 3) y la pasteurización superficial basada en vapor saturado (0, 1, 2 y 3 minutos) en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* enumerado en agar Oxford modificado (MOX). Los números de colonias se presentan como  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.
- La fig. 12 representa las reducciones en los números de colonias (presentados como  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) resultantes del tratamiento combinado de la superficie de pechuga de pavo reestructurada con derivados de humo líquido (Humo 2 o Humo 3) y la pasteurización superficial basada en vapor saturado (0, 1, 2 y 3 minutos) en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* enumerado en agar de soja tríptico.
- 45 La fig. 13 representa las reducciones en los números de colonias (presentadas como  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) resultantes del tratamiento combinado de la superficie de pechuga de pavo reestructurada con derivados de humo líquido (Humo 2 o Humo 3) y la pasteurización superficial basada en vapor saturado (0, 1, 2 y 3 minutos) en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* enumerado en agar Oxford modificado (MOX).
- 50 Las fig. 14A-14E representan los resultados del tratamiento de panecillos parcialmente horneados con Humo 1. Los panecillos parcialmente horneados comerciales se compraron 2 días antes de la fecha de caducidad en el paquete. En el día anterior a la caducidad, se vaporizaron ligeramente con una solución de DHL al 30%, se empaquetaron y se mantuvieron a temperatura ambiente. El nivel de la toma fue del 1,5 al 2,0% para asegurar la cobertura. Se tomaron fotografías a partir de 24 horas después de la fecha de caducidad.
- 55 La fig. 14A representa fotografías de los panecillos parcialmente horneados 1 día después del tratamiento con un DHL (dos paneles superiores). El panel inferior representa un control negativo sin tratar. La fig. 14B representa fotografías de los panecillos parcialmente horneados 2 días después del tratamiento con un DHL (dos paneles superiores). El panel inferior representa un control negativo sin tratar.
- 60 La fig. 14C representa fotografías de los panecillos parcialmente horneados 3 días después del tratamiento con un DHL (dos paneles superiores). El panel inferior representa un control negativo sin tratar. La fig. 14D representa
- 65

fotografías de los panecillos parcialmente horneados 4 días después del tratamiento con un DHL (dos paneles superiores). El panel inferior representa un control negativo sin tratar.

5 La fig. 14E representa fotografías de los panecillos parcialmente horneados 1 semana después del tratamiento con un DHL. Los 12 panecillos eran del mismo paquete que se compró. Los 8 panecillos tratados (dos paneles superiores en cada figura) fueron tratados todos por igual con el mismo DHL y se empaquetaron por separado. Los 4 panecillos de control (panel inferior en las fig. 14A-14D) se dejaron sin tratar y se colocaron en una bolsa de plástico cerrada.

10 Las fig. 15-18 representan los resultados de la inoculación de bajo nivel ( $10^3$ - $10^4$  UFC) con *Listeria monocytogenes*. La fig. 15 representa los resultados del tratamiento de perritos calientes a los que se han inoculado aproximadamente 3.500 UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 16 representa los resultados del tratamiento de rosbif al que se han inoculado aproximadamente 1.700 UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 17 representa los resultados del tratamiento de jamón cocido al que se le han inoculado aproximadamente 1.700 UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 18 representa los resultados del tratamiento de pavo al que se han inoculado aproximadamente 7.500 UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3.

20 Las fig. 19-23 representan los resultados de inoculación de alto nivel ( $10^5$ - $10^7$  UFC) con *Listeria monocytogenes*. La fig. 19 representa los resultados del tratamiento de perritos calientes a los que se ha inoculado aproximadamente  $1,6 \times 10^5$  UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 20 representa los resultados del tratamiento de rosbif al que se han inoculado aproximadamente  $2,4 \times 10^6$  UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 21 representa los resultados del tratamiento de jamón cocido al que se han inoculado aproximadamente  $3,8 \times 10^6$  UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 22 representa los resultados del tratamiento de pavo al que se han inoculado aproximadamente  $1,2 \times 10^6$  UFC de *Listeria monocytogenes* con Humo 8 y Humo 3. La fig. 23 representa el efecto del tratamiento con Humo 2 y/o calor (1 minuto a  $73,9^\circ\text{C}$  [ $165^\circ\text{F}$ ]) en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento en los estantes de perritos calientes inoculados.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 [0043] Todas las referencias citadas en la memoria descriptiva, incluyendo patentes, publicaciones de solicitudes de patentes y bibliografía distinta de patentes, se incorporan en la presente memoria descriptiva como referencia en la medida en que complementan, explican, proporcionan antecedentes o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en la presente memoria descriptiva. También se incluyen como referencia las siguientes patentes de EE. UU. para Moeller y/o Moeller y col.: 5.637.339; 6.214.395; 6.261.623; 6.541.053.

#### I. Definiciones

40 [0044] Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva, salvo que se defina lo contrario más adelante, pretenden tener el mismo significado que se entiende comúnmente entre los expertos en la materia. Las referencias a las técnicas empleadas en la presente memoria descriptiva pretenden referirse a las técnicas tal como se entienden comúnmente en la técnica, incluyendo variaciones en dichas técnicas o sustituciones de técnicas equivalentes que serían evidentes para el experto en la materia. Aunque se cree que los siguientes términos son bien comprendidos por el experto en la materia, las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva.

[0045] Según el convenio legal sobre patentes bien establecido, los términos "un", "una" y "el/la" significan "uno o más" cuando se usa en la presente solicitud, incluidas las reivindicaciones.

50 [0046] Según se usa en la presente memoria descriptiva, salvo que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se usa en el sentido "inclusivo" de "y/o" y no en el sentido "exclusivo" de "o".

[0047] Según se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "humo líquido (HL)" se refiere a una solución que comprende reactivos líquidos capaces de impartir un matiz o coloración ahumados y un aroma ahumado a un producto alimentario expuesto a una fase líquida o de vapor de la solución. El uso de humo líquido proporciona muchas ventajas en el procesamiento de productos cárnicos incluyendo la capacidad de usar procesamiento continuo cuando se ahúma así como un sabor ahumado y una coloración ahumada más uniformes para los productos cárnicos tratados con él. El uso de humo líquido en lugar de humo de leña es hoy convencional en el procesamiento de productos cárnicos y puede apreciarse más ampliamente con referencia a las patentes de EE. UU. nº 3.873.741; 4.250.199; 4.298.435; y 5.043.174 representativas.

60 [0048] Se ha encontrado también que HL posee actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 5.043.174 desvela que el tratamiento de perritos calientes con HL (ZESTI-SMOKE (Código 10), disponible en Mastertaste de Crossville, Tennessee, Estados Unidos de América) puede prevenir la reinoculación tras el procesamiento con *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, el HL usado imparte un aroma ahumado significativo en el alimento tratado, que puede ser no deseable en ciertas circunstancias. Así, sería ventajoso generar derivados de

humo líquido que conserven la actividad antimicrobiana a la vez que no imparten aroma ahumado a los productos alimentarios durante la fase de tratamiento. Este es el resultado inesperado y sorprendente de los procedimientos y composiciones descubiertos y descritos y reivindicados en la presente memoria descriptiva.

5 **[0049]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "actividad antimicrobiana" se refiere generalmente a una actividad de un humo líquido o derivado de humo líquido que tiene como resultado la destrucción de un microorganismo (incluyendo pero sin limitarse a actividades microbicidas y microbiolíticas) o la inhibición del crecimiento de un microorganismo (incluyendo, pero sin limitarse, a actividad microbiostática). Con respecto a una inhibición del crecimiento microbiano, el término "actividad antimicrobiana" pretende comprender la  
10 inhibición total (es decir, el microorganismo no crece en absoluto o lo hace a un ritmo indetectable en presencia del DHL) e inhibición parcial, caracterizándose la segunda por un retraso en el inicio del crecimiento del microorganismo o una reducción en el ritmo al que crece el microorganismo, o ambos.

15 **[0050]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "derivado de humo líquido (DHL)" se refiere a un derivado de humo líquido que tiene características que son apropiadas para un uso dado. Los DLS son normalmente fracciones de un humo líquido que se preparan, por ejemplo, mediante el procesamiento de un humo líquido convencional a través de un evaporador, que separa y condensa los elementos de bajo punto de ebullición del humo líquido para producir el derivado de solución de humo líquido. En consecuencia, las frases "derivado de humo líquido", "derivado", "fracción de humo líquido" y "fracción" se usan indistintamente en la presente memoria  
20 descriptiva y se refieren a un componente de un humo líquido que ha sido aislado del humo líquido en sí, ya sea con o sin etapas adicionales subsiguientes de preparación y/o modificación. En algunas formas de realización, un DHL se caracteriza por la actividad antimicrobiana y no imparte aromas ahumados a un producto alimentario cuando el producto alimentario es tratado con el DHL.

25 **[0051]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "listo para comer (RTE)" se refiere a productos alimentarios que se preparan de tal forma que pueden consumirse inmediatamente o después de recalentarlos. Entre los alimentos RTE de ejemplo se incluyen los fiambres y embutidos (por ejemplo, pavo, rosbif, jamón cocido, pollo, salami, salchicha ahumada, etc.) y los perritos calientes.

30 **[0052]** Los productos alimentarios RTE pueden compararse con los productos alimentarios listos para cocinar. Los productos alimentarios listos para cocinar incluyen normalmente alimentos en bruto sin cocinar como carne de ave, cerdo y vacuno, y alimentos parcialmente cocinados/horneados como productos de masa parcialmente horneada. Entre los productos alimentarios listos para cocinar de ejemplo están la carne de ave, cerdo y vacuno (por ejemplo, carne picada) y productos de masa parcialmente horneada como pan y panecillos. Los  
35 productos alimentarios RTC también pueden incluir mariscos, verduras y otros alimentos mínimamente procesados.

## II. Preparación de derivados de humo líquido a partir de humo líquido

40 **[0053]** Como es bien conocido para los expertos en la materia, las composiciones de humo líquido obtenidas por pirólisis de serrín de madera contienen constituyentes principalmente de la degradación térmica de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Más en particular, las composiciones de humo líquido contienen una amplia diversidad de más de 400 compuestos químicos, y por ello, las composiciones de humo líquido se caracterizan por su contenido de ciertas clases de compuestos, que son ácidos (% de acidez valorable, determinado usando el procedimiento desvelado en la patente de EE. UU. nº 6.214.395), compuestos fenólicos y carbonilos.

45 **[0054]** Los ácidos son conservantes y agentes de control del pH. Las composiciones de humo líquido comerciales tienen normalmente un pH inferior aproximadamente a 2,5, y más normalmente inferior aproximadamente a 2,3, y un % acidez valorable por volumen de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 18%. Los compuestos fenólicos proporcionan un aroma ahumado, y también olor, a las composiciones de humo líquido, que normalmente tienen un contenido en compuestos fenólicos de aproximadamente 10 a aproximadamente  
50 45, y más normalmente, de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 mg/ml. Los carbonilos imparten la capacidad de formación de color oscuro a las composiciones de humo líquido. Los compuestos fenólicos y los carbonilos pueden medirse según se describe en la patente de EE. UU. nº 4.431.032, que describe técnicas para la retirada de un componente de alquitrán no deseable de las composiciones de humo líquido. Debe observarse que  
55 los ácidos y carbonilos son secundarios en su contribución al aroma ahumado de las composiciones de humo líquido.

60 **[0055]** Mastertaste de Crossville, Tennessee es un fabricante de varios humos líquidos. Entre los humos líquidos de ejemplo se incluyen ZESTI-SMOKE Código 10 y ZESTI-SMOKE Código V. Las especificaciones de estos humos líquidos son las siguientes:

		<u>Código 10</u>	<u>Código V</u>
	Acidez (% p/v)	10,5-11,0	6,8-7,8
	Índice de tinción	69-80	Ninguno
5	Nivel de carbonilo (g/100 ml)	15-25	2,0-7,0
	Nivel fenólico (mg/ml)	12-22	1,0-4,0
	Densidad relativa (25°C)	1,068-1,079	1,005-1,015
	Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1.066,45-1.077,24	1.002,95-1.013,73
	pH	2-3	2,0-2,4
10	Color	Ámbar	Ámbar

**[0056]** La fracción ZESTI-SMOKE Código V usada como material de partida por la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva puede ser producida como un derivado o producto secundario de ZESTI-SMOKE Código 10. El Código 10 puede procesarse a través de un separador (por ejemplo, un evaporador AVP) suministrando el Código 10 como una materia prima que primero se calienta para eliminar los ácidos de bajo punto de ebullición de la parte superior del evaporador y a continuación se condensa en Código V como un producto secundario. Este procedimiento también produce un humo líquido concentrado que tiene niveles superiores de porcentaje de ácido, índice de tinción, niveles de carbonilo y fenólico, densidad relativa, densidad y color más oscuro que el humo líquido convencional, y que se comercializa con el nombre comercial SUPERSMOKE™ por parte de Mastertaste de Crossville, Tennessee para una diversidad de usos finales.

**[0057]** El derivado del Código V es un producto de bajo pH, bajo aroma y tinción baja o nula. En algunas formas de realización, el Código V se trata a continuación con un agente de ajuste de pH adecuado, como bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, con el fin de llevar el pH hasta al menos aproximadamente 5,0. El pH puede elevarse aún más hasta aproximadamente 7,0. En algunas formas de realización, el pH está comprendido entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. Este material de ajuste del pH puede modificarse además para producir un derivado de humo líquido según se desvela en la presente memoria descriptiva.

**[0058]** En algunas formas de realización, los derivados de Código V se tratan primero con carbono de acuerdo con el procedimiento desvelado en la patente de EE. UU. nº 5.637.339 para Moeller. Así se eliminan los compuestos fenólicos. El producto resultante se trata a continuación con el agente de ajuste de pH adecuado. Opcionalmente, el ajuste de pH puede realizarse antes del tratamiento con carbono. Este material tratado con carbono y con ajuste de pH puede usarse también como un material de partida para producir un derivado de humo líquido según se usa en la presente memoria descriptiva.

**[0059]** En algunas formas de realización, el serrín se deslignifica antes de la pirólisis para producir productos bajos en aroma. Varios de estos productos y derivados pueden combinarse entre sí para producir una diversidad de niveles de carbonilo. Pueden tratarse con carbono para reducir sustancialmente los compuestos fenólicos. Pueden ser tratados también con agentes de neutralización para ajustar el pH/acidez.

**[0060]** En los Ejemplos presentados a continuación, se usaron varios derivados de humo líquido para probar la actividad antimicrobiana de los DLS frente a bacterias, levadura y moho.

## 45 EJEMPLOS

**[0061]** Los siguientes Ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva. Algunos aspectos de los siguientes Ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los autores de la presente invención para trabajar bien en la práctica de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva. Estos Ejemplos ilustran prácticas estándar de los autores de la invención. A la luz de la presente descripción y del nivel general de conocimientos de la técnica, los expertos en la materia observarán que los siguientes Ejemplos pretenden ser sólo ilustrativos y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del ámbito de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva.

### 55 Ejemplo 1

#### Preparación de derivados de humo líquido

**[0062]** Los Humos 1, 2 y 5 se obtuvieron de condensados primarios de humos que han sido despojados sustancialmente de su contenido fenólico por diversas combinaciones de deslignificación y desfenolización según se describe en la presente memoria descriptiva. El Humo 3 era una versión estándar de un condensado de humo primario que tenía el complemento completo de ácidos, carbonilos y compuestos fenólicos. Su intensidad se ajustó por dilución para tener una acidez valorable similar a algunas de las otras fracciones HL/DHL para una comparación más fácil. El Humo 4 (comparativo) era un extracto de la fracción de alquitrán insoluble que se sedimentó a partir de un condensado de humo primario típico. Era predominantemente una alta fracción fenólica con cantidades menores

de acidez valorable y compuestos de carbonilo. Se volvió soluble en agua mediante la adición de Polisorbato 80. La preparación de Humos 6, 7, 8 y 9 implicaba diversas manipulaciones del condensado a partir de la evaporación de un HL primario. Estas manipulaciones ajustaron los productos para tener niveles variables de acidez valorable, pH y compuestos fenólicos con un impacto escaso o inexistente en las composiciones de carbonilo.

5 **[0063]** Se generó un total de nueve derivados de humo líquido con las características resumidas en la Tabla 1:

Tabla 1

Nº humo	Acidez*	pH	Contenido fenólico (mg/ml)**	Contenido en carbonilo (mg/ml)***
1	4,5-5,9	2-3,0	0-5	151-200,9
2	0-1,4	6,1-7,0	0-5	101-150,9
3	6,0-7,4	2-3,0	0-5	101-150,9
4	3,0-4,4	4,1-5,0	20,1-25,0	0-50,9
5	6,0-7,4	2-3,0	0-5	101-150,9
6	6,0-7,4	2-3,0	0-5	51-100,9
7	1,5-2,9	5,1-6,0	0-5	51-100,9
8	0-1,4	6,1-7,0	0-5	101-150,9
9	0-1,4	6,1-7,0	0-5	51-100,9

\* Cuantificado como ácido acético  
 \*\* Cuantificado como 2,6-dimetoxifenol  
 \*\*\* Cuantificado como 2-butanona

10 **Ejemplo 2**

Valores de MIC frente a bacterias gramnegativas

15 **[0064]** Los derivados de humo líquido 1 a 9 del Ejemplo 1 se usaron en procedimientos de dilución en caldo o agar con respecto a un cóctel de bacterias gramnegativas. El cóctel incluía *Salmonella muenster*, *Salmonella seftenberg*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli* 8677. Se usaron 1.000 células de cada especie bacteriana para inocular varias diluciones (las diluciones se presentan como % v/v) de las fracciones de humo.

20 **[0065]** Con el fin de determinar las concentraciones inhibitoras mínimas para cada una de las fracciones, se realizaron a continuación inoculaciones apropiadas en TSB que contenía diferentes porcentajes de derivados de humo líquido en un tubo de ensayo. Los tubos de ensayo se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas y se puntuó el crecimiento/no crecimiento. Los valores de MIC se obtuvieron por triplicado y se repitieron tres veces para cada uno. Los valores de MIC se presentan en la Tabla 2.

25 **Tabla 2**

Valores de MIC frente a cóctel gramnegativo	
Número de humo	Valor MIC
1	1,5%
2	>2,00%
3	2,00%
4	3,00%
5	2,00%
6	2,00%
7	5,00%
8	>2,00%
9	9,00%

30 **[0066]** Se construyeron curvas de crecimiento por debajo de los niveles MIC predeterminados para derivados de humo líquido (DHL) seleccionados para varias cepas bacterianas individualmente. Las curvas de crecimiento presentadas en las figs. 1 a 4 representan cada una el promedio de tres replicados.

**Ejemplo 3**

35 Valores de MIC frente a bacterias grampositivas

**[0067]** Los derivados de humo líquido 1 a 9 se sometieron también a ensayo frente a bacterias grampositivas (*Listeria innocua* M1) usando las técnicas descritas en el Ejemplo 2. Los valores de MIC se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Valores de MIC de humos líquidos frente a <i>Listeria innocua</i> M1	
1	1,50%
2	2,00%
3	>2,00%
4	2,00%
5	2,00%
6	2,00%
7	4,00%
8	2,00%
9	6,00%

5 **[0068]** Se construyeron curvas de crecimiento por debajo de los niveles de MIC predeterminados para derivados de humo líquido (DHL) seleccionados para *Listeria innocua* M1. Las curvas de crecimiento presentadas en las figs. 5 y 6 representan cada una la media de tres replicados.

#### **Ejemplo 4**

10

##### Valores de MIC frente a levadura

15 **[0069]** Los derivados de humo líquido (DLS) 1, 2, 3 y 8 se sometieron también a ensayo frente a *Saccharomyces cerevisiae* usando las técnicas descritas en el Ejemplo 2, con la salvedad de que se usó caldo de extracto de malta (MEB) en lugar de TSB. Los valores de MIC fueron del 1,5% para cada DHL.

20 **[0070]** Se construyeron curvas de crecimiento para los DLS 1, 2, 3 y 8 en el 0,50%, y para el DHL 1 en el 0,25%, el 0,5% y el 0,75%, para *Saccharomyces cerevisiae*. Las curvas de crecimiento presentadas en las figs. 7 y 8 representan cada una la media de tres replicados.

20

#### **Ejemplo 5**

##### Valores de MIC frente a un hongo representativo

25 **[0071]** Los derivados de humo líquido 1, 2, 3 y 8 también se sometieron a ensayo frente a *Aspergillus niger* usando las técnicas descritas en el Ejemplo 2, con la salvedad de que en lugar de inocular 1.000 células a cada dilución de DHL, se añadió un volumen igual de esporas de *A. niger* a agar de dextrosa de patata (PDA). Los valores de MIC se presentan en la Tabla 4.

30

Tabla 4

Valores de MIC de humos líquidos frente a <i>A. niger</i>	
1	1,50%
2	2,50%
3	2,50%
8	>5,00%

35 **[0072]** A modo de representación de las curvas de crecimiento, se midió la circunferencia de las esporas de *A. niger* a 37°C para DHL 1 al 0,75%, DHL 2 al 1,25%, DHL 3 al 1,25% y DHL 8 al 5,0%, en los días 1, 3, 4 y 7 de tratamiento. Los datos se presentan en la fig. 9.

35

#### Discusión de los Ejemplos 1-5

40 **[0073]** Tal como se desvela anteriormente y en las figuras, los componentes de humo poseen propiedades antimicrobianas. Aunque condensados de humo diferentes se comportan de una manera un tanto diferente frente a diferentes microorganismos, con algunas excepciones, los datos presentados sugieren una correlación general entre acidez y pH en los valores de MIC. De forma interesante, estos datos también sugieren que los carbonilos contribuyen a la eficacia antimicrobiana frente a bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, levadura y hongos. En los valores de MIC también puede influir la compensación de una variable sobre otra (por ejemplo, carbonilos frente a compuestos fenólicos, y a la inversa).

45

**Ejemplo 6**Inhibición de moho en productos precocinados

5 **[0074]** Se compraron panecillos parcialmente horneados dos días antes de la fecha de caducidad en el paquete. En el día anterior a la caducidad, se rociaron ligeramente con una solución al 30% de Humo 1, se empaquetaron, y se mantuvieron a temperatura ambiente. El nivel de toma fue del 1,5% al 2% para garantizar la cobertura. Los panecillos se observaron desde 24 horas después del tratamiento (es decir, en la fecha de caducidad).

10 **[0075]** Los resultados se representan en las figs. 14A-14E. Las manchas oscuras muestran el crecimiento de colonias de moho. El tratamiento dio como resultado un aumento de una semana del tiempo de vida en almacén.

**Ejemplo 7**

15 Validación de productos cárnicos listos para comer (RTE) tratados con humo para control de *Listeria innocua* M1

**[0076]** Se usaron rollos de pavo y cortes de rosbif RTE de alta gama (partes de pechugas enteras formadas para tener no más del 40% aglutinantes y caldo añadidos) y de baja gama (pechugas de pago troceadas que pueden tener hasta el 60% de aglutinantes y caldo añadidos antes de la formación y el cocinado) de un fabricante comercial para someter a prueba la capacidad de las fracciones de humo de controlar la infección por *L. innocua* M1 en el transcurso de 4 semanas. Los productos de pavo estaban comprendidos entre 3,5 y 4,5 kg y se cocinaron en agua caliente en bolsas de cocina contraíbles a una temperatura interna de 71°C seguido por enfriamiento en agua hasta una temperatura interna de 7°C. Cada pieza del rosbif era de aproximadamente 1 kg y estaba embolsada en paquetes de película contraíble, y se usó como una unidad. Los rollos de pavo se cortaron en 4 secciones, con cada sección considerada una unidad.

**[0077]** Se obtuvieron cuatro derivados de humo líquido (DLS) diferentes de Mastertaste de Crossville, Tennessee, Estados Unidos de América. Se sumergió cada carne en DHL al 100% y se mantuvo sumergida durante al menos 60 segundos. Después de la retirada, se dejaron secar las carnes al aire sobre una pantalla a temperatura ambiente durante no menos de 5 minutos antes de inocularles *L. innocua* M1 (obtenida de Dr. P. M. Foegeding, Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh, Carolina del Norte, Estados Unidos de América).

**[0078]** Para cada pieza de carne, se inocularon dos áreas de 25 cm<sup>2</sup> en la superficie (marcadas con tinta de calidad alimentaria usando una plantilla estéril) con 100 UFC de *L. innocua* M1 en 50 µl a partir de un cultivo de crecimiento activo (18 horas) para obtener un inóculo total de 100 UFC/25 cm<sup>2</sup>. A continuación se colocó cada pieza en una bolsa de barrera CRYOVAC® (disponible en CRYOVAC® Food Packaging de Duncan, Carolina del Sur, Estados Unidos de América), se selló al vacío y se colocó a 4°C.

40 **[0079]** Se evaluó la *L. innocua* M1 viable al cabo de 0, 2 y 4 semanas a 4°C. El área marcada se cortó asépticamente y se transfirió a una bolsa Stomacher. Se añadieron 100 ml de 0,1% agua de peptona (AP) estéril al 0,1% y se trató la mezcla en la bolsa durante 2 minutos. Se retiraron las partes alícuotas y se sembraron directamente o se realizaron diluciones y se enumeraron. La enumeración de células viables de *L. innocua* M1 se realizó mediante procedimientos de siembra en placa espiral directa en una AUTOPLATE® 4000 (disponible en Spiral Biotech, Inc. de Norwood, Massachusetts, Estados Unidos de América) usando DIFCO™ TSA (disponible en Difco Laboratories, Inc. de Detroit, Michigan, Estados Unidos de América) suplementado con 250 mg/l de estreptomina y 50 mg/ml de rifampicina. Había tres lotes de cada producto RTE (pavo de alta gama y baja gama, y corte de rosbif) con 15 pruebas realizadas en cada lote. Tres muestras de cada lote sirvieron como controles positivos (sin tratamiento con DHL), una para cada tiempo de muestreo. Los datos se presentan en promedio de UFC a partir de las dos áreas designadas en cada producto y dos muestras de purga en las Tablas 5 a 7.

Tabla 5

Células viables en rollo de pavo de gama baja		
Tratamiento	Purga (UFC/ml)	log <sub>10</sub> (UFC/25 cm <sup>2</sup> )
tiempo = 0 semanas		
Control	-	2,06 ± 0,13
DHL 1	-	2,06 ± 0,16
DHL 1	-	2,02 ± 0,12
DHL 2	-	2,18 ± 0,15
DHL 8	-	2,19 ± 0,08
tiempo = 2 semanas		
Control	7,90 ± 0,65*	3,60 ± 0,32*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND	1,65 ± 0,18*
tiempo = 4 semanas		
Control	7,80 ± 0,66*	4,71 ± 0,48*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
tiempo = 4 semanas		
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND*	ND

\* Indica una identificación positiva de *Listeria innocua* M1 después de enriquecimiento según el procedimiento de enriquecimiento Sección 36.512 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para aislamiento de *L. monocytogenes*. Todas las demás muestras sometidas a ensayo fueron negativas después de enriquecimiento (no se realizaron pruebas en el tiempo = 0 semanas). ND: no detectable (menor que 10 UFC/ml).

5

Tabla 6

Células viables en rollo de pavo de alta gama		
Tratamiento	Purga (UFC/ml)	log <sub>10</sub> (UFC/25 cm <sup>2</sup> )
tiempo = 0 semanas		
Control	-	2,13 ± 0,18
DHL 1	-	2,24 ± 0,15
DHL 1	-	2,13 ± 0,17
DHL 2	-	2,08 ± 0,12
DHL 8	-	2,22 ± 0,15
tiempo = 2 semanas		
Control	5,54 ± 0,45*	3,81 ± 0,31*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND	ND*
tiempo = 4 semanas		
Control	6,26 ± 0,45*	4,57 ± 0,45*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND	ND*

\* Indica una identificación positiva de *Listeria innocua* M1 después de enriquecimiento según el procedimiento de enriquecimiento Sección 36.512 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para aislamiento de *L. monocytogenes*. Todas las demás pruebas fueron negativas después de enriquecimiento. -: no determinado (sin purga en el día 0); ND: no detectable (menor que 10 UFC/ml).

Tabla 7

Células viables en rosbif redondo superior		
Tratamiento	Purga (UFC/ml)	log <sub>10</sub> (UFC/25 cm <sup>2</sup> )
tiempo = 0 semanas		
Control	-	2,07 ± 0,11
DHL 1	-	2,06 ± 0,11
DHL 1	-	2,08 ± 0,11
DHL 2	-	2,12 ± 0,16
DHL 8	-	2,10 ± 0,12
tiempo = 2 semanas		
Control	6,99 ± 0,48*	4,33 ± 0,44*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND*	ND
tiempo = 4 semanas		
Control	7,96 ± 0,68*	4,49 ± 0,45*
DHL 1	ND	ND
DHL 1	ND	ND
DHL 2	ND	ND
DHL 8	ND*	ND

\* Indica una identificación positiva de *Listeria innocua* M1 después de enriquecimiento según el procedimiento de enriquecimiento Sección 36.512 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para aislamiento de *L. monocytogenes*. Todas las demás pruebas fueron negativas después de enriquecimiento. ND: no detectable (menor que 10 UFC/ml).

**Ejemplo 8**

5 Efectos antimicrobianos de los DLS después de inoculación de fiambres y embutidos de bajo nivel con *Listeria monocytogenes*

10 **[0080]** Se empleó un compuesto bacteriano que contenía números iguales de tres cepas de *Listeria monocytogenes* (SLR10,1/2a; SLR31,1/2b; y SLR1234, 4b Scott A; disponible en Silliker, Inc. de South Holland, Illinois, Estados Unidos de América) para probar la actividad antimicrobiana de los DLS Humo 8 y Humo 2 en productos alimentarios. Se inocularon aproximadamente 1.000-10.000 UFC en muestras de jamón cocido, rosbif, perritos calientes y pavo. El inóculo se extendió por la superficie de los productos alimentarios usando un asa estéril, y se dejó secar durante 15 minutos. Se sumergieron piezas individuales de cada producto cárnico de tipo fiambres y embutidos en Humo 8 o Humo 2 durante 15 segundos y se dejó que gotearan durante 1 minuto para eliminar el exceso de líquido. A continuación se empaquetaron los productos en un envase sellado al calor, y se almacenaron a 4°C. Se analizaron muestras individuales en los días 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 90 y/o 120 días. Se sometió a ensayo tanto la carne en sí como cualquier posible exudado. Los datos presentados en las figs. 15 a 18 representan la media de tres replicados en cada instante temporal.

20 **[0081]** Tal como se muestra en la fig. 15, el Humo 8 y el Humo 2 inhibieron el crecimiento de *Listeria* en los perritos calientes, y las muestras tratadas con el Humo 2 no mostraron *Listeria* detectable después del día 2 al día 90 inclusive. La valoración de *Listeria* en los perritos calientes tratados con el Humo 8 se redujo hasta el día 30.

25 **[0082]** Tal como se muestra en la fig. 16, el Humo 8 y el Humo 2 produjeron la inhibición de *Listeria* crecimiento en rosbif hasta el día 10 inclusive.

30 **[0083]** El Humo 8 y el Humo 2 también inhibieron el crecimiento de *Listeria* en el jamón cocido. Tal como se muestra en la fig. 17, para el jamón cocido tratado con el Humo 8, la valoración bacteriana disminuyó generalmente hasta el día 10. El tratamiento con el Humo 2 dio como resultado niveles indetectables de *Listeria* hasta el día 10 inclusive

35 **[0084]** La fig. 18 muestra los resultados del tratamiento de pavo con Humo 8 y Humo 2. De nuevo en este caso, el tratamiento con cada producto dio como resultado niveles bacterianos reducidos o indetectables hasta el día 10.

**[0085]** En resumen, el tratamiento de estos productos alimentarios RTE con fracciones DHL de Humo 8 y Humo 2 dio como resultado un aumento en la vida en almacenamiento de al menos 10 días.

**Ejemplo 9**Efectos antimicrobianos de los DLS después de inoculación de alto nivel de fiambres y embutidos con *Listeria monocytogenes*

5 [0086] Se repitieron los experimentos descritos en el Ejemplo 8, pero esta vez la inoculación inicial estuvo entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC para cada producto alimentario. Se inoculó en los productos de prueba *Listeria monocytogenes*. El cóctel de Listeria se preparó combinando partes iguales de cinco cepas de Listeria reconocidas por USDA que tenían entre 12 y 18 horas de edad. Para inocular los productos de prueba, se colocaron 0,1 ml del cóctel de Listeria en los productos con una micropipeta. Los datos presentados en las figs. 19 a 22 representan tres replicados en cada instante temporal.

15 [0087] La fig. 19 muestra los resultados de inocular perritos calientes con aproximadamente  $10^5$  UFC de *Listeria*. El tratamiento con el Humo 8 dio como resultado un descenso de aproximadamente 1 log en la valoración bacteriana en aproximadamente el día 10, que se mantuvo durante aproximadamente 6 semanas adicionales. El Humo 2, por otra parte, dio como resultado bacterias indetectables en el día 2, que se mantuvieron por debajo del nivel de detección hasta el día 60.

20 [0088] La fig. 20 muestra los resultados del tratamiento de rosbif al que se han inoculado aproximadamente  $10^6$  UFC de *Listeria* con Humo 8 y el tratamiento con el Humo 8 dio como resultado una inhibición del crecimiento hasta el día 60. El tratamiento con el Humo 2 dio como resultado una reducción mayor que 1 log en la valoración bacteriana en el día 1, y una reducción de más de 2 log en el día 22, que persistió hasta el día 60.

25 [0089] La fig. 21 muestra los resultados del tratamiento de jamón cocido al que se han inoculado aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC de *Listeria* con Humo 8 y Humo 2. El tratamiento con el Humo 8 dio como resultado una inhibición del crecimiento hasta el día 5. El tratamiento con el Humo 2 dio como resultado una reducción de más de 1 log en la valoración bacteriana en el día 1, que persistió hasta el día 45.

30 [0090] La fig. 22 muestra los resultados del tratamiento de pavo al que se han inoculado aproximadamente  $10^6$  UFC de *Listeria* con Humo 8 y Humo 2. El tratamiento con el Humo 8 dio como resultado una reducción de aproximadamente 1 log en el día 2. El tratamiento con Humo dio como resultado una reducción de más de 2 log en la valoración bacteriana en el día 1, que persistió hasta el día 10.

**Ejemplo 10**Detalles antimicrobianos de condensados de pirólisis y humo líquido al 100%

40 [0091] Se trataron perritos calientes comprados en una fuente comercial con humo líquido al 100% (Humo 2; Mastertaste) y/o vapor pasteurizado (1 minuto a  $73,9^\circ\text{C}$  [ $165^\circ\text{F}$ ]). Se sumergieron los perritos calientes en Humo 2 durante 2 minutos y se dejó que gotearan durante 60 segundos para eliminar el exceso de líquido. Se colocó al lado un segundo conjunto de perritos calientes de control sin tratamiento. A continuación se les inoculó un cóctel de cuatro cepas de *Listeria monocytogenes*. Las muestras se empaquetaron al vacío en películas de plástico adecuadas. Se sometió una parte de los perritos calientes de cada lote (tratados y sin tratar) a una etapa de pasteurización por calor (1 minuto a  $73,9^\circ\text{C}$  [ $165^\circ\text{F}$ ]). Los ensayos se realizaron por triplicado y las muestras se mantuvieron a  $10^\circ\text{C}$  ( $50^\circ\text{F}$ ) (temperatura de abuso). Los resultados presentados en la fig. 23 mostraron que el calor en solitario produjo una reducción de 2,8 log de *Listeria monocytogenes* que recuperó rápidamente altos niveles. Esto era interesante, pero no inesperado, ya que la temperatura de mantenimiento de  $10^\circ\text{C}$  ( $50^\circ\text{F}$ ) era excesiva. Sin embargo, fue más notorio que a pesar de esta alta temperatura de mantenimiento, el Humo 2 en solitario fue capaz de reproducir una reducción de aproximadamente 2 log de *L. monocytogenes* que se mantuvo durante el periodo de prueba de 6 semanas.

50 [0092] El tratamiento de combinación con humo líquido y calor tuvo un efecto inicial que era similar al observado con calor en solitario. Sin embargo, el tratamiento con humo líquido impidió la rápida recuperación de la bacteria observada con calor en solitario. Además, la valoración bacteriana mantuvo su reducción hasta aproximadamente 3 semanas, alcanzando una reducción final de aproximadamente 7 log y permaneció a ese nivel durante todo el periodo de prueba.

Materiales y procedimientos para el Ejemplo. 11

60 [0093] Preparación del inóculo. Se usó un cóctel de cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* (109, 108M, serotipo 4c, serotipo 3) para inoculación superficial de pechuga de pavo sin piel reestructurada. Se preparó el inóculo a partir de cultivos inclinados después de dos transferencias consecutivas a frascos TSB (disponible de Difco Laboratories, Inc.) en tubos de 5 ml y posteriormente a frascos de centrifugación TSB de 100 ml. Se centrifugaron cultivos en fase estacionaria (20 horas) a 10.000g en una centrífuga Beckman J2-21 M/E usando un rotor JA-14 (disponible en Beckman Coulter Inc. de Fullerton, California, Estados Unidos de América) a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos, se lavó con agua de peptona (AP) al 0,1% estéril, y se combinaron las cuatro cepas (aproximadamente  $10^9$  UFC/ml)

en volúmenes iguales (50 ml cada una) y se usó para inoculación por nebulización. Se determinaron los niveles de inóculo por siembra en placa directa en agar Oxford modificado (MOX, disponible en Oxoid Ltd., de Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) usando placa espiral Whitley (disponible en Don Whitley Scientific Ltd., de Shipley, West Yorkshire, Inglaterra) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de incubación, se contaron colonias negras típicas y se registró como  $\log_{10}$  UFC/ml para nivel de inóculo.

**[0094]** Inoculación y tratamiento del producto. Se retiraron asépticamente las envolturas de producto, y se colocaron los productos en una bandeja y se inocularon por nebulización con el cóctel de cuatro cepas en una cámara de biocontención. Los productos se mantuvieron durante 15 minutos para permitir la unión de *L. monocytogenes*. En los tratamientos que requerían la aplicación de los DLS se roció con los DLS (50 ml/pechuga de pavo) usando un nebulizador de jardinería. A continuación se empaquetó al vacío el producto tratado inoculado y se pasteurizó según el Método de Procesamiento Aséptico de la Universidad Estatal de Kansas (Manhattan, Kansas, Estados Unidos de América) en un pasteurizador de posprocesamiento Townsend (disponible en Townsend de Des Moines, Iowa, Estados Unidos de América) a 96°C durante 1, 2 ó 3 minutos. A continuación se enfriaron los productos pasteurizados en un baño de agua con hielo durante 15 minutos y se muestrearon usando un dispositivo de formación de núcleos superficiales.

**[0095]** Muestreo para *L. monocytogenes* residual. Después de pasteurización y enfriamiento, se muestreó el producto inoculado retirando asépticamente el producto del paquete y aplicando tratamiento de núcleo a las superficies superior e inferior (2 por lado). Las muestras de núcleo de superficie se mezclaron a continuación con 50 ml de AP al 0,1% en una bolsa Stomacher y se homogeneizó (Tekmar Co. de Cincinnati, Ohio, Estados Unidos de América) durante 2 minutos. A continuación se diluyeron en serie las muestras homogeneizadas en AP al 0,1% y se sembraron en placa en MOX y TSA. Se incubaron las placas a 37°C durante 245 horas. La enumeración se realizó contando colonias negras típicas en MOX y TSA (usado para recuperación de células dañadas por calor). Los recuentos se comunicaron como  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

### **Ejemplo 11**

#### Combinación DHL/tratamiento por calor de carnes RTE

**[0096]** Para evaluar la destrucción de *Listeria monocytogenes* inoculada en superficie por DHL en solitario o en combinación con vapor saturado, se empleó un diseño experimental de tres por cuatro. Se usaron tres tratamientos con DHL (control, Humo 1 y Humo 2) y cuatro tratamientos por calor (0, 1, 2 y 3 minutos) según se describe en la sección anterior titulada "Materiales y procedimientos para el Ejemplo 11".

**[0097]** La inoculación por nebulización de los productos de pechuga de pavo reestructurada dio como resultado poblaciones superficiales de *L. monocytogenes* de 4,17  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (figs. 10 y 11). La exposición a vapor saturado durante 1, 2 ó 3 minutos en un pasteurizador de superficie posprocesamiento Townsend dio como resultado reducciones de 1,08, 2,01 y 2,92  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. El tratamiento por nebulización de pechuga de pavo inoculada con DHL dio como resultado reducciones de 0,94 y 0,41  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> para Humo 1 y Humo 2 respectivamente, con respecto al control. El tratamiento por nebulización de producto de pechuga de pavo inoculada con Humo 1 y la posterior exposición a vapor saturado dio como resultado mayores reducciones de poblaciones superficiales de *L. monocytogenes* con reducciones de 2,17, 2,37, y 3,57  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (exposición al vapor de 1, 2 y 3 minutos, respectivamente). Se observaron reducciones similares (2,30, 3,11, y 3,54  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) con Humo 2 más tratamientos de vapor.

#### Discusión del Ejemplo 11

**[0098]** Aunque el tratamiento de nebulización superficial de producto de pechuga de pavo procesado dio como resultado reducciones de *L. monocytogenes*, la combinación de aplicación de humo superficial y tratamiento superficial por calor proporcionó mayores reducciones que el tratamiento en solitario (figs. 12 y 13). Aunque los tratamientos en combinación proporcionaron mayores reducciones, las reducciones medias fueron mayores para producto tratado con DHL y pasteurizado durante 1 minuto.

**[0099]** Se comprenderá que diversos detalles de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva pueden modificarse sin apartarse del ámbito de la materia objeto desvelada en la presente memoria descriptiva. Además, la descripción precedente tiene fines sólo de ilustración, y no de limitación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para inhibir el crecimiento de un microorganismo en un producto alimentario, comprendiendo el procedimiento el tratamiento del producto alimentario con un derivado de humo líquido que no imparte aroma a humo al producto alimentario, en el que el derivado de humo líquido comprende:
- (a) acidez valorable en una concentración del 0 al 6% en peso por unidad de volumen (p/v);  
 (b) al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v) de carbonilo;  
 (c) compuestos fenólicos en una concentración de menos del 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v);  
 (d) agua en una concentración de menos del 97% en peso por unidad de volumen (p/v); y tiene  
 (e) un pH de al menos 3,0,
- por medio del cual el crecimiento de un microorganismo se inhibe.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se selecciona entre el grupo que consiste en una bacteria, una levadura y un hongo.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la bacteria es una cepa de *Streptococcus*, *Shigella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Listeria* o *Salmonella*.
4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la levadura es una cepa de *Saccharomyces*.
5. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el hongo es una cepa de *Aspergillus*.
6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto alimentario es un producto alimentario listo para comer.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el producto alimentario listo para comer comprende carne de ave, cerdo, vacuno, mariscos o un producto de masa horneada.
8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto alimentario es un producto alimentario listo para cocinar.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el producto alimentario listo para cocinar comprende carne de ave, cerdo, vacuno, mariscos, verduras frescas o un producto de masa parcialmente horneada.
10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el derivado de humo líquido comprende carbonilo en una concentración del 12% en peso por unidad de volumen (p/v) y un pH de 5,0 a 6,0.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH está comprendido entre 4,5 y 6,5.
12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el derivado de humo líquido es producido mediante tratamiento con humo líquido a través de un evaporador para separar y condensar los elementos de bajo punto de ebullición asociados para producir el derivado de humo líquido.
13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el derivado de humo líquido se vaporiza sobre el producto alimentario.
14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto alimentario se sumerge en un baño del derivado de humo líquido.
15. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además el calentamiento del producto alimentario a al menos 73,9°C (165°F) durante al menos 1 minuto.
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que la etapa de calentamiento se realiza después de la etapa de tratamiento.
17. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el derivado de humo líquido comprende además un agente de humectación adicional.
18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el que el agente de humectación adicional comprende polisorbato.
19. Un derivado antimicrobiano de humo líquido, en el que el derivado de humo líquido:

(i) comprende

- 5 (a) acidez valorable en una concentración del 0 al 6% en peso por unidad de volumen (p/v);  
(b) carbonilo de al menos el 10% en peso por unidad de volumen (p/v);  
(c) compuestos fenólicos en una concentración de menos del 0,5% en peso por unidad de volumen (p/v);  
(d) agua en una concentración de menos del 97% en peso por unidad de volumen (p/v); y tiene  
(e) un pH de al menos 3,0;

10 (ii) no imparte aroma a humo a un producto alimentario cuando el producto alimentario se trata con el derivado de humo líquido; e

15 (iii) inhibe el crecimiento en un producto alimentario de un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Streptococcus*, *Shigella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Saccharomyces* y *Aspergillus* cuando el producto alimentario es tratado con el derivado de humo líquido.

20. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 19, en el que el pH está comprendido entre 4,5 y 6,5.

20 21. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 19, en el que el derivado de humo líquido comprende carbonilo en una concentración del 12% en peso por unidad de volumen (p/v) y un pH de 5,0 a 6,0.

25 22. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 19, en el que el producto alimentario es un producto alimentario listo para comer.

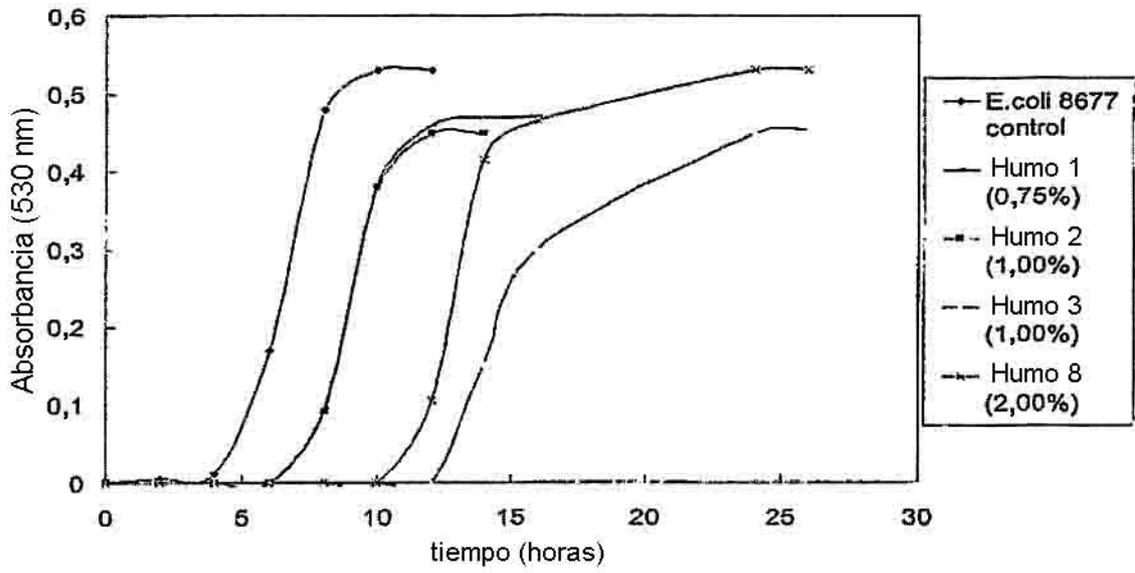
23. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 22, en el que el producto alimentario listo para comer comprende carne de ave, cerdo, vacuno, mariscos o un producto de masa horneada.

30 24. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 19, en el que el producto alimentario es un producto alimentario listo para cocinar.

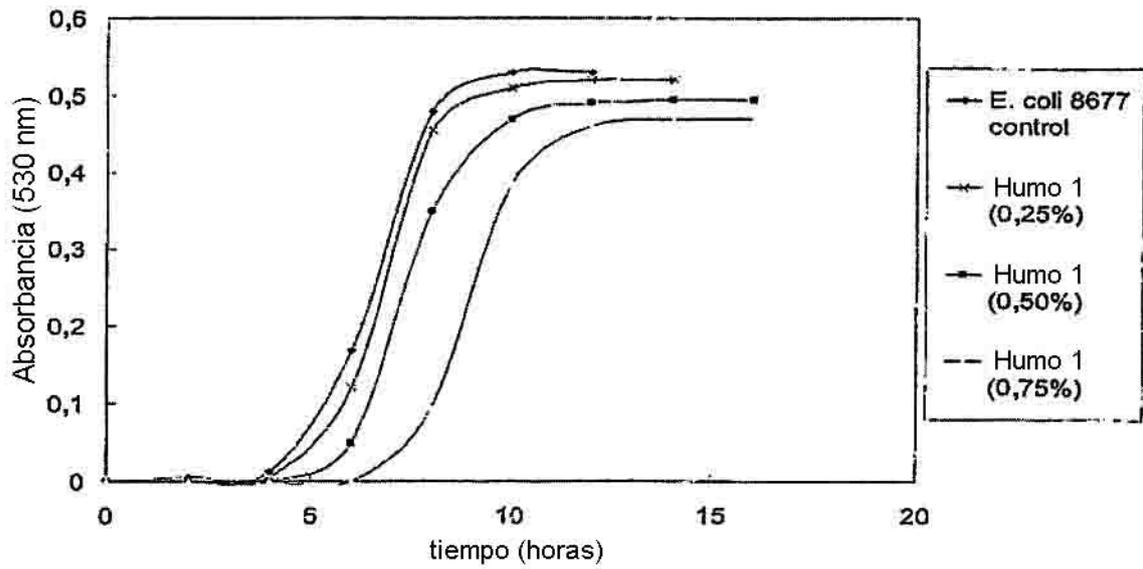
35 25. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 24, en el que el producto alimentario listo para cocinar comprende carne de ave, cerdo o vacuno, mariscos o un producto de masa parcialmente horneada.

26. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 19, en el que el derivado de humo líquido comprende un agente de humectación adicional.

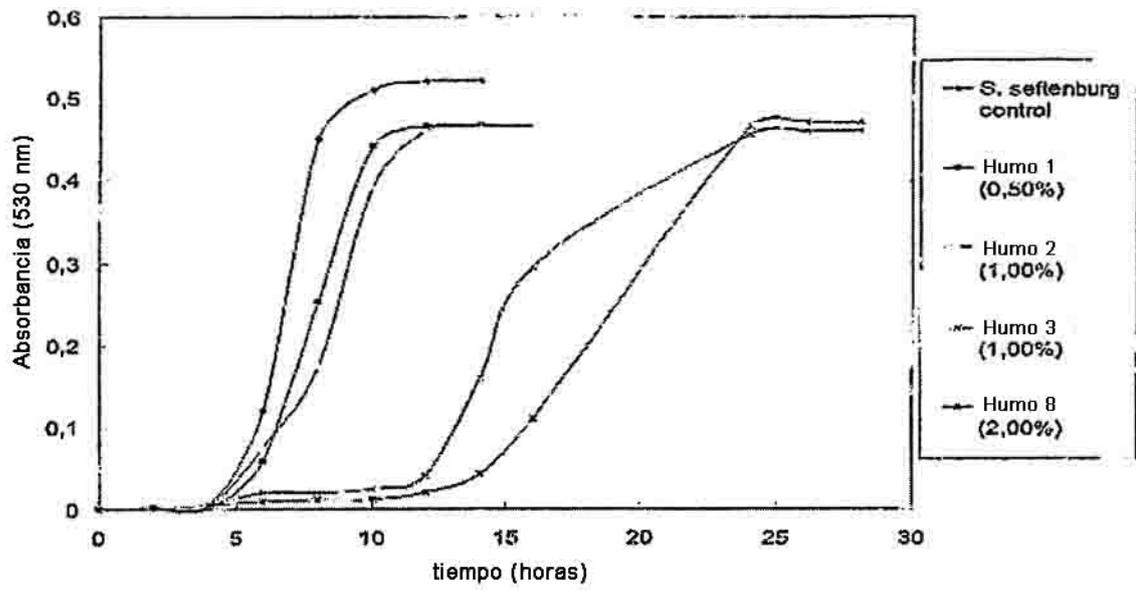
40 27. El derivado antimicrobiano de humo líquido según la reivindicación 26, en el que el agente de humectación adicional comprende polisorbato.



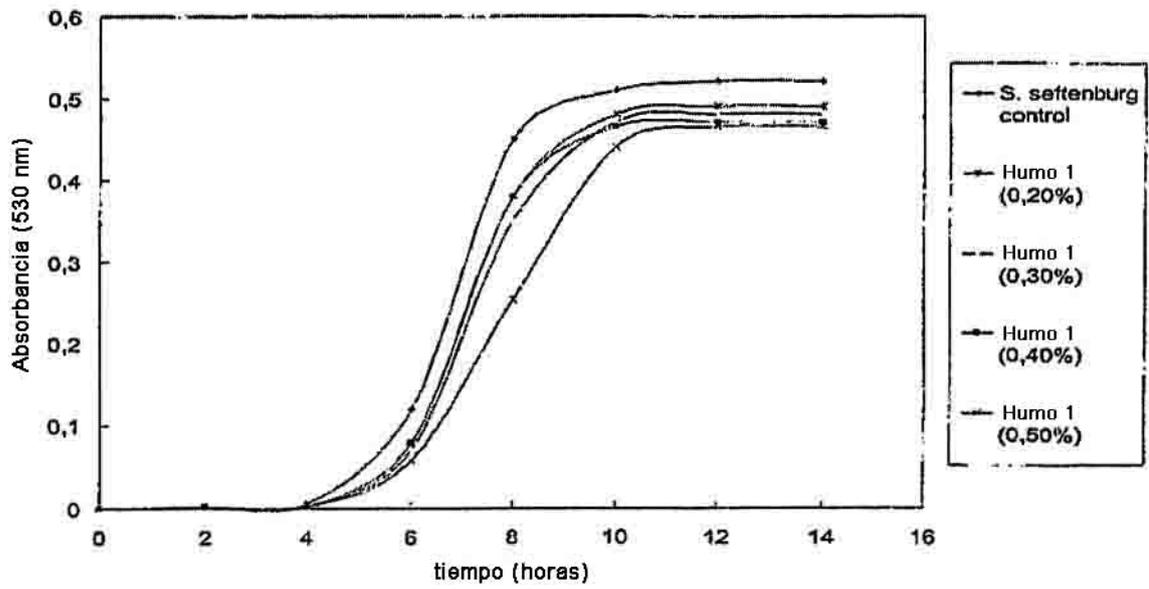
**Figura 1**



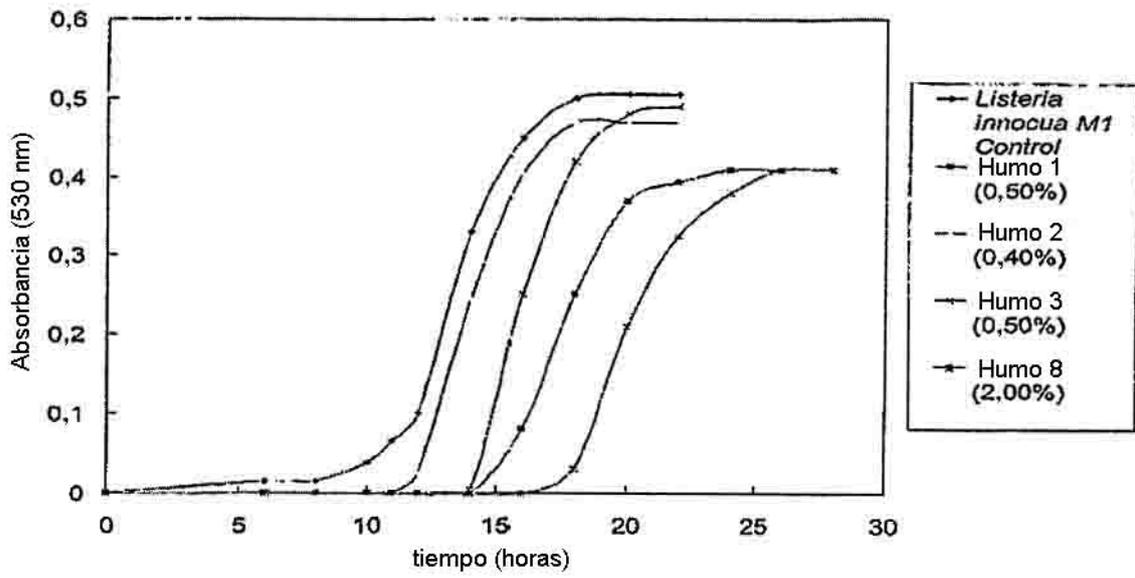
**Figura 2**



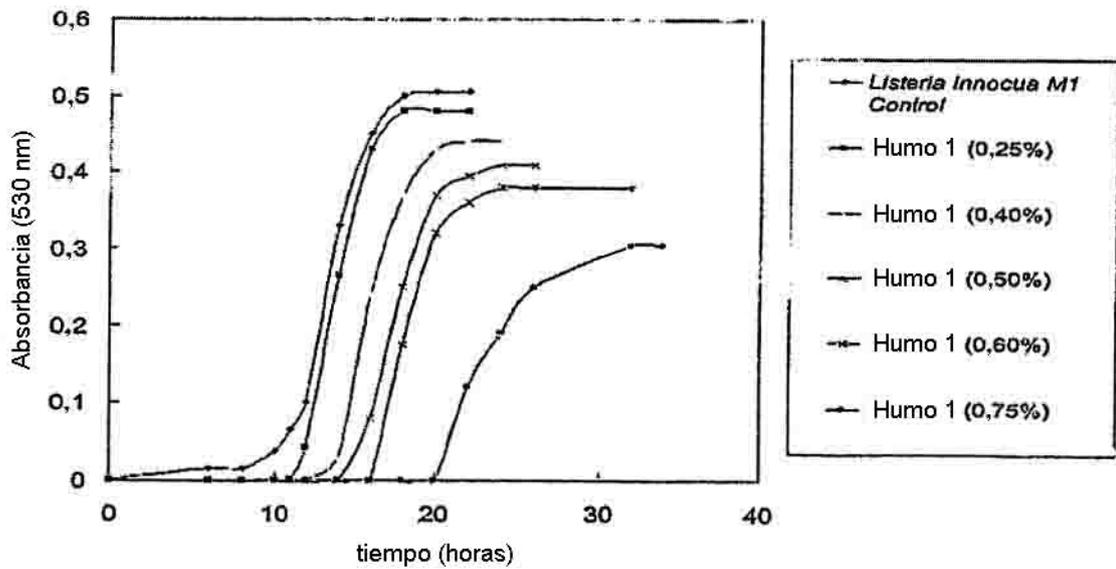
**Figura 3**



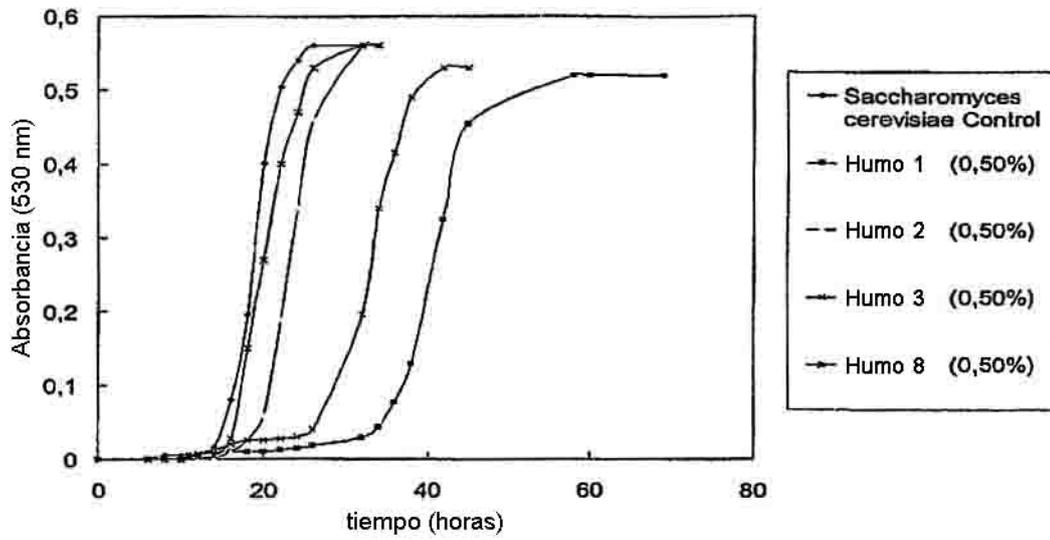
**Figura 4**



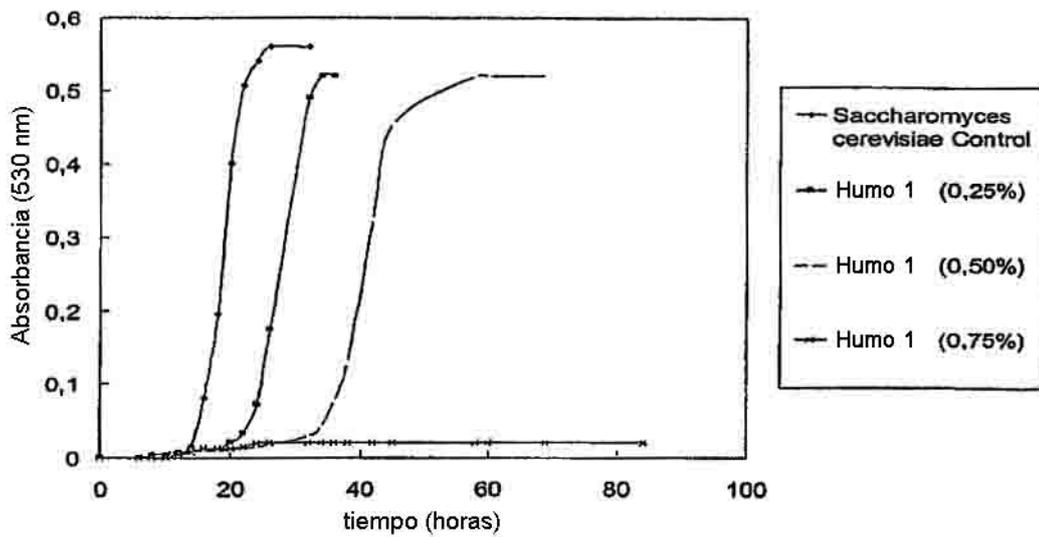
**Figura 5**



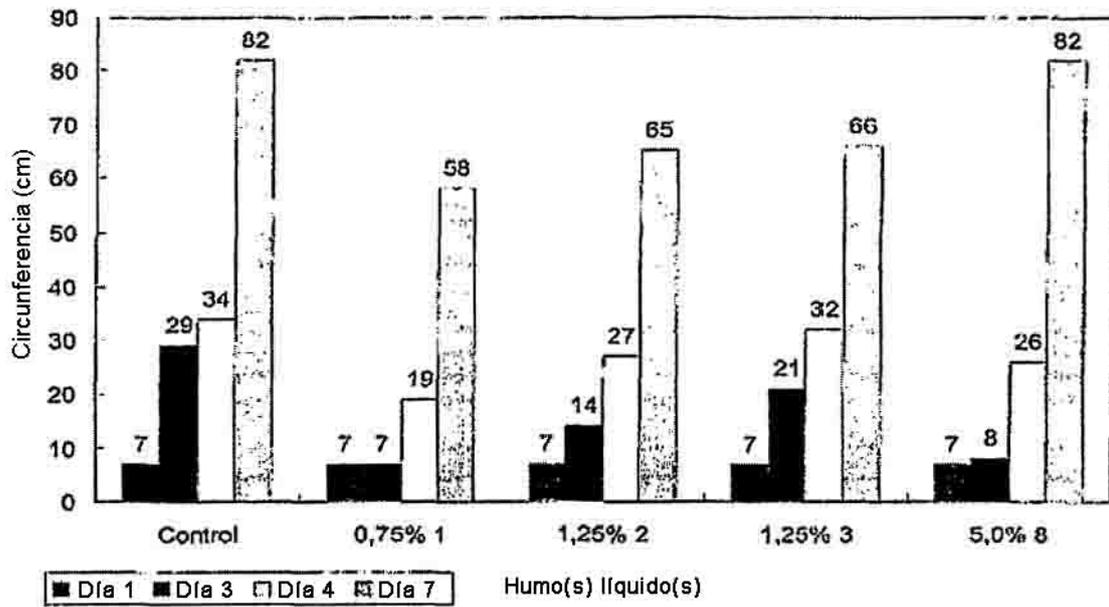
**Figura 6**



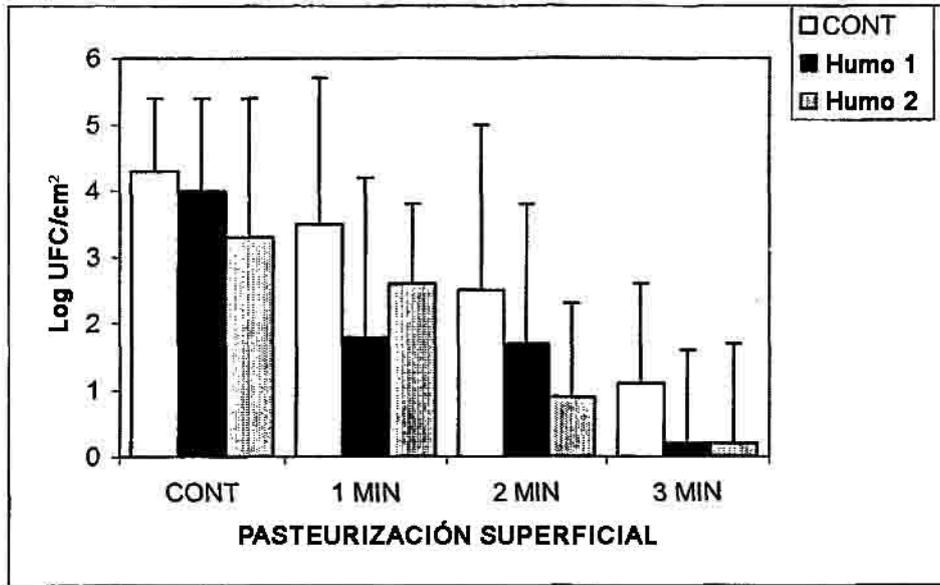
**FIGURA 7**



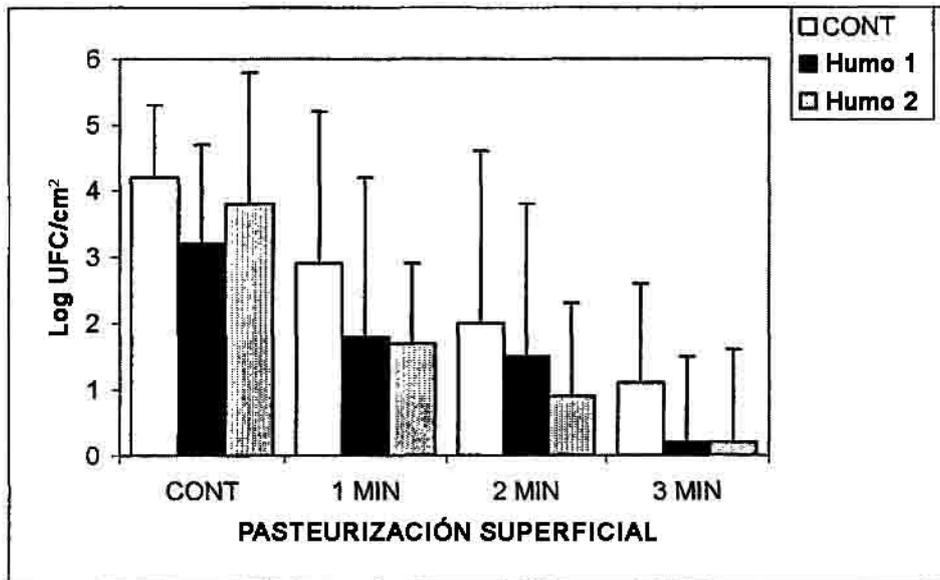
**FIGURA 8**



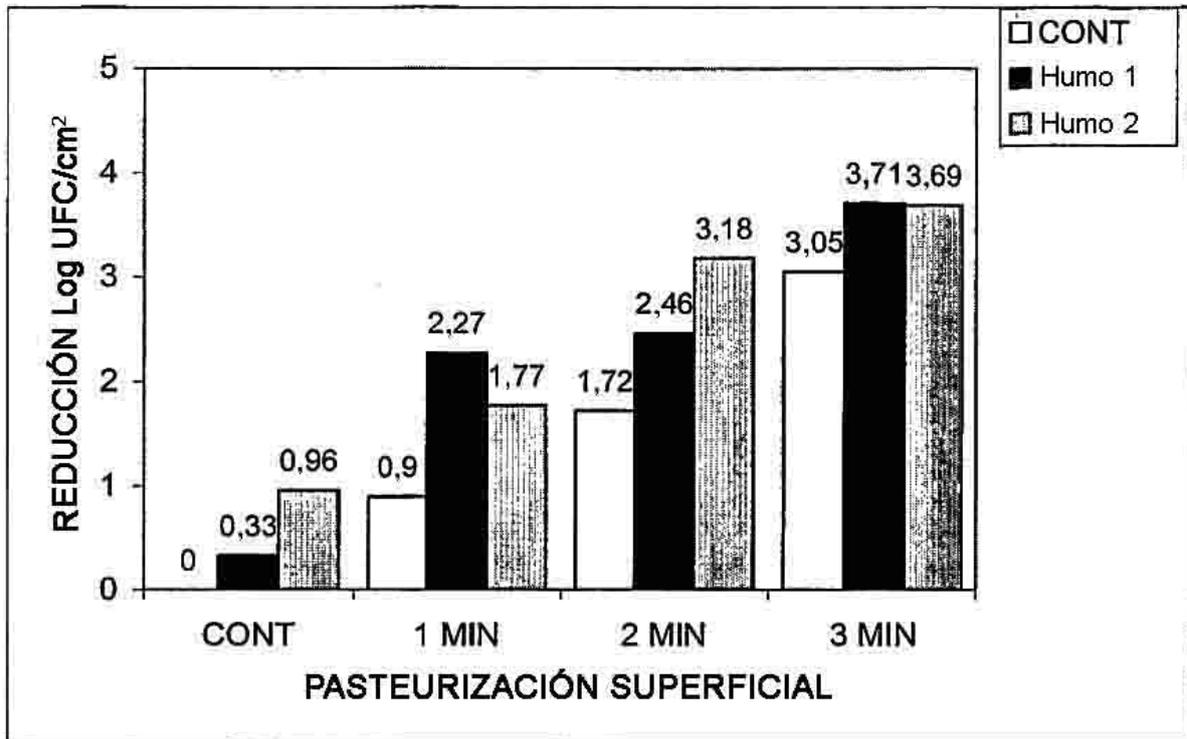
***Figura 9***



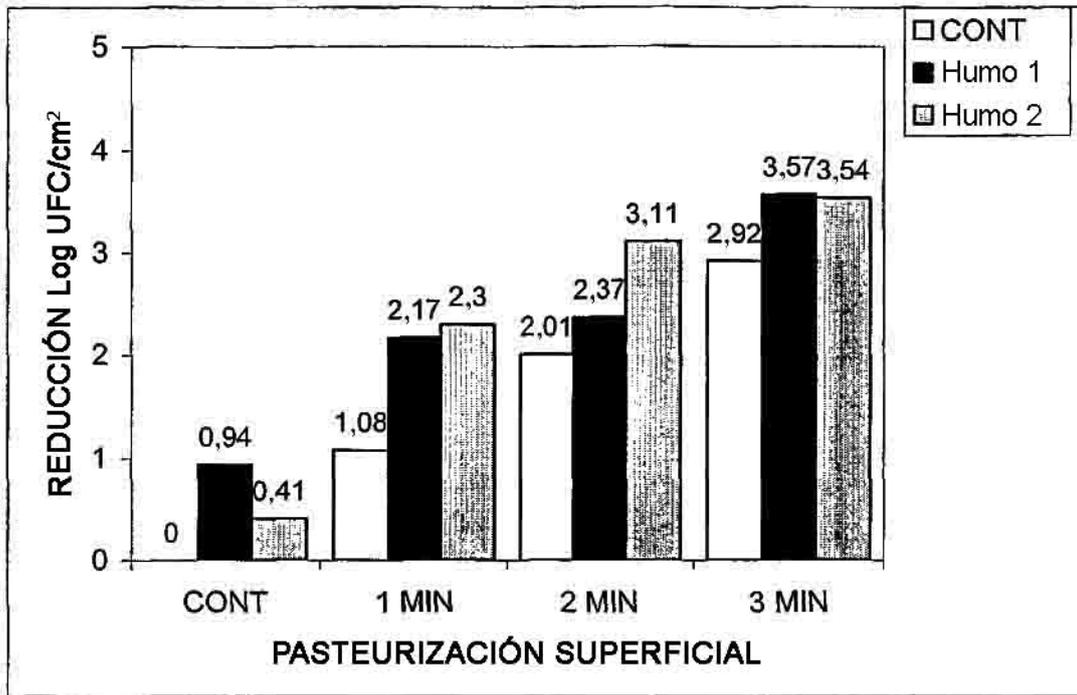
**FIGURA 10**



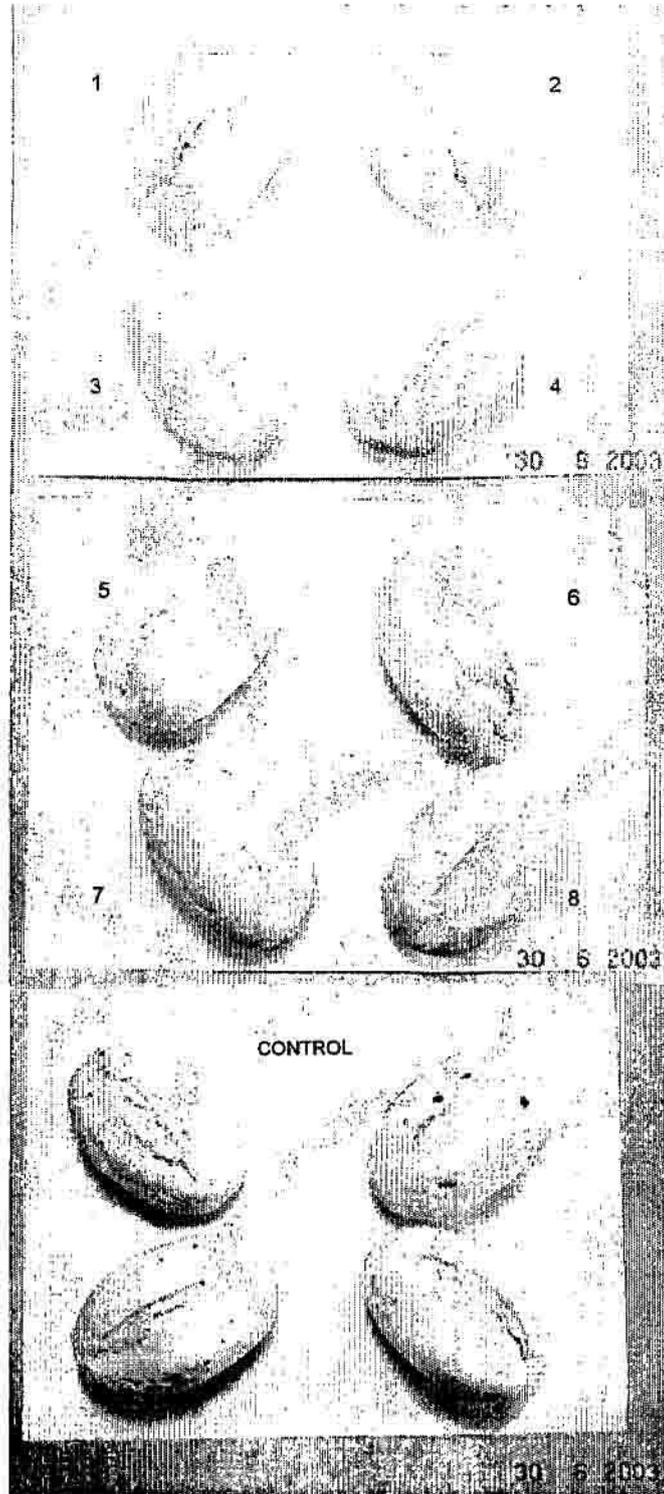
**FIGURA 11**



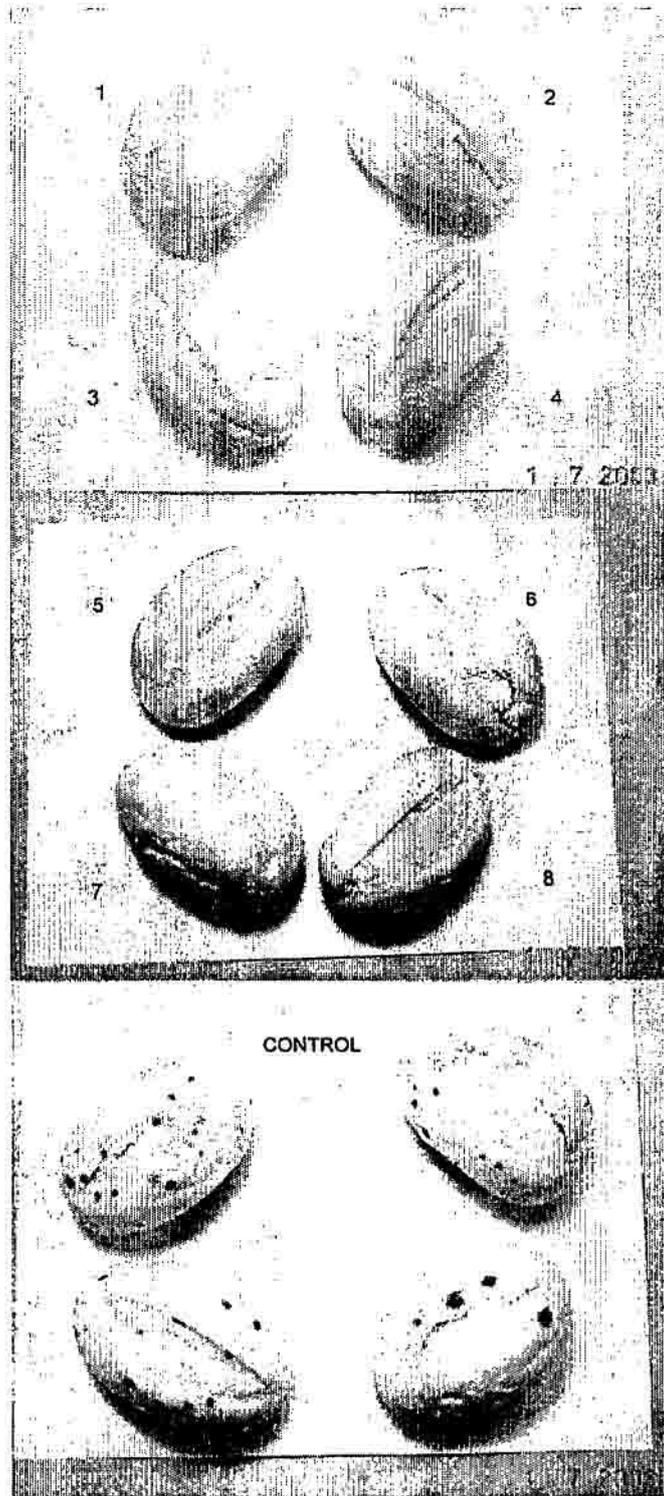
**FIGURA 12**



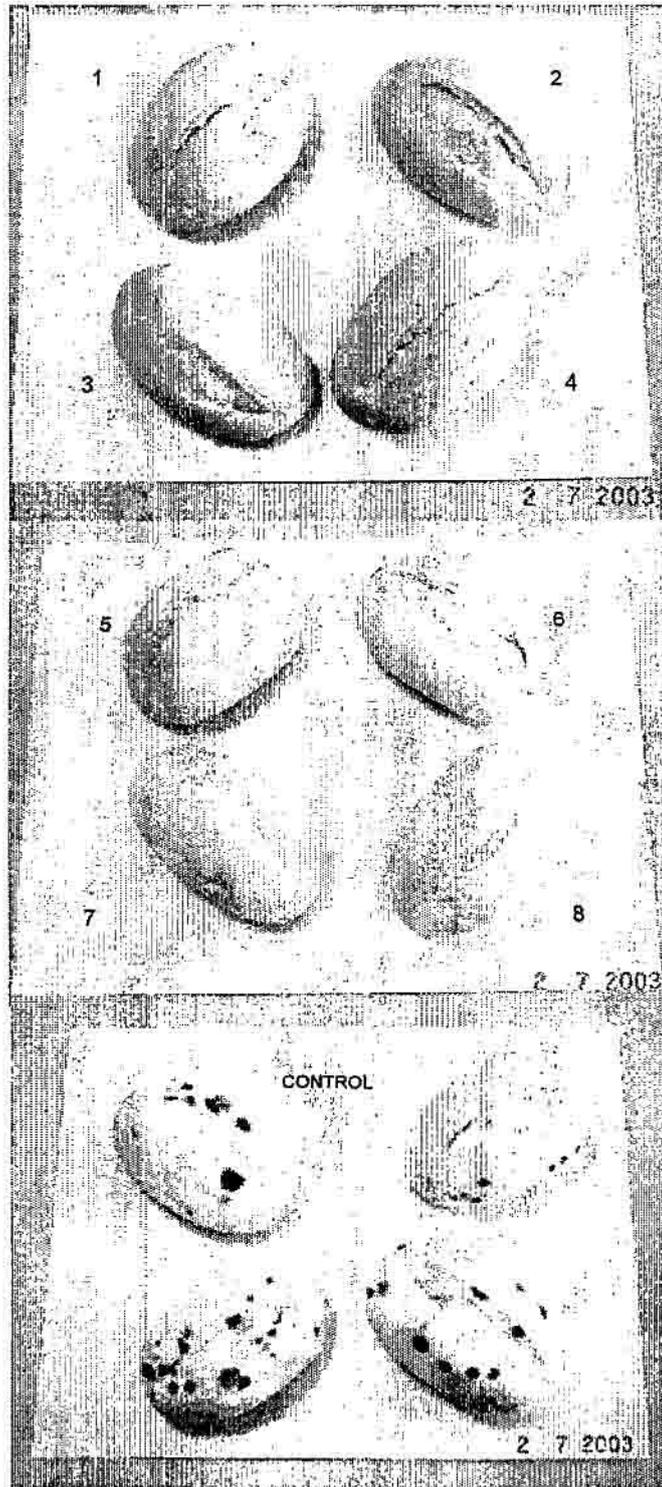
**FIGURA 13**



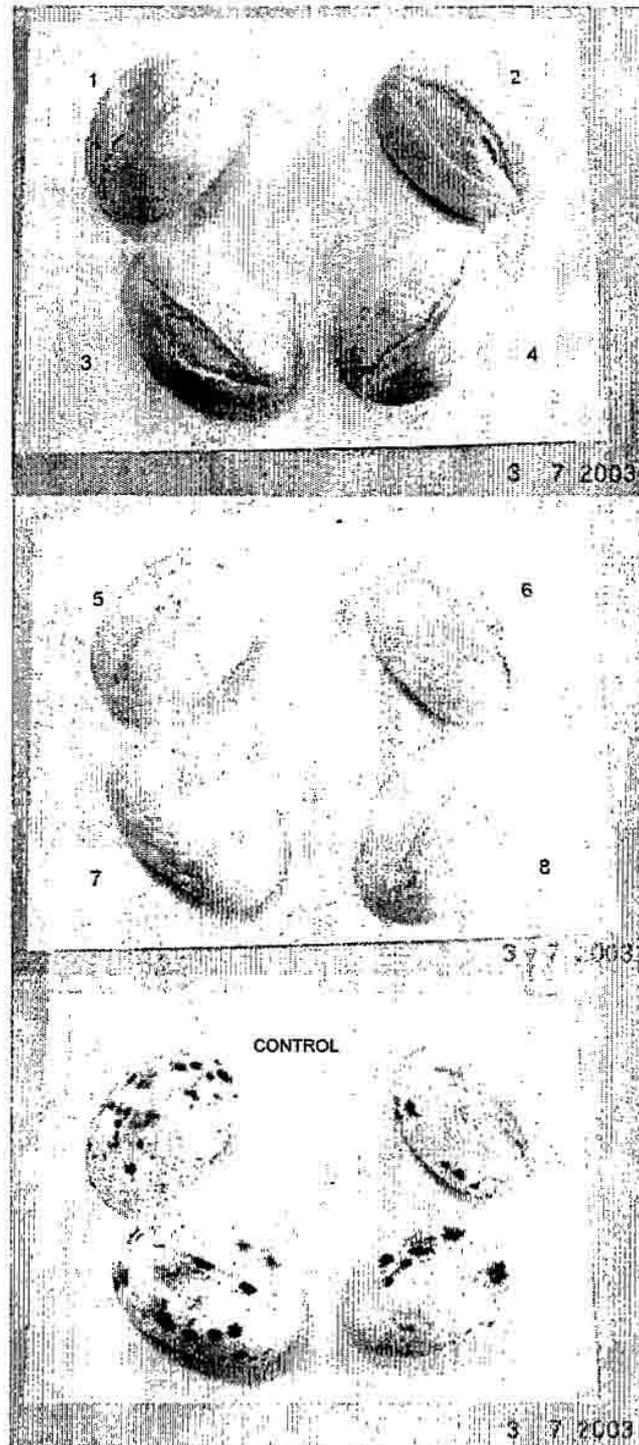
***Figura 14A***



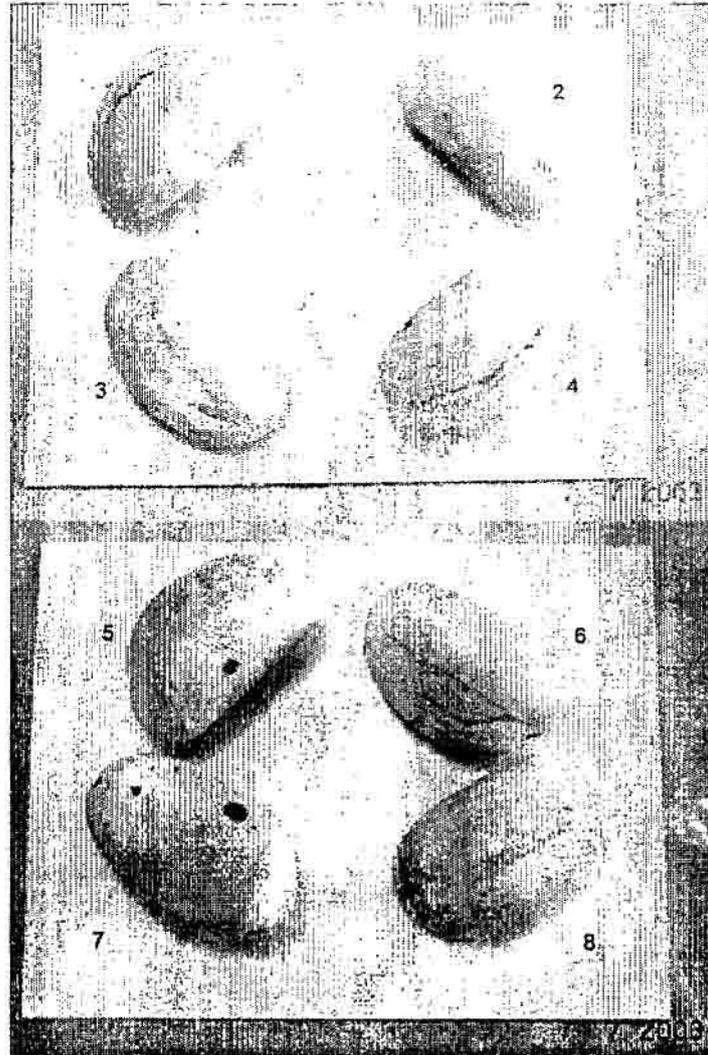
**Figura 14B**



***Figura 14C***



**Figura 14D**



**Figura 14E**

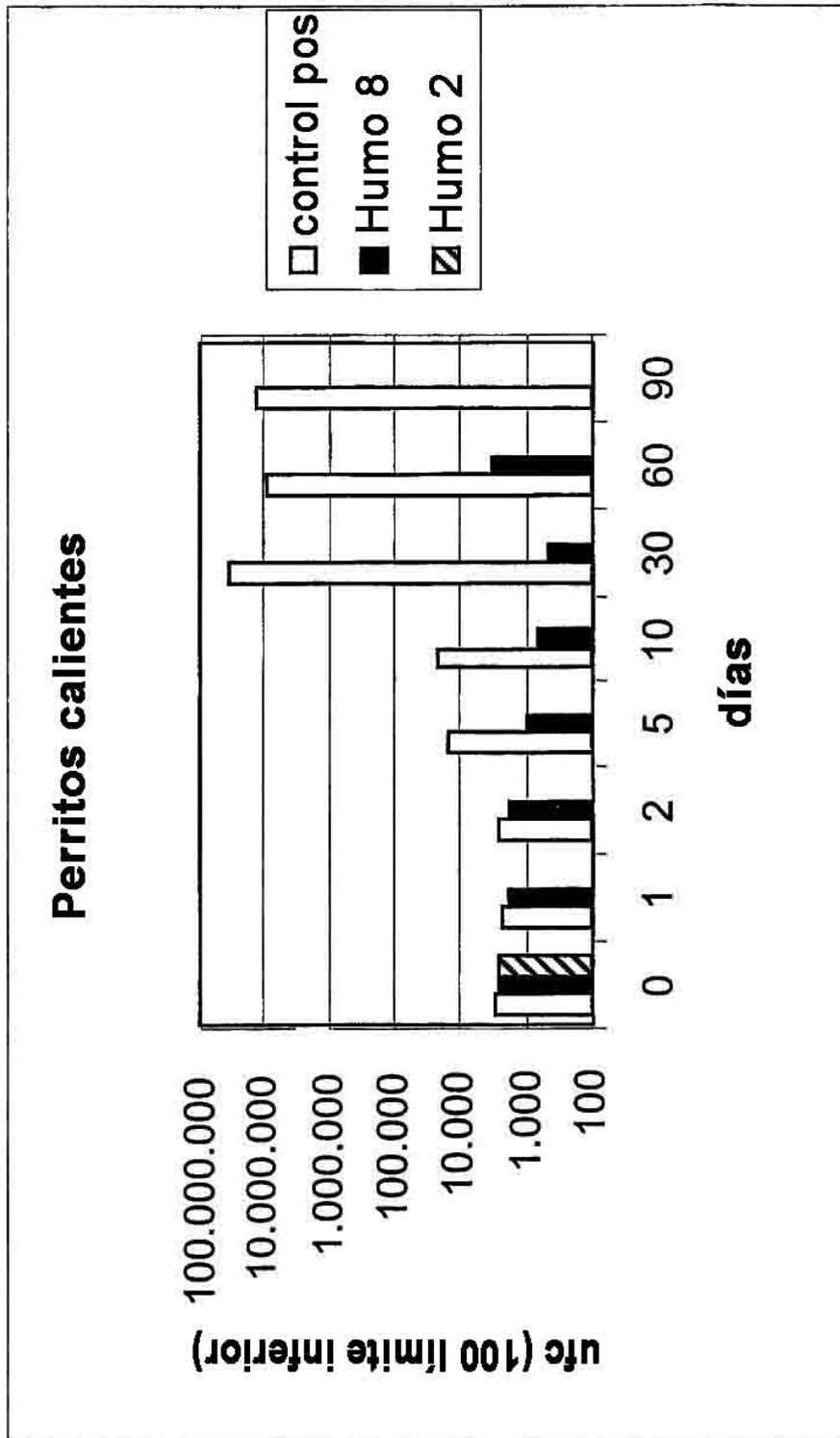


Figura 15

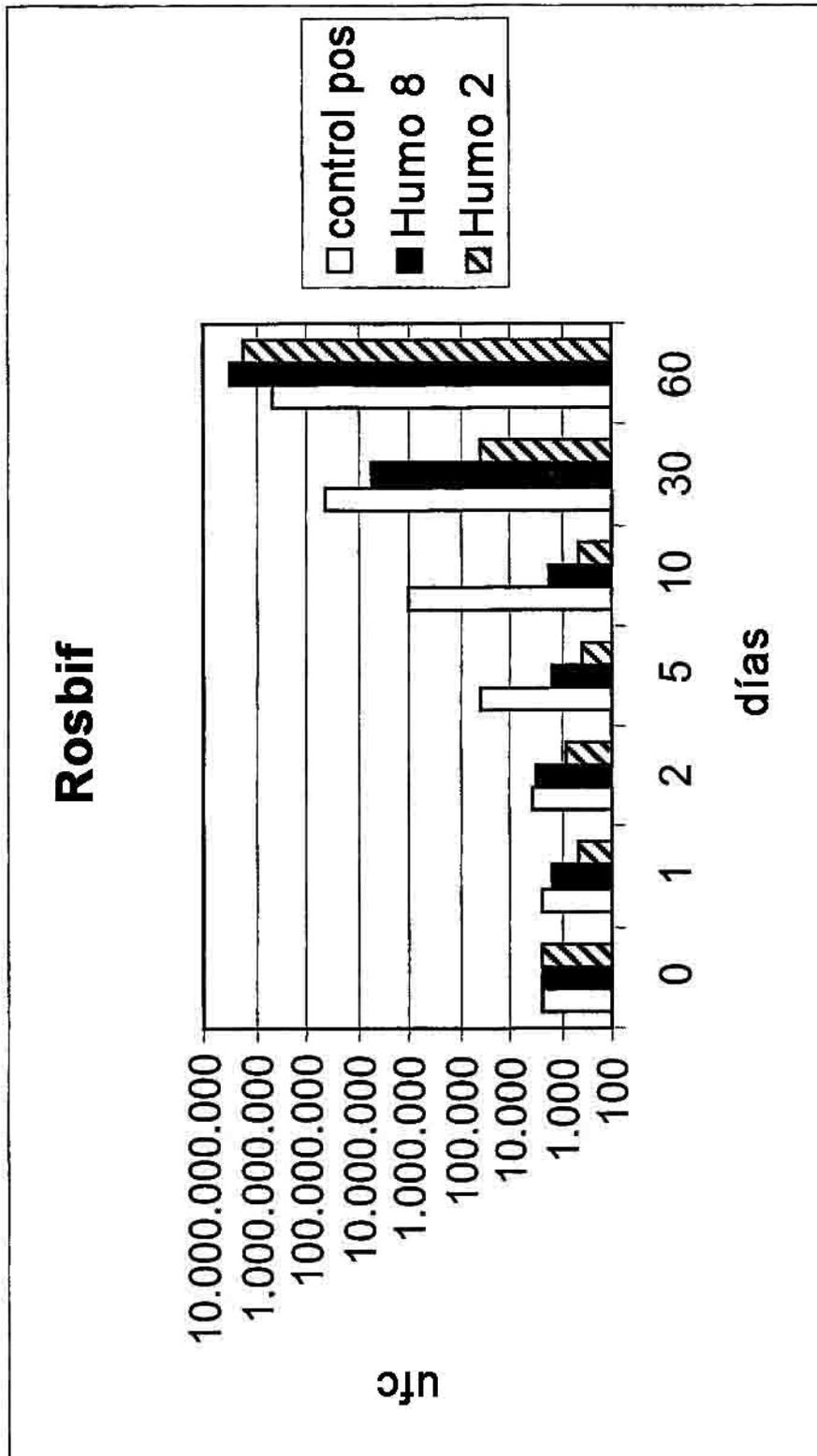


Figura 16

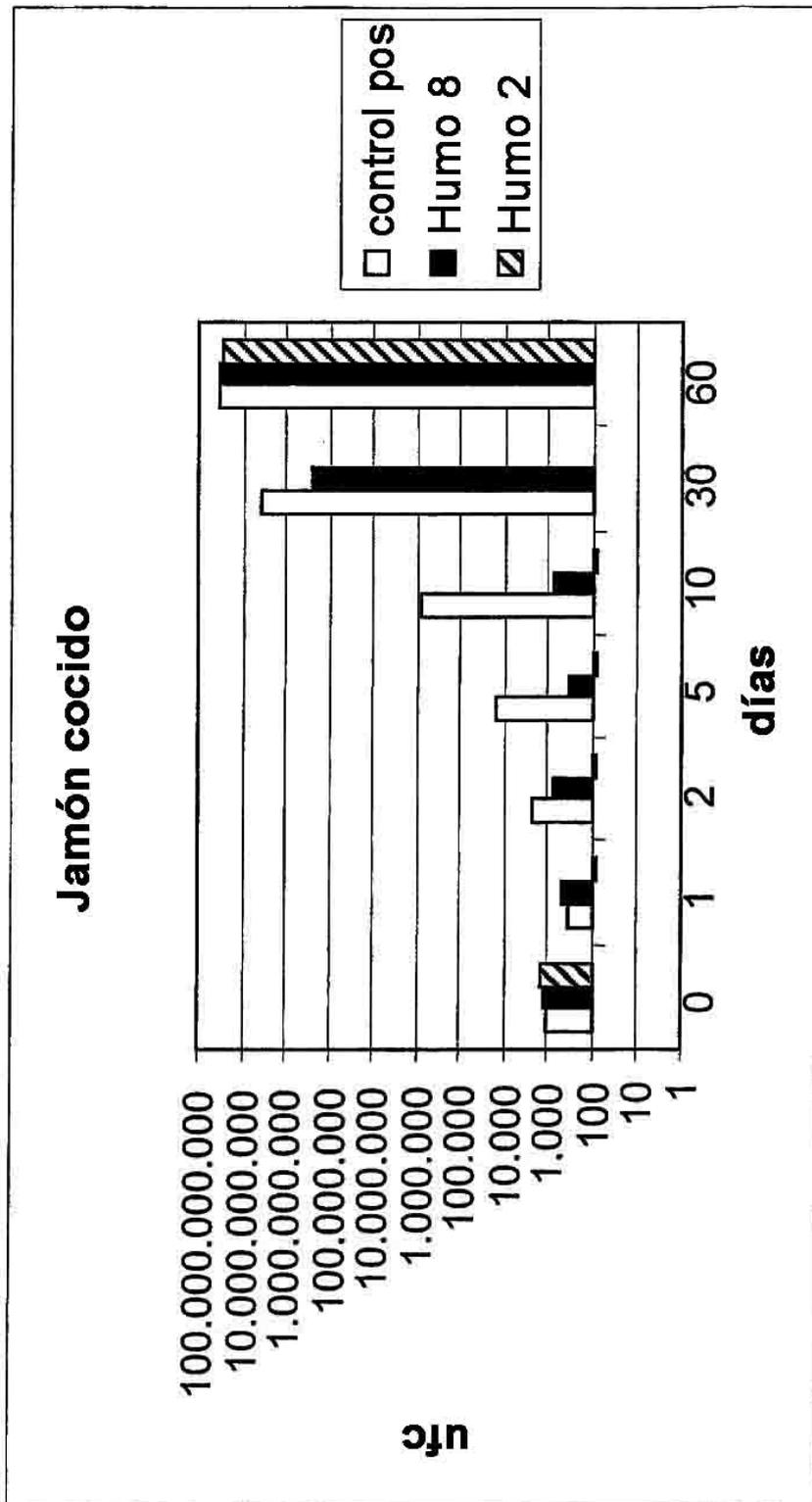
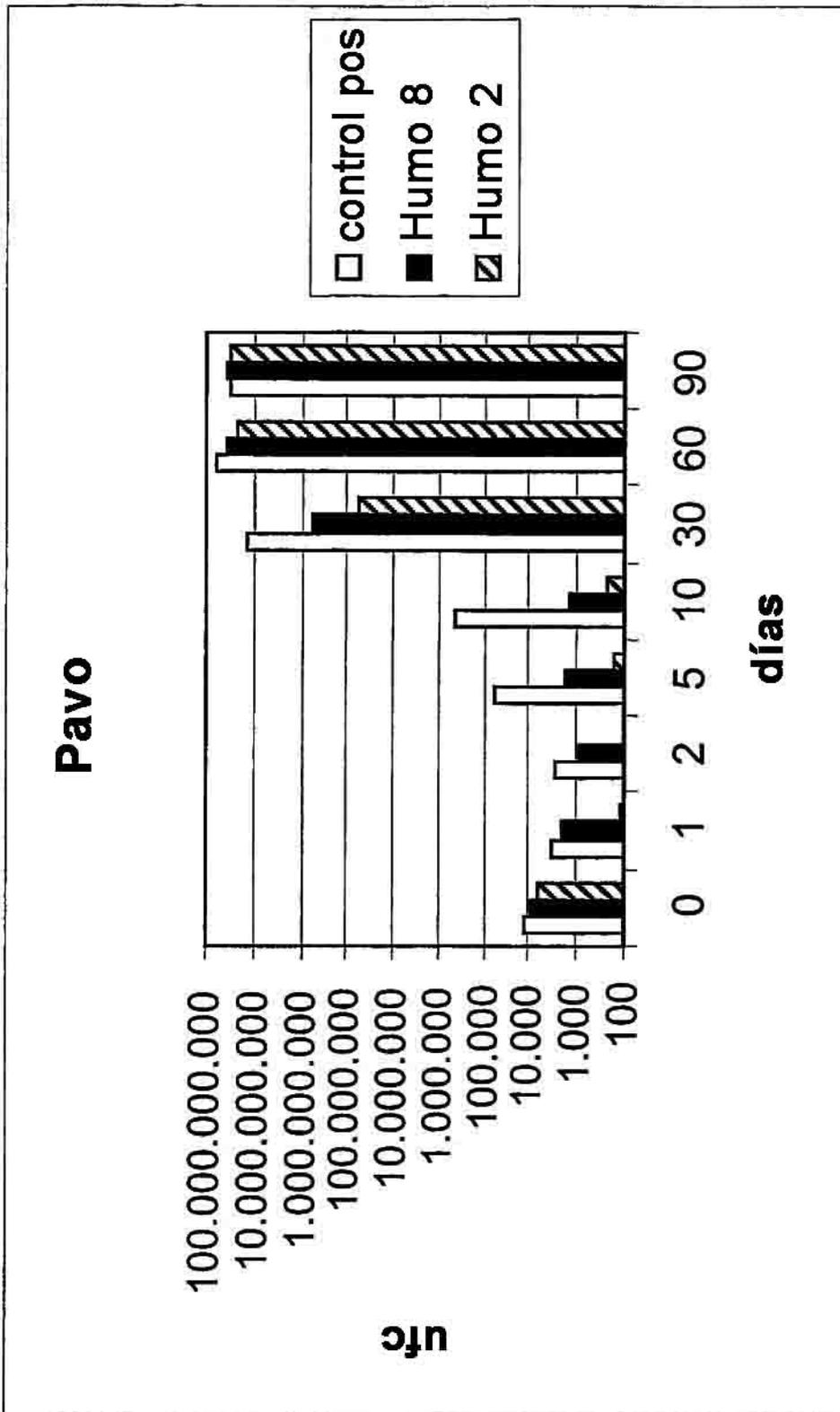
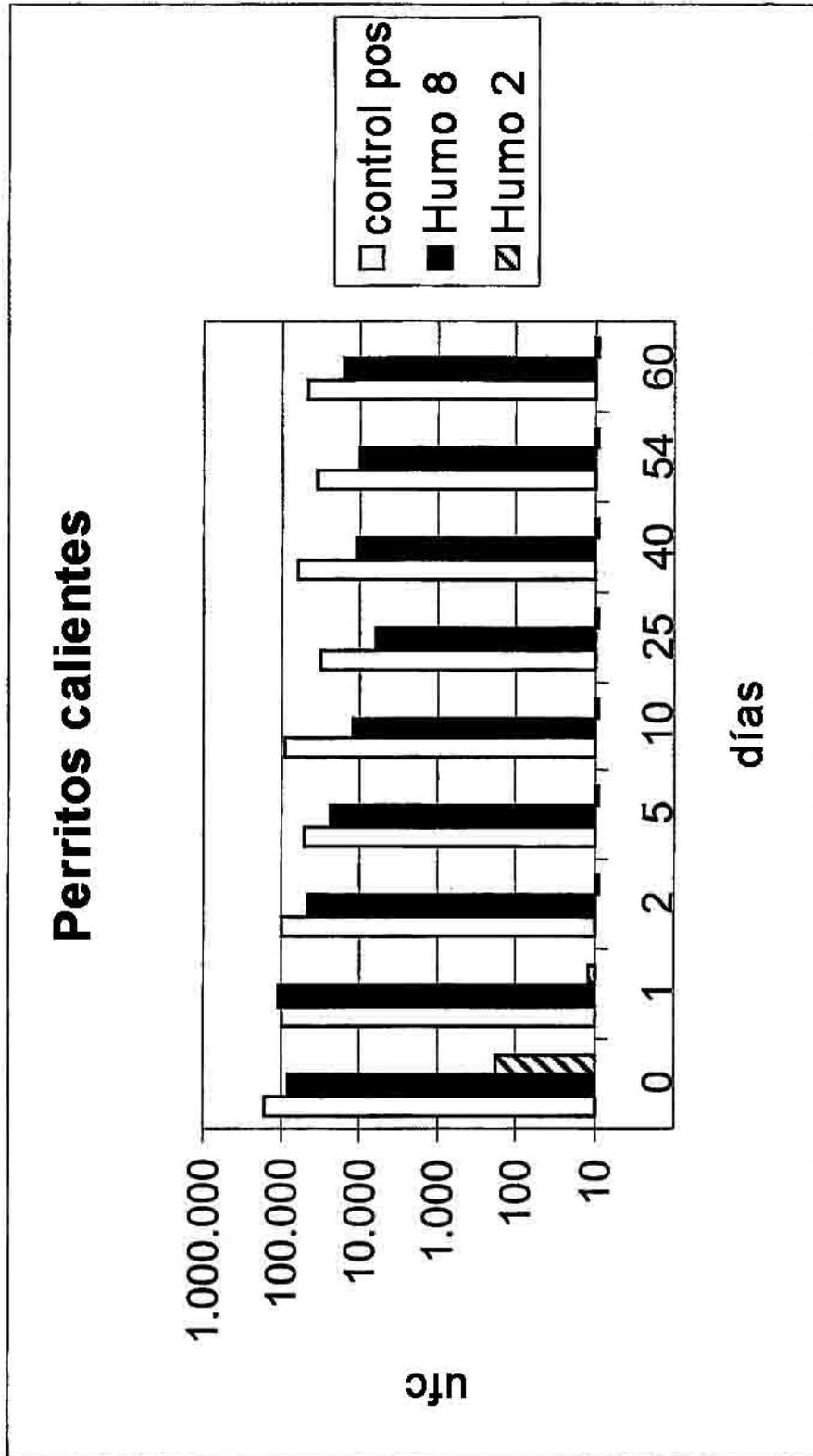


Figura 17



**Figura 18**



*Figura 19*

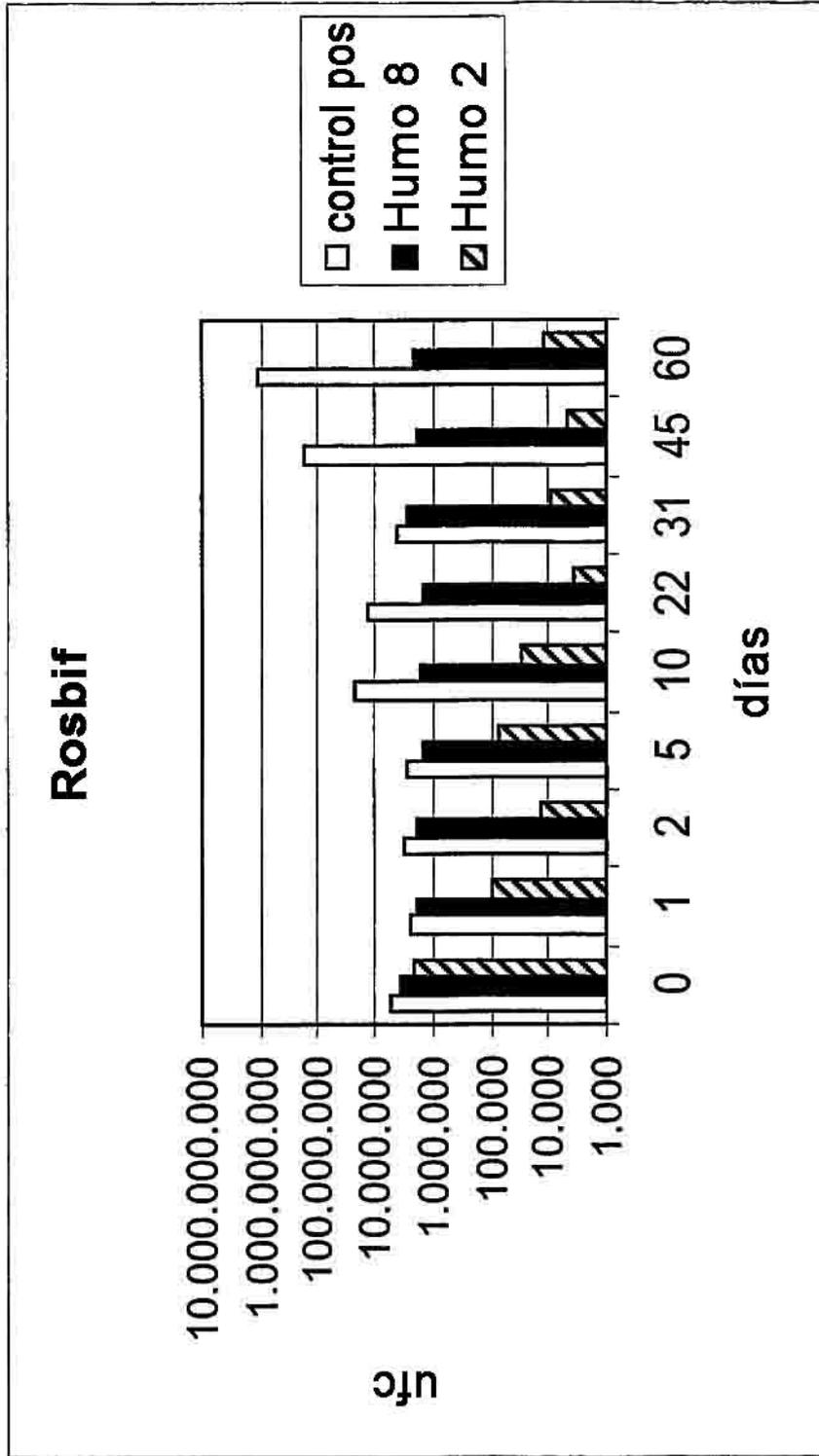


Figura 20

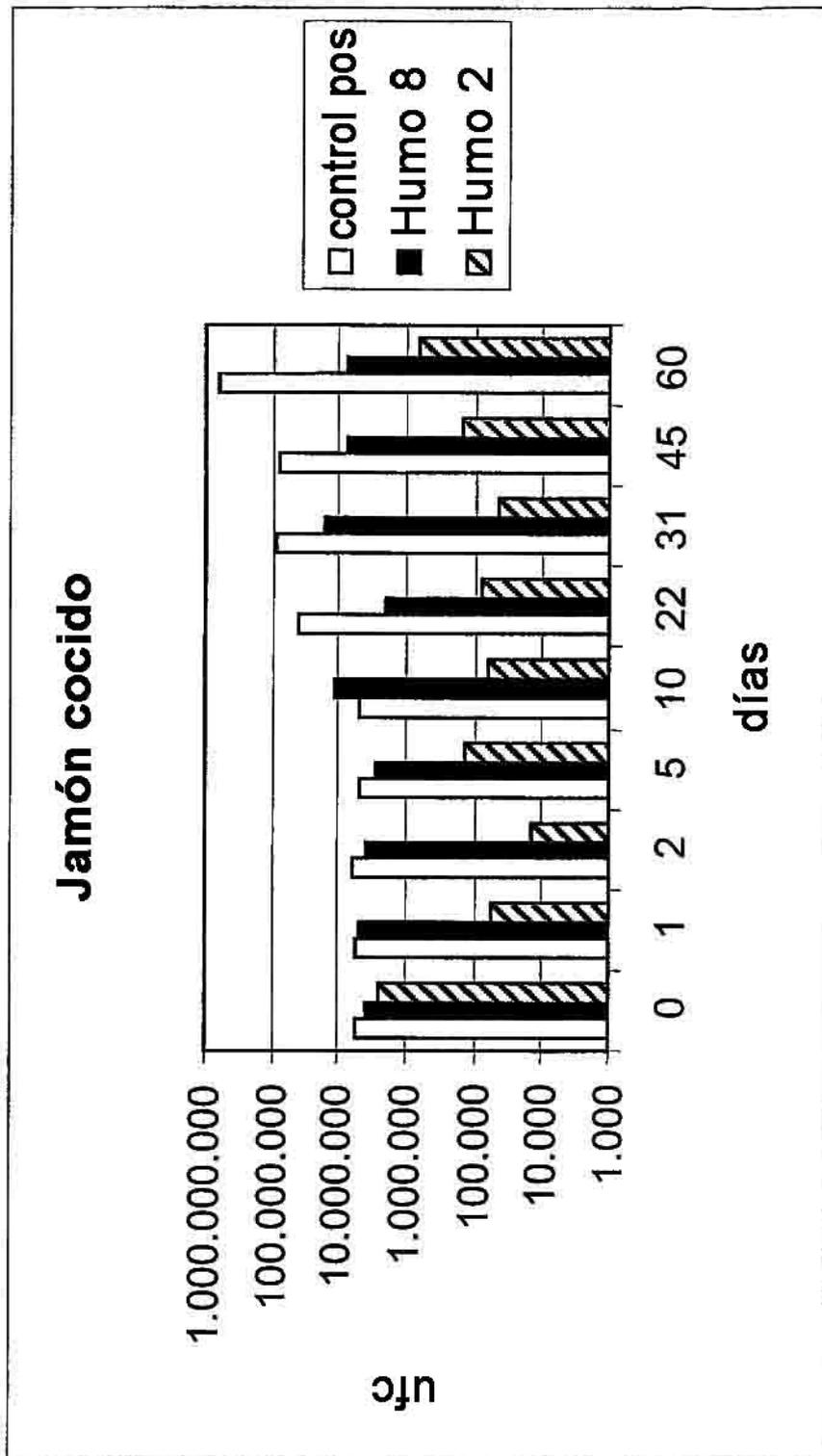


Figura 21

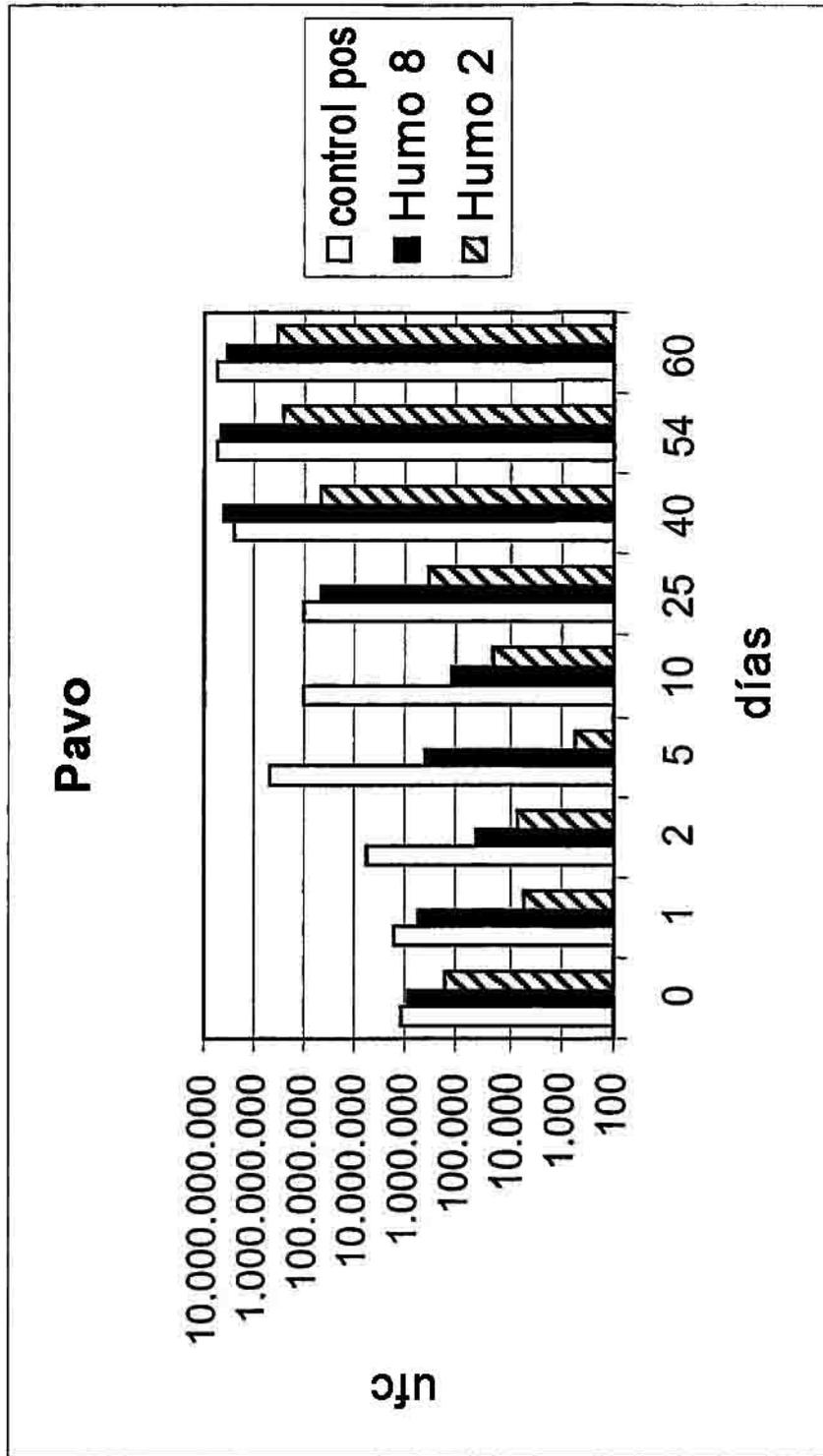
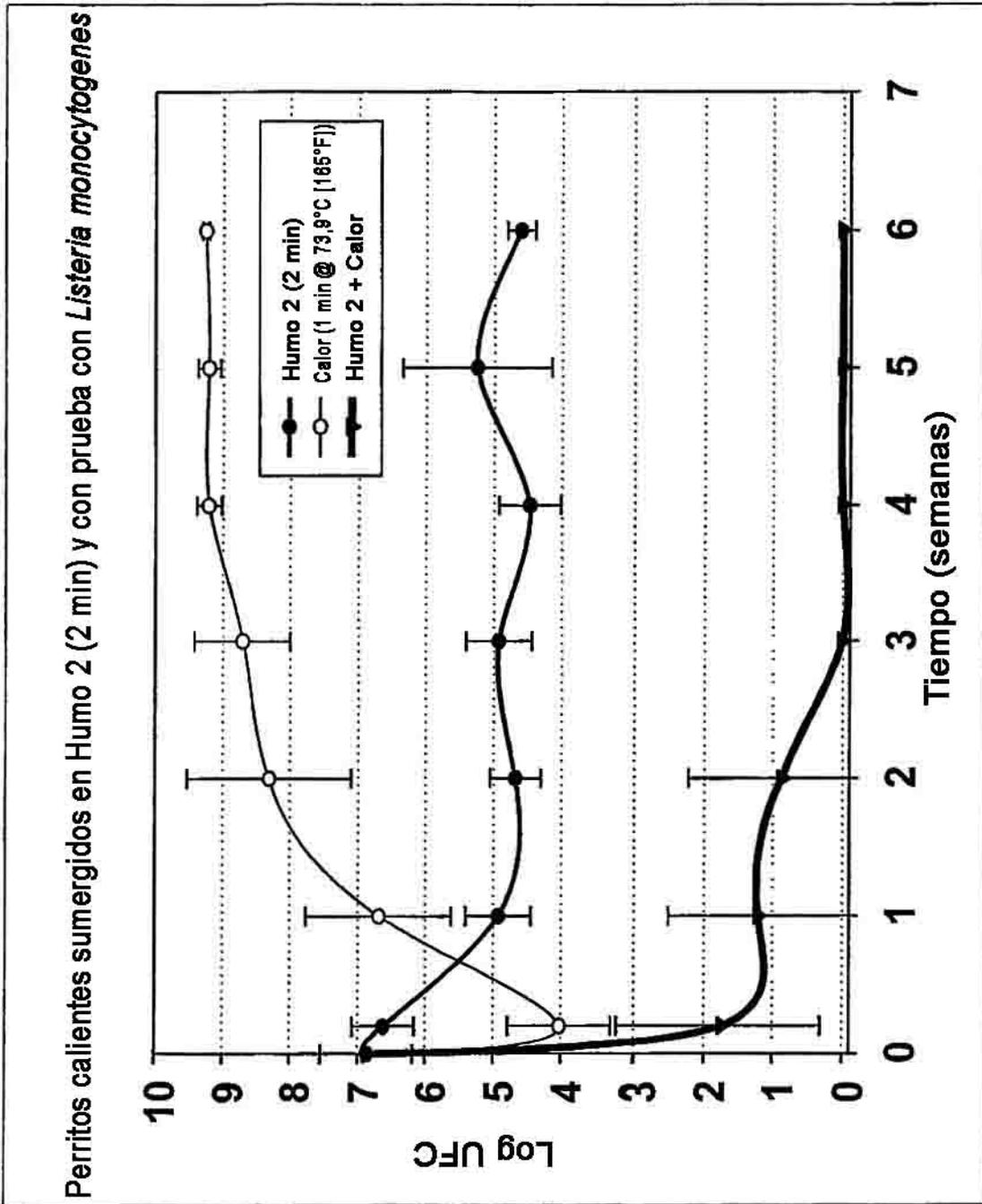


Figura 22



**Figura 23**