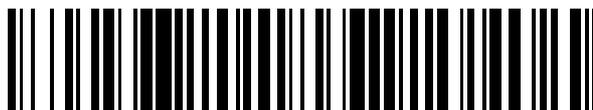


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 378**

51 Int. Cl.:

A23B 4/20 (2006.01)

A23B 4/12 (2006.01)

A23B 5/14 (2006.01)

A23B 7/154 (2006.01)

A23B 9/26 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A23L 3/3508 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

A23L 3/3535 (2006.01)

A23L 3/3544 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11813900 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2654440**

54 Título: **Composición microbicida**

30 Prioridad:

23.12.2010 US 201061426621 P

26.09.2011 US 201161539283 P

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

09.02.2015

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS

(100.0%)

Langebrogade 1, P.O. Box 17

1001 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

**FISCHER, JANA THERESA y
THOMPSON, BRETT WESLEY**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 378 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 microbicida

5 La presente invención se refiere a una composición que muestra una acción microbicida o microbiostática.

Antecedentes

10 La seguridad de los alimentos y la prevención del deterioro de los alimentos es una preocupación constante en todo el mundo, particularmente con la tendencia creciente de la comida rápida tal como comidas preparadas, sopas, salsas o aperitivos. El deterioro de los alimentos es un problema económico principal para el fabricante de alimentos. Los fabricantes de alimentos necesitan proteger la salud y seguridad del público proporcionando productos que es seguro comer. Tales alimentos deben tener un término de caducidad garantizado, ya sea en almacenamiento enfriado o a temperatura ambiente. Los consumidores prefieren los alimentos con buen sabor de alta calidad, esto es difícil de lograr con conservantes químicos, regímenes de calentamiento duros y otras medidas de procesamiento. La protección y seguridad de los alimentos se logran mejor con un sistema de conservación múltiple que usa un enfoque combinado de procesamiento más leve y conservantes naturales. Los microorganismos transportados por los alimentos también son menos capaces de adaptarse y crecer en alimentos conservados con diferentes medidas de conservación.

20 Hay una gran preocupación sobre la protección de los alimentos y el crecimiento de organismos de deterioro de los alimentos tales como *Zygosaccharomyces bailii*. Esta especie particular es una de las levaduras de deterioro más problemáticas y con frecuencia es un organismo de deterioro principal de zumos de fruta, salsas, refrescos carbonatados, aliños para ensaladas, mayonesa y ketchup. Las características fisiológicas poco habituales, tales como resistencia excepcional a agentes antimicrobianos, son en gran medida responsables de su capacidad para provocar deterioro. Adicionalmente, algunas veces los organismos de deterioro pueden adaptarse a diferentes conservantes y condiciones de almacenamiento, por tanto una combinación de medidas de conservación puede ser más satisfactoria que medidas individual.

30 Hay una creciente necesidad de desarrollar sistemas de conservación económicos, naturales y eficaces para cumplir con la demanda del público de productos convenientes, naturales, seguros, sanos, de buena calidad, con un término de caducidad garantizado. Pueden usarse materiales antimicrobianos tales como los derivados vegetales como conservantes en alimentos para cumplir esta necesidad. Se considera que tales extractos vegetales son deseables porque se considera que son naturales. Además, desde un punto de vista regulatorio, debido al largo periodo de uso, los extractos vegetales tienen normalmente un estado de GRAS (generalmente reconocido como seguro). También hay un deseo continuado de proporcionar protección microbiana usando cantidades menores de materiales antimicrobianos. Por tanto, existe una necesidad de proporcionar nuevos materiales antimicrobianos o nuevas combinaciones más eficaces de materiales antimicrobianos.

40 A pesar de sus orígenes naturales, es deseable que los productos antimicrobianos de las plantas se usen en las menores cantidades posibles. Esto es deseable no sólo por motivos de coste sino también para cumplir con el deseo de los consumidores de minimizar la cantidad de "aditivos" en productos alimenticios. Además, muchos materiales vegetales tienen un sabor asociado. Por tanto en muchas aplicaciones alimenticias exigentes la reducción de la cantidad de protector de origen vegetal es ventajosa.

45 La presente invención trata estos y otros objetivos.

50 En un aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende (a) isotiocianato de ajo; y (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

55 En un aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el material con (a) isotiocianato de ajo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

60 En un aspecto la presente invención proporciona un uso de (a) isotiocianato de ajo; un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*]; para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material.

65 En un aspecto la presente invención proporciona un kit para preparar una composición de la invención, comprendiendo el kit; (a) isotiocianato de ajo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*] en envases o recipientes separados; opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o puesta en contacto y/o uso.

En un aspecto la presente invención proporciona un producto alimenticio que comprende una composición

protectora que comprende (a) isotiocianato de alilo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

En el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas se definen aspectos adicionales de la invención.

La presente invención proporciona una combinación sinérgica de componentes para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material, tal como producto alimenticio. Esta combinación de componentes permite usar niveles menores de agentes activos constitutivos, tales como niveles menores de (a) isotiocianato de alilo; y/o (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y/o (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*], para proporcionar una acción eficaz y prevenir el desarrollo de tolerancia al material antimicrobiano. Esto es particularmente importante en aplicaciones alimenticias en las que se desea reducir la dosificación y/o evitar el desarrollo de tolerancia por motivos comerciales y regulatorios. La interacción sinérgica es de particular interés debido al hecho de que con cantidades relativamente pequeñas de diferentes compuestos, minimizando así el impacto de sus propiedades negativas, puede lograrse un efecto antimicrobiano relativamente grande. Además, una combinación de agentes antimicrobianos principales ayudará a seleccionar como diana una gama más amplia de organismos microbianos, puesto que dada la complejidad metabólica de las células microbianas, ya sean procariotas (bacterias) o eucariotas (levaduras y hongos), es muy poco probable que una única sustancia realice todas las acciones. Además, el desarrollo de resistencia de poblaciones microbianas contra una combinación de compuestos activos es menos probable.

Con respecto al material específico usado en la presente invención, concretamente (a) isotiocianato de alilo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*], cada uno de los componentes tiene propiedades desfavorables. Por ejemplo, el uso de isotiocianato de alilo está actualmente limitado debido a su aroma irritante para el seno con sabor a mostaza apreciable a concentraciones extremadamente bajas. El uso de extracto de té verde [*Camellia sinensis*] en altas concentraciones puede afrontar restricciones reguladoras ya que se necesita tener en cuenta los valores de ingesta diaria aceptable (ADI) de catequinas componentes.

Por facilidad de referencia, ahora se comentan estos y otros aspectos de la presente invención con títulos de sección apropiados. Sin embargo, las enseñanzas en cada sección no se limitan necesariamente a cada sección particular.

Aspectos preferidos

ÁCIDO ORGÁNICO

Tal como se comenta en el presente documento la presente invención usa un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos

En un aspecto el ácido orgánico es ácido acético. En un aspecto el ácido orgánico es ácido propiónico. En un aspecto preferido el ácido orgánico es una mezcla de ácido acético y ácido propiónico.

El ácido acético y/o ácido propiónico puede prepararse mediante cualquier procedimiento conocido o proporcionarse a partir de cualquier fuente. Sin embargo, para proporcionar estos componentes de una fuente natural se prefiere que se obtengan de un producto cultivado. Por tanto en un aspecto preferido el ácido orgánico se proporciona en forma de, o a partir de, un fermento de cultivo. En un aspecto preferido el ácido acético se proporciona en forma de, o a partir de, un fermento de cultivo. En un aspecto preferido el ácido propiónico se proporciona en forma de, o a partir de, un fermento de cultivo. En un aspecto preferido el ácido acético y ácido propiónico se proporcionan en forma de, o a partir de, un fermento de cultivo.

Un experto en la técnica apreciará que el fermento de cultivo puede ser de cualquier microorganismo adecuado para proporcionar el/los ácido(s) orgánico(s) deseado(s). En un aspecto el fermento de cultivo se prepara a partir de una o más cepas seleccionadas de *Propionibacterium shermanii*, *Lactobacillus acidophilus*; *Propionibacterium acidipropionici* y combinaciones de las mismas. En un aspecto el fermento de cultivo se prepara a partir de una o más cepas de *Propionibacterium shermanii*. En un aspecto el fermento de cultivo se prepara a partir de una o más cepas de *Lactobacillus acidophilus*. En un aspecto el fermento de cultivo se prepara a partir de una o más cepas de *Propionibacterium acidipropionici*. En un aspecto el fermento de cultivo se prepara a partir de una combinación de una o más cepas de *Propionibacterium acidipropionici* y una o más cepas de *Lactobacillus acidophilus*.

Los microorganismos adecuados adicionales a partir de los cuales puede(n) prepararse el/los ácido(s) orgánico(s) deseado(s) como fermento de cultivo incluyen *Propionibacterium freudenreichii*; *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus cellobios*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus reuteri*.

Un fermento de cultivo preferido es un producto fermentado en el que los componentes activos son ácido acético en

una cantidad del 12 - 15 % en peso basándose en el producto fermentado y ácido propiónico en una cantidad del 20 - 25% en peso basándose en el producto fermentado. Un fermento de cultivo preferido es un producto fermentado en el que los componentes activos son ácido acético en una cantidad del 7 - 8% en peso basándose en el producto fermentado y ácido propiónico en una cantidad del 2,5 - 4% en peso basándose en el producto fermentado. Un fermento de cultivo preferido es un producto de dextrosa cultivado, en el que los componentes activos son ácido acético en una cantidad del 7 - 8% en peso basándose en el producto fermentado y ácido propiónico en una cantidad del 2,5 - 4% en peso basándose en el producto fermentado.

El ácido orgánico puede estar presente en cualquier cantidad para proporcionar el efecto microbicida o microbiostático requerido. Este efecto puede estar normalmente en el material final en el que va a inhibirse el crecimiento microbiano. Por tanto cuando la presente invención proporciona una composición protectora el ácido orgánico puede estar presente en una cantidad tal que cuando se añade la composición al material que va a "protegerse" en las cantidades indicadas, el ácido orgánico está presente en una cantidad en el material que va a protegerse para proporcionar el efecto microbicida o microbiostático requerido.

En un aspecto el ácido orgánico está presente en una cantidad para proporcionar un efecto microbicida o microbiostático.

En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el ácido orgánico en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de al menos el 1% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de al menos el 2% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de al menos el 3% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de al menos el 5% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de al menos el 6% en peso basándose en la composición. En estos y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el ácido orgánico en una cantidad de no más del 15% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de no más del 12% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de no más del 10% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de no más del 8% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad de no más del 7% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el ácido orgánico en una cantidad del 0,5 al 15% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el ácido orgánico en una cantidad del 0,5 al 12% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 1 al 15% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 2 al 15% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 3 al 12% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 5 al 12% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 3 al 10% en peso basándose en la composición. El ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 5 al 10% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido orgánico puede estar presente en una cantidad del 6 al 10% en peso basándose en la composición.

En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el ácido acético en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad de al menos el 1% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad de al menos el 2% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad de al menos el 2,5% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad de al menos el 3% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido acético puede estar presente en una cantidad de al menos el 4% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el ácido acético en una cantidad del 0,5 al 10% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 1 al 10% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 2 al 10% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 2,5 al 10% en peso basándose en la composición. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 3 al 8% en peso. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 5 al 8% en peso. El ácido acético puede estar presente en una cantidad del 3 al 7% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido acético puede estar presente en una cantidad del 4 al 6% en peso basándose en la composición.

En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el ácido propiónico en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,2% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad de al menos el 1,2% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido propiónico puede estar presente en una cantidad de al menos el 1,5% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el ácido

5 propiónico en una cantidad del 0,1 al 5% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 0,2 al 5% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 0,5 al 3% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,0 al 3% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,0 al 2,5% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,0 al 2% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,5 al 3% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,5 al 2,5% en peso basándose en la composición. El ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 1,5 al 2% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el ácido propiónico puede estar presente en una cantidad del 4 al 6% en peso basándose en la composición.

EXTRACTO DE TÉ VERDE

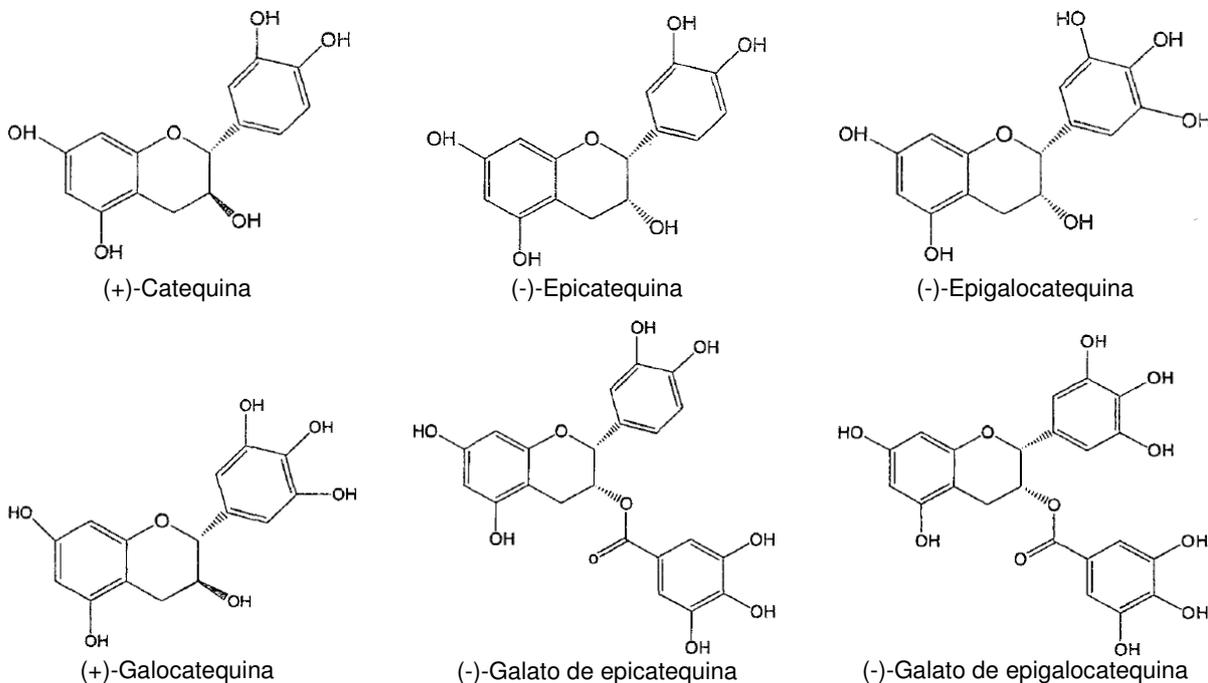
15 Tal como se comenta en el presente documento la composición comprende extracto de té verde [*Camellia sinensis*]. Un experto en la técnica entenderá que todas las referencias en el presente documento a extracto de té verde significan un extracto de una planta de la especie *Camellia sinensis*.

20 Un experto en la técnica apreciará que por el término “extracto” o “extractos” quiere decirse cualquier constituyente de la planta que puede aislarse de la planta entera.

En un aspecto preferido por el término “extracto” o “extractos” de té verde quiere decirse una hoja de la planta o un constituyente que puede aislarse de la hoja de la planta entera.

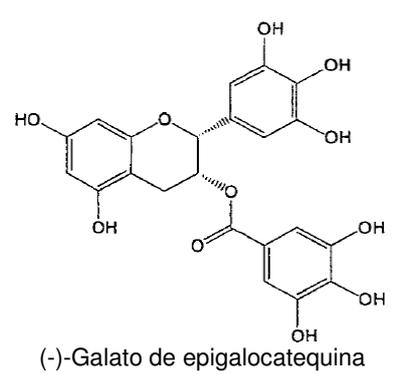
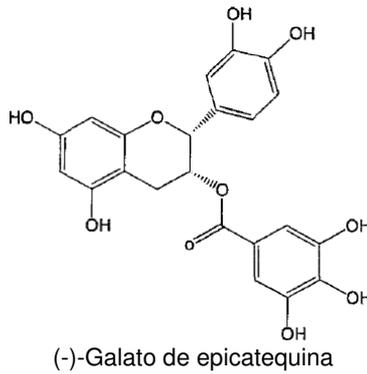
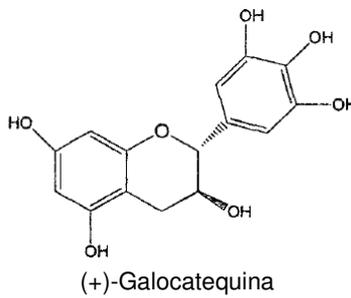
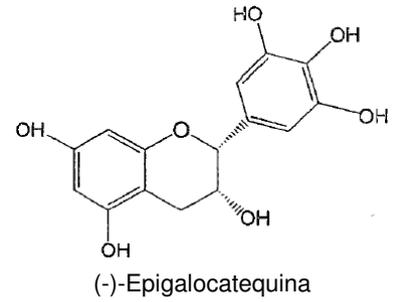
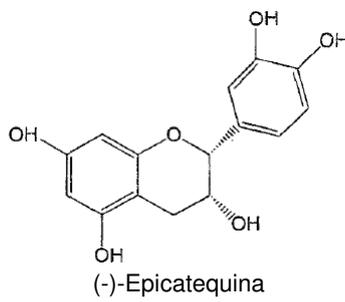
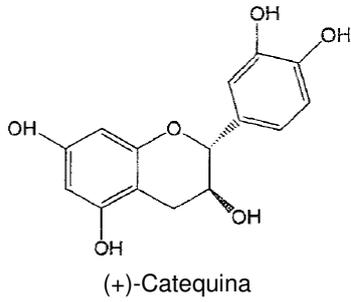
25 Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido las propiedades beneficiosas para la salud del té verde (*Camellia sinensis*) y polifenoles del té incluyendo antioxidación y actividad antimicrobiana [Kubo *et al.*]. En resumen, las catequinas (flavonoides) son un componente principal del té verde. Según YAM *et al.* (1997) las catequinas y sus galatos son los principales restos químicos responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de té verde, siendo las sustancias que tienen configuración epi aparentemente más activas [Yam *et al.*, Ikigai *et al.*, Kajiya *et al.*].

30 En un aspecto preferido el extracto de té verde es un polifenol del té. Preferiblemente el extracto de té verde es una catequina. En un aspecto altamente preferido el extracto de té verde es un compuesto seleccionado de



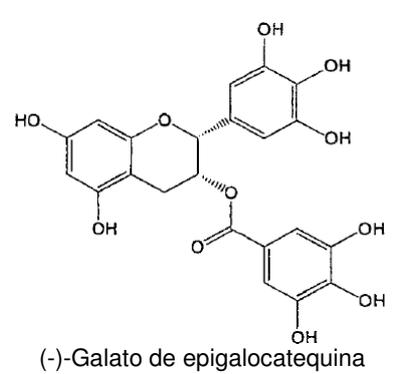
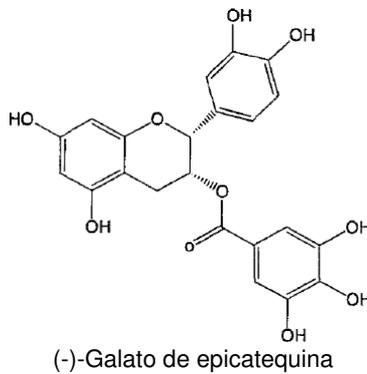
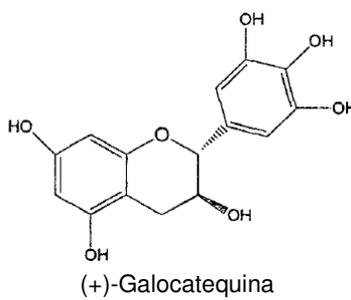
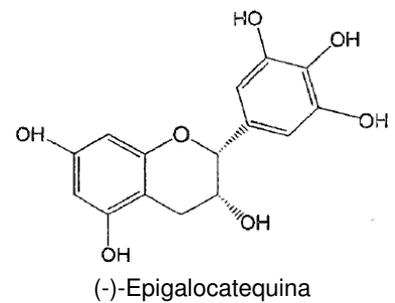
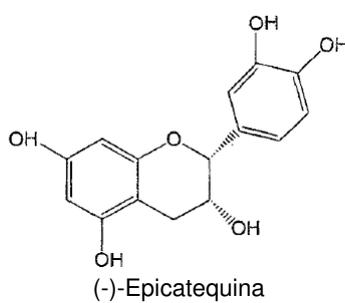
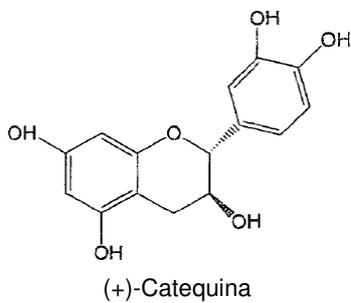
35 y mezclas de los mismos. Estos seis compuestos se denominan en el presente documento catequinas de té verde o catequinas de extracto de té verde. El extracto de té verde contiene estas seis catequinas en una cantidad combinada de aproximadamente el 75% en peso basándose en el extracto de té verde. Un experto en la técnica apreciará que los compuestos anteriores, aunque de manera ideal se aíslan de una planta de té verde, pueden obtenerse por rutas sintéticas. Por tanto en un aspecto la presente invención puede proporcionar

40 • una composición que comprende (a) isotiocianato de alilo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) un compuesto seleccionado de



y mezclas de los mismos

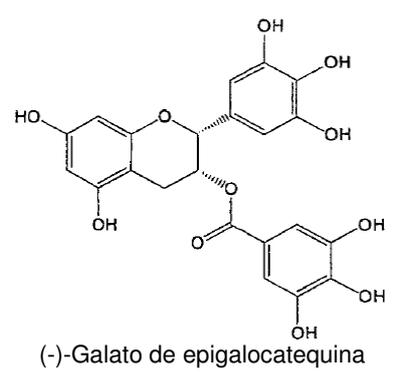
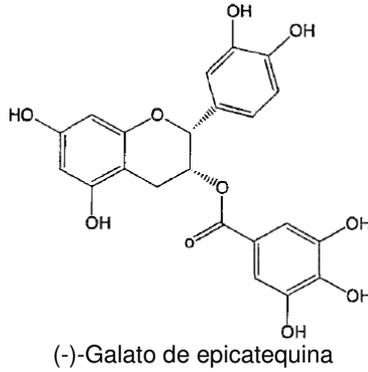
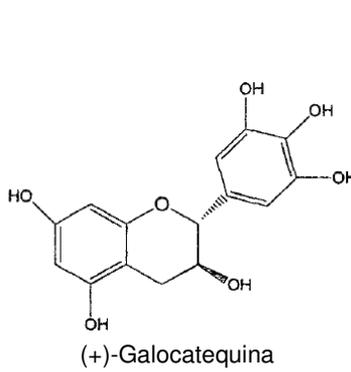
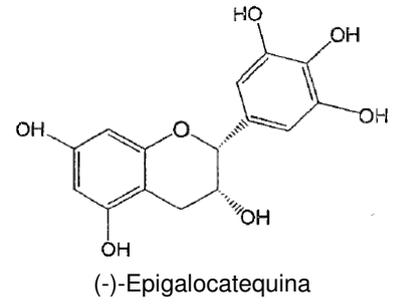
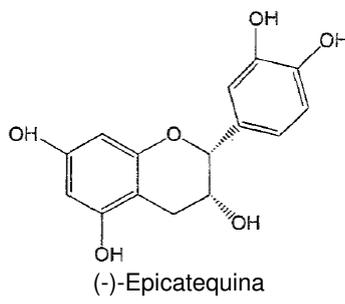
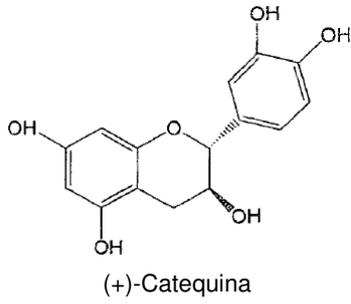
- 5 • un procedimiento para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el material con (a) isotiocianato de ajo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y (c) un compuesto seleccionado de



10 y mezclas de los mismos

- uso de (a) isotiocianato de ajo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y (c) un compuesto seleccionado de

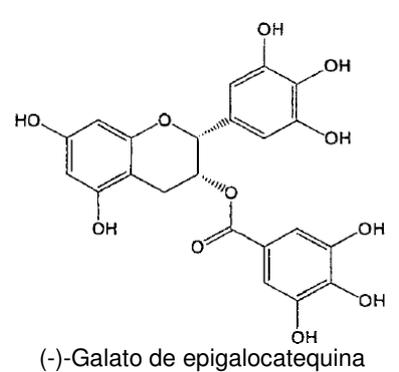
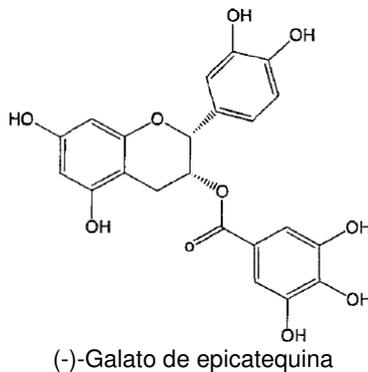
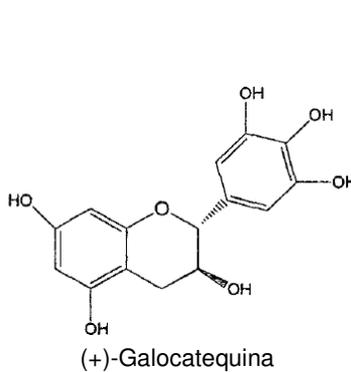
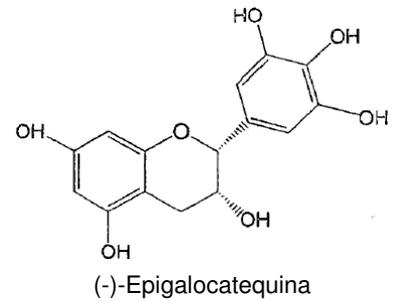
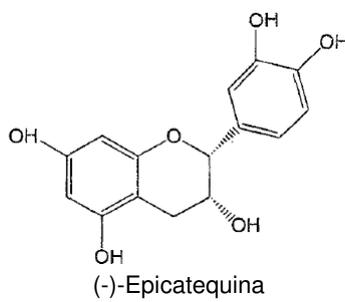
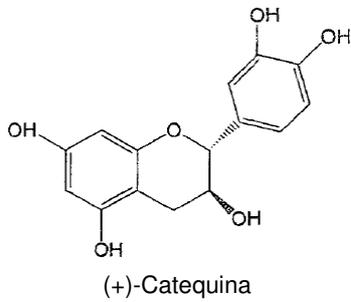
15



y mezclas de los mismos

para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material.

- 5
- un kit para preparar una composición de la invención, comprendiendo el kit; (a) isotiocianato de ajo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) un compuesto seleccionado de

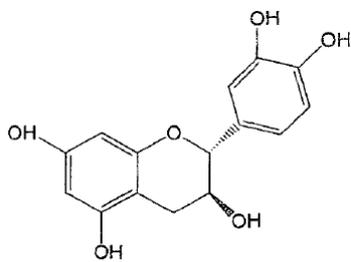


10 y mezclas de los mismos

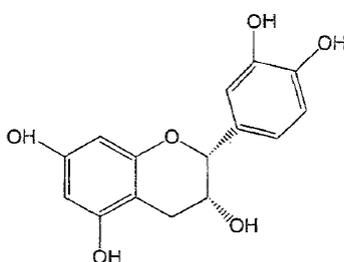
en envases o recipientes separados; opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o puesta en contacto y/o uso.

15

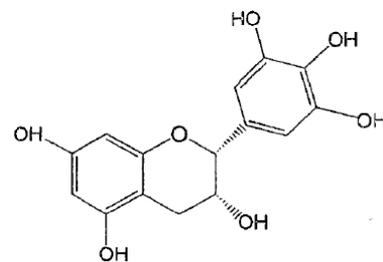
- un producto alimenticio que comprende una composición protectora que comprende (a) isotiocianato de alilo; (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y que comprende además (c) un compuesto seleccionado de



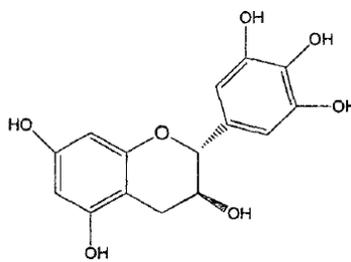
(+)-Catequina



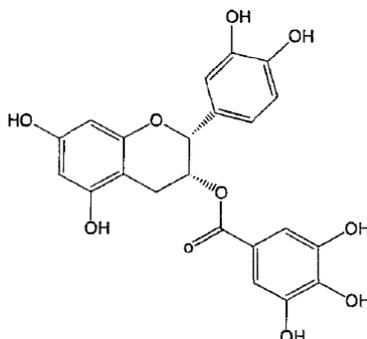
(-)-Epicatequina



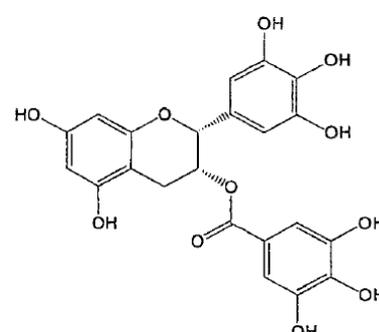
(-)-Epigallocatequina



(+)-Galocatequina



(-)-Galato de epicatequina



(-)-Galato de epigallocatequina

5 y mezclas de los mismos

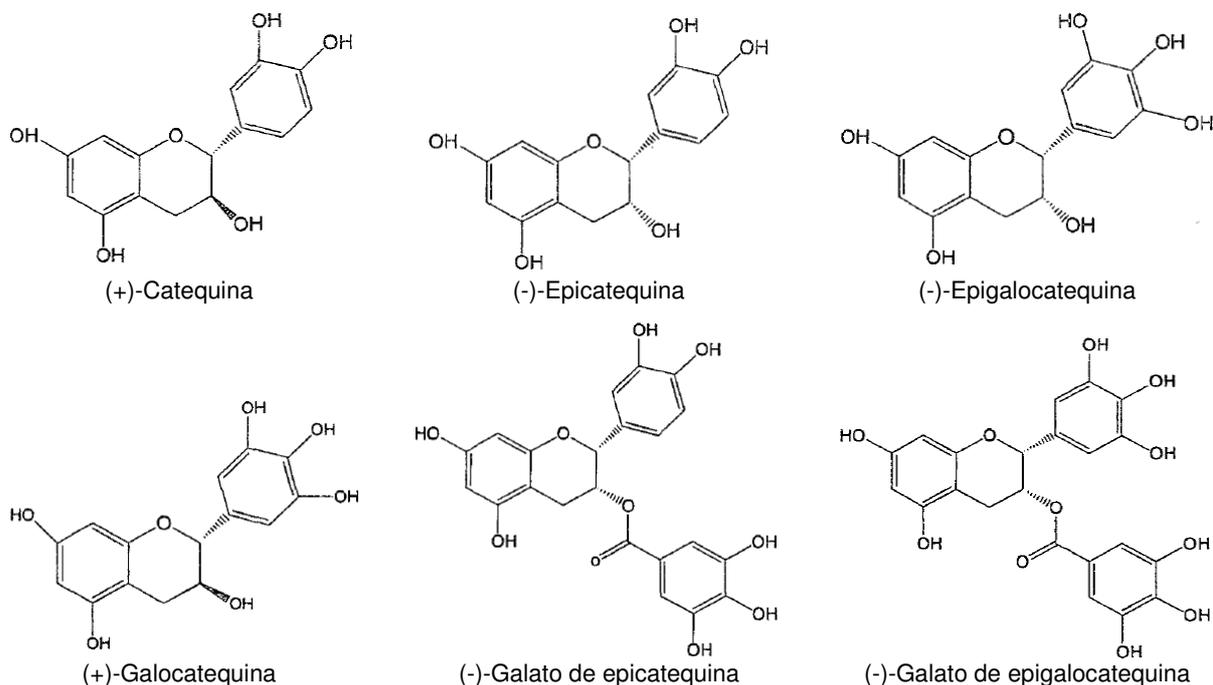
10 El extracto de té verde puede estar presente en cualquier cantidad para proporcionar el efecto microbicida o microbiostático requerido. Este efecto puede estar normalmente en el material final en el que va a inhibirse el crecimiento microbiano. Por tanto cuando la presente invención proporciona una composición protectora el extracto de té verde puede estar presente en una cantidad tal que cuando se añade la composición al material que va a "protegerse" en las cantidades indicadas, el extracto de té verde está presente en una cantidad en el material que va a protegerse para proporcionar el efecto microbicida o microbiostático requerido.

15 En un aspecto el extracto de té verde está presente en una cantidad para proporcionar un efecto microbicida o microbiostático.

20 Un experto en la técnica aprecia que las cantidades de extracto de té verde se indican normalmente mediante la cantidad de catequinas proporcionadas por el extracto de té verde. A continuación se facilitan cantidades adecuadas de extracto de té verde para su uso en la presente invención. En un aspecto preferido las cantidades de extracto de té verde mencionadas en el presente documento se basan en un extracto de té verde que contiene el 75% en peso catequinas. En este aspecto, un experto en la técnica puede modificar las cantidades mencionadas en el presente documento si el extracto de té verde que esté usándose contiene catequinas en una cantidad superior o inferior al 75% en peso.

25 En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el extracto de té verde en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,2% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad de al menos el 1,5% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el extracto de té verde puede estar presente en una cantidad de al menos el 2,0% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el extracto de té verde en una cantidad del 0,1 al 5% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad del 0,2 al 5% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad del 0,5 al 3% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad del 1,0 al 3% en peso basándose en la composición. El extracto de té verde puede estar presente en una cantidad del 1,5 al 3% en peso basándose en la composición.

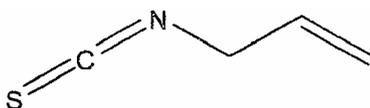
40 En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente las catequinas de extracto de té verde, concretamente



en una cantidad combinada de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada de al menos el 0,2% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada de al menos el 1,5% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada de al menos el 2,0% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender las catequinas de extracto de té verde en una cantidad combinada del 0,1 al 5% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 0,2 al 3% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 0,5 al 3% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 1,0 al 3% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 1,5 al 2,5% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 2,0 al 2,5% en peso basándose en la composición. Las catequinas de extracto de té verde pueden estar presentes en una cantidad combinada del 2,1 al 2,3% en peso basándose en la composición.

ISOTIOCIANATO DE ALILO

Tal como se comenta en el presente documento la composición comprende isotiocianato de alilo (AITC). La estructura del isotiocianato de alilo es



El isotiocianato de alilo también puede denominarse aceites esenciales de mostaza y se sabe que tiene propiedades bacterianas y fungistáticas. Los aceites esenciales (EO) son generalmente líquidos hidrófobos que contienen compuestos aromáticos. Muestran actividad antimicrobiana, principalmente debido a su carácter fenólico [3]. Por tanto, en un aspecto el isotiocianato de alilo se obtiene de semilla de mostaza. En un aspecto el isotiocianato de alilo se obtiene de semillas de mostaza negra (*Brassica nigra*) o de mostaza india marrón (*Brassica juncea*).

En un aspecto la composición es una composición protectora antimicrobiana. En este y en otros aspectos la composición comprende preferiblemente el isotiocianato de alilo en una cantidad de al menos el 0,01% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,05% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad de al

menos el 0,15% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,2% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,25% en peso basándose en la composición. La composición puede comprender el isotiocianato de alilo en una cantidad del 0,01 al 1% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,05 al 1% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,1 al 1% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,1 al 0,5% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,2 al 0,5% en peso basándose en la composición. El isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,2 al 0,4% en peso basándose en la composición. Aún adicionalmente el isotiocianato de alilo puede estar presente en una cantidad del 0,2 al 0,3% en peso basándose en la composición.

COMPOSICIÓN

15 La presente invención proporciona una composición que comprende

(a) isotiocianato de alilo;

20 (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y

(c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

Cada una de las cantidades preferidas de cada uno de (a), (b) y (c) pueden combinarse para proporcionar una composición preferida. En un aspecto la composición comprende

25

- isotiocianato de alilo en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición;

- ácido acético en una cantidad de al menos el 2% en peso basándose en la composición;

30 - ácido propiónico en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición; y

- extracto de té verde en una cantidad de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición.

Una composición preferida comprende

35

(a) isotiocianato de alilo;

(b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos y

40 (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*]

en una cantidad para proporcionar un efecto sinérgico microbicida o microbiostático con respecto a levaduras, moho o tanto levaduras como moho. En un aspecto preferido adicional los materiales están presentes en una cantidad para proporcionar un efecto sinérgico microbicida o microbiostático (i) con respecto a levaduras, moho o tanto levaduras como moho y (ii) con respecto a bacterias gram-negativas.

45

La composición de la presente invención puede usarse en cualquier aplicación requerida. En un aspecto la composición es una composición protectora adecuada para su adición a un producto alimenticio.

50 La composición de la presente invención o la composición para su uso en la presente invención pueden contener uno o más componentes adicionales. Sin embargo, en algunos aspectos la composición protectora de la presente invención (adecuada para su adición a un producto alimenticio) no contiene ningún componente adicional o no contiene ningún componente adicional que afecte significativamente a las propiedades de la composición.

55 La composición de la presente invención o la composición para su uso en la presente invención pueden contener uno o más componentes adicionales seleccionados de cultivos, subproductos de fermentación, bacteriocinas, extractos vegetales, enzimas, ácidos orgánicos y mezclas de los mismos. Los cultivos preferidos incluyen producto fermentado de *Lactococcus lactis* y producto fermentado de *Lactobacillus sakei*. Los metabolitos refinados preferidos incluyen MicroGARD CS1-50, CM1-50, Nisaplin, nisina, pediocina y sakacina. A continuación se indican extractos vegetales preferidos. Las enzimas preferidas incluyen lisozima de clara de huevo. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen ácido láctico.

60

En un aspecto preferido la composición comprende además un extracto vegetal (adicional). Preferiblemente el extracto vegetal se selecciona de extracto de lúpulo (incluyendo ácidos alfa y beta, humulones y lupulones), extracto de romero (incluyendo ácido carnósico), vainillina, extracto de canela (incluyendo aldehído trans-cinámico), extracto de corteza de pino, extracto de uva, resveratrol, pinosilvina, castaño de indias, salvia, timol, extracto de yuca,

65

arándano y bioflavonoides cítricos.

En un aspecto preferido la composición comprende además un emulsionante. Preferiblemente el emulsionante se selecciona de ésteres de polioxietilensorbitano (E432-E436) también conocidos como polisorbatos (por ejemplo Tween 80, Tween 20), monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de ácido acético de mono-diglicéridos, ésteres de ácido tartárico de mono-diglicéridos y ésteres de ácido cítrico de mono-diglicéridos.

En un aspecto preferido la composición comprende además un quelante. Preferiblemente el quelante se selecciona de EDTA, ácido cítrico, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos y polifosfatos.

En el documento US 5573801 se enseñan quelantes adecuados adicionales e incluyen ácidos carboxílicos, ácidos policarboxílicos, aminoácidos y fosfatos. En particular, los siguientes compuestos y sus sales pueden ser útiles:

ácido acético, adenina, ácido adípico, ADP, alanina, B-alanina, albúmina, arginina, ácido ascórbico, asparagina, ácido aspártico, ATP, ácido benzoico, ácido n-butírico, caseína, ácido citracónico, ácido cítrico, cisteína, ácido deshidroacético, desferri-ferricrisina, desferri-ferricromo, desferri-ferrioxamina E, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), dimetilglioxima, O,O-dimetilpurpurogalina, EDTA, ácido fórmico, ácido fumárico, globulina, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glutárico, glicina, ácido glicólico, glicilglicina, glicilsarcosina, guanosina, histamina, histidina, 3-hidroxiflavona, inosina, trifosfato de inosina, ferricromo libre de hierro, ácido isovalérico, ácido itacónico, ácido kójico, ácido láctico, leucina, lisina, ácido maleico, ácido málico, metionina, metilsalicilato, ácido nitrilotriacético (NTA), ornitina, ortofosfato, ácido oxálico, oxiestearina, B-fenilalanina, ácido fosfórico, fitato, ácido pimélico, ácido piválico, polifosfato, prolina, ácido propiónico, purina, pirofosfato, ácido pirúvico, riboflavina, salicilaldehído, ácido salicílico, sarcosina, serina, sorbitol, ácido succínico, ácido tartárico, tetrametafosfato, tiosulfato, treonina, trimetafosfato, trifosfato, triptófano, difosfato de uridina, trifosfato de uridina, ácido n-valérico, valina, vainillina y xantósina.

Muchos de los agentes secuestrantes anteriores son útiles en el procesamiento de alimentos en sus formas de sales, que son comúnmente sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como sodio, potasio o calcio o sales de amonio cuaternario. Pueden usarse de manera beneficiosa compuestos secuestrantes con múltiples valencias para ajustar el pH o introducir o retirar selectivamente iones metálicos por ejemplo en un recubrimiento de sistemas alimenticios. Se dan a conocer quelantes con información adicional en T. E. Furia (Ed.), CRC Handbook of Food Additives, 2ª ed., págs. 271-294 (1972, Chemical Rubber Co.), y M. S. Peterson and A. M. Johnson (Eds.), Encyclopaedia of Food Science, págs. 694-699 (1978, AVI Publishing Company, Inc.), artículos que se incorporan ambos en el presente documento como referencia.

El término "quelante" se define como compuestos orgánicos o inorgánicos que pueden formar complejos de coordinación con metales. Además, según se usa el término "quelante" en el presente documento, incluye compuestos de encapsulación molecular tales como ciclodextrina o maltodextrina. El quelante puede ser orgánico o inorgánico, pero preferiblemente es orgánico.

Los quelantes preferidos no son tóxicos para mamíferos e incluyen ácidos aminopolicarboxílicos y sus sales tales como ácido etilendiaminatetraácido (EDTA) o sus sales (particularmente sus sales de di y tri-sodio), y ácidos hidrocarboxílicos y sus sales tales como ácido cítrico. Sin embargo, también se cree que quelantes de ácidos hidrocarboxílicos distintos de ácido cítrico y distintos de citrato son útiles en la presente invención tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido tartárico y sus sales.

Tal como se indicó anteriormente, el término "quelante" se define y se usa en el presente documento como sinónimo de agente secuestrante y también se define como que incluye compuestos de encapsulación molecular tales como ciclodextrina. Las ciclodextrinas son moléculas de hidratos de carbono cíclicas que tienen seis, siete u ocho monómeros de glucosa dispuestos en un anillo en forma de donut, que se denominan alfa, beta o gamma-ciclodextrina, respectivamente. Tal como se usa en el presente documento, la ciclodextrina se refiere a monómeros y polímeros de ciclodextrina tanto no modificados como modificados. Los agentes de encapsulación molecular de ciclodextrinas están disponibles comercialmente de American Maize-Products of Hammond, Ind. Las ciclodextrinas se describen adicionalmente en el capítulo 11 titulado "Industrial Applications of Cyclodextrin", de J. Szejtli, página 331-390 de Inclusion Compounds, Vol. III (Academic Press, 1984), capítulo que se incorpora en el presente documento como referencia.

En un aspecto preferido el isotiocianato de alilo se compleja con ciclodextrina. En este aspecto el isotiocianato de alilo se proporciona entonces fácilmente en forma de polvo.

En un aspecto preferido el ácido orgánico se mezcla con maltodextrina.

En un aspecto preferido el extracto de té verde se mezcla con maltodextrina. En este aspecto el extracto de té verde puede proporcionarse más fácilmente en forma normalizada.

Preferiblemente el quelante potencia la actividad antimicrobiana y/o el espectro antimicrobiano del material

antimicrobiano. Más preferiblemente el quelante potencia la actividad antimicrobiana y/o el espectro antimicrobiano del material antimicrobiano con respecto a bacterias gram-negativas y otros microorganismos.

5 En un aspecto preferido la composición comprende además una enzima lítica. Preferiblemente la enzima lítica es una lisozima.

MICROORGANISMOS

10 En el contexto de la presente invención se pretende que el término "antimicrobiano" signifique que hay un efecto bactericida y/o bacteriostático y/o fungicida y/o fungistático y/o un efecto virucida, en el que:

El término "bactericida" debe entenderse como que puede destruir células bacterianas.

15 El término "bacteriostático" debe entenderse como que puede inhibir el crecimiento bacteriano, es decir inhibir células bacterianas en crecimiento.

El término "fungicida" debe entenderse como que puede destruir células fúngicas.

20 El término "fungistático" debe entenderse como que puede inhibir el crecimiento fúngico, es decir inhibir células fúngicas en crecimiento.

El término "virucida" debe entenderse como que puede inactivar virus.

25 El término "células microbianas" indica células bacterianas o fúngicas, y el término microorganismo indica un hongo (incluyendo levaduras) o una bacteria.

En el contexto de la presente invención se pretende que el término "inhibir el crecimiento de células microbianas" signifique que las células están en el estado no de crecimiento, es decir, no pueden propagarse.

30 Tal como se comenta en el presente documento la presente invención puede prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material. Esto puede ser ralentizando o deteniendo un microorganismo, tal como bacterias, o destruyendo el microorganismo presente al entrar en contacto con la presente composición.

35 En un aspecto altamente preferido el efecto microbicida o microbiostático es un efecto bactericida o bacteriostático.

Resulta ventajoso que el efecto microbicida o microbiostático sea con respecto a levaduras, moho o tanto levaduras como moho. Preferiblemente el efecto microbicida o microbiostático es (i) con respecto a levaduras, moho o tanto levaduras como moho y (ii) con respecto a bacterias gram-negativas.

40 En un aspecto preferido el efecto microbicida o microbiostático es con respecto a un organismo seleccionado de especies de *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium spp.* y *Pseudomonas fluorescens*.

45 En un aspecto preferido el efecto microbicida o microbiostático es con respecto a un organismo seleccionado de especies de *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus parasiticus* y *Pseudomonas fluorescens*.

PRODUCTO ALIMENTICIO

50 La composición, el procedimiento y el uso de la presente invención pueden prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en cualquier material. Sin embargo, en vista de los problemas asociados con el deterioro y la contaminación de productos alimenticios y en vista de la eficacia particular de la presente invención en productos alimenticios, preferiblemente la composición es un producto alimenticio o puede añadirse a un producto alimenticio. Los componentes pueden haberse añadido al producto alimenticio de manera secuencial. En un aspecto adicional uno o más de los componentes pueden haberse formado *in situ* en el producto alimenticio. Por ejemplo el 55 ácido orgánico y/o AITC pueden formarse *in situ* en el producto alimenticio.

60 La presente invención puede abarcar además el uso de una composición antimicrobiana tal como se define en el presente documento en alimentos y/o composiciones enzimáticas alimenticias, y puede abarcar alimentos y/o composiciones alimenticias que comprenden una composición antimicrobiana tal como se define en el presente documento. Tales composiciones pueden contener uno o más aditivos o ingredientes alimenticios adicionales. Mediante formulación de la composición antimicrobiana de la invención dentro de un alimento y/o composición alimenticia, la composición puede estabilizarse para permitir un almacenamiento prolongado (en condiciones adecuadas) antes de su uso en alimentos y/o producción alimenticia. Además la composición antimicrobiana de la presente invención proporciona agentes antimicrobianos en una forma adecuada para su uso seguro para la 65 aplicación en la preparación de productos alimenticios y/o piensos, o ingredientes para su uso en alimentos y/o preparación alimenticia. Tales composiciones pueden estar en forma líquida, semilíquida, cristalina, de sales o

sólida/granular.

En un aspecto la composición de la presente invención es una composición protectora antimicrobiana adecuada para su adición a un producto alimenticio.

5 Muchos productos alimenticios pueden protegerse mediante la presente invención. Productos alimenticios típicos son:

10 Salsas de mesa - salsas que se usan como salsas de mesa, incluyendo salsas para múltiples propósitos y que pueden usarse como salsas de mesa, adobo y/o salsa para cocinar (por ejemplo al saltear, cocinar al vapor, etc.), tales como salsa picante, incluyendo salsa picante fresca, o salsa barbacoa (BBQ). Existen diversos tipos de salsas fermentadas en diferentes regiones y se incluyen diferentes variantes para cada país. Los ejemplos incluyen salsa española, salsa de chile, Worcester, ciruela, menta para carne, salsa tártara, salsa de manzana para carne, salsa de rábano, arándanos para carne, etc. y ostras, salsa hoisin, etc.

15 Salsas a base de soja – Salsas fermentadas a base de soja. Los ejemplos incluyen salsa de soja oscura y salsa de soja clara, salsas a base de soja combinadas, por ejemplo, teriyaki (salsa de soja combinada con adición de azúcar y mirin), sukiyaki (con adición de azúcar, mirin y caldo de carne), yakitori (con adición de mirin, sake, azúcar).

20 Salsas para pasta – o bien añadida directamente a la pasta cocinada o bien calentada previamente durante unos minutos, o alternativamente añadida a ingredientes frescos, por ejemplo carne o verduras, y calentada para preparar una salsa que entonces se añadirá a pasta cocinada. Los ejemplos incluyen boloñesa, carbonara, de champiñones, de tomate, de verduras, pesto, etc.

25 Salsas líquidas/para cocinar – Salsas/pastas para cocinar para receta líquidas (es decir no deshidratadas) que se añaden a ingredientes (carne y/o verduras) para producir una comida. Esto incluye salsas/pasta para receta que pueden añadirse antes del procedimiento de cocinado (adobos) y/o durante el procedimiento de cocinado (por ejemplo al vapor, a la parrilla, salteado, estofado, etc.).

30 Salsas deshidratadas/mezclas en polvo – Salsas deshidratadas a las que se les añade agua hirviendo o leche antes de su consumo. Aquí se incluyen mezclas en polvo para receta y adobos en polvo deshidratados. Algunas salsas deshidratadas pueden requerir calentar en la estufa para que la salsa se espese tras añadirle agua/leche. Los ejemplos incluyen salsa holandesa, salsa blanca, salsa a la pimienta, salsa agrídulce, boloñesa para espaguetis, etc.

35 Aliños para ensalada habituales (convencionales fáciles de preparar). También se incluyen aliños para ensalada deshidratados (es decir polvos envasados en sobres que se mezclan con aceite/vinagre) aunque no están en una forma lista para comer. Los ejemplos incluyen productos a base de aceite, mil islas, queso azul, salsa Cesar, crema para ensaladas, aliño ranchero, etc.

40 Aliños para ensalada bajos en grasas. Los ejemplos incluyen productos a base de aceite, mil islas, queso azul, Cesar, crema para ensaladas, aliño ranchero, etc.

45 Vinagretas. Incluye todos los aliños para ensaladas basados en vinagre. Los ejemplos incluyen vinagreta.

50 Otras salsas, aliños y condimentos. Los ejemplos incluyen 1) salsas de mesa no fermentadas, 2) wasabi, 3) pastas, purés no para receta (por ejemplo purés/pastas de ajo), 4) adobos deshidratados, 5) mezclas en polvo para receta deshidratadas (por ejemplo mezcla picante para fajitas), 5) rebozado/recubrimiento para receta deshidratado (usado para cocinar, por ejemplo, freír, cocinar a la parrilla, hornear).

55 Sopas: Sopa en lata – Incluye todas las variedades de sopa en lata en forma lista para comer o condensada (debe añadirse agua). La sopa lista para comer o condensada en bricks o envases flexibles herméticos también se clasifican como sopa UHT. Los ejemplos incluyen verduras mixtas, guisantes, puerro, pescado, champiñones, tomate, sopa de pollo, sopa de carne, sopa de ternera, pollo y champiñones, eintopf, etc.

60 Sopa deshidratada – Sopa en polvo a la que se le añade agua, y después se cocina durante varios minutos antes de consumirla.

60 Sopa instantánea – Sopa en polvo a la que se le añade agua hirviendo justo antes de consumirla.

Sopa enfriada. Sopa preparada a partir de ingredientes frescos y almacenada en armarios refrigeradores. Estos productos tienen habitualmente un término de caducidad limitado.

65 Sopa UHT. Incluye todas las variedades de sopa en forma lista para comer o condensada (debe añadirse agua) vendidas a temperatura ambiente (es decir no almacenadas en armarios refrigeradores). Los tipos de

producto incluyen verduras mixtas, guisantes, puerro, pescado, champiñones, tomate, sopa de pollo, sopa de carne, sopa de ternera, pollo y champiñones.

5 Sopa congelada. Incluye todas las variedades de sopa vendidas en forma congelada. Los tipos de producto incluyen verduras mixtas, guisantes, puerro, pescado, champiñones, tomate, sopa de pollo, sopa de carne, sopa de ternera, pollo y champiñones, eintopf, etc.

Las áreas de aplicación adicionales incluyen

10 - productos horneados, incluyendo productos de panadería fina, productos de panadería fina con humedad intermedia y alta tales como magdalenas, tortillas, gofres, tortitas, pizzas, pasteles, bizcochos y similares,

- bebidas, incluyendo bebidas que contienen frutas, que contienen verduras y que contienen productos lácteos

15 - productos lácteos incluyendo yogurt, nata agria, quesos, requesón

- preparaciones de frutas, mermeladas, gelatinas, conservas

20 - comidas preparadas refrigeradas y congeladas (que contienen carne/verduras/cereales), salsas para untar (que contienen verduras/productos lácteos/cereales), ensaladas deli y otros acompañamientos preparados (que contienen carne/verduras/cereales).

25 En un aspecto el producto alimenticio se selecciona de salsa picante, salsa barbacoa (BBQ) y aliño ranchero. En un aspecto el producto alimenticio es salsa picante. En un aspecto el producto alimenticio es salsa barbacoa (BBQ). En un aspecto el producto alimenticio es aliño ranchero.

El término "producto alimenticio" tal como se usa en el presente documento significa una sustancia que es adecuada para su consumo por seres humanos y/o animales.

30 De manera adecuada, el término "producto alimenticio" tal como se usa en el presente documento puede significar un producto alimenticio en una forma que está lista para su consumo. Sin embargo, alternativa o adicionalmente el término producto alimenticio tal como se usa en el presente documento puede significar uno o más materiales alimenticios que se usan en la preparación de un producto alimenticio. Únicamente a modo de ejemplo, el término producto alimenticio abarca tanto productos horneados producidos a partir de masa así como la masa usada en la
35 preparación de dichos productos horneados.

40 En otro aspecto, el producto alimenticio según la presente invención puede ser una alimentación para animales. De manera adecuada, la alimentación para animales puede ser alimentos para mascotas. El producto alimenticio según la presente invención puede ser una alimentación para animales seleccionada de mejoradores de la palatabilidad líquidos y potenciadores de la palatabilidad, potenciadores de la palatabilidad deshidratados, premios (especialmente premios semihúmedos), piensos y alimentaciones.

45 En un aspecto el producto alimenticio se selecciona preferiblemente de uno o más de los siguientes: comidas procesadas listas para comer, por ejemplo pastas listas para comer, salsas para pasta listas para comer, carnes listas para comer, verduras listas para comer y salsas de verduras listas para comer, platos "de acompañamiento" listos para comer tales como ensaladas deli y en particular ensalada de repollo, ensalada de pollo, ensalada de patatas; y vinagretas, aliños y salsas, y en particular salsas barbacoa, salsas a base de tomate, salsas para pasta y aliños para ensalada.

50 Preferiblemente el producto alimenticio según la presente invención es un producto alimenticio que contiene agua. De manera adecuada, el producto alimenticio puede estar compuesto por el 10-99% de agua, de manera adecuada el 14-99%, de manera adecuada el 18-99% de agua, de manera adecuada el 20-99%, de manera adecuada el 40-99%, de manera adecuada el 50-99%, de manera adecuada el 70-99%, de manera adecuada el 75-99%.

55 La composición antimicrobiana se incorpora normalmente en el producto alimenticio poniendo en contacto la composición antimicrobiana con ingredientes alimenticios para producir un producto alimenticio protegido. Esto puede producirse durante la producción normal del producto alimenticio. En aspectos adicionales, la composición antimicrobiana puede aplicarse al producto alimenticio mediante inmersión, o recubrimiento en superficie del producto alimenticio o bien mediante pulverización de la composición sobre la superficie del alimento o bien
60 mediante aplicación de la composición a coladas o recubrimientos o películas comestibles.

En un aspecto adicional, la composición puede mezclarse en el producto alimenticio.

65 En un aspecto el producto alimenticio puede comprender la composición en una cantidad de no más de 30.000 ppm basándose en el producto alimenticio. En un aspecto el producto alimenticio puede comprender la composición en una cantidad de no más de 15.000 ppm basándose en el producto alimenticio. En un aspecto el producto alimenticio

puede comprender la composición en una cantidad de no menos de 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio. En un aspecto el producto alimenticio puede comprender la composición en una cantidad de no menos de 2.500 ppm basándose en el producto alimenticio. Por ejemplo el producto alimenticio o material protegido antimicrobiano puede comprender

- 5 • la composición en una cantidad de no más de 25.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no más de 20.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 10 • la composición en una cantidad de no más de 15.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no más de 10.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 15 • la composición en una cantidad de no más de 7.500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no menos de 500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no menos de 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 20 • la composición en una cantidad de no menos de 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no menos de 3.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de no menos de 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 25 • la composición en una cantidad de 2.500 a 30.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de 5.000 a 20.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 30 • la composición en una cantidad de 1.000 a 15.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- la composición en una cantidad de 5.000 a 15.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 35 • la composición en una cantidad de aproximadamente 10.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 150 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 40 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 50 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 40 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 45 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 37,5 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 2 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 2,5 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 50 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 5 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 10 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 15 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 55 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 20 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de no menos de 25 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 60 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de 20 a 150 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de 20 a 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el isotiocianato de alilo en una cantidad de 25 a 50 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 65 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de 2 a 40 ppm basándose en el producto alimenticio, o

ES 2 528 378 T3

- el isotiocianato de alilo en una cantidad de 2,5 a 37,5 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 5 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de aproximadamente 35 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no más de 12.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no más de 10.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 10 • el ácido orgánico en una cantidad de no más de 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no más de 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 15 • el ácido orgánico en una cantidad de no más de 1.500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no más de 1.300 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no más de 1.275 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 20 • el ácido orgánico en una cantidad de no más de 1.200 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 20 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 40 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 25 • el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 60 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 80 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 30 • el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 85 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 200 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 35 • el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de no menos de 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 40 • el ácido orgánico en una cantidad de 200 a 12.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de 500 a 10.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de 1.000 a 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 45 • el ácido orgánico en una cantidad de 80 a 1.500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido orgánico en una cantidad de 85 a 1.275 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 50 • el ácido orgánico en una cantidad de aproximadamente 1.150 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de no más de 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de no más de 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 55 • el ácido acético en una cantidad de no más de 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de no más de 900 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 60 • el ácido acético en una cantidad de no menos de 50 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de no menos de 60 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de no menos de 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 65 • el ácido acético en una cantidad de no menos de 200 ppm basándose en el producto alimenticio, o

ES 2 528 378 T3

- el ácido acético en una cantidad de no menos de 500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 5 • el ácido acético en una cantidad de 100 a 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de 200 a 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de 500 a 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 10 • el ácido acético en una cantidad de 60 a 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido acético en una cantidad de 60 a 900 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 15 • el ácido acético en una cantidad de aproximadamente 800 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no más de 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no más de 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 20 • el ácido propiónico en una cantidad de no más de 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no más de 750 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 25 • el ácido propiónico en una cantidad de no más de 500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no más de 400 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no más de 375 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 30 • el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 20 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 25 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 35 • el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 50 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 200 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 40 • el ácido propiónico en una cantidad de no menos de 300 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de 100 a 5.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 45 • el ácido propiónico en una cantidad de 200 a 2.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de 300 a 1.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de 20 a 400 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 50 • el ácido propiónico en una cantidad de 25 a 375 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el ácido propiónico en una cantidad de aproximadamente 350 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 55 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no más de 300 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no más de 200 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- 60 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no más de 150 ppm basándose en el producto alimenticio
- el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no menos de 10 ppm basándose en el producto alimenticio
- 65 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no menos de 15 ppm

basándose en el producto alimenticio

- 5 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no menos de 100 ppm basándose en el producto alimenticio
 - el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no menos de 120 ppm basándose en el producto alimenticio
 - 10 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de no menos de 130 ppm basándose en el producto alimenticio
 - el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de 100 a 300 ppm basándose en el producto alimenticio
 - 15 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de 10 a 200 ppm basándose en el producto alimenticio
 - el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de 15 a 200 ppm basándose en el producto alimenticio
 - 20 • el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de 120 a 200 ppm basándose en el producto alimenticio
 - el extracto de té verde (cuando comprende el 75% de catequinas) en una cantidad de 130 a 150 ppm basándose en el producto alimenticio
 - 25 • el extracto de té verde en una cantidad de aproximadamente 135 ppm basándose en el producto alimenticio.
- En un aspecto el producto alimenticio puede comprender la composición en una cantidad tal que tras el procesamiento, y en particular tras el calentamiento, el producto alimenticio comprende la composición en las cantidades anteriores. Un experto en la técnica entiende que el procesamiento de un producto alimenticio, y en particular el calentamiento, puede reducir la cantidad de composición protectora activa. Por tanto en un aspecto el producto alimenticio puede comprender la composición en una cantidad de no más de 30.000 ppm basándose en el producto alimenticio, en el que el producto alimenticio se somete opcionalmente a procesamiento posterior, y en particular a calentamiento. Por ejemplo el producto alimenticio o material protegido antimicrobiano puede comprender
- 30 • la composición en una cantidad de no más de 25.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 40 • la composición en una cantidad de no más de 20.500 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - la composición en una cantidad de no más de 15.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 45 • el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 100 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 75 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el isotiocianato de alilo en una cantidad de no más de 60 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 50 • el ácido orgánico en una cantidad de no más de 36.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el ácido orgánico en una cantidad de no más de 30.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 55 • el ácido orgánico en una cantidad de no más de 24.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el ácido acético en una cantidad de no más de 24.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el ácido acético en una cantidad de no más de 18.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 60 • el ácido acético en una cantidad de no más de 12.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el ácido propiónico en una cantidad de no más de 18.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - 65 • el ácido propiónico en una cantidad de no más de 12.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o
 - el ácido propiónico en una cantidad de no más de 6.000 ppm basándose en el producto alimenticio, o

- el extracto de té verde en una cantidad de no más de 675 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el extracto de té verde en una cantidad de no más de 375 ppm basándose en el producto alimenticio, o
- el extracto de té verde en una cantidad de no más de 300 ppm basándose en el producto alimenticio,

en el que el producto alimenticio se somete opcionalmente a procesamiento posterior, y en particular a calentamiento.

PROCESO

Tal como se comenta en el presente documento en un aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el material con

- (a) isotiocianato de alilo;
- (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y
- (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

En un aspecto el contacto con el material es simultáneo. En un aspecto el contacto con el material es secuencial.

Tal como se comenta en el presente documento en un aspecto la presente invención proporciona un uso de

- (a) isotiocianato de alilo;
- (b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y
- (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*];

para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material.

Ahora se describirá la presente invención con más detalle únicamente a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Las figuras 1 a 8 son gráficas.

Ahora se describirá la presente invención con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Material de muestra

La tabla 1 indica los diferentes compuestos y combinaciones de los mismos usados en esta investigación que se obtuvieron de fuentes comerciales y después se combinaron.

Tabla 1: Lista de muestra

ID de muestra			Descripción de muestra
A523	MEO-S	Polvo	Aceite esencial de mostaza (25%), goma arábica, almidón de maíz; almidón modificado, vainillina
A63	OA-F (producto fermentado de ácido orgánico)	Polvo	Producto fermentado de ácido orgánico que contiene ácido acético (7 - 8%) y ácido propiónico (2,5 - 4%)
A165	GTE	Polvo	Extracto de té verde que contiene el 75% de catequinas totales
A533	FP100Q-S*	Polvo	MEO-S (para proporcionar el 0,35% de AITC); GTE (para proporcionar el 2,25% de catequinas total); OA-F (70%)
A573	FP1000-AB	Polvo	MEO-S (para proporcionar el 0,35% de AITC); OA-F (70% de FP1000-AB para proporcionar ácidos orgánicos en una cantidad del 6,65 al 8,4%)

A574	FP1000-AC	Polvo	MEO-S (para proporcionar el 0,35% de AITC); GTE (para proporcionar el 2,25% de catequinas totales)
A575	FP1000-BC	Polvo	GTE (para proporcionar el 2,25% de catequinas totales); OA-F (70%)

*Las concentraciones usadas en la formulación se basaron en las restricciones reguladoras y limitaciones sensoriales. Los % facilitados para cada una de las mezclas de FP1000 se basan en el peso total de la mezcla.

Preparación de cultivos bacterianos

- 5 Las cepas diana usadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana son aislados de diferentes orígenes, por ejemplo, aislados de deterioro de alimentos, organismos de deterioro proporcionados por un cliente, colecciones de cepas nacionales (por ejemplo DSMZ, ATCC) recogidas en la Colección de Cultivos de Danisco (DCS) interna (Danisco, Brabrand, Dinamarca), mantenidas a -86°C en caldo adecuado que contenía glicerol al 50% (v/v). Las cepas se eligieron para representar cepas gram-negativas y fúngicas. Todas las especies usadas fueron aerobias. Antes de cada experimento, se propagaron cultivos madre a través de dos ciclos de crecimiento consecutivos en medios y a temperatura adecuados. Se diluyeron los cultivos durante la noche en solución salina para obtener cultivos de trabajo.
- 10
- 15 Se prepararon inóculos de esporas de moho de la siguiente manera: se usaron aproximadamente 2 ml de agua estéril desmineralizada para lavar las esporas de un moho que se hizo crecer (placa de 5 días como mínimo). Se transfiere esta suspensión a un recipiente estéril.
- 20 Se incubaron cepas de levadura y moho a 25°C, y se hicieron crecer aislados bacterianos a 30°C en condiciones aerobias dependiendo de las condiciones preferidas para la cepa particular (método n.º AP-002).

Tabla 2: Cepas indicadoras sometidas a prueba

Cepa	N.º	Condición de crecimiento
<i>Escherichia coli</i>	DCS 495	Caldo Caso (Oxoid), pH 6,0 30°C
<i>Salmonella enteritidis</i>	DCS 1152	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DCS 428	
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	Caldo YM (Merck), pH 6,0 25°C
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DCS 599	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DCS 606	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DCS 605	
<i>Pichia anomala</i>	DCS 603	
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	

Determinación de la concentración inhibitoria mínima

- 25 El ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM) es un ensayo en líquido en 96 pocillos desarrollado para un sistema de evaluación automatizado y realizado esencialmente tal como se describe en (método n.º AP-003). Se someten a prueba las cepas indicadoras (tabla 2) para determinar la inhibición de crecimiento mediante supuestas sustancias antimicrobianas y combinaciones de las mismas, usando un amplio intervalo de concentración (dependiendo del compuesto), en este caso realizando una serie de dilución de 2/3 de cada muestra a pH 6,0 (±0,2). A partir de un cultivo durante la noche diluido 10 veces se inocularon 5 µl de cada cepa en un pocillo correspondiente a una densidad de inoculación aproximada de 10³-10⁴ células/pocillo. Los medios usados fueron caldo YM para levaduras y mohos y caldo CASO para aislados bacterianos. Se incubaron las cepas a 24°C o 30°C durante de 24 a 48 horas dependiendo de la cepa. Se compara el aumento de la densidad óptica (D.O.) tras la incubación con un control de crecimiento para estimar si la sustancia tiene un efecto bacteriostático y para determinar la CIM. Se define la CIM como la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibirá el crecimiento medible. Se define un efecto bacteriostático como que la DO₆₂₀ es inferior o igual al 20% del control de crecimiento tras la incubación.
- 30
- 35
- 40 Para obtener estimaciones más precisas de los valores, se usó una macro de Excel para procesar los datos sin

procesar. La macro explora los datos sin procesar y encuentra las dos concentraciones que se encuentran a ambos lados del valor umbral del 20% de D.O. Entonces localiza la concentración real a la que la D.O. cruza el umbral, usando una correlación lineal. Todos los datos se presentan como los valores medios de repeticiones duplicadas para cada microorganismo.

5 Se realizaron los ensayos de CIM en un sistema de evaluación completamente automatizado que consistía en un instrumento 9-hotel Cytotel (Thermo), un robot pipeteador Biomek FxP (Beckman Coulter), un brazo robótico ORCA en un carril de 3 metros (Beckman Coulter), 2 espectrofotómetros Synergy HT (Biotek), una incubadora Cytomat 6001 (Thermo) y una incubadora Cytomat 2C (Thermo).

10 RESULTADOS

Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas

15 Se investigó el crecimiento de las cepas de prueba en presencia de los compuestos individuales, aceite esencial de mostaza (MEO-S), extracto de té verde (GTE) y OA-F, sistemas de 2 componentes y la combinación de los tres. Las tablas 3 a 6 contienen la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las combinaciones posibles de MEO-S (A), OA-F (B) y GTE (C) frente a 6 levaduras y 3 mohos pero también frente a bacterias gram-negativas. Con fines de comparación, las tablas también incluyen los datos de CIM (ppm) para cada componente solo y su presencia (calculada) a la concentración de la combinación que provocó la inhibición total de la cepa sometida a prueba. Todos los datos de concentración inhibitoria mínima obtenidos se presentan como los valores medios de repeticiones duplicadas para cada microorganismo. Cuanto menor es el valor de CIM, mayor es el nivel de actividad bacteriostática. La figura 1 a la figura 3 a continuación demuestran la eficacia notable de los componentes individuales en las formulaciones propuestas frente a organismos gram-negativos y levaduras y moho, en las que la figura 1 muestra MEO-S, la figura 2 muestra GTE y la figura 3 muestra el efecto para OA-F.

Las concentraciones inhibitorias mínimas de MEO-S (tabla 3) frente a levaduras y mohos fueron de entre 38 y 380 ppm. Estos hallazgos sugieren que isotiocianato de alilo (AITC), el componente activo de MEO-S, puede ser un posible agente antifúngico natural para la conservación de alimentos. La actividad frente a cepas bacterianas no pareció eficaz para el aceite esencial de mostaza. Generalmente las bacterias gram-negativas no se ven inhibidas, o sólo se inhiben moderadamente, por los productos de aceite esencial de mostaza. Si dentro del intervalo de prueba de desde 0,13 mg/ml hasta 5 mg/ml, las concentraciones inhibitorias mínimas frente a organismos gram-negativos son de 4,2 mg/ml, generalmente altas, especialmente teniendo en cuenta el impacto organoléptico de este tipo de compuesto.

35 Se investigó el efecto de OA-F sobre el crecimiento de las cepas indicadoras en el intervalo de 0,78 mg/ml a 30 mg/ml. Para la mayoría de las cepas de prueba sólo se observaron pequeñas diferencias en el crecimiento final en comparación con el control de crecimiento. El crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* se inhibió en cierta medida a las mayores concentraciones (10,3 mg/ml) del producto fermentado. *Rhodotorula glutinis* fue la levadura más sensible. Para esta cepa se encontró una CIM de 3,28 mg/ml.

45 En la tabla 3 también se muestra la actividad antimicrobiana de extracto de té verde. La CIM promedio de GTE frente a organismos gram-negativos fue de 4,13 mg/ml, lo que es ligeramente inferior a la concentración inhibitoria media frente a cepas de levadura (4,9 mg/ml). Sin embargo, los mohos sometidos a prueba fueron los más sensibles al GTE y en promedio se vieron inhibidos a 0,78 mg/ml.

50 Dada la complejidad metabólica de las células microbianas, ya sean procariontes (bacterias) o eucariontes (levaduras y hongos), es muy poco probable que una única sustancia realice todas las acciones. Cuando se usan combinaciones de las sustancias mencionadas anteriormente en una formulación, se obtuvo como resultado una lisis celular más eficaz probablemente debido a múltiples modos de acción. Por tanto, no sólo se observa un espectro de inhibición más amplio sino que además las concentraciones necesarias para controlar microorganismos individuales son menores. Las concentraciones inhibitorias reducidas de los compuestos individuales en la combinación son indicativas de una acción sinérgica. La combinación sinérgica de MEO, GTE y OA-F aumenta la eficacia de los componentes individuales hasta 136 veces. Esto puede observarse en la figura 2 (para referencia, véase también la tabla 3), por ejemplo para la cepa de prueba *Candida parapsilosis* en la que GTE solo únicamente inhibe la levadura a 4 mg/ml, en combinación con el aceite esencial y el producto fermentado sólo se necesitan 0,029 mg/ml del extracto vegetal para controlar la levadura. Teniendo en cuenta todas las cepas de prueba investigadas, la actividad antimicrobiana de GTE en la combinación es generalmente de 5 a 136 veces superior frente al compuesto individual.

60 Se mostró una eficacia hasta 115 veces superior a la del componente individual para *Aspergillus parasiticus* teniendo en cuenta OA-F, tal como se observa en la figura 3 (para referencia, véase también la tabla 3), en la que OA-F no puede suprimir suficientemente el crecimiento del moho a una concentración de 30 mg/ml. En cambio, en combinación con el aceite esencial y el extracto vegetal sólo se necesitan 0,26 mg/ml de producto fermentado para controlar el moho.

65 Al igual que para GTE y OA-F, la combinación de los 3 compuestos también dio como resultado para MEO un efecto

sinérgico, con concentraciones inhibitorias de 3 a 25 veces inferiores a las de los compuestos individuales, tal como se observa en la figura 1 y la tabla 3, respectivamente.

5 La CIM para la combinación sinérgica propuesta "FP1000-S" osciló entre 0,55 mg/ml y 5,4 mg/ml frente a organismos de levadura y moho y entre 5,8 mg/ml y >10 mg/ml frente a las bacterias gram-negativas (columna "FP1000-S", tabla 3). Comparando los valores de CIM del sistema de 3 componentes con las posibles combinaciones de 2 componentes puede observarse que "FP1000-S" es un 15% más eficaz que una combinación de MEO y OA-F (columna de valores de CIM "FP1000-AB", tabla 4), un 40% más eficaz que la combinación de MEO y GTE (columna de valores de CIM "FP1000-AC", tabla 5), e incluso un 70% más eficaz que la combinación de OA-F y GTE (columna de valores de CIM "FP1000-BC", tabla 6). Además, el espectro de inhibición, especialmente cuando se tienen en cuenta las cepas sometidas a prueba gram-negativas, es más amplio en "FP1000-S" que en las combinaciones de 2 componentes. Por ejemplo, en un intervalo de concentración de "FP1000-S" de 5,4 a 10 mg/ml, la densidad óptica que se alcanzó al final del experimento fue ligeramente inferior a los valores de control para *E. coli* y *Salmonella enteritidis*. Sin embargo, las combinaciones "FP1000-AB" y "FP1000-BC" no suprimieron el crecimiento de estas cepas de prueba. "FP-1000-AC" suprimió el crecimiento de los organismos gram-negativos a concentraciones superiores pero no inhibió *Pseudomonas fluorescens*.

20 Tabla 3: Concentración inhibitoria mínima (CIM; valores medios de repeticiones duplicadas) de la combinación de 3 componentes FP1000S, las CIM de los compuestos individuales y la presencia real de los compuestos individuales en la combinación al nivel de CIM en ppm

		FP 1000S	MEO-S		OA-F		GTE	
Intervalo de prueba [ppm]		260 – 10000 ppm	130 – 5000 ppm		780 – 30000 ppm		260 – 7500 ppm	
Cepa	N.º	CIM, ppm [FP1000S]	CIM, ppm [MEO-S]	Concentración de AITC	CIM, ppm [OA-F]	Concentración de OA-F	CIM, ppm [GTE]	Concentración de GTE
<i>Escherichia coli</i>	DCS 495	>10000	>5000	>700	N-30000	N-6000	6375	>300
<i>Salmonella enteritidis</i>	DCS 1152	>10000	>5000	>700	>30000	>6000	1680	>300
<i>Pseudomonas</i>	DCS 428	5890	4230	412	10300	3534	1230	177
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	2040	2030	143	>30000	1224	306	61
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	549	175	38	N-30000	262	855	18
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	1520	2630	106	>30000	912	594	46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DCS 599	2800	797	196	N-30000	1680	>7500	84
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DCS 606	2850	2930	200	3280	1710	399	86
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DCS 605	3040	2160	213	N-30000	1824	565	91
<i>Pichia anomala</i>	DCS 603	5430	1430	380	N-30000	3258	>7500	163
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	3360	752	235	N-30000	2016	2258	101
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	954	278	67	>30000	572	3968	29

Tabla 4: Concentración inhibitoria mínima (CIM; valores medios de repeticiones duplicadas) de una combinación de 2 componentes FP1000AB, las CIM de los compuestos individuales MEO y OA-F y la presencia real de los compuestos individuales en la combinación al nivel de CIM en ppm

		FP 1000 AB	MEO-S		OA-F	
Intervalo de prueba [ppm]		260 - 10000 ppm	13-500 ppm		780 - 30000 ppm	
Cepa	N.º	CIM, ppm [FP1000AB]	CIM, ppm [MEO-S]	Concentración de MEO-S	CIM, ppm [OA-F]	Concentración de OA-F
<i>Escherichia coli</i>	DCS 495	N-10000	>5000	>700	N-30000	N-10000
<i>Salmonella enteritidis</i>	DCS 1152	N-10000	>5000	>700	>30000	>10000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DCS 428	9980	4230	699	10300	5988
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	2400	2030	168	>30000	1440
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	690	175	48	N-30000	256
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	1540	2630	108	>30000	924

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DCS 599	2840	797	199	N-30000	1704
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DCS 606	2310	2930	162	3280	1386
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DCS 605	3360	2160	235	N-30000	2016
<i>Pichia anomala</i>	DCS 603	8830	1430	618	N-30000	5298
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	3380	752	237	N-30000	2028
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	1430	278	100	>30000	858

Tabla 5: Concentración inhibitoria mínima (CIM; valores medios de repeticiones duplicadas) de una combinación de 2 componentes FP1000AC, las CIM de los compuestos individuales MEO y GTE y la presencia real de los compuestos individuales en la combinación al nivel de CIM en ppm

		FP 1000 AC	MEO-S		GTE	
Intervalo de prueba [ppm]		260 - 10000 ppm	13 - 500 ppm		260 - 7500 ppm	
Cepa	N.º	CIM, ppm [FP1000AC]	CIM, ppm [MEO-S]	Concentración de MEO-S	CIM, ppm [GTE]	Concentración de GTE
<i>Escherichia coli</i>	DCS 495	>10000	>5000	>700	6375	>300
<i>Salmonella enteritidis</i>	DCS 1152	>10000	>5000	>700	1680	>300
<i>Pseudomonas luorescens</i>	DCS 428	>10000	4230	>700	1230	>300
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	5140	2030	360	306	154
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	585	175	41	855	18
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	7830	2630	548	594	235
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DCS 599	4630	797	324	>7500	139
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DCS 606	9090	2930	636	399	273
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DCS 605	5240	2160	367	565	157
<i>Pichia anomala</i>	DCS 603	6350	1430	445	>7500	191
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	3190	752	223	2258	96
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	1600	278	112	3968	48

5

Tabla 6: Concentración inhibitoria mínima (CIM; valores medios de repeticiones duplicadas) de una combinación de 2 componentes FP1000BC, las CIM de los compuestos individuales OA-F y GTE y la presencia real de los compuestos individuales en la combinación al nivel de CIM en ppm

		FP 1000 BC	OA-F		GTE	
Intervalo de prueba [ppm]		260 - 10000 ppm	780 - 30000 ppm		260 - 7500 ppm	
Cepa	N.º	CIM, ppm [FP1000BC]	CIM, ppm [OA-F]	Concentración de OA-F	CIM, ppm [GTE]	Concentración de GTE
<i>Escherichia coli</i>	DCS 495	N-10000	N-30000	N-7000	6375	N-450
<i>Salmonella enteritidis</i>	DCS 1152	N-10000	>30000	N-7000	1680	N-450
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DCS 428	>10000	10300	>7000	1230	300
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	9650	>30000	5790	306	290
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	N-10000	N-30000	N-7000	855	N-450
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	N-10000	>30000	N-7000	594	N-450
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DCS 599	N-10000	N-30000	N-7000	>7500	N-450
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DCS 606	>10000	3280	>7000	399	300
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DCS 605	6740	N-30000	4044	565	202
<i>Pichia anomala</i>	DCS 603	>10000	N-30000	>7000	>7500	300

<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	N-10000	N-30000	N-7000	2258	450
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	>10000	>30000	>7000	3968	300

N-xxxx: Sin inhibición a la mayor concentración

CONCLUSIÓN

5 La presente formulación novedosa contiene componentes que se han aprobado para su uso directamente en alimentos, se consideran GRAS por la FDA o se ha demostrado que son seguros para su contacto con los seres humanos y para el medio ambiente.

10 La formulación que contiene los 3 componentes, aceite esencial de mostaza, OA-F y extracto de té verde, fue la más eficaz en inhibir organismos gram-negativos y levaduras y mohos con una actividad inhibitoria mínima promedio de 0,86 mg/ml, 0,3 mg/ml y 0,12 mg/ml, respectivamente. Además, la naturaleza sinérgica de la combinación descrita permite bajas dosificaciones de los componentes individuales.

15 Aceite esencial de mostaza y OA-F en combinación muestran una eficacia un 15% inferior a la del sistema de 3 componentes. Aceite esencial de mostaza y té verde son incluso un 40% menos eficaces y OA-F y té verde son en promedio un 70% menos potentes.

20 Además de concentraciones inhibitorias mínimas considerablemente inferiores de la formulación de 3 componentes, también se observó un espectro de inhibición más amplio en comparación con las combinaciones de 2 componentes.

ESTUDIO DE APLICACIÓN - SALSA BBQ

25 El objetivo del presente estudio era monitorizar el efecto de dos concentraciones del presente agente antifúngico (YM10) sobre levaduras y mohos de deterioro en una salsa BBQ pasteurizada y así evaluar el potencial del producto en comparación con MicroGARD®200, un producto fermentado de competencia de la técnica anterior, y sorbato de potasio.

30 Se añadió el presente agente antifúngico, que consistía en isotiocianato de alilo de mostaza marrón, catequinas de té verde y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias, a concentraciones del 1% y el 0,5%, y se sometió la salsa BBQ (pH 3,8) a una combinación de 4 especies de levaduras y una combinación de 4 especies de mohos, respectivamente a la tasa de inoculación definida de 500 a 1000 UFC/ml.

35 Los resultados experimentales del estudio de exposición han mostrado que el 0,5% (p/p) del presente agente antifúngico (YM10) proporcionó efectos bactericidas frente a las cepas de prueba y compitió con el agente de referencia sorbato de potasio durante al menos 15 semanas de almacenamiento.

40 El agente antimicrobiano de competencia y MicroGARD® 200, empleados al 1,25% y al 1% respectivamente, no protegieron de manera convincente la salsa BBQ sometida a prueba frente al deterioro por levadura en las condiciones de prueba aplicadas, ya que sólo se observó un ligero retraso en comparación con el control sin conservantes. Con incubación a 20°C, el moho no encontró un sustrato adecuado en la salsa BBQ. No se detectó crecimiento de moho visual.

45 En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que la formulación antifúngica investigada en este caso, el presente agente antifúngico (YM10), tenía el potencial para controlar el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada (500 - 1000 UFC/g) en salsa BBQ (pH <4,0) cuando se almacenaba a temperatura ambiente (20°C).

INTRODUCCIÓN

50 El presente agente antifúngico (YM10) contiene isotiocianato de alilo (AITC) de mostaza marrón (en forma de WasaOURO D de Mitsubishi Food, Inc.), catequinas de té verde (té verde extraído con agua obtenido de Taiyo Ltd.) y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias (en forma de MicroGARD®200).

55 La combinación y sus componentes individuales tienen actividad antifúngica y antibacteriana demostrada cuando se someten a prueba *in vitro* e *in situ*. Para demostrar el posible uso del presente agente antifúngico (YM10) en productos culinarios tales como salsa BBQ, se realizaron estudios de exposición, con el objetivo de monitorizar el efecto de combinaciones recién desarrolladas *in situ* a diferentes dosificaciones de la combinación funcional sobre levaduras y mohos de deterioro usando como agente de referencia sorbato de potasio, un producto de competencia, y un producto antimicrobiano de Danisco, MicroGARD® 200 (tabla 7).

60 Se seleccionó salsa BBQ como representante de productos culinarios con un término de caducidad previsto de 90 días.

Tabla 7: Agentes antimicrobianos investigados y su composición

ID DE LOTE	B/C	D	E	F
Agente antimicrobiano	Agente antifúngico novedoso (YM10)	MicroGARD™ 200	Sorbato de potasio	Producto de competencia
Componente activo (concentración, composición de combinación)	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido orgánico total (8 - 11%) • Catequinas de té verde (1,0%) • Isotiocianato de alilo (AITC) (0,35%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos acéticos (7 - 8%) • Ácido propiónico (2 - 4%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sorbato de potasio 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos acéticos (6%) • Ácido propiónico (16%) • Ácido láctico (28%)

PARTE EXPERIMENTAL

5 Se produjeron muestras de la salsa BBQ (fórmula en la tabla 9) con y sin la combinación experimental en el Danisco Culinary Application Laboratory, Brabrand. Se diseñaron las variables con la intención de demostrar la viabilidad en cuanto a eficacia antifúngica del agente antifúngico conceptual a los niveles propuestos usando como agente de referencia sorbato de potasio; producto de competencia y MicroGARD® 200 a niveles habitualmente usados.

10 Se dividió cada lote (esquema en la tabla 8) en sondas de 90 gramos y se colocaron en jarros estériles. Se inocularon 42 sondas de cada lote con el nivel deseado de levadura y se inocularon 5 sondas de cada lote con esporas de moho, respectivamente a una tasa de inoculación objetivo de 500 a 1000 UFC/g.

15 Se mezclaron exhaustivamente los productos viscosos (2 minutos) en el plazo de 10 minutos desde la inoculación para garantizar que el inóculo se distribuyó uniformemente por todo el producto. Una muestra permaneció sin inocular y se usó como control negativo para monitorizar la flora de contaminación nativa. Se incubaron todas las muestras a temperatura ambiente (20°C) y se sometieron a ensayo para determinar las levaduras, se sembraron en placa en un medio de levaduras apropiado, hasta confirmarse el fallo ($\geq 1,0E+06$ UFC/g) o hasta el crecimiento de moho visible, respectivamente. En paralelo, se monitorizaron el crecimiento de bacterias ácido lácticas y el recuento de células totales sobre MRS y PCA en todos los lotes y la muestra ciega no inoculada, respectivamente.

Tabla 8: Resumen de muestras

Agente anti-microbiano	A		B		C		D		E		F		
	Sin agentes antimicrobianos		Agente antifúngico novedoso (YM10)		Agente antifúngico novedoso (YM10)		MicroGard 200		Sorbato de potasio		Producto de competencia		
Cantidad			1%		0,5%		1%		0,1%		1,25%		
Cepas		Moho	Levadura	Moho	Levadura	Moho	Levadura	Moho	Levadura	Moho	Levadura	Moho	Levadura
UFC/ml	0	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*	11000*
Medición	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
Número de muestras / día de muestreo	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5	3
Número total de muestras	42	5	42	5	42	5	42	5	42	5	42	5	42

* 500-1000 UFC/g

25 Leyenda de la medición:

- 1 - Recuento de placas total / Recuento de levaduras / Recuento láctico, medición de pH
- 2 - Visual (crecimiento de moho)

Formulación de laboratorio: salsa BBQ

30 La salsa BBQ investigada en este estudio se produjo según una receta convencional usando las siguientes variables:

Tabla 9: Formulación de salsa BBQ

Ingredientes [%]	Lote A Control sin proteger	Lote B YM10 (1%)	Lote C YM10 (0,5%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)	Lote F Producto de competencia (1,25%)
Agua corriente	27,85	26,85	27,35	26,85	27,75	26,6
GRINDSTED® CFF 1105	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Pasta de tomate	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5
Vinagre (5%)	20	20	20	20	20	20
Azúcar moreno	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
Salsa de soja	5	5	5	5	5	5
Humo líquido	1	1	1	1	1	1
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Chile en polvo	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Mostaza en polvo	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cebolla en polvo	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Ajo en polvo	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Pimienta cayena	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agente antimicrobiano	0	1	0,5	1	0,1	1,25
Total calculado	100	100	100	100	100	100

GRINDSTED® CFF 1105 es un texturizante/estabilizador disponible de Danisco A/S compuesto por almidón modificado, alginato de sodio y goma de semilla de algarroba.

Procedimiento

- 5 Combinar los ingredientes secos y los agentes antimicrobianos*
Añadir la mezcla seca lentamente al agua con cizalladura 5-8 min e hidratar durante un par de minutos
- 10 Añadir el resto de los ingredientes (a base de tomate)
Calentar hasta 90°C mientras se mezcla a 300 RPM, mantener durante 5-7 min
- 15 Terminar de enfriar hasta 25°C, después llenar
*disolver los agentes antimicrobianos en 50 ml de agua y ajustar el pH a 4 con ácido cítrico

Preparación de cultivos bacterianos

- 20 Las cepas de levaduras y moho que se investigaron en este estudio de exposición se muestran en la tabla 10. En total se emplearon 8 cepas, disponibles de la Colección de Cultivos de Danisco (DCS) (Danisco A/S, Brabrand, Dinamarca) como una combinación de levaduras y una de mohos en la salsa BBQ respectiva. Originalmente, se aislaron por ejemplo de ketchup, mayonesa, aliño de salsa picante deteriorados o se obtuvieron de colecciones de cultivo oficiales tales como DMSZ.

- 25 Tabla 10: Cepas investigadas que se usaron como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en este estudio.

Organismo	Código	Aislado de
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	DSMZ 1346
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1167	Ketchup deteriorado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1172	Ketchup deteriorado
<i>Pichia spp</i>	DCS 1175	Mayonesa
<i>Penicillium sp</i>	DCS 1380	Aliño de salsa picante
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	DSMZ 63292
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	
<i>Mucor sp</i>	DCS 1140	Alimento para mascotas

- 30 Antes de cada experimento, se propagó un cultivo madre de cada levadura, mantenido a -86°C en caldo adecuado que contenía glicerol al 50% (v/v), a través de dos ciclos de crecimiento consecutivos en medios adecuados (YGC-agar (VWR) pH 5,1 + 0,2; caldo YM (Becton, Dickinson and company) a pH 6,0 ± 0,2 y a temperatura (25°C). Se

diluyen los cultivos durante la noche en solución salina para obtener cultivos de trabajo. Se generó un cóctel de las levaduras añadiendo recuentos de células iguales de cada cultivo en un recipiente estéril y se mezclaron apropiadamente. Se diluyó el cóctel de levaduras y se inoculó en el producto para alcanzar la concentración final deseada. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

5 Se prepararon esporas de moho de la siguiente manera: se usaron aproximadamente 2 ml de agua estéril desmineralizada para lavar las esporas de una variedad de moho que se hizo crecer (placa de 5 días como mínimo). Se transfirió esta suspensión a un recipiente estéril. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

10 Análisis de muestras

15 Se sometieron a ensayo las salsas BBQ en el momento cero, día 2, día 5, día 12, semanalmente hasta la semana 10 (día 68) y bisemanalmente después de eso hasta la semana 19 (día 131). Se detectaron las UFC/g para 3 muestras de cada lote inoculado con levaduras. Antes de cada toma de muestras (jarro cerrado), se mezcló exhaustivamente la muestra. Se extrajo aseptícamente una muestra de 10 gramos de cada jarro y se diluyó con agua peptonada. Se digirió cada muestra (1 min, configuración normal), se sembró en placas por duplicado sobre YGC-agar (VWR) y MRS (VWR), y se incubó a 25°C durante 5 días y 37°C durante 3 días, respectivamente.

20 Se analizaron visualmente 5 muestras de cada lote inoculado con moho para determinar el crecimiento de moho.

Tuvo lugar una medición del pH de material de muestra no inoculada en cada fecha de toma de muestras usando un medidor de pH SevenEasy de Mettler Toledo.

25 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Análisis de muestras

30 La figura 4 y los datos correlacionados en la tabla 11 muestran la influencia de los diferentes agentes antimicrobianos en comparación con un control sin conservantes sobre el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada a aproximadamente 500 UFC/ml. Tal como puede observarse en la figura, las levaduras inoculadas comenzaron a crecer tras 12 días de incubación a temperatura ambiente (20°C) en el control (gráfico rojo en la figura 4). Por tanto, se alcanzó el crecimiento estacionario con recuentos de células sobre YGC-agar de 9,2E+07 UFC/g tras 49 días. El lote F, producto de competencia al 1,25%, siguió la curva de crecimiento del control y sólo se observaron recuentos de células ligeramente inferiores en comparación con el lote sin proteger tras el día 19. Se alcanzó el crecimiento estacionario tras 4 semanas (día 26) con recuentos de células de 5,4E+05 UFC/g. MicroGARD 200, lote C, pudo mantener el recuento de células al nivel de inoculación hasta 12 días. Sin embargo, en el siguiente momento de toma de muestras se determinaron los mismos recuentos de levaduras altos que en el control sin proteger y el lote con el producto de competencia.

40 Por otro lado, se observó un efecto bactericida en las muestras de salsa BBQ con el 1% y el 0,5% del presente agente antifúngico (YM10) (gráfico verde y púrpura en la figura 4) y sorbato de potasio (gráfico naranja en la figura 4) reduciendo la carga inicial hasta por debajo del límite de detección (destrucción de 3 log). El agente antifúngico dosificado al 0,5% pudo competir con sorbato de potasio al menos hasta el día 104. Se observó crecimiento de las levaduras añadidas comenzando en el día de toma de muestras 117. En el último día de toma de muestras (día 131), también se determinaron recuentos viables en las muestras con sorbato de potasio. No obstante, el objetivo era un término de caducidad de 90 días lo que pudo lograrse cuando se empleó el 0,5% del presente agente antifúngico (YM10). De manera interesante, una tasa de dosificación del 1% del presente agente antifúngico (YM10) no pudo controlar el crecimiento de levaduras, a pesar de la reducción de 3 log observada. Ya en el día 19, se determinaron 3,6E+03 UFC/ml. Los recuentos de células aumentaron hasta 5,0E+05 UFC/ml con 6 semanas.

Tabla 11: Recuentos celulares sobre YGC-agar para determinar el crecimiento de levaduras tras la inoculación con 300 - 800 UFC/g a lo largo del periodo de prueba en los diferentes lotes de salsa BBQ.

día	Lote A Control sin proteger	Lote B YM10 (1%)	Lote C YM10 (0,5%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)	Lote E Producto de competencia (1,25%)
0	5,77E+02	5,92E+02	5,67E+02	5,78E+02	6,07E+02	6,05E+02
2	1,20E+02	1,03E+02	1,05E+02	1,37E+02	1,47E+02	1,22E+02
5	8,20E+01	5,00E+01	3,50E+01	6,30E+01	2,50E+01	8,70E+01
12	4,29E+04	1,00E+00	1,00E+00	5,15E+02	1,00E+00	2,15E+04
19	1,26E+06	3,58E+03	1,00E+00	2,87E+05	1,00E+00	4,40E+05
26	7,18E+06	1,45E+05	4,78E+02	1,43E+06	1,00E+00	1,02E+06
41	6,23E+07	5,03E+05	1,00E+00	7,22E+06	1,00E+00	5,37E+05
49	9,15E+07	-	1,00E+00	-	1,00E+00	-

55	-	-	1,00E+00	-	1,00E+00	-
68	-	-	1,00E+00	-	1,00E+00	-
82	-	-	1,00E+00	-	1,00E+00	-
104	-	-	1,00E+00	-	1,00E+00	-
117	-	-	2,70E+01	-	1,00E+00	-
131	-	-	1,95E+03	-	2,50E+01	-

"-" no sometido a ensayo adicionalmente

Además del crecimiento de levaduras, también se monitorizó el crecimiento de moho. Por tanto, se sometieron a prueba 5 tubos por variante de muestra. Las esporas de moho inoculadas no mostraron crecimiento visible a temperatura ambiente ni siquiera en las muestras sin proteger.

Además, el deterioro debido a bacterias ácido lácticas también fue una preocupación. Sin embargo, en ninguno de los lotes se encontraron células cultivables a lo largo del periodo de prueba de 131 días.

Tal como se mencionó anteriormente, se encontró mejor protección en el lote con una menor dosificación del presente agente antifúngico (YM10), lo cual era algo inesperado. Para explicar este comportamiento del crecimiento y excluir una posible mezcla de los dos lotes que contenían el agente antifúngico recién desarrollado, se investigó el contenido en ácido orgánico de los 2 lotes de salsa BBQ diferentes mediante métodos analíticos (CG/EM; A2729). La tabla 12 contiene los resultados de la determinación del contenido en ácido orgánico.

El ácido propiónico era un importante marcador para este ensayo. Teniendo en cuenta la concentración de ácido propiónico añadida con los agentes antimicrobianos en el lote B (YM 10 al 1%) y C (YM 10 al 0,5%), la concentración esperada sería de aproximadamente 300 y 150 ppm. Las concentraciones encontradas se ajustan bien a lo que se esperaba en cuanto a la clasificación. Por consiguiente, se excluye la posibilidad de que se mezclaran los dos lotes.

Tabla 12: Contenido en ácido orgánico (ppm) de dos lotes de salsa BBQ seleccionados

	Lote B YM10 al 1%	Lote C YM10 al 0,5%	LOD	LOQ
Ácido acético	13000	12000	20	60
Ácido propiónico	300	130	10	30
Ácido láctico	650	520	30	90

El pH es un parámetro muy importante y obstáculo para el crecimiento bacteriano, por ejemplo un aumento del pH puede dar como resultado una flora antimicrobiana diferente ya que se reduce el nivel de pH como obstáculo. Para evitar la diferencia de pH en los diferentes lotes se ajustó el pH con ácido cítrico. Tras la formulación para la salsa BBQ se supuso que el pH esperado era de aproximadamente pH 3,8.

Se observó que el pH en todos los lotes, con excepción de la muestra no controlada, permaneció estable a lo largo del periodo de prueba. Esto también respalda el hecho de que no se encontraron ácidos lácticos viables (tal como se mencionó anteriormente). Se midió un ligero aumento del pH en el lote de control.

Tabla 13: Desarrollo del pH de los diferentes lotes de salsa BBQ a lo largo del periodo de prueba

día	Lote A Control sin proteger	Lote B YM10 (1%)	Lote C YM10 (0,5%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)	Lote E Producto de competencia (1,25%)
0	3,75	3,75	3,77	3,77	3,74	3,70
2	3,81	3,79	3,81	3,80	3,80	3,77
5	3,78	3,81	3,79	3,80	3,78	3,76
12	3,74	3,74	3,74	3,73	3,72	3,70
19	3,76	3,76	3,77	3,77	3,74	3,75
26	3,85	3,81	3,81	3,85	3,80	3,82
41	n.t.	n.t.	3,79	n.t.	3,80	n.t.
49	3,91	3,80	3,78	3,85	3,77	3,81
55	4,08	3,82	3,79	3,86	3,76	3,86
68	3,96	3,74	3,72	3,77	3,71	3,81
82	4,16	3,86	3,78	3,97	3,78	3,86
104	4,14	3,82	3,77	3,84	3,75	3,85
117	4,10	3,88	3,78	4,16	3,76	3,84
131	4,10	3,76	3,79	3,84	3,79	3,81

35 Conclusión

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que la formulación antifúngica investigada en este

caso, el presente agente antifúngico (YM10), puede controlar el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada (500 – 1000 UFC/g) en la salsa BBQ (pH <4,0) cuando se almacena a temperatura ambiente (20°C). Una dosificación del 1% y el 0,5% del presente agente antifúngico (YM10) pero también sorbato de potasio provocaron una reducción inicial de 3 log de la carga celular inoculada. El agente antifúngico dosificado al 0,5% pudo competir con sorbato de potasio al menos hasta el día 104 (semana 15). Se observó crecimiento de las levaduras añadidas comenzando en el día de toma de muestras 117 (semana 17). En el último día de toma de muestras (día 131), también se determinaron recuentos viables en las muestras con sorbato de potasio.

El producto de competencia y MicroGARD® 200, empleados al 1,25% y al 1% respectivamente, no protegieron de manera convincente la salsa BBQ sometida a prueba frente a deterioro por levaduras en las condiciones de prueba aplicadas, observándose que se proporcionó sólo un ligero retraso en comparación con el control sin conservantes.

El moho investigado no encontró un sustrato adecuado en el modelo de alimentos elegido. No pudo detectarse crecimiento de moho visual. Además, se monitorizó el crecimiento de bacterias ácido lácticas a lo largo del periodo de prueba ya que estos organismos de deterioro eran una preocupación. Sin embargo, no se encontraron células cultivables en ninguno de los lotes a lo largo del periodo de prueba de 131 días. Esto puede correlacionarse bien con el hecho de que no se registró ningún cambio significativo en el pH.

Con este estudio de exposición se identificó que la combinación propuesta (YM10) demostraba un efecto antifúngico inmediato y eficaz tras la adición, y controlaba el crecimiento de las levaduras seleccionadas como diana en el producto investigado (salsa BBQ) a lo largo del almacenamiento durante al menos 17 semanas a temperatura ambiente. Por tanto, respalda la promoción del presente agente antifúngico (YM10) como nuevo producto antifúngico.

ESTUDIO DE APLICACIÓN - SALSA PICANTE (FRESCA)

El objetivo del presente estudio era monitorizar el efecto de dos variaciones de la combinación antifúngica novedosa FP 1000 sobre levaduras y mohos de deterioro en un modelo de salsa picante no pasteurizada y así evaluar el potencial del producto en comparación con MicroGARD®200 y sorbato de potasio.

Se añadieron FP 1000-D1 y FP 1000-D2, que consistían en isotiocianato de ajo de mostaza marrón, catequinas de té verde y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias en diferentes razones, a concentraciones del 1%, y se sometió la salsa picante fresca (pH 4,2) a una combinación de 4 especies de levaduras y una combinación de 4 especies de mohos, respectivamente a cada una de dos tasas de inoculación definidas de 500 UFC/ml.

Los resultados experimentales del estudio de exposición han mostrado que el 1% (p/p) de FP 1000-D1 y FP 1000-D2 proporcionaron efectos bactericidas frente a las cepas de prueba e incluso tuvieron un rendimiento ligeramente mejor que el del agente de referencia sorbato de potasio. El agente antimicrobiano comercial MicroGARD®200, empleado al 1%, no protegió de manera convincente la salsa picante sometida a prueba frente al deterioro por levaduras en las condiciones de prueba aplicadas, dado que los mayores recuentos de células de levadura se encontraron en este lote.

El número de células de levadura viable en las muestras no tratadas (lote de control) aumentó hasta 1,2E+05 UFC/g durante el ensayo de exposición de 92 días, aunque el crecimiento comenzó inesperadamente tarde (día 42). La mayor concentración de ácido acético de todos los lotes se encontró en el control, tal como se determinó al final del estudio mediante CG/EM.

Con incubación a 4°C, el moho no encontró un sustrato adecuado en la salsa picante. No se detectó ningún crecimiento de moho visual.

Desde una perspectiva antimicrobiana, basándose en los resultados, no era posible distinguir ninguna de las formulaciones, ya que ambas versiones tuvieron un rendimiento igual de bueno. Puede preferirse el producto antifúngico FP 1000-D1, ya que tiene una menor concentración de los componentes activos isotiocianato de ajo y catequinas de té verde, por consiguiente se cree que el impacto sensorial es menor.

INTRODUCCIÓN

FP 1000, que contiene isotiocianato de ajo (AITC) de mostaza marrón (en forma de WasaOURO D de Mitsubishi Food, Inc.), catequinas de té verde (té verde extraído con agua obtenido de Taiyo Ltd) y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias (en forma de MicroGARD®200), es una combinación novedosa.

La combinación y sus componentes individuales tienen actividad antifúngica y antibacteriana demostrada cuando se someten a prueba *in vitro* e *in situ*. Para demostrar el posible uso de FP 1000 en productos culinarios tales como salsa picante, se realizaron estudios de exposición, con el objetivo de monitorizar el efecto de combinaciones recién desarrolladas *in situ* a diferentes dosificaciones de los componentes activos (FP 1000-D1 y FP 1000-D2) sobre

levaduras y mohos de deterioro usando como agente de referencia sorbato de potasio y MicroGARD®200 (tabla 14).

Se seleccionó salsa picante no pasteurizada, denominada en el presente documento "salsa picante fresca", como representativa para productos culinarios con un término de caducidad previsto de 30 días. El término de caducidad relativamente corto esperado se debía a que faltaba la etapa de calentamiento en el procedimiento.

Tabla 14: Agentes antimicrobianos investigados y su composición

ID DE LOTE	B	C	D	E
Agente antimicrobiano	FP1000-D1	FP1000-D2	MicroGARD™ 200	Sorbato de potasio
Componente activo (concentración, composición de combinación)	MicroGARD™ 200 (93,65%) Catequinas de té verde (1,0%) AITC (0,25%)	MicroGARD™ 200 (91%) Catequinas de té verde (1,5%) AITC (0,35%)	Ácidos acéticos (7 - 8%) Ácido propiónico (2 - 4%)	Sorbato de potasio

MicroGARD™ 200 comprende ácido acético (7 - 8%) y ácido propiónico (2 - 4%)

10 PARTE EXPERIMENTAL

Se produjeron muestras de la salsa picante (fórmula en la tabla 17) con y sin la combinación experimental. Se diseñaron las variables con la intención de demostrar la viabilidad en cuanto a eficacia antifúngica del agente antifúngico conceptual a los niveles propuestos usando como agente de referencia sorbato de potasio y MicroGARD® 200 a niveles habitualmente usados. Debe mencionarse que no se pasteurizó la salsa picante.

Se dividió cada lote (esquema en la tabla 15) en sondas de 90 gramos y se colocaron en jarros estériles. Se inocularon 21 sondas de cada lote con el nivel deseado de levadura y se inocularon 5 sondas de cada lote con esporas de moho, respectivamente a una tasa de inoculación objetivo de 300 a 800 UFC/g.

Se mezclaron exhaustivamente los productos viscosos (2 minutos) en el plazo de 10 minutos desde la inoculación para garantizar que el inóculo se distribuyó uniformemente por todo el producto. Una muestra permaneció sin inocular y se usó como control negativo para monitorizar la flora de contaminación nativa. Se incubaron todas las muestras en la oscuridad a temperatura enfriada (4°C) y se sometieron a ensayo para determinar las levaduras, se sembraron en placa en un medio de levaduras apropiado, hasta confirmarse el fallo ($\geq 1,0E+06$ UFC/g) o hasta el crecimiento de moho visible, respectivamente. En paralelo, se monitorizaron el crecimiento de bacterias ácido lácticas y el recuento de células totales sobre MRS y PCA en todos los lotes y la muestra ciega no inoculada, respectivamente.

30 Tabla 15: Resumen de muestras

Lote	A			B/C/D/E	
	Sin agentes antimicrobianos			Agente antimicrobiano	
Cepas		Moho	Levaduras	Moho	Levaduras
UFC/ml	0	1000	1000	1000	1000
Medición	1	3	2	3	2
Número de muestras/día de muestreo	3	5	3	5	3
Número total de muestras	21	5	21	5	21

Leyenda de la medición:

1 - Recuento de placas total, medición de pH

2- Recuento de levaduras / Recuento láctico, medición de pH

3 - Visual (crecimiento de moho)

35 Preparación de cultivos bacterianos

Las cepas de levaduras y moho que se investigaron en este estudio de exposición se muestran en la tabla 16. En total se emplearon 8 cepas, disponibles de la Colección de Cultivos de Danisco (DCS) (Danisco A/S, Brabrand, Dinamarca) como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en la salsa picante respectiva. Originalmente, se aislaron por ejemplo de ketchup, mayonesa, aliño de salsa picante deteriorados o se obtuvieron de colecciones de cultivo oficiales tales como DMSZ.

Tabla 16: Cepas investigadas que se usaron como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en este estudio.

Organismo	Código	Aislado de
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	DSMZ 1346
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1167	Ketchup deteriorado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1172	Ketchup deteriorado
<i>Pichia spp</i>	DCS 1175	Mayonesa
<i>Penicillium sp</i>	DCS 1380	Aliño de salsa picante
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	DSMZ 63292

Aspergillus parasiticus
Mucor sp

DCS 709
DCS 1140

Alimento para mascotas

- 5 Antes de cada experimento, se propagó un cultivo madre de cada levadura, mantenido a -86°C en caldo adecuado que contenía glicerol al 50% (v/v), a través de dos ciclos de crecimiento consecutivos en medios adecuados (YGC-agar (VWR) pH 5,1 + 0,2; caldo YM (Becton, Dickinson and company) a pH 6,0 ± 0,2 y a temperatura (25°C). Se diluyen los cultivos durante la noche en solución salina para obtener cultivos de trabajo. Se generó un cóctel de las levaduras añadiendo recuentos de células iguales de cada cultivo en un recipiente estéril y se mezclaron apropiadamente. Se diluyó el cóctel de levaduras y se inoculó en el producto para alcanzar la concentración final deseada. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.
- 10 Se prepararon esporas de moho de la siguiente manera: se usaron aproximadamente 2 ml de agua estéril desmineralizada para lavar las esporas de una variedad de moho que se hizo crecer (placa de 5 días como mínimo). Se transfiere esta suspensión a un recipiente estéril. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

15 Formulación de laboratorio: Salsa picante

La salsa picante investigada en este estudio se produjo según una receta convencional usando las siguientes variables:

20 Tabla 17: Formulación de salsa picante

Ingredientes [%]	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000 - D1 (1%)	Lote C FP1000 - D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
Agua corriente	29,35	28,35	28,35	28,35	29,25
Sal (cloruro de sodio)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Jugo de tomate picado	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Pasta de tomate	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00
Tomates picados	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Pimiento verde picado	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Cebolla picada	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
Cilantro, IQF	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Azúcar	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Jalapeños	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Bestmix	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Ajo en polvo	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Sorbato de potasio					0,10
MicroGARD®200				1,00	
FP 1000		1,00	1,00		
Total calculado	100	100	100	100	100

PROCEDIMIENTO

- 25 Combinar los ingredientes secos y los agentes antimicrobianos
- Añadir la mezcla seca lentamente al agua e hidratar durante un par de minutos
- Añadir el resto de los ingredientes (a base de tomate)
- 30 Homogeneizar durante el procesamiento

Análisis de muestras

- 35 Se sometieron a ensayo las salsas picantes en el momento cero, día 3, día 7, día 14 y se sembraron en placa bisemanalmente después de eso hasta el día 92. Se detectaron las UFC/g para 3 muestras de cada lote inoculado

con levaduras. Antes de cada toma de muestras (jarro cerrado), se mezcló exhaustivamente la muestra. Se extrajo asepticamente una muestra de 10 gramos de cada jarro y se diluyó con agua peptonada. Se digirió cada muestra (1 min, configuración normal), se sembró en placas por duplicado sobre YGC-agar (VWR) y MRS (VWR), y se incubó a 25°C durante 5 días y 37°C durante 3 días, respectivamente.

5 Se analizaron visualmente 5 muestras de cada lote inoculado con moho para determinar el crecimiento de moho.

Para la muestra no inoculada, no tratada, se realizó el recuento de células totales sembrando en placa sobre PC-agar y MRS-agar (VWR).

10 Tuvo lugar una medición del pH de material de muestra no inoculada en cada fecha de toma de muestras usando un medidor de pH SevenEasy de Mettler Toledo.

15 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de muestras

20 La figura 5 y los datos correlacionados en la tabla 18 muestran la influencia de los diferentes agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada a aproximadamente 500 UFC/ml en comparación con un control sin conservantes. Tal como puede observarse en la figura, las levaduras inoculadas crecieron por primera vez tras 42 días de incubación a temperatura enfriada (4°C) en el control (gráfico azul en la figura 5). El crecimiento tardío de las cepas indicadoras seleccionadas como diana en las muestras de salsa picante sin conservantes fue inesperado, especialmente en comparación con el lote que contenía el 1% (p/p) de MicroGARD® 200, en el que las levaduras ya comenzaron a crecer tras una semana (alcanzando recuentos estacionarios tras 42 días). Incluso al final del estudio, tras 92 días, el recuento de levaduras en el lote sin conservantes fue aproximadamente 2 log inferior en comparación con la adición del 1% de MircoGARD® 200, que alcanzó recuentos de células de levaduras sobre YGC-agar de hasta 2,0E+07 UFC/g.

30 Por otro lado, el 1% de las combinaciones experimentales FP 1000-D1 y FP 1000-D2 (gráfico rosa y amarillo en la figura 5) tuvieron el mejor rendimiento incluso en comparación con sorbato de potasio (gráfico púrpura en la figura 7) ya que mostraron efectos bactericidas. Sin embargo, no fue posible una distinción de las dos combinaciones basándose en los resultados ya que las diferencias en los recuentos de células no fueron significativas.

35 Debido a que faltaba la etapa de pasteurización durante la producción de la salsa picante, las bacterias ácido lácticas fueron una preocupación. Sin embargo, la figura 6 y los datos correlacionados en la tabla 19 demuestran que, aunque estaban presentes de manera nativa, las bacterias ácido lácticas no alcanzaron altos recuentos de células. Con excepción del lote que contenía sorbato de potasio (gráfico púrpura en la figura 6) los recuentos microbianos sobre MRS-agar aumentaron aproximadamente 1 log tras 3 días de incubación, tal como puede observarse en la figura. Sin embargo, con una incubación más larga los recuentos de células disminuyeron en todas las muestras. Los recuentos en los lotes que contenían FP 1000-D1 y FP 1000-D2 (gráfico rosa y amarillo en la figura 6) disminuyeron más rápido en comparación con los del control (gráfico azul en la figura 6). El sorbato de potasio pareció controlar mejor el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en comparación con cualquier otro tratamiento. Ya no se detectaron más colonias sobre MRS-agar tras 42 días. Sin embargo, la pendiente del crecimiento bacteriano fue comparable con las muestras de FP 1000.

45 Tabla 18: Recuentos de células sobre YGC-agar para determinar el crecimiento de levaduras tras la inoculación con 300 - 800 UFC/g a lo largo del periodo de prueba en los diferentes lotes de salsa picante.

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	3,05E+02	4,80E+02	4,75E+02	8,25E+02	4,75E+02
2	3,40E+02	2,70E+02	2,80E+02	4,10E+02	2,50E+02
5	2,80E+02	2,40E+02	2,50E+02	2,00E+02	1,00E+02
7	2,60E+02	2,18E+02	2,12E+02	1,37E+02	6,80E+01
14	1,71E+02	1,18E+02	1,48E+02	1,37E+03	4,80E+01
28	1,45E+02	3,50E+01	<1,00E+01	4,00E+04	1,45E+02
41	1,35E+02	<1,00E+01	<1,00E+01	1,40E+07	3,30E+01
55	1,72E+04	<1,00E+01	<1,00E+01	2,15E+07	3,20E+01
93	1,18E+05	<1,00E+01	<1,00E+01	2,03E+07	3,30E+01

50 Tabla 19: Recuentos de células a lo largo del periodo de prueba sobre MRS-agar para determinar la flora nativa de bacterias ácido lácticas en los diferentes lotes de salsa picante.

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	3,05E+02	4,80E+02	4,75E+02	8,25E+02	4,75E+02
2	1,40E+04	8,00E+03	7,90E+03	1,20E+04	1,50E+03

5	1,19E+04	7,70E+03	7,00E+03	1,09E+04	1,40E+02
7	1,23E+04	3,82E+03	5,53E+03	1,13E+04	1,30E+03
14	1,03E+04	4,75E+03	3,80E+03	1,08E+04	5,38E+02
28	6,85E+03	1,17E+03	1,13E+03	2,88E+05	4,30E+01
41	4,17E+03	2,50E+02	1,80E+02	5,55E+02	<1,00E+01
55	3,88E+03	3,20E+02	2,13E+02	3,17E+02	<1,00E+01
93	N/A*	5,25E+02	2,12E+02	1,00E+02	<1,00E+01

* Las placas de MRS estaban saturadas con levadura, el recuento de colonias no fue posible

Además del crecimiento de levaduras también se monitorizó el crecimiento de moho. Por tanto, se sometieron a prueba 5 tubos por variante de muestra. Las esporas de moho inoculadas no mostraron crecimiento visible a 4°C ni siquiera en las muestras sin proteger. Sin embargo, al final del término de caducidad, se encontraron mohos (recuento de placas) en las muestras inoculadas con levadura sin ningún sistema de conservantes. Por otro lado, el 1% de las combinaciones experimentales de 3 componentes pudieron controlar el crecimiento de moho durante 12 semanas. Esto también se observó para la aplicación de MicroGARD® 200 y sorbato de potasio.

Para explicar el crecimiento tardío del organismo diana en el lote de control, se investigó el contenido en ácido orgánico de los 5 lotes diferentes de salsa picante mediante métodos analíticos (CG/EM; A2729). La tabla 20 contiene los resultados de la determinación del contenido en ácido orgánico.

El ácido propiónico era un importante marcador para este ensayo. Teniendo en cuenta la concentración de ácido propiónico añadida con los agentes antimicrobianos en los lotes B, C y D, la concentración esperada sería del 0,036%, el 0,035% y el 0,039%. Las concentraciones encontradas, aunque ligeramente inferiores a lo que se añadió, se ajustan bien a lo que se esperaba en cuanto a la clasificación. De manera más precisa, se encontró el 0,03%, el 0,028% y el 0,032% de ácido propiónico en los lotes B, C y D.

La concentración por defecto de ácido acético en la salsa picante (siguiendo la formulación en la tabla 15) puede ser de aproximadamente el 0,13% (p/p) tal como se encontró en la muestra que contenía sorbato de potasio (lote E) (sin ácido acético adicional añadido; sin deterioro).

El control sin conservantes tenía, de manera algo sorprendente, la mayor concentración de ácido acético. El contenido en ácido acético era del 0,52%, aproximadamente tres veces superior al del lote E y dos veces el de los lotes B, C y D en los que, con los agentes antimicrobianos empleados, se añadió del 0,064 al 0,08% más de ácido acético en comparación con los lotes A y E. Es bastante poco probable que estos altos niveles de ácido acético se deban a la fermentación bacteriana, dadas las condiciones del entorno: bajo pH, temperatura enfriada, disponibilidad de sustrato. Sin embargo, las bacterias pueden haber contribuido en cierta medida ya que las bacterias ácido lácticas también producen ácido acético junto con el ácido láctico. *Acetobacter* spp gram-negativa que forma ácido acético puede ser un contaminante procedente de las hierbas y especias usadas y puede haber estado metabolizando glucosa para dar ácido acético.

El bajo pH (4,2) en la salsa picante y las condiciones de almacenamiento enfriadas pueden ser el motivo para el crecimiento tardío en el control. Una vez que comienzan a crecer las levaduras diana *Pichia* spp. y *Zygosaccharomyces bali* pueden haber sido la causa de las altas concentraciones de ácido acético encontradas. Otra situación puede ser que si el ácido acético estaba en la muestra al comienzo del ensayo, tanto la concentración superior de ácido acético como de ácido láctico pueden explicar el crecimiento tardío en esta muestra (lote A).

Tabla 20: Contenido en ácido orgánico (% p/p) de los lotes de salsa picante

	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)	LOD	LOQ
Ácido acético	0,52	0,20	0,22	0,25	0,13	0,0015	0,004
Ácido propiónico	ND	0,03	0,028	0,032	ND	0,0010	0,003
Ácido láctico	0,31	0,045	0,037	0,036	<0,018	0,006	0,018

Además, merece la pena mencionar que las colonias dominantes del lote que contenía MicroGARD® 200 se aislaron e identificaron mediante VITEK y secuenciación de 18S. Esto se realizó para mostrar si una levadura de tipo natural creció en las muestras o si era uno de los organismos seleccionados como diana.

De manera interesante, las levaduras aisladas en el lote de MicroGARD® 200 se identificaron como *Saccharomyces servazzii*, lo cual no se había añadido con la combinación. Se rastreó el origen de las levaduras dominantes en el lote de control hasta *Pichia* spp., que es probable que sea la cepa DCS 1175 añadida. Se desconoce en qué momento se produjeron las levaduras contaminantes. Se sometieron a prueba las levaduras contaminantes, *Saccharomyces servazzii*, *in vitro* para determinar la sensibilidad frente a MicroGARD® 200, isotiocianato de alilo y la

variante de FP1000, FP 1000-D1, mediante la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (datos no mostrados). Los resultados confirmaron una tolerancia de las levaduras frente a MicroGARD® 200 al 1% (p/v) y sensibilidad frente a isotiocianato de alilo al 0,01% y FP 1000-D1 al 1% (p/v), respectivamente. Por consiguiente, aunque finalmente estaba presente en todos los lotes, *Saccharomyces servazzii* podía haberse suprimido en los lotes con conservantes, pero pudo crecer en el lote D. La alta concentración de ácido acético en el lote A sin conservantes y la flora de levaduras de competencia pudieron haber provocado la supresión del contaminante en esas muestras.

Para resumir estos hallazgos, los altos recuentos de células de levaduras en el lote D y el crecimiento temprano están asociados con un contaminante tolerante frente a MicroGAR®200 y por tanto no deben compararse directamente con el lote A de control.

Siguiendo la formulación para la salsa picante se suponía que el pH esperado era de pH 4,1. Sin embargo, se observó que el pH del control era de pH 4,23, ligeramente superior, tal como se observa en la figura 7. Se demostró que con la aplicación de las combinaciones experimentales y el producto fermentado MicroGARD® 200 el pH aumentó a pH 4,44 (4,51) y 4,50 (tabla 21), respectivamente. Esta observación se hizo anteriormente y se explica por la producción del producto fermentado y por la composición de la combinación conceptual. Fue algo sorprendente la influencia sobre el pH de la adición de sorbato de potasio al 0,1%, lo cual también dio como resultado un aumento del pH a pH 4,32.

El pH es un parámetro muy importante y obstáculo para el crecimiento bacteriano, por ejemplo un aumento del pH puede dar como resultado una flora antimicrobiana diferente ya que se reduce el nivel de pH como obstáculo. Sin embargo, para no implementar ácidos adicionales, que también influirían sobre la actividad antimicrobiana, se decidió no ajustar los pH en los lotes sino más bien monitorizar el efecto microbiológico mediante determinación del recuento de células totales y enumeración de bacterias ácido lácticas sobre medios de crecimiento adecuados. Se observó que los pH en todos los lotes siguieron la misma tendencia y disminuyeron ligeramente a lo largo del periodo de prueba.

Tabla 21: Desarrollo del pH de los diferentes lotes de salsa picante a lo largo del periodo de prueba

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	4,23	4,51	4,44	4,50	4,32
2	4,18	4,45	4,44	4,40	4,27
5	4,16	4,47	4,44	4,45	4,29
7	4,33	4,53	4,49	4,5	4,36
14	4,18	4,42	4,37	4,49	4,37
28	4,21	4,45	4,4	4,42	4,25
41	4,08	4,26	4,29	4,42	4,14
55	4,15	4,38	4,37	4,48	4,24
93	4,13	4,29	4,23	4,38	4,09

Conclusión

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que las formulaciones de FP1000 investigadas en este caso (FP1000-D1 y FP1000-D2) tenían el potencial para controlar el crecimiento de la combinación inoculada de levaduras (300 - 800 UFC/g) y moho (300 - 800 UFC/g) en una salsa picante no pasteurizada (pH <4,2) cuando se almacenó a 4°C. El número de células de levaduras viables en las muestras no tratadas aumentó hasta 1,2E+05 UFC/g durante el ensayo de exposición de 92 días, aunque el crecimiento comenzó inesperadamente tarde (día 42). Este lote contenía la mayor concentración de ácido acético de todos los lotes. Resultó evidente que el 1% de FP 1000-D1 y FP 1000-D2 mostró efectos bactericidas contra las cepas de prueba e incluso tuvo un rendimiento ligeramente mejor que el sorbato de potasio usado como agente de referencia. El agente antimicrobiano comercial MicroGAR® 200, empelado al 1%, no protegió de manera convincente la salsa picante sometida a prueba frente al deterioro por levaduras en las condiciones de prueba aplicadas, ya que los mayores recuentos de células de levaduras se encontraron en este lote. Sin embargo, la cepa aislada se identificó como *Saccharomyces servazzii*, que no era parte de la combinación de levaduras inoculada y que mostró tolerancia frente al producto fermentado cuando se sometió a prueba *in vitro*.

El moho investigado no encontró un sustrato adecuado en el modelo de alimentos elegido. No pudo detectarse ningún crecimiento de moho visual.

Además, se monitorizó el crecimiento de bacterias ácido lácticas a lo largo del periodo de prueba ya que estos organismos de deterioro eran una preocupación. Aunque se observó un aumento inicial de 1 log, los recuentos de células permanecieron estables a lo largo del periodo de prueba y estuvieron por debajo de 1,3E+04 UFC.

Se observa que el pH en todos los lotes siguió la misma tendencia y disminuyó ligeramente a lo largo del periodo de

prueba. La acidificación mediante bacterias de deterioro pudo explicar parcialmente este efecto, aunque no se encontró una correlación con el recuento de células para todas las muestras.

Desde una perspectiva antimicrobiana, basándose en los resultados, no era posible distinguir ninguna de las formulaciones, ya que ambas versiones tuvieron un rendimiento igual de bueno.

ESTUDIO DE APLICACIÓN - ALIÑO RANCHERO

El objetivo del presente estudio era monitorizar el efecto de una composición antifúngica recién desarrollada “FP 1000” sobre levaduras y mohos de deterioro en un aliño ranchero regular y así evaluar dos composiciones del producto potencial en comparación con MicroGAR®200, y sorbato de potasio. Se añadieron “FP 1000-D1” y “FP1000-D2”, que consistían ambas en isotiocianato de alilo de mostaza marrón, catequinas de té verde y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias pero a 2 razones diferentes, a concentraciones del 1% (p/p), y se sometió el aliño ranchero regular (pH 4) a una combinación de 4 especies de levaduras y una combinación de 4 especies de mohos, respectivamente a la tasa de inoculación definida de 500 a 1000 UFC/g.

Los resultados experimentales del estudio de exposición han mostrado que las formulaciones antifúngicas, “FP1000 D1” y “FP1000 D2”, aplicadas al 1%, tenían el potencial para controlar el crecimiento de la combinación de levaduras inoculadas en el aliño ranchero regular cuando se almacenaba a temperatura ambiente (20°C). Los efectos bactericidas proporcionados (reducción inicial de 2 log) frente a las cepas de prueba compitieron con el agente de referencia sorbato de potasio durante al menos 29 semanas (198 días) de almacenamiento. Con incubación a 20°C, el moho no encontró un sustrato adecuado en el Aliño ranchero. No se detectó ningún crecimiento de moho visual.

INTRODUCCIÓN

“FP 1000”, que contenía isotiocianato de alilo (AITC) de mostaza marrón (en forma de WasaOURO D de Mitsubishi Food, Inc.), catequinas de té verde (té verde extraído con agua obtenido de Taiyo Ltd.) y ácidos orgánicos de un producto fermentado de propionibacterias (en forma de MicroGARD®200).

La combinación y sus componentes individuales tienen actividad antifúngica y antibacteriana demostrada cuando se somete a prueba *in vitro* e *in situ*, véase anteriormente. Sin embargo, para evaluar el posible uso de “FP1000” en productos culinarios tales como aliño ranchero regular, se realizaron estudios de exposición, con el objetivo de monitorizar el efecto de combinaciones recién desarrolladas *in situ* a diferentes niveles de dosificación de los componentes de combinación sobre levaduras y mohos de deterioro usando como agente de referencia sorbato de potasio, y un producto antimicrobiano de Danisco, MicroGARD® 200 (tabla 22).

Se seleccionó aliño ranchero regular como representativo de productos culinarios con un término de caducidad previsto de 90 a 120 días a temperatura ambiente.

Tabla 22: Agentes antimicrobianos investigados y su composición

ID DE LOTE	B	C	D	E
Agente antimicrobiano	“FP 1000-D1”	“FP 1000-D2”	MicroGARD™ 200	Sorbato de potasio
Componente activo (concentración, composición de combinación)	Ácido orgánico total (8,5 - 11,5%) Catequinas de té verde (1,0%) Isotiocianato de alilo (AITC) (0,25%)	Ácido orgánico total (8-11%) Catequinas de té verde (1,5%) Isotiocianato de alilo (AITC) (0,35%)	Ácidos acéticos (7-8%) Ácido propiónico (2-4%)	Sorbato de potasio

PARTE EXPERIMENTAL

Se produjeron muestras del aliño ranchero regular (fórmula en la tabla 24) con y sin la combinación experimental en el Danisco Culinary Application Laboratory, Brabrand. Se diseñaron las variables con la intención de demostrar la viabilidad en cuanto a eficacia antifúngica del agente antifúngico conceptual a los niveles propuestos usando como agente de referencia sorbato de potasio y MicroGARD® 200 a niveles habitualmente usados.

Se dividió cada lote (esquema en la tabla 23) en sondas de 90 gramos y se colocaron en jarros estériles. Se inocularon 36 sondas de cada lote con el nivel deseado de levadura y se inocularon 5 sondas de cada lote con esporas de moho, respectivamente a una tasa de inoculación objetivo de 500 a 1000 UFC/g.

Se mezclaron exhaustivamente los productos viscosos (2 minutos) en el plazo de 10 minutos desde la inoculación para garantizar que el inóculo se distribuyó uniformemente por todo el producto. Una muestra permaneció sin inocular y se usó como control negativo para monitorizar la flora de contaminación nativa. Se incubaron todas las muestras a temperatura ambiente (20°C) y se sometieron a ensayo para determinar las levaduras, se sembraron en placa en un medio de levaduras apropiado, hasta confirmarse el fallo ($\geq 1,0E+05$ UFC/g) o hasta el crecimiento de moho visible, respectivamente. En paralelo, se monitorizaron el crecimiento de bacterias ácido lácticas y el recuento

ES 2 528 378 T3

de células totales sobre MRS y PCA en todos los lotes y la muestra ciega no inoculada, respectivamente.

Tabla 23: Resumen de muestras

	A			B		C		D		E	
Agente antimicrobiano	Sin agentes antimicrobianos			FP 1000-D1		FP 1000-D2		MicroGard 200		Sorbato de potasio	
Cantidad				1%		1%		1%		0,1%	
Cepas		Moho	Levaduras	Moho	Levaduras	Moho	Levaduras	Moho	Levaduras	Moho	Levaduras
UFC/g	0	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*
Medición	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
Número de Muestras / día de muestreo	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5	3
Número total de muestras	36	5	36	5	36	5	36	5	36	5	36

* 500-1000 UFC/g

5 Leyenda de la medición:

1 - Recuento de placas total / Recuento de levaduras / Recuento láctico, medición de pH
2 - Visual (crecimiento de moho)

Formulación de laboratorio: Aliño ranchero

10 El aliño ranchero investigado en este estudio se produjo según una receta convencional usando las siguientes variables:

Tabla 24: Formulación de aliño ranchero

Ingredientes [%]	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
Agua corriente	22,216	21,216	21,216	21,216	22,116
Aceite de semilla de soja	58,0	58,0	58,0	58,0	58,0
Yema de huevo con sal	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Producto granulado	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Azúcar					
Sal	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Ácido láctico (88%)	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Ajo en polvo	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cebolla en polvo	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Cebolletas deshidratadas	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Concentrado de jugo de limón	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Copos de perejil	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Pimienta blanca	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
Goma xantana	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Suero de manteca en polvo	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Eneldo deshidratado	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Vinagre blanco	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Agente antimicrobiano	0	1	1	1	0,1
Total calculado	100	100	100	100	100

Procedimiento

- Combinar en seco el azúcar y la goma xantana
- 5 Añadirlo a la fase acuosa y dejar hidratarse los hidrocoloides durante algunos minutos
- Añadir la yema de huevo
- 10 Añadir el suero de manteca en polvo
- Añadir el resto de los ingredientes secos (sal, especias, hierbas, agentes antimicrobianos (lote B a E))
- Emulsionar el aceite con alta cizalladura
- 15 Añadir el ingrediente ácido (vinagre y jugo de limón)

Reparación de cultivos bacterianos

- 20 Las cepas de levaduras y moho que se investigaron en este estudio de exposición se muestran en la tabla 4. En total se emplearon 8 cepas, de la Colección de Cultivos interna de Danisco (DCS) (Danisco A/S, Brabrand, Dinamarca) como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en el aliño ranchero respectivo. Originalmente, se aislaron por ejemplo de ketchup, mayonesa, aliño de salsa picante deteriorados o se obtuvieron de colecciones de cultivo oficiales tales como DSMZ.

- 25 Tabla 25: Cepas investigadas que se usaron como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en este estudio

Organismo	Código	Aislado de
<i>Candida tropicalis</i>	DCS 604	DSMZ 1346
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1167	Ketchup deteriorado
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	DCS 1172	Ketchup deteriorado
<i>Pichia spp</i>	DCS 1175	Mayonesa
<i>Penicillium sp</i>	DCS 1380	Aliño de salsa picante
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	DSMZ 63292
<i>Aspergillus parasiticus</i>	DCS 709	
<i>Mucor sp</i>	DCS 1140	Alimento para mascotas

- 30 Antes de cada experimento, se propagó un cultivo madre de cada levadura, mantenido a -86°C en caldo adecuado que contenía glicerol al 50% (v/v), a través de dos ciclos de crecimiento consecutivos en medios adecuados (YGC-agar (VWR) pH 5,1 + 0,2; caldo YM (Becton, Dickinson and company) a pH 6,0 ± 0,2 y a temperatura (25°C). Se diluyen los cultivos durante la noche en solución salina para obtener cultivos de trabajo. Se generó un cóctel de las levaduras añadiendo recuentos de células iguales de cada cultivo en un recipiente estéril y se mezclaron apropiadamente. Se diluyó el cóctel de levaduras y se inoculó en el producto para alcanzar la concentración final deseada. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas. Se prepararon esporas de moho de la siguiente manera: se usaron aproximadamente 2 ml de agua estéril desmineralizada para lavar las esporas de una variedad de moho que se hizo crecer (placa de 5 días como mínimo). Se transfiere esta suspensión a un recipiente estéril. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

40 Análisis de muestras

- Se sometió a ensayo el aliño ranchero en el momento cero, día 3, día 7, día 14, bisemanalmente después de eso hasta la semana 13 (día 90) y cada de 4 a 6 semanas hasta la semana 29. Se detectaron las UFC/g para 3 muestras de cada lote inoculado con levaduras. Antes de cada toma de muestras (jarro cerrado), se mezcló exhaustivamente la muestra. Se extrajo aseptícamente una muestra de 10 gramos de cada jarro y se diluyó con agua peptonada. Se digirió cada muestra (1 min, configuración normal), se sembró en placas por duplicado sobre YGC-agar (VWR), PC-agar y MRS-agar (VWR), y se incubó a 25°C durante 5 y 7 días y 37°C durante 3 días, respectivamente.

Se analizaron visualmente 5 muestras de cada lote inoculado con moho para determinar el crecimiento de moho.

- 50 Tuvo lugar una medición del pH de material de muestra no inoculada en cada fecha de toma de muestras usando un medidor de pH Seven Easy de Mettler Toledo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

55 Análisis de muestras

La figura 8 y los datos correlacionados en la tabla 26 muestran la influencia de los diferentes agentes

antimicrobianos en comparación con un control sin conservantes sobre el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada a aproximadamente 500 UFC/ml. Tal como puede observarse en la figura, las levaduras inoculadas comenzaron a crecer tras 7 días de incubación a temperatura ambiente (20°C) en el control libre de conservante (gráfico rojo en la figura 8). Por tanto, alcanzó crecimiento estacionario con recuentos de células sobre YGC-agar de 1,93E+04 UFC/g tras 14 días. Esto estaba aproximadamente 1 log por debajo del nivel de deterioro definido. MicroGARD 200, lote D, pudo mantener el recuento de células al nivel de inoculación hasta el día 64, en el que se detectó un alto recuento de células aberrante de 4,7E+03 UFC/g. Sin embargo, el recuento de células sobre YGC-agar para el lote D volvió a estar por debajo del límite de detección (1,0E+01 UFC/g) los siguientes días de toma de muestras.

Se observó un efecto bactericida en las muestras de aliño ranchero con el 1% de las dos composiciones antifúngicas de "FP 1000" (gráficos verde oscuro y claro en la figura 8) así como las muestras que contenían el 0,1% de sorbato de potasio (gráfico azul, figura 8) reduciendo la carga inicial hasta por debajo del límite de detección (destrucción de 2 log). La combinación de levaduras no pudo recuperarse de la destrucción inicial a lo largo de 198 días de investigación en ninguno de los lotes con conservantes.

Tabla 26: Recuentos de células sobre YGC-agar para determinar el crecimiento de levaduras tras la inoculación con 500 UFC/g a lo largo del periodo de prueba en los diferentes lotes de aliño ranchero.

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	2,60E+02	3,90E+02	3,90E+02	2,50E+02	3,20E+02
3	1,50E+02	1,00E+02	1,30E+02	1,50E+02	1,70E+02
7	1,80E+03	1,45E+02	9,50E+01	1,20E+02	7,50E+01
14	1,93E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
28	2,25E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
42	1,47E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
56	1,71E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
64	1,98E+04	1,00E+01	1,00E+01	4,68E+03	1,00E+01
90	2,20E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
157	1,67E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
198	1,37E+04	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01

Además del crecimiento de levaduras, también se monitorizó el crecimiento de moho. Por tanto, se sometieron a prueba 5 recipientes por variante de muestra. En la tabla 6 se documentó el crecimiento visible por tubo de ensayo. Las esporas de moho inoculadas no mostraron ningún crecimiento visible a temperatura ambiente ni siquiera en las muestras sin proteger.

Tabla 27: Crecimiento de moho en aliño ranchero, determinado de manera visible y documentado como "+" (por ejemplo "+++--" 3 de 5 jarros mostraron crecimiento).

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D1 (0,5%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	----	----	----	----	----
3	----	----	----	----	----
7	----	----	----	----	----
14	----	----	----	----	----
28	----	----	----	----	----
42	----	----	----	----	----
56	----	----	----	----	----
64	----	----	----	----	----
90	----	----	----	----	----
157	----	----	----	----	----
198	----	----	----	----	----

El pH es un parámetro muy importante y obstáculo para el crecimiento bacteriano, por ejemplo un aumento del pH puede dar como resultado una flora antimicrobiana diferente ya que se reduce el nivel de pH como obstáculo.

Sin embargo, se decidió no ajustar los pH para no cambiar la formulación, sino más bien monitorizar el efecto mediante determinación del recuento de células totales y enumeración de bacterias ácido lácticas sobre medios de crecimiento adecuados. El menor pH (3,84) se observó para el lote de control, mientras que todas las muestras que contenían el producto fermentado tenían un pH superior a 4,1. Incluso el pH del lote con sorbato de potasio era de pH 4,02, superior al del lote de control. El desarrollo del pH a lo largo del tiempo puede observarse en la tabla 28. Se observa que los pH en todos los lotes siguen la misma tendencia y disminuyen aproximadamente 0,1 unidades de pH a lo largo del tiempo de almacenamiento. No se encontró una correlación con el recuento de células (datos para la enumeración del recuento de células totales no mostrados). (Los recuentos de células sobre medios selectivos

para ácido láctico estuvieron por debajo del límite de detección a lo largo de todo el periodo de prueba). Por tanto, la acidificación a través de bacteria de deterioro no parece explicar el efecto. Además, los diferentes pH iniciales de las muestras no parecieron tener una influencia directa sobre el estudio de exposición.

5 Tabla 28: Desarrollo del pH de los diferentes lotes de aliño ranchero a lo largo del periodo de prueba

día	Lote A Control sin proteger	Lote B FP1000-D1 (1%)	Lote C FP1000-D2 (1%)	Lote D MG200 (1%)	Lote E Sorbato de potasio (0,1%)
0	3,84	4,12	4,13	4,14	4,02
3	Nd	4,11	4,13	4,14	4,00
7	3,84	4,13	4,14	4,14	4,02
14	3,84	4,11	4,12	4,12	4,00
21	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
28	3,80	4,05	4,08	4,09	3,94
42	3,79	4,06	4,09	4,08	3,96
56	3,82	4,07	4,07	4,07	3,96
64	3,80	4,05	4,08	4,08	3,95
90	3,73	4,06	4,04	4,08	3,96
157	Nd	4,03	4,03	4,04	3,92
198	Nd	4,02	4,05	4,05	3,94

Conclusión

10 En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que las formulaciones antifúngicas investigadas en este caso, "FP1000 D1" y "FP1000 D2", tenían el potencial para controlar el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada (500 - 1000 UFC/g) en el aliño ranchero regular (pH 4,0) cuando se almacenaba a temperatura ambiente (20°C).

15 Una dosificación del 1% de las composiciones antifúngicas, que se diferenciaban en cuanto a la composición de los componentes activos ácidos orgánicos, isotiocianato de ajo y catequinas, provocó una reducción inicial de 2 log de la carga celular inoculada. Esto también se aplica para el 1% de MicroGARD 200 y el 0,1% de sorbato de potasio.

20 La combinación de levaduras no pudo recuperarse de la destrucción inicial a lo largo de 198 días de investigación en ninguno de los lotes con conservantes.

El moho investigado no encontró un sustrato adecuado en el modelo de alimentos elegido. No pudo detectarse ningún crecimiento de moho visual.

25 Además, se monitorizó el crecimiento de bacterias ácido lácticas a lo largo del periodo de prueba ya que estos organismos de deterioro eran una preocupación. Sin embargo, no se encontraron células cultivables en ninguno de los lotes a lo largo del periodo de prueba de 198 días. Esto puede correlacionarse bien con el hecho de que no se registró ningún cambio significativo en el pH.

30 Con este estudio de exposición se identificó que las combinaciones propuestas "FP1000 D1" y "FP1000 D2" demostraron un efecto antifúngico inmediato y eficaz tras la adición, y controlaron el crecimiento de las levaduras seleccionadas como diana en el producto investigado (aliño ranchero regular) a lo largo del almacenamiento durante al menos 29 semanas a temperatura ambiente.

ESTUDIO DE APLICACIÓN - ALIMENTO PARA MASCOTAS

35 El objetivo del presente estudio era evaluar la influencia de combinaciones experimentales seleccionadas sobre una combinación de levaduras y una combinación de mohos en mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas a pH 3,0 y pH 4,0. La combinación experimental "FP1000" consistía en el 0,95% de isotiocianato de ajo de mostaza marrón, el 7,5% de catequinas de té verde y del 8 al 11% de ácidos orgánicos totales de un producto fermentado de propionibacterias. La formulación se añadió a concentraciones del 0,35% y el 0,7% (p/p) al modelo de aplicación.

40 Los resultados experimentales del estudio de exposición han mostrado que la formulación antifúngica investigada en este caso, "FP1000", tenía el potencial para controlar el crecimiento de la combinación de levaduras inoculada en el mejorador de la palatabilidad regular a ambos niveles de pH sometidos a prueba cuando se almacenó a 42°C, compitiendo por tanto con el agente antimicrobiano industrial usado. Esto también se aplicó para el crecimiento de moho, que se suprimió por "FP 1000" en el producto a pH superior en comparación con el control sin proteger.

Configuración experimental

50 AFB International proporcionó muestras de mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas a pH 3 y pH 4 sin ninguna medida de conservación. Se diseñaron las variables con la intención de demostrar la viabilidad en

cuanto a eficacia antifúngica del agente antifúngico conceptual a los niveles propuestos usando como agente de referencia un conservante normalmente usado en la industria. AFB International también proporcionó un lote de mejorador de la palatabilidad (pH 4) que contenía concentraciones usadas comúnmente de este conservante.

5 Se dividió cada lote (esquema en la tabla 30) en sondas de 200 ml y se colocaron en jarros estériles. Se inocularon sondas de cada lote con el nivel deseado de levaduras, y se inocularon 10 ml de cada lote con esporas de moho, respectivamente a una tasa de inoculación objetivo de 500 a 1000 UFC/g.

10 Se mezclaron exhaustivamente los productos viscosos (2 minutos) en el plazo de 10 minutos desde la inoculación para garantizar que el inóculo se distribuyó uniformemente por todo el producto. Se incubaron todas las muestras a 42°C y se sometieron a ensayo para determinar el crecimiento de levaduras, se sembraron en placa sobre medio adecuado hasta 6 semanas de almacenamiento o hasta el crecimiento de moho visible, respectivamente. Se limitó el periodo de prueba debido a los volúmenes proporcionados del mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas.

15

Tabla 29

Lote	Agente antimicrobiano	Concentración % (p/p)	pH	Organismo indicador	UFC/g	Número de muestras ¹
A	Sin agente antimicrobiano	N/A	3,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
B	Sin agente antimicrobiano	N/A	4,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
C	Agente antimicrobiano industrial	Desconocido	4,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
D	FP 1000-C1	0,35	3,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
E	FP 1000-C2	0,7	3,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
F	FP 1000-C1	0,35	4,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2
G	FP 1000-C2	0,7	4,0	Moho	1000	5
				Levaduras	1000	2

¹ Las mismas muestras se analizan a lo largo del periodo de prueba (jarro abierto).

Preparación de cultivos bacterianos

20

Las cepas de levaduras y moho que se investigaron en este estudio de exposición se muestran en la tabla 32. En total se emplearon 8 cepas, de la Colección de Cultivos interna de Danisco (DCS) (Danisco A/S, Brabrand, Dinamarca), como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en el mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas respectivo. Originalmente, se aislaron por ejemplo de alimentos y alimento para mascotas deteriorados o se obtuvieron de colecciones de cultivo oficiales tales como DMSZ y ATCC.

25

Tabla 30: Cepas investigadas que se usaron como 1 combinación de levaduras y 1 de mohos en este estudio.

Organismo	Código	Aislado de
<i>Candida lipolytica</i>	DCS 1346	Aislado de alimentos
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 1090	Aislado de alimentos
<i>Candida parapsilosis</i>	DCS 787	
<i>Candida albicans</i>	DCS 1289	ATCC 9179
<i>Aspergillus versicolor</i>	DCS 1069	DSMZ 63292
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1115	Aislado de alimento para mascotas
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1291	ATCC 16404
<i>Aspergillus niger</i>	DCS 1325	DSMZ 737

30

Antes de cada experimento, se propagó un cultivo madre de cada levadura, mantenido a -86°C en caldo adecuado que contenía glicerol al 50% (v/v), a través de dos ciclos de crecimiento consecutivos en medios adecuados (YGC-agar (VWR) pH 5,1 + 0,2; caldo YM (Becton, Dickinson and company) a pH 6,0 ± 0,2 y a temperatura (25°C). Se diluyen los cultivos durante la noche en solución salina para obtener cultivos de trabajo. Se generó un cóctel de las

levaduras añadiendo recuentos de células iguales de cada cultivo en un recipiente estéril y se mezclaron apropiadamente. Se diluyó el cóctel de levaduras y se inoculó en el producto para alcanzar la concentración final deseada. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

- 5 Se prepararon esporas de moho de la siguiente manera: se usaron aproximadamente 2 ml de agua estéril desmineralizada para lavar las esporas de una variedad de moho que se hizo crecer (placa de 5 días como mínimo). Se transfirió esta suspensión a un recipiente estéril. Se verificaron los recuentos de combinaciones mediante recuento de placas.

10 Análisis de muestras

15 Para tener muestras representativas, siempre se mezcló el mejorador de la palatabilidad líquido de 2 fases antes de la inoculación y toma de muestras durante el estudio. Se sometió a ensayo el mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas inoculado almacenado a 42°C en el momento cero, y semanalmente después de eso hasta la semana 6. (El almacenamiento y la toma de muestras se limitaron por los volúmenes de mejorador de la palatabilidad proporcionados). Se detectaron las UFC/g por duplicado para 2 muestras de cada lote inoculado con levaduras. Se extrajo asepticamente una parte de la muestra de cada jarro, se diluyó 10 veces en solución de Ringer y se sembró en placas con una técnica de instrumento de siembra en placas en espiral sobre agar adecuado. Se incubaron las muestras sometidas a ensayo para detectar levaduras a 30°C durante 48 horas sobre YGC-agar [AM-20 015].

Se analizaron visualmente 5 muestras de cada lote inoculado con moho para determinar el crecimiento de moho. (Las muestras con inoculación con moho no se mezclaron).

25 *Resultados*

Enumeración de levaduras

30 Los resultados de la enumeración de levaduras en el mejorador de la palatabilidad de experimentación durante 6 semanas de almacenamiento se muestran en la tabla 31. El sistema de conservación convencional así como la combinación experimental "FP 1000" no permitieron un crecimiento del organismo diana a lo largo del periodo de almacenamiento a ambos niveles de pH. Por otro lado, se consideró que los lotes sin proteger a pH 3 y pH 4 estaban deteriorados en el plazo de la semana 2. Sin embargo, debe mencionarse que la combinación investigada de levaduras indicadoras pareció sensible al pH bajo en el producto a pH 3. A lo largo del tiempo, la densidad celular disminuyó en todas las muestras incluyendo el control sin proteger.

Tabla 31: Recuentos de células sobre YGC-agar para determinar el crecimiento de levaduras tras la inoculación con 1.000 UFC/g a lo largo del periodo de prueba en los diferentes lotes de mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas.

Lote	Levaduras sobre YGC-agar						
	pH	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 6
A	3	1,65E+03	4,50E+03	2,50E+04	2,00E+03	n.t.	n.t.
B	4	1,35E+03	5,00E+05	1,70E+04	1,95E+05	n.t.	n.t.
C	4	1,50E+03	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02
D	3	1,65E+03	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02
E	4	1,35E+03	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02
F	3	1,65E+03	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02
G	4	1,35E+03	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02	<1,00E+02

40 <1,00E+02 UFC/g es el límite de detección del método de siembra en placas en espiral usado

Mohos

45 Se monitorizaron 5 tubos de mejorador de la palatabilidad por variante de muestra para determinar el crecimiento de moho visible. Tal como puede observarse en la tabla 32, a lo largo del periodo de prueba sólo se observó moho en el lote sin proteger a pH 4. Ninguna de las demás muestras proporcionó un entorno favorable para el crecimiento de moho.

50 Tabla 32: Crecimiento de moho en mejorador de la palatabilidad de alimento para mascotas. El crecimiento visible se documenta como "x", la ausencia de crecimiento se notifica como "-" (por ejemplo "xxxxx" 5 de 5 tubos mostraron crecimiento).

Lote	Mohos						
	pH	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 6
A	3	----	----	----	----	----	----
B	4	----	xxxxx	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
C	4	----	----	----	----	----	----

D	3	----	----	----	----	----	----
E	4	----	----	----	----	----	----
F	3	----	----	----	----	----	----
G	4	----	----	----	----	----	----

Conclusiones

5 El pH superior es un obstáculo reducido para organismos de deterioro y por tanto más difícil de proteger. Se observó un aumento en la densidad de células de levaduras en el control sin conservante a pH 4 tras una semana de incubación. Sin embargo, la combinación investigada de levaduras indicadoras pareció sensible al pH bajo en el producto a pH 3. A lo largo del tiempo, la densidad celular disminuyó en todas las muestras incluyendo el control sin proteger. Sin embargo, ambas concentraciones (el 0,35% y el 0,7%) de la combinación experimental ("FP 1000") que contenía extracto de té verde, aceite de mostaza y un producto fermentado, controlaron la contaminación por 10 levaduras e impidieron el deterioro del producto a ambos niveles de pH. Por tanto, compitió con un conservante usado normalmente en la industria, en el que los organismos de prueba no crecieron dentro del plazo del periodo de prueba. Las esporas de moho inoculadas mostraron crecimiento visible en las muestras sin proteger a pH 4 tras 2 días.

15 **Bibliografía**

OHATA, Y.; MATSUI, Y.; OSAWA, T. Y KAWAKISHI, S.; 2004; Retarding effect of cyclodextrins on the decomposition of organic isothiocyanate in an aqueous solution; Bioscience biotechnology Biochemistry 68 (3), 671-675; 2004

20 ISAO KUBO, HISAE MUROI, Y MASAKI HIMEJIMA; 1992; Antimicrobial Activity of green tea flavor components and their combination effects; J. Agric. Food Chem., 40 (2); 1992

25 YAM, T.S.; SHAH, S. Y HAMILTON MILLER, J.M.T.; 1997; Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (Camellia sinensis), and of tea components; FEMS Microbiology Letters; 1997;

IKIGAI, H.; NAKAE, T.; HARA, Y. Y SHIMAMURA, T.; 1993; Bactericidal catechin damage the lipid bilayer; Biochimica et Biophysica Acta., 1993

30 KAJIYA, K.; HOJO, H.; SUZUKI, M.; NANJO, F.; KUMAZAWA, S. Y NAKAYAMA, T.; 2004; Relationship between Antibacterial Activity of (+)-Catechin Derivatives and Their Interaction with a Model Membrane ; J. Agric. Food Chem., 52, 2004

35 LUND, B. M. Y EKLUND, T. KAJIYA; 2000; Control of pH and use of organic acids; Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Ed.) Aspen Publishers Inc.: The microbiological safety and quality of food. págs. 175-199.; 2000

FREER, S.N.; 2002, Acetic acid production by Dekkera/Brettanomyces yeasts, Journal of Microbiology & Biotechnology 18; 2002.

40 Aunque se ha descrito la invención en relación con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse excesivamente a tales realizaciones específicas.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende

5 (a) isotiocianato de alilo; y

(b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y

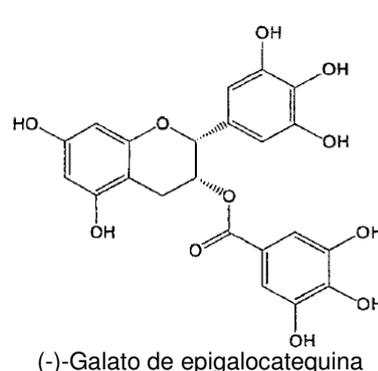
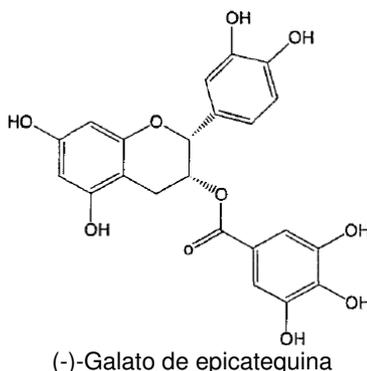
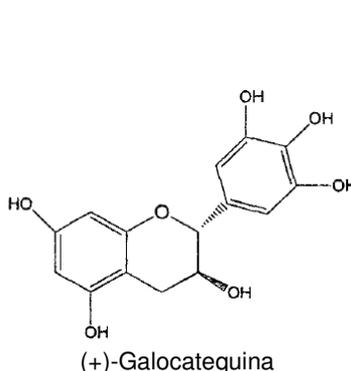
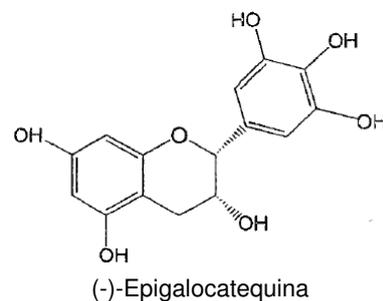
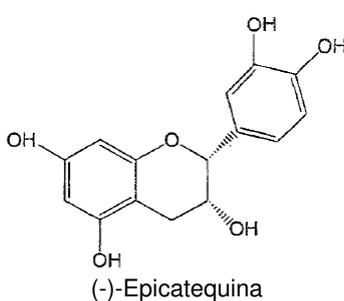
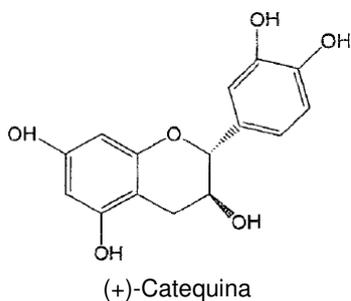
(c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

10

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el ácido orgánico es una mezcla de ácido acético y ácido propiónico.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el extracto de té verde es un compuesto seleccionado de

15



y mezclas de los mismos.

4. Composición según la reivindicación 1, 2 ó 3, en la que la composición comprende el isotiocianato de alilo en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición.

20

5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende el ácido orgánico en una cantidad de al menos el 3% en peso basándose en la composición.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende ácido acético en una cantidad de al menos el 2% en peso basándose en la composición.

25

7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende ácido propiónico en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición.

30

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende el extracto de té verde en una cantidad de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende

35

- isotiocianato de alilo en una cantidad de al menos el 0,1% en peso basándose en la composición;

- ácido acético en una cantidad de al menos el 2% en peso basándose en la composición;

40 - ácido propiónico en una cantidad de al menos el 0,5% en peso basándose en la composición; y

- extracto de té verde en una cantidad de al menos el 1,0% en peso basándose en la composición.

5 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un emulsionante seleccionado de polisorbatos, monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de ácido acético de mono-diglicéridos, ésteres de ácido tartárico de mono-diglicéridos y ésteres de ácido cítrico de mono-diglicéridos.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un quelante seleccionado de EDTA, ácido cítrico, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos y polifosfatos.

10 12. Producto alimenticio que comprende una composición protectora antimicrobiana según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

13. Procedimiento para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el material con

15 (a) isotiocianato de alilo;

(b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y

20 (c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*].

14. Uso de

25 (a) isotiocianato de alilo;

(b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y

(c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*];

30 para prevenir y/o inhibir el crecimiento de, y/o destruir, un microorganismo en un material.

15. Kit para preparar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el kit

35 (a) isotiocianato de alilo;

(b) un ácido orgánico seleccionado de ácido acético, ácido propiónico y mezclas de los mismos; y

(c) extracto de té verde [*Camellia sinensis*]

40 en envases o recipientes separados; opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o puesta en contacto y/o uso.

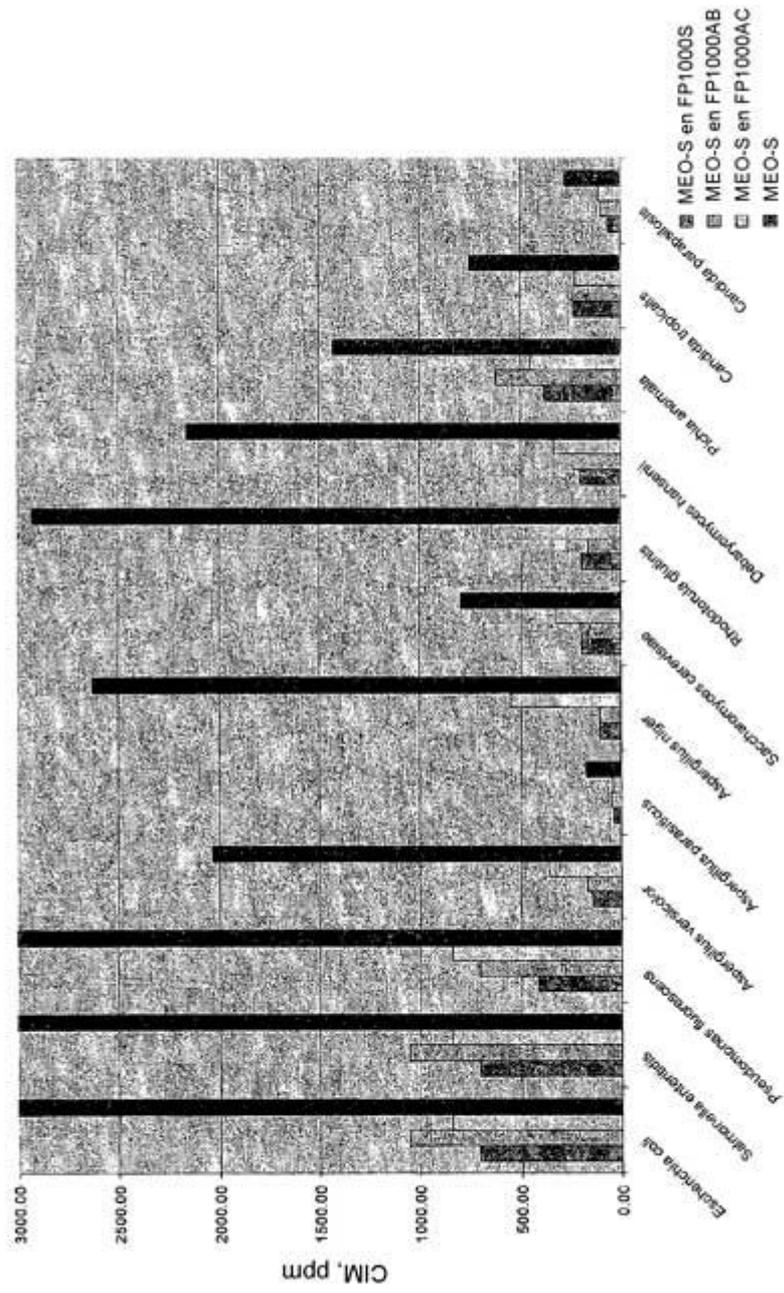


Figura 1: Concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de mostaza (MEO-S) en combinación con té verde y OA-F "FP1000-S", en combinación con OA-F "FP1000-AB" y en combinación con té verde "FP1000AC" así como el compuesto individual MEO-S

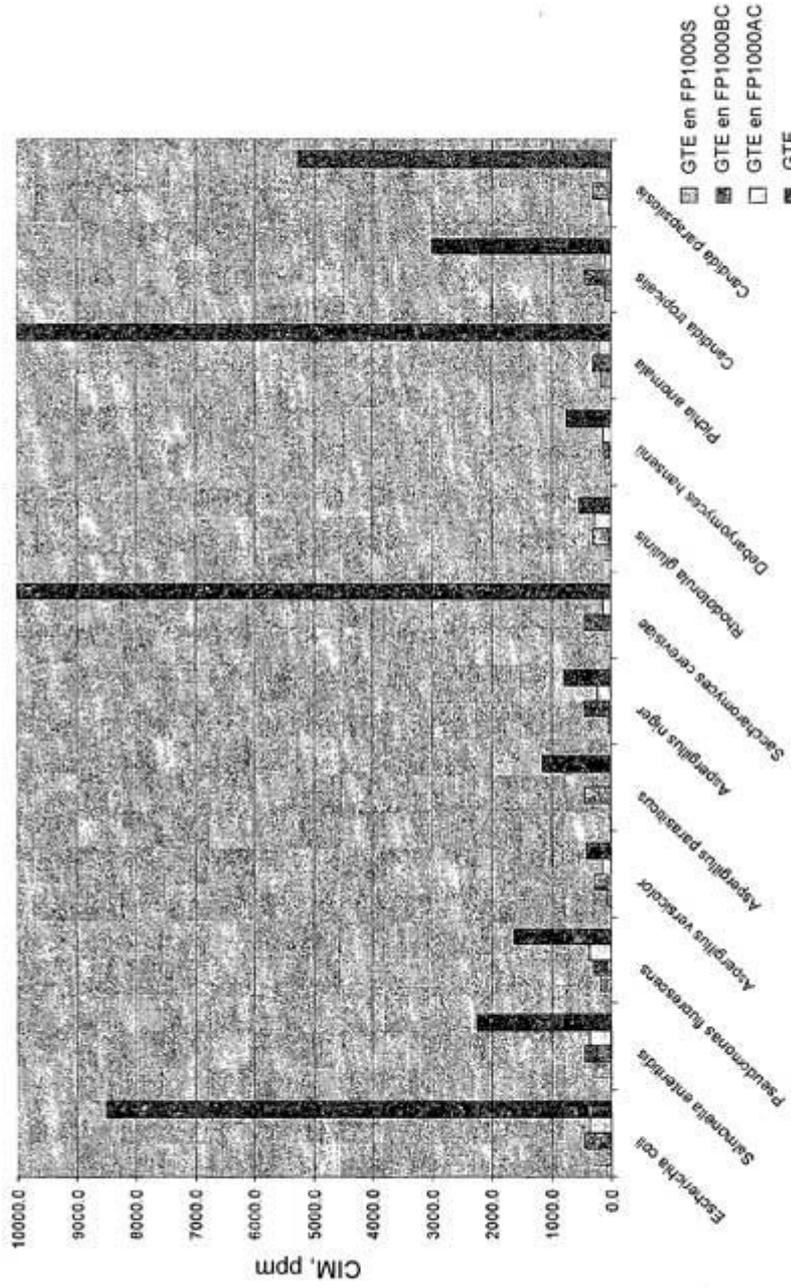


Figura 2: Concentración inhibitoria mínima (CIM) del té verde (GTE) en combinación con aceite esencial de mostaza y OA-F "FP1000-S", en combinación con aceite esencial de mostaza "FP1000AC" y en combinación con OA-F "FP1000-BC" así como el compuesto individual GTE

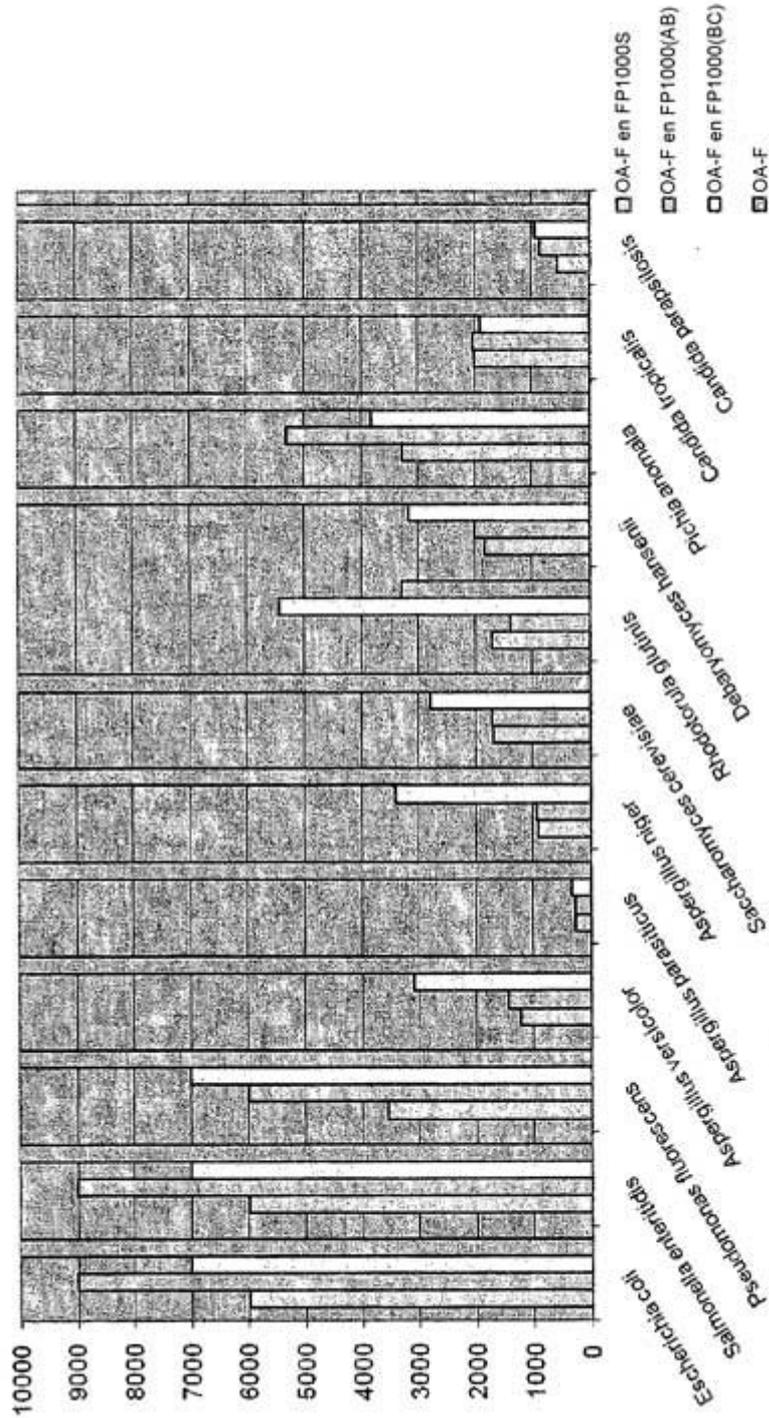


Figura 3: Concentración inhibitoria mínima (CIM, ppm) del producto fermentado OA-F en combinación con té verde y aceite esencial de mostaza "FP1000-S", en combinación con aceite esencial de mostaza "FP1000-AB" y en combinación con té verde "FP1000BC" así como el compuesto individual OA-F

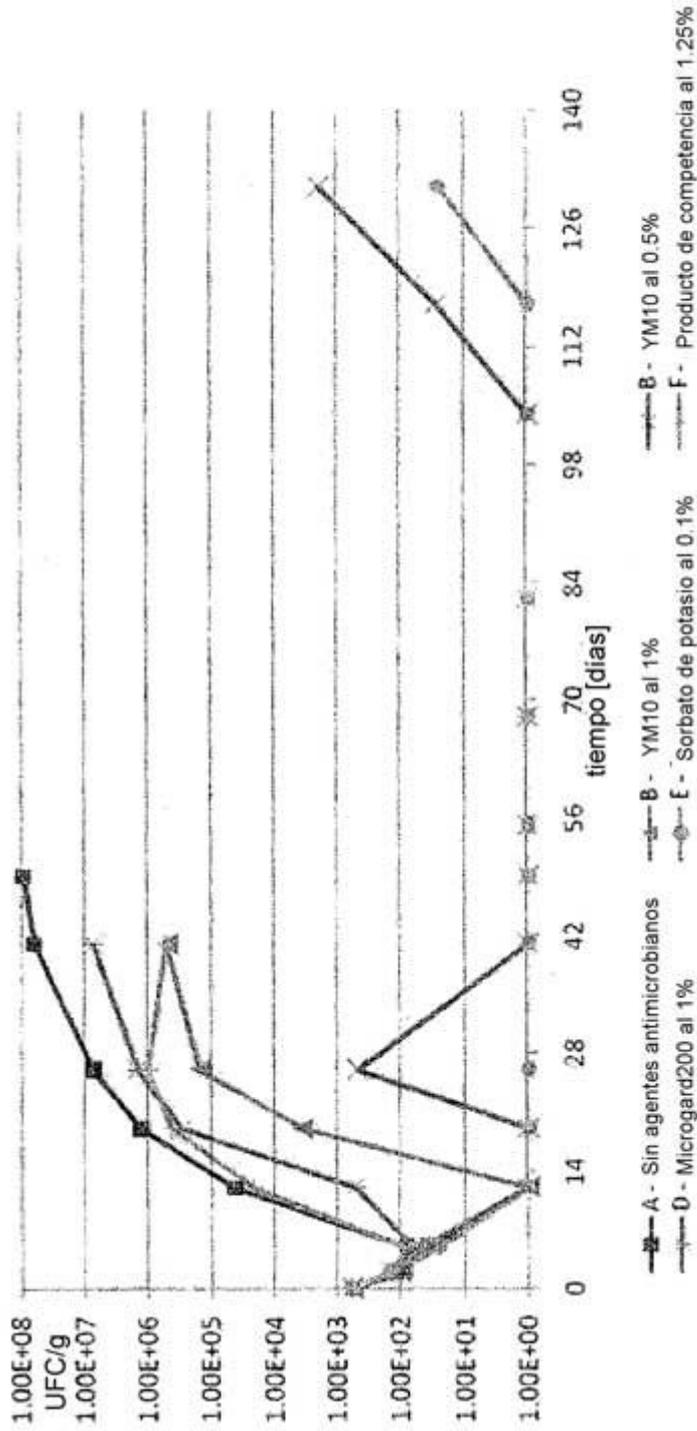


Figura 4: Crecimiento de levaduras (tasa de inoculación: 500-1000 UFC/g) en salsa BBQ empleando dos concentraciones diferentes de agente antifúngico recién desarrollado YM10; MicroGARD[®] al 1%; producto de competencia al 1.25%; sorbato de potasio al 0.1% y una muestra libre de conservantes.

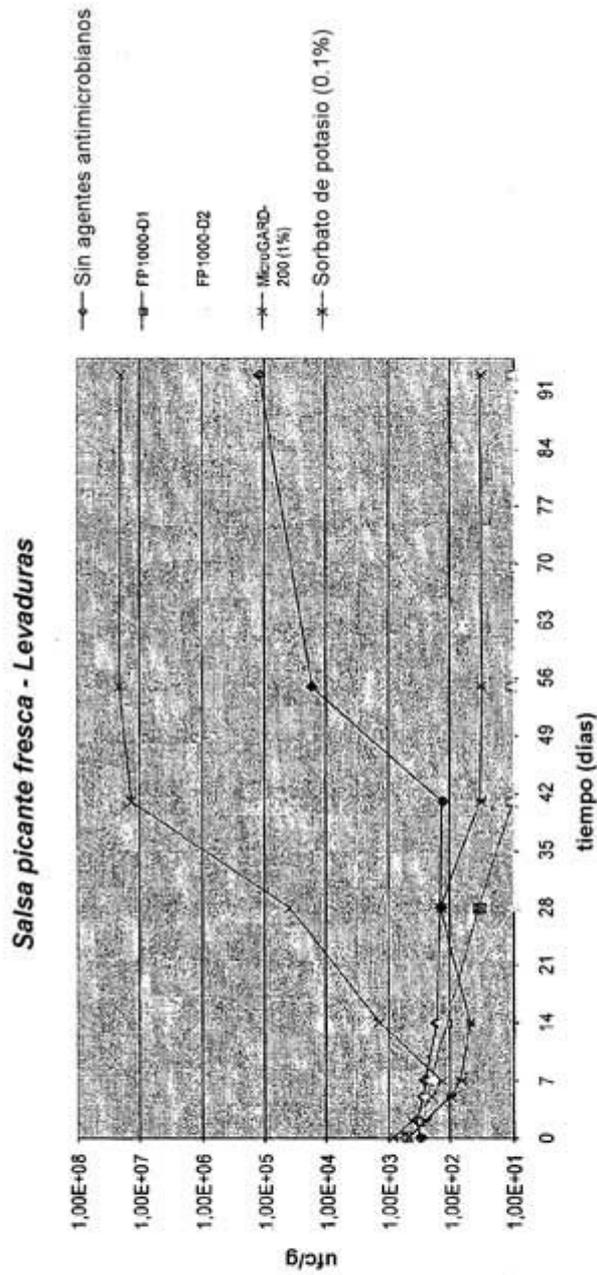


Figura 5: Crecimiento de levaduras (tasa de inoculación: 300-800 UFC/g) en salsa picante fresca empleando dos concentraciones diferentes de los componentes activos de la combinación experimental FP1000 (MicroGARD® 200, extracto de té verde y aceite esencial de mostaza), MicroGARD® 200 al 1%, sorbato de potasio al 0.1% y una muestra libre de conservantes.

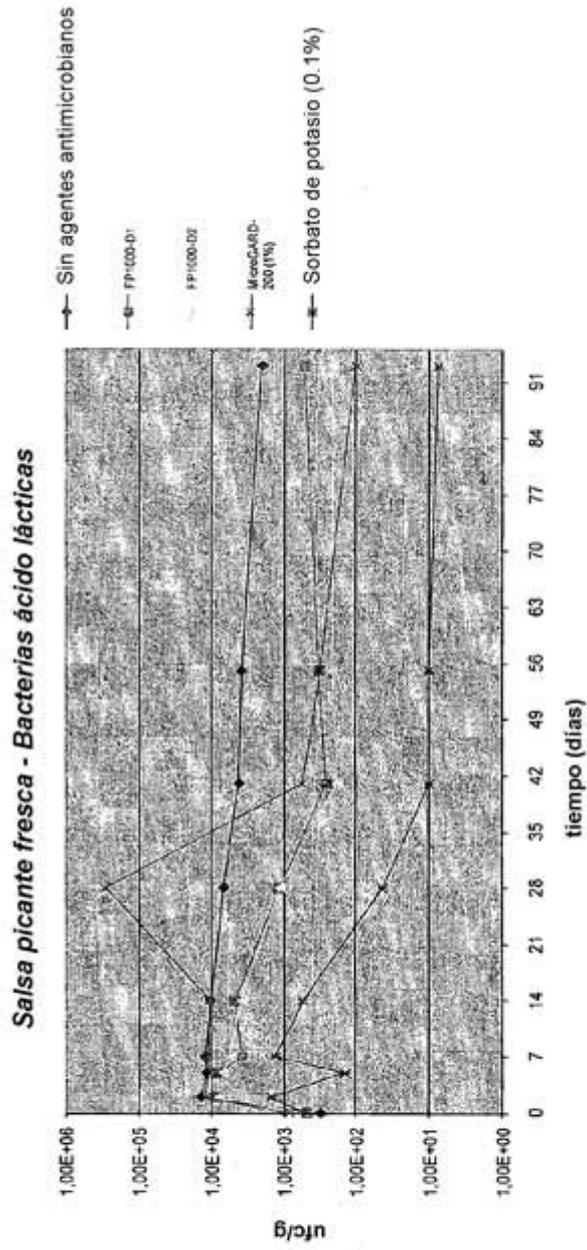


Figura 6: Bacterias del ácido láctico (flora nativa) en salsa picante empleando dos concentraciones diferentes de los componentes activos de la combinación experimental FP1000 (MicroGARD™ 200, extracto de té verde y aceite esencial de mostaza), MicroGARD™ 200 al 1%, sorbato de potasio al 0.1% y una muestra libre de conservantes.

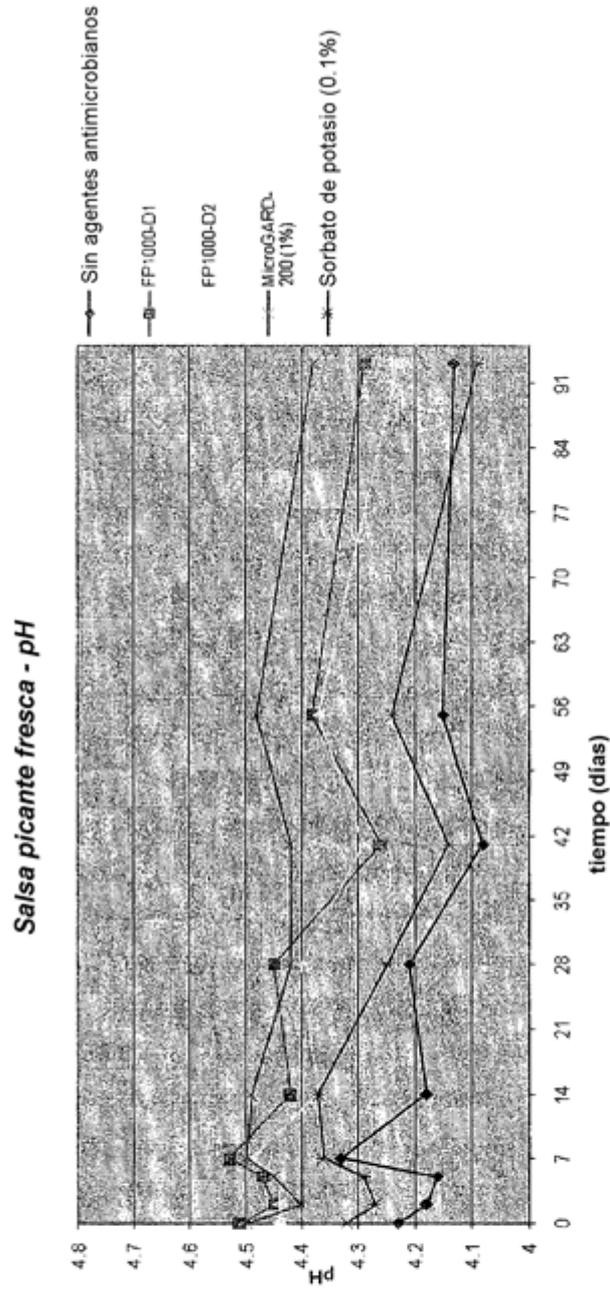


Figura 7: Desarrollo del pH en salsa picante a lo largo de 92 días de almacenamiento a 4°C

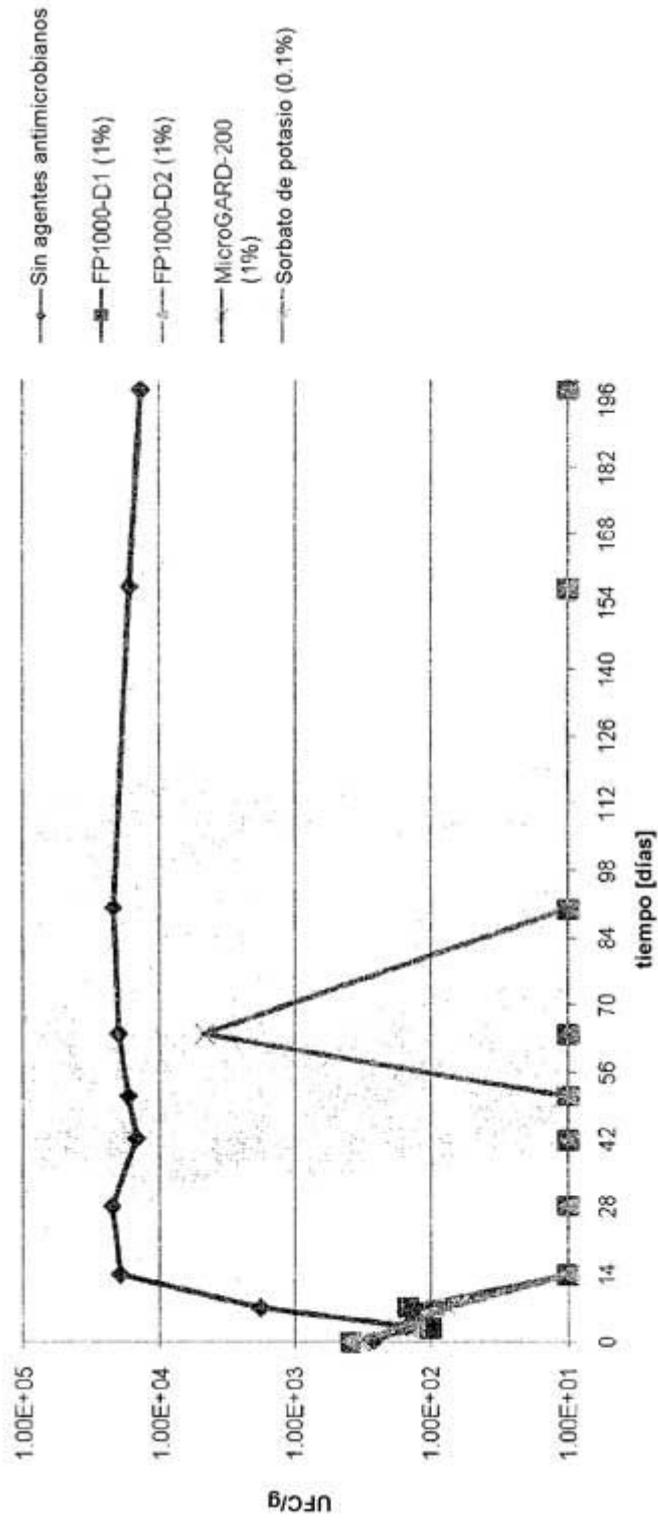


Figura 8: Crecimiento de levaduras (tasa de inoculación: 500 UFC/g) en aliño ranchero empleando dos concentraciones diferentes de los componentes activos en "FP1000" (D1; D2), un agente antifúngico recién desarrollado; MicroGARD® 200 al 1%; y sorbato de potasio al 0.1% así como el crecimiento en la muestra libre de conservantes.