

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 182**

51 Int. Cl.:

**A23B 4/20** (2006.01)

**A23L 13/40** (2006.01)

**A23L 13/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12162532 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2644033**

54 Título: **Composición para conservar productos alimenticios y su uso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2016**

73 Titular/es:

**NIACET B.V. (100.0%)  
Papesteeg 91  
4006 WC Tiel, NL**

72 Inventor/es:

**ANAGNOSTOU, ANGELIKI;  
AHOLA, JUHANA;  
BRENDLER, DOMINICUS;  
VAN KUIK, PETER;  
VAN LENT, HENK JAN;  
HIETALA, JUKKA y  
MARTENS, JEROEN**

74 Agente/Representante:

**VIGAND, Philippe**

ES 2 569 182 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 para conservar productos alimenticios y su uso

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición para conservar productos alimenticios que comprende esencialmente acetato de potasio y diacetato de metal alcalino. La presente invención se refiere asimismo a un uso de la composición para conservar productos alimenticios. La presente invención se refiere adicionalmente a un método para conservar productos alimenticios, y a un producto cárnico cocido que comprende la composición para conservar productos alimenticios.

Antecedentes de la invención

15 *Listeria monocytogenes* (también conocida como *L. monocytogenes* o *Listeria*) se ha reconocido como un organismo nocivo que es probable que se produzca en productos alimenticios, tales como productos cárnicos, de pescado y avícolas (listos para consumir) cocidos. En cuanto a la listeriosis, se indica que los alimentos listos para el consumo, tales como embutidos y salchichas Frankfurt suponen un importante riesgo de enfermedad/muerte por ración de este organismo.

20 Un motivo de preocupación incluye la capacidad de *Listeria monocytogenes* para sobrevivir en entornos de procesamiento, en productos recontaminados durante el procesamiento postérmico, y en el crecimiento posterior en el producto acabado a temperaturas de refrigeración.

25 Se ha indicado que las sales de ácido láctico y ácido acético presentan una actividad antimicrobiana significativa contra *Listeria*. La incorporación de lactato y/o diacetato en la formulación del producto se ha utilizado ampliamente para prevenir el crecimiento de *Listeria* con las ventajas de bajo costo y garantía de actividad residual tras la apertura del envase (Lianou A., Geornaras I., Kendall P. A., Belk K. E., Scanga J. A., Smith G. C., y Sofos J. N., 2007, *Fate of Listeria monocytogenes in commercial ham, formulated with or without antimicrobials under conditions simulating contamination in the processing or retail environment and during home storage*, J. Food Prot., 70:378-385).

35 El documento WO 2011/014669 A1 desvela una composición de conservación antimicrobiana para productos alimenticios que comprende: ácido láctico o su sal, ácido acético o su sal, y ácido propiónico o su sal. Se desvela igualmente un producto alimenticio y un método para producir el producto alimenticio que comprende la composición de conservación.

40 La solicitud de la patente de Estados Unidos 2008/0317921 A1 se refiere también a la utilización de sales de ácido láctico y/o ácido acético en conservación. Se desvela un proceso para fabricar un producto cárnico cocido con un aumento en la estabilidad del periodo de validez y una mayor resistencia contra el crecimiento de bacterias. En el proceso un producto cárnico sin cocer se combina con una sal de ácido orgánico seleccionada entre sales de lactato, sales de acetato y sus combinaciones, y un ácido latente, seguido por la cocción del producto cárnico. El ácido latente no muestra propiedades ácidas cuando se añade al producto cárnico sin cocer, aunque se convierte en ácido carboxílico durante la cocción.

45 Sin embargo, el lactato que es altamente higroscópico requiere prepararse como una solución al 60 % con diacetato, afectando negativamente al sabor (Stekelenburg F. K. y Kant-Muermans M. L. T., 2001, *Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of Lactobacillus curvatus and Listeria monocytogenes*, Int J. Food Microbiol., 66:197-203).

50 Además, la adición de ácidos a los productos cárnicos se asocia con una serie de desventajas. La adición de un compuesto ácido puede afectar perjudicialmente al sabor de la carne, su estructura, y diversas propiedades, tales como olor y sabor.

55 Esto significa que se requiere hallar un equilibrio entre la cantidad y el tipo de ácido que se puede añadir sin afectar perjudicialmente al sabor de la carne y sus otras propiedades, y la resistencia microbiológica a obtener.

60 El documento WO2005/034640A1 desvela métodos para inhibir el crecimiento bacteriano en carne y carne de aves de corral crudas.

65 El documento WO03/005963A2 desvela una composición con actividad bacteriostática y bactericida contra las esporas bacterianas y las células vegetativas.

Stekelenburg F K, *Food Microbiology* vol. 20 n.º 1 págs. 133-137 (2003), describe una inhibición potenciada de *L. monocytogenes* en la salchicha Frankfurt por medio de la adición de mezclas de lactato de potasio y diacetato de sodio.

El documento US2006/127547A1 desvela el uso combinado de glicina y/o derivado de glicina y lactato y/o sales de (di)acetato, como agente antibacteriano contra *Listeria* en los productos alimenticios y bebidas.

5 El documento GB543582A se refiere a la conservación de productos alimenticios, bebidas y otras sustancias susceptibles de filamentación y/o mohos.

*Current Protocols in Cell Biology* (1998), Laboratory Stock Solutions and Equipment, Common Stock Solutions, Buffers and Media, págs. A2A1-A2A10, describe un intervalo de soluciones tampón.

10 Sumario de la invención

15 La presente invención se dirige a una composición para conservar productos alimenticios que comprende acetato de potasio y diacetato de metal alcalino, en la que la relación en peso de acetato de potasio:diacetato de metal alcalino oscila entre 1,5 y 9:1, y en la que la composición para conservar productos alimenticios se encuentra en forma sólida.

20 La presente invención se dirige además a un método para conservar productos alimenticios, en el que el método comprende mezclar la composición para conservar productos alimenticios de la invención con productos alimenticios.

La presente invención se dirige igualmente al uso de la composición para conservar productos alimenticios de la invención para evitar el crecimiento de la cepa de *Listeria* y bacterias aerobias mesófilas en condiciones de almacenamiento.

25 La presente invención se dirige asimismo a un producto cárnico cocido que comprende la composición para conservar productos alimenticios de la invención.

30 Sorprendentemente, se ha descubierto que una combinación particular de acetato de potasio y diacetato de metal alcalino, tal como diacetato de sodio y diacetato de potasio, permite fabricar productos alimenticios que muestran una alta resistencia contra el crecimiento de bacterias patógenas, en particular, *Listeria monocytogenes* y bacterias aerobias mesófilas. Se obtiene al mismo tiempo un aumento de la resistencia contra otras bacterias.

35 Además, se ha hallado de manera sorprendente que la composición para conservar productos alimenticios de acetato de potasio y diacetato de metal alcalino no afecta perjudicialmente al olor, al sabor y a la textura de dicho producto alimenticio.

#### Figuras

40 La Figura 1 a muestra el crecimiento de *L. monocytogenes* a 4 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt inoculadas tratadas con diversas composiciones de conservación.

La Figura 1 b muestra el crecimiento de *L. monocytogenes* a 7 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt inoculadas tratadas con diversas composiciones de conservación.

45 La Figura 1 c muestra el crecimiento de *L. monocytogenes* a 10 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt inoculadas tratadas con diversas composiciones de conservación.

50 La Figura 1 d muestra el crecimiento de *L. monocytogenes* a 15 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt inoculadas tratadas con diversas composiciones de conservación.

La Figura 2a muestra el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (BAM) a 4 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt sin inocular tratadas con diversas composiciones de conservación.

55 La Figura 2b muestra el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (BAM) a 7 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt sin inocular tratadas con diversas composiciones de conservación.

La Figura 2c muestra el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (BAM) a 10 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt sin inocular tratadas con diversas composiciones de conservación.

60 La Figura 2d muestra el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (BAM) a 15 °C durante 90 días de almacenamiento en salchichas Frankfurt sin inocular tratadas con diversas composiciones de conservación.

65 La Figura 3a muestra el crecimiento de *L. monocytogenes* en muestras de carne picada almacenadas en frío (a + 7 °C) tratadas con diversas composiciones de conservación.

La Figura 3b muestra el crecimiento de bacterias aerobias totales en muestras de carne picada almacenadas en

frío (a + 7 °C) tratadas con diversas composiciones de conservación.

La Figura 3c muestra el crecimiento de *Salmonella* en la carne de vacuno picada (almacenada aeróbicamente a 10 °C) tratada con diversas composiciones de conservación.

5 Descripción detallada de la invención

10 La composición para conservar productos alimenticios según el primer aspecto de la presente invención comprende acetato de potasio y diacetato de metal alcalino, en la que la relación en peso de acetato de potasio:diacetato de metal alcalino oscila entre 1,5 a 9:1, y en la que la composición para conservar productos alimenticios se encuentra en forma sólida.

15 En una realización preferente, la relación en peso de acetato de potasio:diacetato de metal alcalino oscila entre 2,3 y 9:1, preferentemente de 3 a 5,7:1, más preferentemente de 3,3 a 4,9:1, y más preferentemente 4:1.

20 En otra realización preferente, el acetato de potasio está presente en una cantidad de 60-90 % en peso, preferentemente en una cantidad de 70-90 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 75-85 % en peso y aún más preferentemente en una cantidad de 77-88 % en peso en base al peso de la composición final para conservar productos alimenticios.

25 En otra realización preferente, el diacetato de metal alcalino está presente en una cantidad de 10-40 % en peso, preferentemente en una cantidad de 10-30 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 15-25 % en peso y aún más preferentemente en una cantidad de 17-23 % en peso en base al peso de la composición final para conservar productos alimenticios.

30 El diacetato de metal alcalino es preferentemente diacetato de sodio, diacetato de potasio o sus mezclas. El diacetato de metal alcalino es más preferentemente diacetato de potasio.

35 Se conoce por la literatura que el diacetato de metal alcalino es una combinación sólida de un acetato de metal alcalino y ácido acético con una relación molar de acetato de metal alcalino:ácido acético de aproximadamente 1:1. A modo de ejemplo, el diacetato de sodio anhidro consiste en acetato de sodio cristalino con ácido acético como solvato y puede presentar un contenido de 39 a 42 % de ácido acético y 57 a 60 % de acetato de sodio.

40 El diacetato de metal alcalino se entiende, además, como una combinación de una base de metal alcalino y ácido acético.

45 El diacetato de metal alcalino puede obtenerse por una reacción de ácido acético y base de metal alcalino de manera que la relación molar de ácido acético:metal alcalino es 2:1. En una reacción de este tipo una parte del ácido acético se neutraliza por la base.

50 Ejemplos de bases de metal alcalino son carbonato de metal alcalino, bicarbonato de metal alcalino e hidróxido de metal alcalino.

55 Alternativamente, el diacetato de metal alcalino puede obtenerse por cristalización a partir de una solución de acetato de metal alcalino en agua y ácido acético. En este compuesto cristalino, la relación molar de ácido acético:acetato de metal alcalino es 1:1.

60 Cuando el diacetato está en contacto con la humedad o cuando se disuelve en solución acuosa, se libera ácido acético. Por lo tanto, aumentando la cantidad del diacetato a partir de las cantidades definidas previamente también aumenta la cantidad de ácido acético en el producto, que a su vez afecta perjudicialmente al sabor del producto alimenticio, su estructura, y diversas propiedades, tales como olor y textura. Además de esto, la adición de ácidos orgánicos, especialmente de ácido acético, reduce la resistencia térmica de la levadura.

65 El acetato de potasio y los diacetatos de metal alcalino son productos químicos disponibles comercialmente. El acetato de potasio y el diacetato de metal alcalino son de calidad alimenticia.

La composición para conservar productos alimenticios puede estar en forma sólida, preferentemente en polvo o en forma cristalina. La composición para conservar productos alimenticios en forma sólida es más fácil de transportar y utilizar que la forma líquida. Al utilizar la composición para conservar productos alimenticios en forma sólida sin agua adicional se añade al producto alimenticio final. Si es necesario emplear la composición para conservar productos alimenticios en forma líquida, la composición sólida puede disolverse fácilmente en agua o en etanol acuoso.

Si la composición para conservar productos alimenticios se utiliza en forma líquida, por lo general se presenta en forma de una composición acuosa, que puede ser una solución o dispersión. Dicha composición acuosa comprende las cantidades de acetato de potasio y diacetato de metal alcalino especificadas previamente, con una concentración de 40-70 %, más preferentemente 50-55 %.

5 Según una realización preferente, la composición para conservar productos alimenticios en su forma sólida comprende además un agente antiaglutinante. Por el término "agente antiaglutinante" se entiende una composición o compuesto que evita el aglutinamiento de la composición en polvo para conservar productos alimenticios y por consiguiente permite una manipulación más eficiente y fácil de la composición para conservar productos alimenticios. Además, afecta la forma en que la composición para conservar productos alimenticios se mezcla eficientemente en un producto alimenticio. El término "agente antiaglutinante" se conoce por un experto en la materia.

10 El agente antiaglutinante se selecciona entre el grupo que consiste en óxido de magnesio, silicato de magnesio, carbonato de magnesio, fosfato de magnesio, sales de ácidos grasos de magnesio o calcio, dióxido de silicio, triglicéridos de ácido graso, celulosa y sus mezclas, preferentemente el agente antiaglutinante es una sal de ácido graso de magnesio o calcio, más preferentemente estearato de calcio o estearato de magnesio. Los agentes antiaglutinantes se disponen comercialmente y son de calidad alimenticia.

15 El agente antiaglutinante está presente en la composición para conservar productos alimenticios en una cantidad de 0,01-5 % en peso, preferentemente 0,1-3 % en peso, y más preferentemente 0,5-2,5 % en peso, en base al peso de la composición final para conservar productos alimenticios. Si el agente antiaglutinante está presente en cantidades superiores, se considera como aditivo, no como adyuvante.

20 La composición para conservar productos alimenticios está presente en el producto alimenticio final en una cantidad de 0,05-5 % en peso, preferentemente 0,1-3 % en peso y más preferentemente 0,2-2,5 % en peso, en base al peso del producto alimenticio final. Si la cantidad excede 5 % en peso, la calidad del producto alimenticio final comienza a verse afectada. El olor, el sabor y la textura ya no son tan apetecibles.

25 Los métodos de fabricación de cualquier tipo conocido en la literatura pueden aplicarse en la producción de la composición para conservar productos alimenticios de la presente invención. Por ejemplo se mezclan entre sí acetato, diacetato de metal alcalino y opcionalmente un agente antiaglutinante. En otro ejemplo, la composición para conservar productos alimenticios se produce al añadir ácido acético a acetato de potasio. En otro ejemplo, la composición para conservar productos alimenticios se produce por reacción de una base de metal alcalino, tal como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) o carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) con una cantidad suficiente de ácido acético.

30 En una realización preferente, la composición para conservar productos alimenticios se produce al añadir acetato de potasio y diacetato de metal alcalino, y opcionalmente un agente antiaglutinante, a un recipiente, preferentemente en una atmósfera inerte y seca. Los compuestos se mezclan manual o mecánicamente, preferentemente en atmósfera inerte y seca hasta obtener una mezcla homogénea de los compuestos. La composición de conservación se utiliza bien fresca o bien almacenada en condiciones secas, frías e inertes.

35 La composición para conservar productos alimenticios de la presente invención puede comprender cualquier componente adicional, tal como aditivos.

40 Por el término "producto alimenticio" se entiende cualquier ejemplo de material que puede utilizarse como alimento. El producto alimenticio puede estar cocido o crudo. Ejemplos de productos alimenticios son carne, productos alimenticios sin procesar y preprocesados, alimentos en conservas y productos lácteos.

45 La carne puede estar cocida o cruda. El término carne incluye, además, productos cárnicos preprocesados. Ejemplos de productos cárnicos preferentes son salchichas Frankfurt, embutidos, productos alimenticios cárnicos en conserva, jamón, alimentos listos para el consumo, fiambres y carnes envasadas al vacío.

50 Es preciso señalar que el término carne también incluye aves de corral, pescados y mariscos, tales como almejas, cangrejo, crustáceos y langosta.

55 Preferentemente el producto alimenticio es carne o productos alimenticios cárnicos en conserva. Preferentemente, la composición para conservar productos alimenticios según la presente invención es una composición de conservación de carne.

60 Según el segundo aspecto de la presente invención, la presente invención se refiere a un método para conservar productos alimenticios, preferentemente carne, en el que el método comprende mezclar la composición para conservar productos alimenticios, preferentemente la composición para conservar carne, según la presente invención con productos alimenticios.

65 En una realización preferente la composición de conservación de carne según la presente invención se añade de preferencia en forma de polvo por agitación a través del producto cárnico. Cualquier componente añadido en forma líquida se combina y se mezcla a través del producto cárnico. En el caso de piezas de carne, la composición para conservar carne y cualquier componente adicional, por ejemplo, se inyectan en la carne en forma líquida. Para

beneficiarse de los efectos de la invención, resulta preferente que los compuestos activos estén presentes también en el interior del producto cárnico, y no solo en el exterior. La adición de la composición para conservar carne y cualquier componente adicional mediante inmersión de piezas de carne en la solución es un método alternativo. Otros métodos adecuados, tales como aplicaciones por pulverización, mediante los cuales la composición para conservar carne y cualquier componente adicional que pueden agregarse al producto cárnico resultarán evidentes para los fabricantes de carne y no requieren ninguna divulgación adicional en este caso.

En una realización, tras la adición de la composición para conservar carne, se cocina el producto cárnico. La cocción de productos cárnicos es parte del conocimiento de la ciencia doméstica general del experto y no requiere mayor divulgación en el presente documento.

Según el tercer aspecto de la presente invención, la presente invención se refiere a un uso de la composición para conservar productos alimenticios para prevenir el crecimiento de bacterias.

Según una forma de realización preferente de la presente invención, el uso de la composición para conservar productos alimenticios según la presente invención se dirige a reducir, preferentemente prevenir el crecimiento de bacterias en condiciones de almacenamiento. Preferentemente, el uso de la composición para conservar productos alimenticios según la presente invención se dirige a reducir, preferentemente prevenir el crecimiento de la cepa de *Listeria*, bacterias aerobias mesófilas, *salmonella*, *E. coli* y bacterias de ácido láctico en condiciones de almacenamiento, preferentemente de cepas de *Listeria* y bacterias aerobias mesófilas.

Por condiciones de almacenamiento, tales como las condiciones de almacenamiento en frío, se entiende las condiciones en las que se almacena el producto alimenticio. Por ejemplo, en el caso de la carne, las condiciones de almacenamiento en frío incluyen temperaturas de 2 a 8 °C.

Según el cuarto aspecto de la presente invención, la presente invención se refiere a un producto cárnico que comprende la composición para conservar productos alimenticios según la presente invención. El producto cárnico puede estar curado o sin curar. Ejemplos de productos cárnicos sin curar adecuados son pollo, pavo y carne asada cocidos. Ejemplos de productos cárnicos curados adecuados son jamón de cerdo curado, salchichas Frankfurt y otros embutidos curados.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, sin quedar limitada en modo alguno a los mismos o de ese modo.

#### Parte experimental

##### Ejemplo 1

##### Preparación de la composición para conservar productos alimenticios que comprende acetato de potasio y diacetato de potasio

El acetato de potasio (80 g) y el diacetato de potasio (20 g) se añaden a un recipiente, en una atmósfera inerte y seca. Los compuestos se mezclan mecánicamente en atmósfera inerte y seca hasta obtener una mezcla homogénea de compuestos.

##### Preparación de la composición para conservar productos alimenticios que comprende acetato de potasio, diacetato de potasio y un agente antiaglutinante

El acetato de potasio (78,4 g), el diacetato de potasio (19,6 g) y el estearato de magnesio (2,0 g) se añaden a un recipiente en una atmósfera inerte y seca. Los compuestos se mezclan mecánicamente en atmósfera inerte y seca hasta obtener una mezcla homogénea de los compuestos.

##### Ensayo sensorial de salchichas Frankfurt con composiciones de conservación de la presente invención

Se prepararon diez preparaciones (salchichas Frankfurt) con las composiciones de conservación de la presente invención y una salchicha Frankfurt de control. El % en peso diferente de acetato de potasio y diacetato de potasio se utilizó en las composiciones. Asimismo, la cantidad de la composición de conservación en las salchichas Frankfurt finales era variada. Las cantidades de las composiciones se desvelan en la Tabla 1.

Las preparaciones, nivel regular de sal al 1,8 % de las salchichas Frankfurt, pueden prepararse por cualquier método conocido. Se prepararon diez masas de 3.100 g a partir de las cuales se prepararon las salchichas Frankfurt. Se mezclaron nueve de las masas de las composiciones de conservación y una masa era el control (no se añadió la composición de conservación).

Tabla 1

	control (1)		2	3	4	5	6	7	8	9	10
	(g)	(g)									
acetato de potasio al 83 %: <u>diacetato</u> de potasio al 17 %	0,75 %	0,000	23,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 83 %: <u>diacetato</u> de potasio al 17 %	1 %	0,000	0,000	31,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 83 %: <u>diacetato</u> de potasio al 17 %	1,45 %	0,000	0,000	0,000	44,95	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 80 %: <u>diacetato</u> de potasio al 10 %	0,75 %	0,000	0,000	0,000	0,000	23,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 80 %: <u>diacetato</u> de potasio al 20 %	1 %	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	31,00	0,000	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 80 %: <u>diacetato</u> de potasio al 20 %	1,25 %	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	38,75	0,000	0,000	0,000
acetato de potasio al 75 %: <u>diacetato</u> de potasio al 25 %	0,50 %	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	15,50	0,000	0,000
acetato de potasio al 75 %: <u>diacetato</u> de potasio al 25 %	0,75 %	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	23,25	0,000
acetato de potasio al 75 %: <u>diacetato</u> de potasio al 25 %	1 %	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	31,00

## ES 2 569 182 T3

Las evaluaciones sensoriales se llevaron a cabo en tres partes. Se evaluaron tres composiciones de conservación (preparaciones) con la misma relación de acetato de potasio:diacetato de potasio con respecto a la referencia mediante un panel de catadores. El panel de catadores (doce panelistas) determinó las salchichas Frankfurt generalmente preferentes al evaluar el olfato, el gusto y el sabor. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Ensayo 1	preparación 1													0
	preparación 2							X				X		2
	preparación 3					X				X				2
	preparación 4	X	X				X						X	4
Ensayo 2	preparación 1	X		X										2
	preparación 5		X		X	X	X							4
	preparación 6		X		X			X			X			4
	preparación 7		X		X	X			X	X		X	X	7
Ensayo 3	preparación 1	X		X	X				X			X		5
	preparación 8					X		X	X					3
	preparación 9			X							X		X	3
	preparación 10		X							X	X			3

5 La salchicha Frankfurt (preparación) número 7 resultó la más preferente. La composición de conservación 7 tuvo una relación de acetato de potasio:diacetato de potasio de 80 %:20 %. Este conservante se seleccionó para realizar experimentos adicionales.

10 Ejemplo 2

### Comparación de composiciones de conservación

#### 15 Preparación del nivel regular de sal al 1,8 %de salchicha Frankfurt

Se compraron carne cruda (paletilla de cerdo, tocino dorsal de cerdo, y carne magra al 85 %) e ingredientes no cárnicos a excepción de ingredientes antimicrobianos (composiciones de conservación) que provenían de Kemira ChemSolutions b.v. (Tiel, Países Bajos).

20 Las salchichas Frankfurt pueden prepararse por cualquier método conocido. La Tabla 3 desvela composiciones de conservación ensayadas y las cantidades de las composiciones de conservación de las salchichas Frankfurt.

Tabla 3.

Formulación	Composición de conservación	Cantidad del conservante en la salchicha Frankfurt (% en peso)	Abreviación de la formulación
Control	sin conservante		CTR
Composición 2	lactato de sodio al 50 %:acetato de sodio al 50 %	0,5	0,5 % PP
Composición 3	lactato de sodio al 50 %:acetato de sodio al 50 %	1,0	1,0 % PP
Composición 4	lactato de sodio al 38 %:acetato de sodio al 38 %:diacetato de sodio al 23 %	0,65	0,65 % PD
Composición 5 <sup>a</sup>	acetato de potasio al 80 %:diacetato de potasio al 20 %	0,75	0,75 % PK
Composición 6 <sup>a</sup>	acetato de potasio al 80 %:diacetato de potasio al 20 %	1,0	1 % PK
Composición 7	solución de lactato de sodio al 60 %	2,5	2,5 % SL



Formulación	Composición de conservación	Cantidad del conservante en la salchicha Frankfurt (% en peso)	Abreviación de la formulación
Composición 8	solución de lactato de sodio y diacetato de sodio al 60 %	2,5	2,5 % SL-SD
Composición 9	solución de lactato de <u>potasio</u> al 60 %	2,5	2,5 % PL
Composición 10	solución de lactato de potasio y diacetato de sodio al 60 %	2,5	2,5 % PL-SD
<sup>a</sup> Composición de conservación según la presente invención.			

Las composiciones 2 a 6 se encontraban en forma de polvo. Las composiciones 7 a 10 eran soluciones acuosas.

5 Se prepararon tres grupos de muestras para el análisis microbiano, evaluación fisicoquímica y ensayos sensoriales de consumidores.

Cepas de *L. monocytogenes* e inoculación en salchichas Frankfurt

10 Se utilizó un cóctel (~1 x 10<sup>6</sup> UCF/ml) de seis cepas de *L. monocytogenes*, que representa diferentes serotipos y patrones de electroforesis en gel de campo pulsante (EGCP). Se transfirieron asépticamente cincuenta salchichas Frankfurt de cada formulación a una bolsa de malla y se inmergen en el cóctel de *L. monocytogenes* con agitación suave. Después de 1 minuto, la bolsa de malla se retiró y se drenó durante un minuto antes de transferir las salchichas Frankfurt en la bandeja a una campana de bioseguridad. Tras absorberse el inóculo en el producto durante 25 minutos, se transfirieron asépticamente dos salchichas Frankfurt a una bolsa de vacío Shanvac D.E 4x6. 15 y se envasaron al vacío. Ocho bolsas de cada formulación se almacenaron a 4, 7 y 10 °C durante un máximo de 90 días. Las salchichas Frankfurt sin inocular de cada formulación también se prepararon de la misma manera para la cuantificación microflora de fondo y análisis sensorial.

20 Análisis microbiano

Al principio y tras 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días de almacenamiento a 4, 7, 10 y 15 °C, *L. monocytogenes* y bacterias aerobias mesófilas (BAM) se cuantificaron respectivamente, en las muestras inoculadas y sin inocular. Todas las muestras de 25 g se diluyeron en solución tampón fosfato estéril (STF) y se homogeneizaron por homogeneización durante 1 min. Las diluciones en serie apropiadas en STF se sembraron en placas en agar oxford modificado (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.) y agar de tripticasa de soja complementado con extracto de levadura al 0,6 % (p/v) para enumerar *L. monocytogenes* y BAM, respectivamente, tras 48 h de incubación a 35 °C. 25

Análisis sensorial

30 En cada una de las tres replicaciones, se reclutaron 50 panelistas consumidores para evaluar cinco muestras para el aspecto, la textura, el sabor y la aceptabilidad general en base a una escala hedónica de 9 puntos. Las salchichas Frankfurt se calentaron (72 °C) en agua hervida y se mantuvieron en un calentador (63 °C) después de insertarse en una bolsa con cierre hermético. Tras servir, se cortaron muestras de cinco tratamientos diferentes (secciones transversales de 4 cm) y se presentaron a cada panelista. Los datos se combinaron para un total de n = ~150. 35

Análisis fisicoquímico

Siete evaluaron siete parámetros fisicoquímicos para las salchichas Frankfurt después del corte. El pH, la proteína, la grasa, la humedad y la actividad del agua se midieron utilizando un medidor de pH, analizador de nitrógeno, extractor de grasa, horno seco, y medidor de la actividad del agua AquaLab, respectivamente. El contenido en sodio se analizó utilizando un analizador de pH/ion tras el calibrado, y el rendimiento de cocción se calculó por la diferencia de peso antes y después de la cocción. 40

Análisis estadístico

45 Los datos se sometieron a un modelo mixto de procedimiento ANOVA de SAS (SAS Institute, 2002). Las medias globales se separaron con el ensayo de Tukey para un nivel P < 0,05. Cuando la replicación y el tratamiento eran significativos (P < 0,05), se indicaron por separado las diferencias entre los tratamientos para cada replicación empleando un ajuste de Bonferroni en base al número de dichas comparaciones en cada replicación. 50

Resultados del experimentoCrecimiento microbiano

5 Para obtener la inoculación diana de  $10^4$  UFC/g de muestra para cuatro temperaturas de almacenamiento (4, 7, 10 y 15 °C) se llevaron a cabo ensayos preliminares con todas las salchichas Frankfurt inmersas en el mismo cóctel preparado.

10 Utilizando este método, se logró el nivel de inoculación de *L. monocytogenes* de  $10^4$  UFC/g de muestra. Durante los 90 días de almacenamiento a 4, 7, 10, o 15 °C, la formulación de control corroboró el crecimiento más rápido de *L. monocytogenes* a 4 °C (Fig. 1 a). Las dos sales de lactato únicas (2,5 % SL y 2,5 % PL) así como la dosis más baja de la formulación lactato:acetato (0,5% PP) produjeron un crecimiento intermedio, mientras que no se observó crecimiento alguno en las seis formulaciones restantes (1 % PP, 2,5 % PL-SD, 2,5 % SL-SD, 0,65 % PD, 0,75 % PK, y 1 % PK) (Fig. 1 a).

15 A 7 °C, *L. monocytogenes* creció en dos formulaciones (control y 0,5 % PP), alcanzando una población máxima de 7 log UFC/g tras 30 y 45 días, respectivamente. El crecimiento más lento de *L. monocytogenes* se observó en las seis formulaciones (2,5 % SL, 2,5 % PL, 1 % PP, 2,5 % PL-SD, 0,65 % PD, 2,5 % SL-SD) que oscilan desde 5,7 a 7,3 log UFC/g tras 90 días. Las dos formulaciones restantes (0,75 % PK y 1 % PK) inhibieron completamente *L. monocytogenes* durante el almacenamiento (Fig. 1 b).

20 Cuando se almacenaron a 10 y 15 °C, *L. monocytogenes* creció rápidamente en todas las formulaciones a 6-7 log UFC/g tras 15-30 días, a excepción de 0,75 % PK y 1 % PK a 10 °C, y 1 % PK a 15 °C (Fig. 1 c y Fig. 1 d).

25 Las salchichas Frankfurt sin inocular contenían un recuento inicial de bacterias aerobias mesófilas (BAM) de fondo de 1,58 log UFC/g. Las poblaciones de BAM en el control alcanzaron 7,5 log UFC/g tras 45 días a 4 °C y se mantuvieron en este nivel durante el resto del almacenamiento. Las nueve muestras restantes tratadas también exhibieron picos de crecimiento a los 45 días pero con niveles significativamente inferiores (4,7 a 5,8 log UFC/g) que el control (Fig. 2a). Tras el pico, cuatro formulaciones (1 % PP, 0,65 % PD, 0,75 % PK y 1 % PK) redujeron las poblaciones de BAM en 0,1-0,9 log UFC/g, mientras que otras cinco formulaciones (0,5 % PP, 2,5 % SL, 2,5 % PL, 2,5 % SL-SD, y 2,5 % PL-SD) aumentaron las poblaciones en 0,3-0,7 log UFC/g al final del almacenamiento (Fig. 2a).

30 A 7 °C, el control proporcionó una población máxima de 7,6 log UFC/g en 45 días y luego se redujo a 6,4 log UFC/g. Las nueve muestras que contienen inhibidores corroboraron el crecimiento de BAM a 5,5-6,5 log UFC/g en 45 días de almacenamiento y se mantuvieron los niveles al final del almacenamiento (Fig. 2b).

35 A 10 y 15 °C, todas las formulaciones excepto 1 % PK permitieron el rápido crecimiento a 6 log UFC/g o superior tras 30 días, excediendo con el tiempo a 7 log UFC/g durante el resto de almacenamiento (Fig. 2c y Fig. 2d).

40

Análisis sensorial

45 Para la evaluación de diez muestras de formulación, se organizaron dos conjuntos de pruebas sensoriales: 1) cuatro muestras basadas en sodio (0,5 % PP, 0,65 % PD, 2,5 % SL y 2,5 % SL-SD) y un control matinal, y 2) cuatro muestras basadas en potasio (0,75 % PK, 1,0 % PK, 2,5 % PL y 2,5 % PL-SD) y un control por la tarde (Tabla 4). La muestra que contiene 1 % PP no se incluyó ya que las regulaciones actuales del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) no permiten el uso de diacetato de sodio (o acetato) a niveles superiores a 0,25 %. En las salchichas Frankfurt basadas en sodio, no se encontró diferencia significativa para el aspecto, la textura, el sabor, y la aceptabilidad global independientemente de la formulación. En las salchichas Frankfurt basadas en potasio, no se observaron diferencias significativas del control en el aspecto, la textura, el sabor, y la aceptabilidad global independientemente de la formulación.

50

Tabla 4.

SALCHICHAS FRANKFURT	0 % CTR	0,5 % PP	0,65 % PD	2,5 % SL	2,5 % SL-SD	Error típico
ASPECTO	6,35	6,50	6,44	6,44	6,35	0,19
TEXTURA	6,52	6,49	6,76	6,49	6,37	0,21
SABOR	6,51	6,52	6,80	6,38	6,26	0,21
GENERAL	6,51	6,43	6,74	6,30	6,15	0,2

SALCHICHAS FRANKFURT	0 % CTR	0,75 % PK	1,0 % PK	2,5 % PL	2,5 % PL-SD	Error típico
ASPECTO	6,31	6,15	6,23	6,36	6,35	0,18
TEXTURA	6,40	6,13	6,27	6,43	6,23	0,19
SABOR	6,36	6,24	6,14	5,92	6,14	0,2
GENERAL	6,19	5,94	6,10	5,98	6,07	0,2

#### Análisis fisicoquímico

5 En la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las salchichas Frankfurt, se midieron siete parámetros (sodio, pH,  $a_a$ , rendimiento de cocción, humedad, proteína, y grasa) (Tabla 5). En los contenidos en sodio, los tres valores más altos (1.279-1.345 mg/100g) se hallaron en las formulaciones 2,5 % SL, 2,5 % SL-SD, 1,0 % PP, mientras que los cinco valores más bajos (950-1.035 mg/100g) se detectaron en las formulaciones 2,5 % PL, 2,5 % PL-SD, 0,75 % PK, 1,0 % PK, y CTR, con los valores intermedios (1.172-1.178 mg/100g) observados en las formulaciones (0,5 % PP, 0,65 % PD).

15 Con respecto al pH, las formulaciones con o sin trazas de diacetato (1 % PP, 2,5 % PL, 2,5 % PL-SD, 2,5 % SL y 0,5 % PP) mostraron los cinco valores más altos (pH 6,39-6,41), mientras que las formulaciones con más de una traza (0,65 % PD, 1,0 % PK, 0,75 % PK, 2,5 % SL-SD) marcaron los cinco valores más bajos (6,21-6,26) y el valor intermedio (pH 6,35) en el control. Además del diacetato (pH 4,5-5,0 como tal), el pH puede verse influenciado por la presencia y la cantidad de acetato de sodio (pH 8,9) y lactato de sodio (pH 6,3).

20 Tras la cocción, seis formulaciones (CTR, 1,0 % PP, 0,65 % PD, 1,0 % PK, 2,5 % PL, y 2,5 % PL-SD) generaron un rendimiento de cocción superior a 90 %, que es ~2 % mayor que los (~88 %) de las otras cuatro formulaciones (0,5 % PP, 0,75 % PK, 2,5 % SL, y 2,5 % SL-SD). El resto de parámetros ( $a_a$ , humedad, proteína, y grasa) mostraron algunas variaciones en el intervalo mínimo de < 0,5 % a excepción de la grasa.

Tabla 5.

CARACTERÍSTICAS	0 % CTR	0,5 % PP	1,0 % PP	0,65 % PD	0,75 % PK	1,0 % PK
SODIO	1.031	1.178	1.279	1.172	1.035	1.021
pH	6,35	6,39	6,41	6,21	6,26	6,22
$a_a$	0,956	0,955	0,950	0,956	0,950	0,955
RENDIMIENTO DE COCCIÓN	89,50	88,51	90,03	90,69	88,07	90,08
HUMEDAD	60,79	60,02	60,50	60,61	60,50	60,84
PROTEÍNA	14,86	15,15	14,44	14,58	14,62	14,48
GRASA	18,67	18,59	18,84	18,47	17,78	18,82
CARACTERÍSTICAS	2,5 % SL	2,5 % SL-SD	2,5 % PL	2,5 % PL-SD	Error típico	
SODIO	1.345	1.328	950	SD*	SD*	
pH	6,39	6,26	6,40	6,40	0,004	
$a_a$	0,951	0,949	0,95	0,953	0,002	
RENDIMIENTO DE COCCIÓN	88,03	88,01	90,16	90,04	0,12	
HUMEDAD	60,07	59,71	60,33	60,11	0,1	
PROTEÍNA	14,18	14,65	14,32	14,16	0,2	
GRASA	17,03	17,42	17,71	16,55	0,21	
*SD = sin datos						

Las formulaciones que comprenden acetato de potasio y diacetato de potasio mostraron mayor resistencia general contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y bacterias aerobias mesófilas en salchichas Frankfurt durante 90 días de almacenamiento a 4, 7, 10 y 15 °C. Además, no hubo diferencias significativas entre las formulaciones que comprenden acetato de potasio y diacetato de potasio y las otras formulaciones ensayadas, en los resultados del análisis sensorial y fisicoquímico.

### Ejemplo 3

#### Comparación de composiciones de conservación

##### Preparación de muestras de carne picada

La carne de ternera picada fresca sin tratar se dividió asépticamente en 144 piezas de carne picada (10 g cada una) y se colocaron en bolsas de plástico estériles. Las composiciones de conservación (composición de conservación según la presente invención y composiciones de conservación disponibles comercialmente) se mezclaron en muestras de carne de vacuno picada. Además, las muestras de carne no tratadas sin aditivos se utilizaron como muestras de control.

Se utilizaron dos patógenos, *Listeria* y *Salmonella* como organismos de ensayo. Se utilizaron tres cepas de *Listeria monocytogenes* como el cóctel de *Listeria* y dos de *Salmonella typhimurium*, así como se utilizó una cepa de *Salmonella Enteritidis* como el cóctel de *Salmonella*. Las cepas de bacterias se precultivaron (1 día, + 37 °C, 160 rpm) en el caldo infusión cerebro corazón comercial (*Salmonella*) o en caldo de nutrientes (*Salmonella*), los inóculos se diluyeron a una concentración de aprox. 104 UFC/ml utilizando ICC o caldo de nutrientes y se combinaron en los tres cócteles de cepas. Se añadieron 100 µl de estos cócteles de patógenos en muestras de carne picada, un tercio de las muestras se dejó sin inoculación patógena con el fin de seguir los crecimientos de las bacterias aerobias totales que estaban de forma natural presentes en la carne. Tras las adiciones conservantes y las inoculaciones bacterianas, las muestras se incubaron en un refrigerador a + 7 °C (*Listeria*) o a + 10 °C (*Salmonella*).

Los crecimientos de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y bacterias aerobias totales se siguieron al inicio del ensayo (0 días) y después de 2 d, 7 d y 14 d de tiempo de almacenamiento. En cada punto de seguimiento, se añadió agua peptonada al 0,1 % (90 ml) en las bolsas de plástico y las muestras de carne (10 g) se homogeneizaron (BagMixer 400 CC, Inter-science, Francia) durante 1 minuto y se diluyeron con vasos de dilución comercial. 1 ml de estas diluciones se sembró en placas como muestras por duplicado en placas PetriFilms 3M comerciales, específicas para *Listeria*, *Salmonella* o bacterias aerobias totales. Por último, se sellaron las placas PetriFilms en bolsas de plástico, se colocaron en una incubadora (+ 37 °C) y las colonias formadas se contaron tras 2 días de cultivo.

La Tabla 6 desvela composiciones de conservación ensayadas y las cantidades de las composiciones de conservación en las muestras de carne picada.

Tabla 6.

Formulación	Composición de conservación	Cantidad (% en peso)	Abreviación de la formulación
Control	sin conservante		CTR
Composición 11 <sup>a</sup>	acetato de potasio 80 %:diacetato de potasio al 20 %	0,2	0,2 % PK
Composición 12 <sup>b</sup>	una mezcla de diacetato de sodio, mono- y diglicéridos de ácidos grasos, ácido láctico y cloruro de sodio	0,2	Comp 12 al 0,2 %
Composición 13 <sup>b</sup>	una mezcla de diacetato de sodio, mono- y diglicéridos de ácidos grasos, ácido láctico y cloruro de sodio	0,4	Comp 13 al 0,4 %
<sup>a</sup> Composición de conservación según la presente invención.			
<sup>b</sup> Composición de conservación disponible comercialmente.			

#### Resultados del experimento

La eficacia del crecimiento de inhibición de las composiciones de conservación, Composición 11, Composición 12 y Composición 13, contra *Listeria*, *Salmonella* y bacterias aerobias totales en la carne picada de ternera cruda se muestra en las Figuras 3a, 3b y 3c.

La población de *Listeria* inoculada (~5x10<sup>3</sup> ufc/ml) creció 3 logs (de 3 log a 6 log) en muestras de carne sin conservantes, mientras que todas las composiciones de conservación estudiadas inhibieron la población de *Listeria* (crecimiento inferior a 1 log), durante el almacenamiento de 14 d (Fig. 3a). La Composición 11 era bactericida. Se redujo el nivel de *Listeria* inicial. Por el contrario, la Composición 12 y la Composición 13 eran bacteriostáticas. Es

decir, el nivel de *Listeria* se mantuvo en el nivel de inoculación.

5 La Figura 3b muestra el contenido inicial elevado en bacterias aeróbicas totales (5 log) (0 día) de carne de vacuno picada. Este nivel se incrementó más de 4 logs (5 log a 9 log) durante el cultivo de 14 días en el almacenamiento a 7 °C de las muestras de carne sin conservantes. Al contrario, todos los conservantes estudiados inhibieron 2-4 logs de bacterias aeróbicas totales. La Composición 12 inhibió 2 logs de bacterias aerobias totales. La Composición 13 mostró una inhibición tan buena como la Composición 11.

10 La población de *Salmonella* inoculada ( $\sim 10^3$  ufc/ml) creció 3 logs (3 log a 6 log) en muestras de carne sin conservantes, mientras que todas las composiciones de conservación estudiadas inhibieron la población de *Salmonella*. El crecimiento de *Salmonella* se evitó (crecimiento inferior a 1 log), durante 14 días (Fig. 3c) con todas las composiciones estudiadas, excepto con la Composición 12 que permitió un buen crecimiento de *Salmonella* tras 7 d.

15 En base a los resultados, la Composición 11 inhibe eficazmente *Listeria*, *Salmonella* y bacterias aerobias totales almacenadas aeróbicamente en la carne de ternera picada cruda. Al tener en cuenta los niveles de dosificación y eficacia antimicrobiana obtenida, la Composición 11 superó a los otros productos de ensayo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para conservar productos alimenticios que comprende acetato de potasio y diacetato de metal alcalino, en la que la relación en peso de acetato de potasio:diacetato de metal alcalino varía de 1,5 a 9:1, preferentemente 2,3 a 9:1, más preferentemente 3 a 5,7:1, incluso más preferentemente 3,3 a 4,9:1, y más preferentemente 4:1, y en la que la composición para conservar productos alimenticios se encuentra en forma sólida, preferentemente en polvo o en forma cristalina.
- 10 2. La composición para conservar productos alimenticios según la reivindicación 1, en la que el acetato de potasio está presente en una cantidad de 60-90 % en peso en base al peso de la composición final para conservar productos alimenticios.
- 15 3. La composición para conservar productos alimenticios según la reivindicación 1 o 2, en la que el diacetato de metal alcalino es diacetato de sodio, diacetato de potasio o una mezcla de los mismos, preferentemente diacetato de potasio.
- 20 4. La composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición para conservar productos alimenticios comprende además un agente antiaglutinante.
- 25 5. La composición para conservar productos alimenticios según la reivindicación 4, en la que el agente antiaglutinante se selecciona entre el grupo que consiste en óxido de magnesio, silicato de magnesio, carbonato de magnesio, fosfato de magnesio, sales de ácido graso de magnesio o de calcio, dióxido de silicio, triglicéridos de ácido graso, celulosa y sus mezclas, preferentemente el agente antiaglutinante es sales de ácidos grasos de magnesio o calcio, más preferentemente estearato de calcio o estearato de magnesio.
- 30 6. La composición para conservar productos alimenticios según la reivindicación 4 o 5, en la que el agente antiaglutinante está presente en una cantidad de 0,01-5 % en peso, preferentemente 0,1-3 % en peso, y más preferentemente 0,5-2,5 % en peso, en base al peso de la composición final para conservar productos alimenticios.
- 35 7. La composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición para conservar productos alimenticios se utiliza en una cantidad de 0,05-5 % en peso, preferentemente 0,1-3 % en peso y más preferentemente 0,2-2,5 % en peso, en base al peso del producto alimenticio final.
- 40 8. La composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el producto alimenticio es carne.
9. Un método para conservar productos alimenticios, en el que el método comprende mezclar la composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 con productos alimenticios.
- 45 10. Uso de la composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para prevenir el crecimiento de una cepa de *Listeria* y bacterias aerobias mesófilas en condiciones de almacenamiento.
11. Un producto cárnico cocido que comprende la composición para conservar productos alimenticios según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

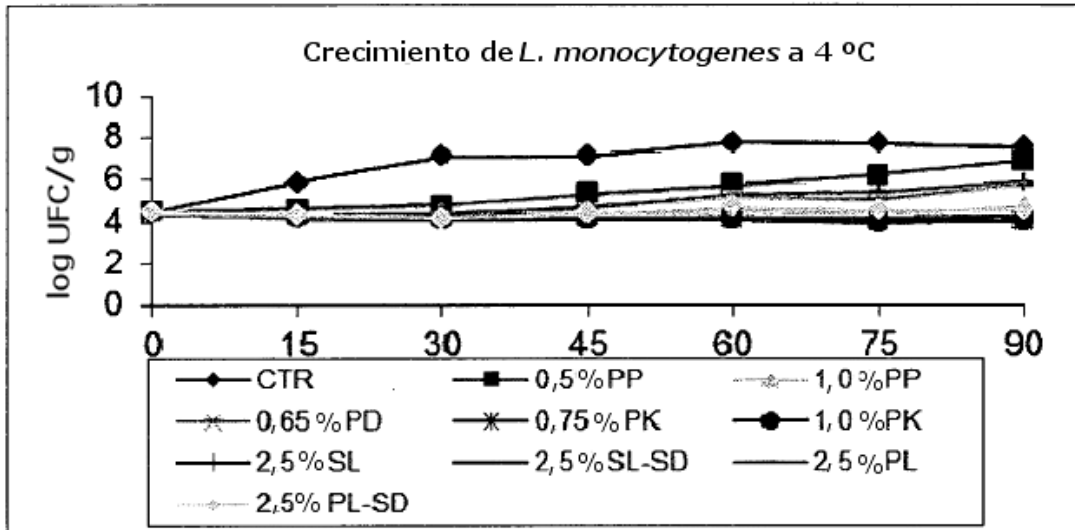


FIG. 1a

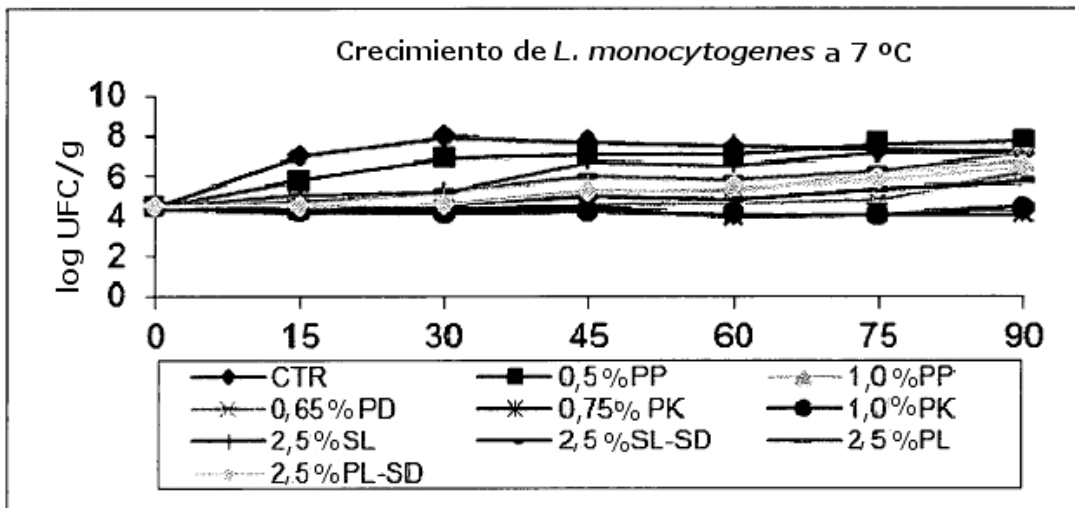


FIG. 1b

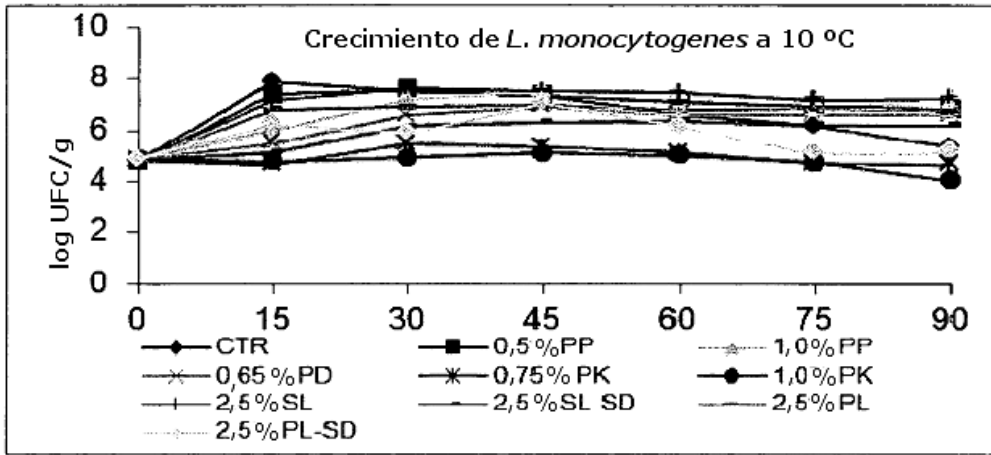


FIG. 1c

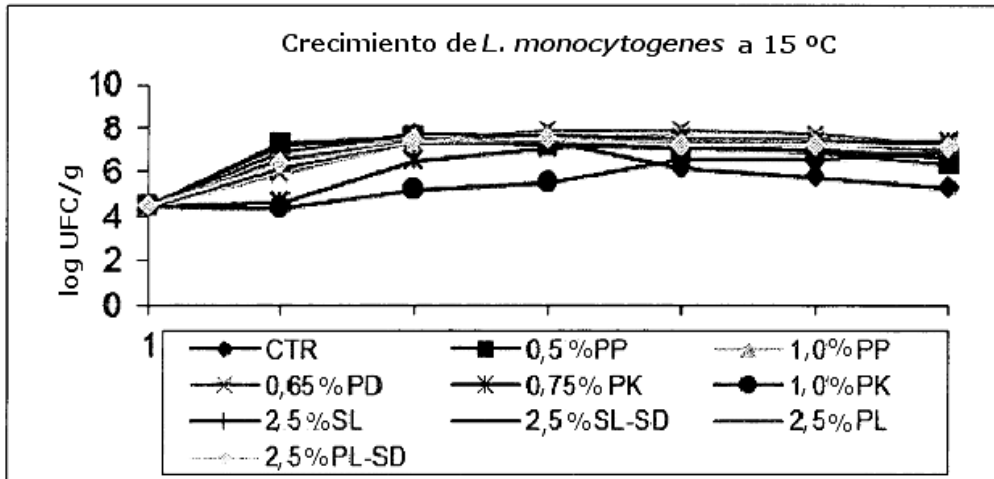


FIG. 1d



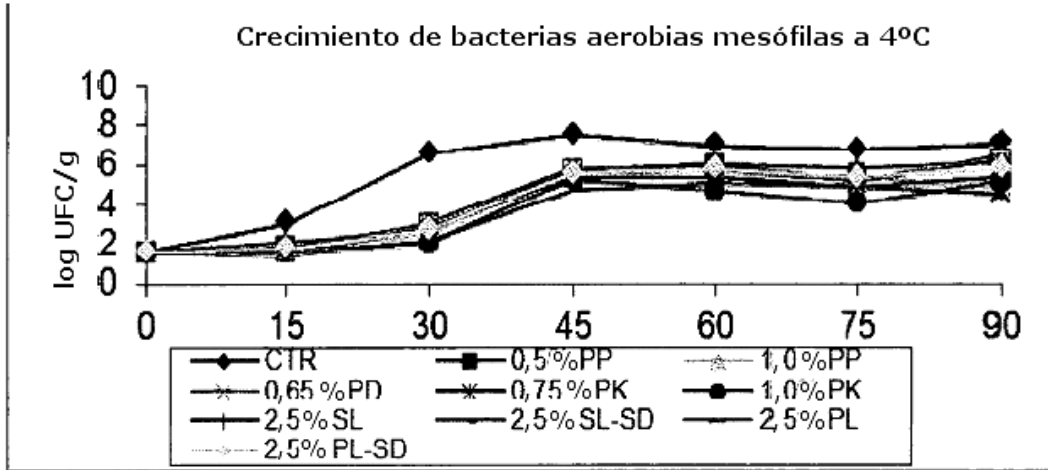


FIG. 2a

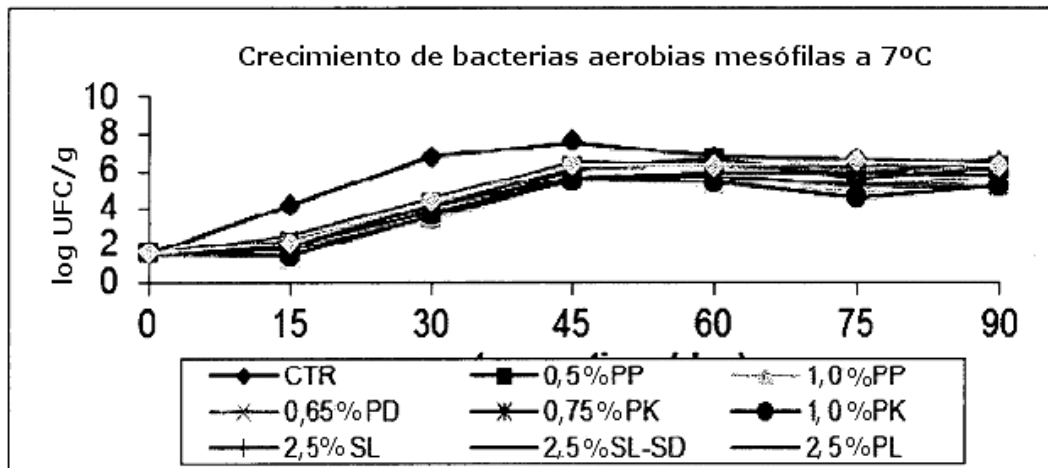


FIG. 2b

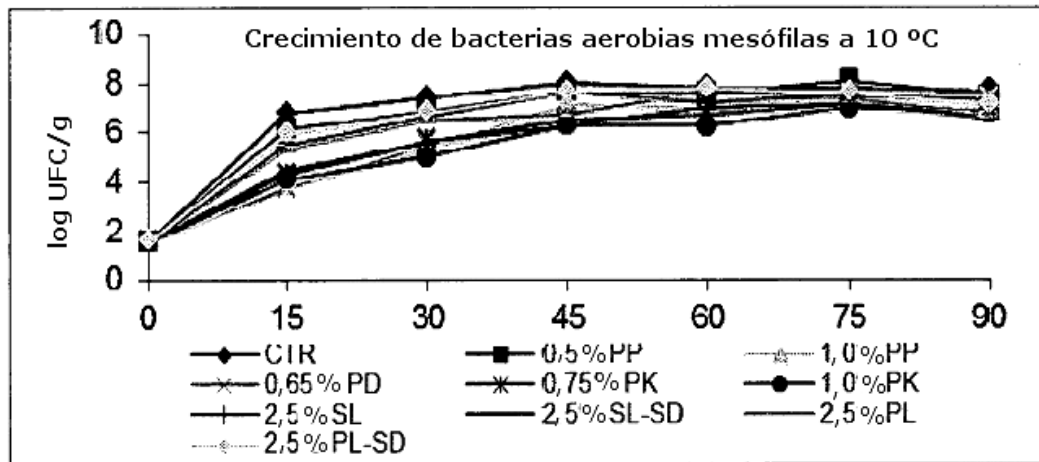


FIG. 2c

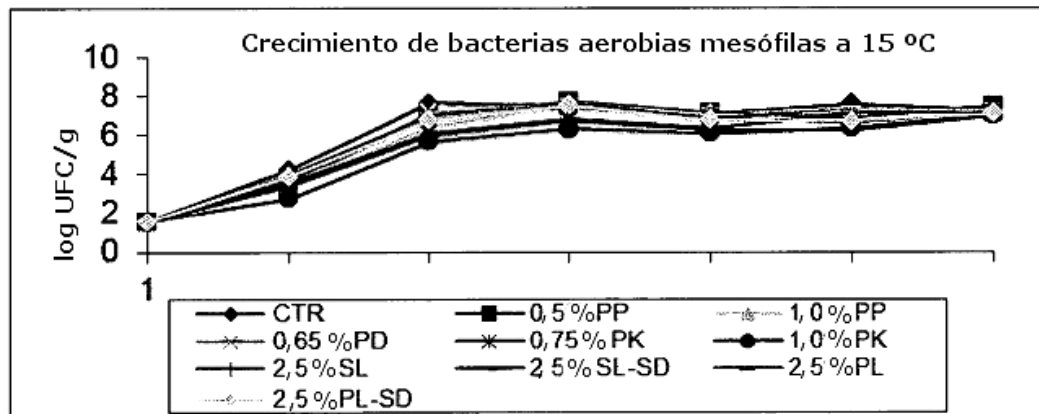


FIG. 2d

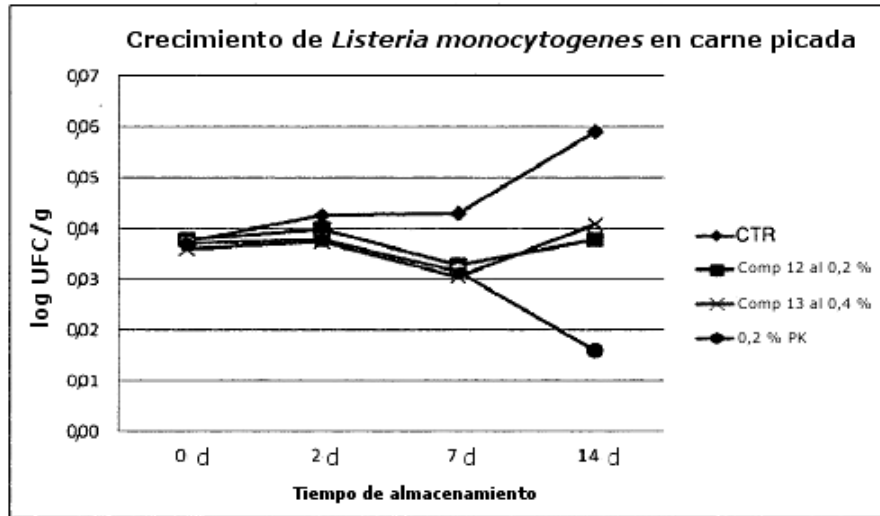


FIG. 3a

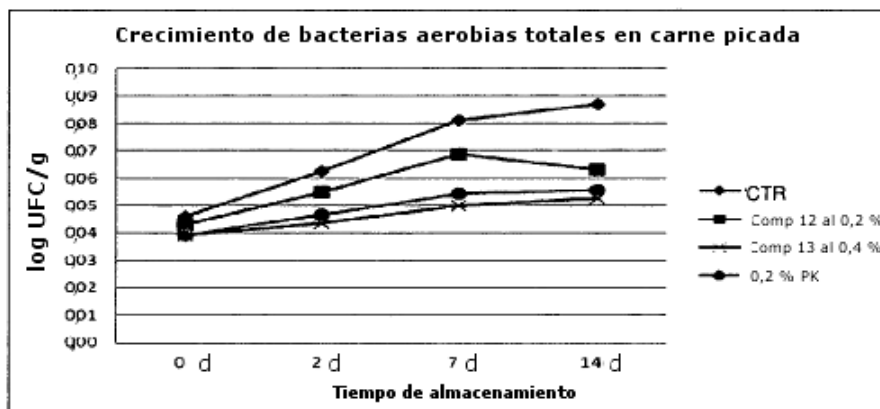


FIG. 3b

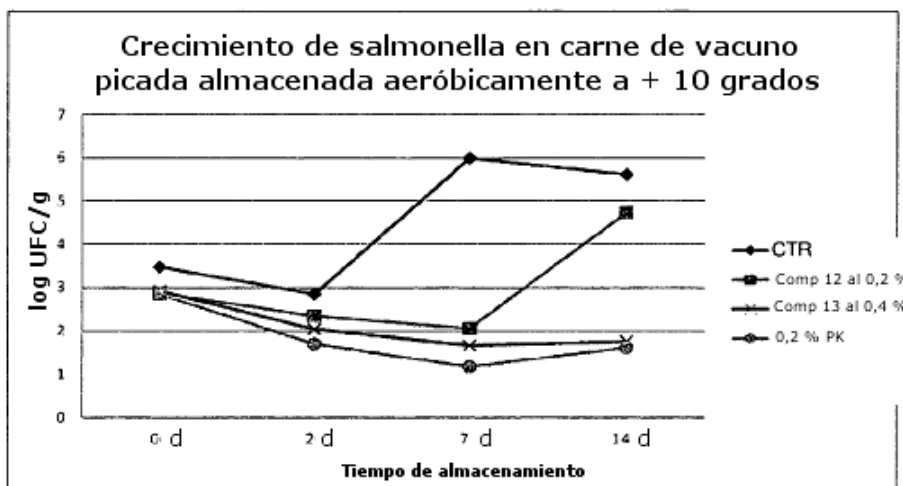


FIG. 3c