

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 245**

51 Int. Cl.:

A23B 4/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2005 E 05789632 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 1824343**

54 Título: **Agente antibacteriano para conservar carne fresca**

30 Prioridad:

27.08.2004 EP 04104118

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

02.09.2016

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:

**BONTENBAL, EDWIN, ELIZE, WILLEM y
VEGT, DE, BERT, THEO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 581 245 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

Agente antibacteriano para conservar carne fresca

5 [0001] Esta invención se refiere a un agente antibacteriano para la conservación de carne fresca.

[0002] Convencionalmente, el crecimiento bacteriano en aplicaciones de alimento y bebida es controlado y/o evitado mediante regulación de pH, control de actividad de agua, refrigeración, adición de agentes conservantes de calidad como por ejemplo nitrito y/o usando varias técnicas de tratamiento como por ejemplo tratamiento térmico, irradiación o
10 tratamiento de alta presión.

[0003] Sin embargo, para la conservación de carne fresca la demanda es alta. Por un lado es porque la gente se habitúan a la calidad (tanto respecto al sabor como a la textura) de la carne no conservada y por lo tanto todos los métodos de conservación deberán preservar la calidad de la carne fresca.

15 Esto no es asegurado por los métodos de conservación más convencionales. Por ejemplo, el control de la actividad de agua en productos es posible mediante por ejemplo adición de sal. Controlar o prevenir el crecimiento bacteriano en productos mediante adición de sal sin embargo requiere altas concentraciones de sal.

20 Dichas altas concentraciones frecuentemente llevan a una pérdida de sabor debido a que el producto se vuelve demasiado salado.

Además, una dosificación de sal demasiado alta tampoco es deseada debido a temas de salud como por ejemplo enfermedades del corazón y vasculares o presión sanguínea.

Especialmente, en productos con proteínas tales como carne fresca (incluyendo pescado y aves) dichas altas concentraciones de sal pueden llevar a deterioro de la textura del producto.

25 [0004] También la regulación del pH como medio para controlar el crecimiento bacteriano puede causar pérdida de sabor y/o pérdida de textura de la carne fresca.

Se añade nitrito en las aplicaciones de carne polimerizada con el objetivo de preservar la calidad del producto.

El nitrito es capaz de parar el crecimiento bacteriano de algunos tipos de bacterias como por ejemplo *Clostridium*.

30 En algunos casos se añade nitrito como agente colorante para mantener un color determinado en el producto de carne.

En la carne fresca normalmente no se añade ningún nitrito.

Actualmente la legislación tiene como objetivo la minimización del uso de nitrito en aplicaciones alimenticias.

Otras técnicas de tratamiento como por ejemplo irradiación o tratamiento de alta presión como método para conservar productos se usan para carne fresca pero son costosos, llevan mucho tiempo y frecuentemente no son preferidos por el
35 consumidor.

[0005] Por otro lado, los riesgos de contaminación en la carne fresca no son despreciables.

Durante la excavación, el deshuesado y la trituración, los patógenos alimenticios y bacterias de alteración alimenticia que están presentes abundantemente en los intestinos pueden entrar en contacto con la carne fresca.

40 Como la carne fresca es un medio rico con una cantidad de proteínas y grasas y tiene un pH casi neutro, es un paraíso para el crecimiento de dichos patógenos alimenticios y bacterias de alteración alimenticia.

[0006] Comúnmente, la carne fresca es refrigerada antes de la preparación y/o el consumo.

Es conocido que una de las causas más importantes de la intoxicación es la contaminación debida a una incorrecta manipulación del alimento.

Además, los productos son frecuentemente almacenado bajo condiciones inapropiadas.

Una temperatura indebida (por ejemplo, un almacenamiento secundario a alta temperatura) puede causar que bacterias ya presentes pero controladas en el producto crezcan otra vez dando como resultado intoxicación por bacterias patógenas.

50 Patógenos especialmente alimenticios como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* son amenazas notorias en la carne fresca.

La invención proporciona un método para la conservación de carne fresca donde los problemas mencionados anteriormente en la conservación de carne fresca, especialmente la intoxicación, son resueltos y además proporciona un medio para combatir la intoxicación por bacterias patógenas de carne fresca debida a por ejemplo una temperatura indebida y/o contaminación debida a por ejemplo una manipulación inapropiada y/o una preparación inapropiada.
55

[0007] Existen varias publicaciones que describen el efecto antibacteriano de la glicina contra la alteración del alimento en la carne cocinada, y otros alimentos: JP2000-224976 describe un conservante para alimento que usa lactato de calcio y glicina en combinación con sales de ácido orgánico tales como por ejemplo ácido cítrico, ácido acético o ácido glucónico.
60

- [0008] JP2001-245644 describe un método para la mejora de un periodo conservable de un alimento procesado tal como carnes procesadas o platos diarios comestibles que usa al menos una sal de ácido láctico y una sal de ácido acético. La glicina se puede añadir como sea necesario.
- 5 [0009] GB 1510942 describe el uso concurrente de maltosa y glicina para prevenir la putrefacción en productos alimenticios tales como confiterías de estilo japonés, mermeladas, gelatinas, postres servidos en frío, productos lácteos y conservas de fruta.
- 10 [0010] US 2711976 describe que la glicina se puede para evitar la alteración de alimento por "flora indígena o natural resistente al calor, que sobrevive a la cocción u operación de tratamiento térmico habituales" de productos alimenticios tipo natillas.
- 15 [0011] JP 08-154640 A divulga el uso de un agente antimicrobiano en alimentos para mejorar la conservación donde dicho agente contiene 1-30 % en peso de ácido acético, con preferiblemente 1-30 % en peso de glicina y preferiblemente 0,05-1 % en peso de calcio horneado. Gioza (bollos rellenos de carne) y Harumaki (masa de huevo envuelta alrededor de verduras picadas, carne etc. en un rollo pequeño y frita en grasa) se describen como aplicaciones alimenticias donde dicho agente antibacteriano se usa.
- 20 [0012] JP 03 290174 A describe la incorporación de un alimento no calentado o de temperatura baja termotratado con glicina y además un ácido orgánico tal como ácido acético, ajustado a pH 5,5. o menos y que es consecuentemente puesto en un contenedor para ser sometido al tratamiento de alta presión por un medio de presión acuosa para la esterilización.
- 25 [0013] International Food Information, XP002315132, Hozova et al., "Prolonging the storage life of foods by non-traditional preservation methods", Slovak. Inst. Of Tech., Czechoslovakia, 1989; Este artículo describe el efecto de la glicina en la prolongación del tiempo máximo de almacenamiento de productos conservados. Se utilizó gulash de cerdo como producto de prueba. Todas las muestras fueron procesadas por tratamiento térmico.
- 30 Los resultados muestran que la adición de glicina tiene un efecto en el crecimiento de mohos y levaduras que están presentes en el cerdo crudo que ha sido termotratado posteriormente y pasteurizado. La parte de los microorganismos que implica microorganismos *Coliform* y aeróbicos formadores de esporas no se ve significativamente influida por la presencia de glicina.
- 35 [0014] La presente invención se refiere a un método para la conservación de carne fresca tal y como se define en la reivindicación 1 donde se agrega glicina y/o derivados de glicina a carne fresca.
- 40 [0015] Con derivado de glicina se entienden sales de álcali de (tierra) de glicina, glicinato de amonio, di- y tripéptidos que comprenden glicina y ésteres de glicina y alcoholes C1-C8. Con ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 se entiende: ésteres de glicina y alcoholes que contienen de 1 a 8 átomos de carbono. Dichas cadenas de átomo de carbono pueden ser ramificadas o rectas. Ejemplos de glicinatos de álcali son glicinato de sodio y glicinato de potasio; ejemplos de glicinatos de álcali de tierra son glicinato de magnesio y glicinato de calcio; ejemplos de ésteres de glicinato de alcoholes C1-C8 son metilo
- 45 CA 1261855 divulga un método para controlar el crecimiento de *Clostridium botulinum* en determinados productos alimenticios, por ejemplo carne, usando un ácido N-acilamino.
- [0016] US 6200619 se refiere a un agente de preservación para alimentos y bebidas que contiene una hemicelulosa hidrosoluble y otros compuestos, entre ellos glicina.
- 50 [0017] EP 1290955 divulga unas pocas aplicaciones alimenticias donde se evalúan mezclas de conservantes, algunos de los cuales contienen glicina, pero no revela el uso de glicina como agente antibacteriano en la carne fresca.
- [0018] US 4820520 divulga la prueba de un agente antiséptico que comprende un producto de descomposición de pectina y, opcionalmente, glicina, en el caldo y alimento nutritivo, pero no revela el uso de glicina contra los patógenos bacterianos gram-negativos alimenticios en la carne fresca.
- 55 [0019] US 3552978 divulga un método para mejorar la calidad de alimentos que contienen carne, pero no trata el uso de glicina contra los patógenos bacterianos gram-negativos alimenticios.
- 60 [0020] JP 59-175870 divulga una mejora de la conservación de una amplia variedad de alimentos procesados por la incorporación en la glicina alimenticia y en una sal de ácido acético.

Sin embargo, no menciona unas especies bacterianas, ni menciona la conservación de carne fresca.

- 5 [0021] Stonsaovapak et al. "Study on the Effect of Environment on Growth and Survival of Foodborne Pathogen *Escherichia coli* O157:H7" International Food Information Service AN-2001-00-c0487 (XP002315133) revela que la glicina afecta al crecimiento de dos tensiones de *E. coli* en caldo nutritivo TSB. Además, la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en tres alimentos listos para comer mantenidos a 4°C se mide, sin embargo, sin la adición de glicina.
- 10 [0022] JP 62-201563 divulga un conservante alimenticio para pasta de pescado hervido, embutidos, pasteles, etc. obtenido por la combinación de una sustancia antibacteriana, por ejemplo glicina, con protamina. No menciona especies bacterianas específicas, ni menciona carne fresca.
- 15 [0023] GB 1363209 se refiere a aditivos para el tratamiento de carne y productos de carne que estabilizan el color original de la carne cruda: glicinato, glicinato etilo, glicinato de butilo y glicinato de hexilo.
- 20 [0024] Mientras experimentos donde aditivos tales como ácidos, conservantes (por ejemplo sorbatos) etcétera son añadidos a un caldo son frecuentemente usados como una predicción de su efecto en productos de comida y bebida reales, hemos encontrado que el efecto de la glicina en un caldo no da ninguna indicación de su efecto en la carne fresca. El medio presente en carne fresca comprende proteínas y grasas, tiene una movilidad específica de los líquidos presentes, y adsorción o incorporación de la glicina en el producto alimenticio pueden ocurrir. Sin estar comprometidos con una teoría, se piensa que el hecho de que la glicina es un aminoácido y un bloque de construcción natural de carne fresca y está abundantemente presente en componentes alimenticios, causa que interfiera de una manera más bien imprevisible en productos de comida y bebida reales.
- 25 [0025] Hemos descubierto que la glicina y/o sus derivados son especialmente adecuados para la prevención de la intoxicación provocada por los patógenos bacterianos gram-negativos *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*. Dichos patógenos producen toxina y/o causan infecciones. Debido a la presencia de una pared celular y consecuentemente propiedades físicas y químicas totalmente diferente, generalmente, patógenos bacterianos gram-negativos son más difíciles de combatir que las bacterias gram-positivas.
- 30 [0026] Hemos descubierto que la glicina y/o sus derivados pueden eficazmente ser usados como un agente antibacteriano solo en concentraciones que son todavía aceptables en la carne fresca sin afectar negativamente a la calidad de producto respecto por ejemplo a sabor y textura. Hemos encontrado que la glicina y/o sus derivados se pueden usar como único agente antibacteriano para preservar y además para prevenir las consecuencias de contaminación de carne fresca como intoxicación por bacterias patógenas debido a temperatura indebida y/o contaminación. No se necesita añadir un agente antibacteriano auxiliar para conseguir el efecto de conservación deseado. Esto resulta no solo en unos costes de material inferiores pero también en una calidad de producto más alta.
- 35 [0026] Productos se obtienen con menos ingredientes auxiliares añadidos mientras se mantiene e incluso mejora de la calidad y tiempo de conservación de dichos productos. Además, esto está de acuerdo con la legislación que aspira a la minimización del uso de aditivos en aplicaciones de alimento y bebida. Además, los productos obtenidos están también protegidos contra las consecuencias de temperatura indebida o contaminación.
- 45 [0027] La carne fresca es normalmente refrigerada. Normalmente está a una temperatura entre 4 y 7 °C con picos ocasionales de 12 °C. El uso de glicina y sus derivados es muy adecuado para controlar la *Salmonella* en productos refrigerados porque es bien reconocido que la *Salmonella* permanece viable durante periodos largos de tiempo en alimentos congelados y que su supervivencia mejora conforme la temperatura de almacenamiento aumenta. Además, la carne fresca como otros productos refrigerados es especialmente sensible a temperatura indebida y/o contaminación debido a manipulación inapropiada de los productos. Un abuso de temperatura puede ocurrir durante el transporte del producto del proveedor al depósito (por ejemplo enfriamiento inapropiado del contenedor de camión) pero frecuentemente también ocurre durante el transporte del producto de la tienda al hogar. Incluso en el caso de aumento de temperatura secundaria de la carne fresca, la seguridad alimenticia se asegura cuando la glicina y/o sus derivados son aplicados.
- 60 [0028] Con carne fresca nos referimos tanto a carne fresca "real", como pescado fresco y aves frescas.

Ejemplos de carne fresca son: carne de res, bistec de carne de res, rabos de buey de carne de res, huesos del cuello, nervaduras cortas, asados de carne de res, carne de estofado, costillas de carne de res, cerdo, chuletas de cerdo, bistecs de cerdo, costeletas, asados de cerdo, cordero, carne de ternero, cabra, filete americano, filete tártaro, o carpaccio.

5 Ejemplos de aves frescas incluyen pollo, pavo, pato y otras aves tales como gallina de Cornualles, paloma, codorniz y faisán.

Ejemplos de pescado fresco incluye tanto pescados de aleta (filete, anchoa, picuda, carpa, siluro, bacalao, corbina, anguila, gorriona, eglefino, arenque, caballa, trilla, gallineta nórdica, lucio, pámpano, pargo, rayo, salmón, sardinas, lubina, tiburón, eperlano, esturión, pez espada, trucha, atún, pescadilla), crustáceo (abulón, almejas, cangrejo, cangrejo de río, langosta, mejillones, ostras, vieiras, gamba y caracoles) y otros alimentos marinos tales como medusa, pulpo, huevas de pescado, calamar, tortuga, ancas de rana.

15 [0029] Algunas de estas aplicaciones de carne fresca se deben consumir crudas, mientras que otras se consumen tras la aplicación de un tratamiento térmico solo parcial, intencionalmente aplicado como por ejemplo para bistec cocinado al punto o de manera no intencional debido a preparación inapropiada o manipulación inapropiada de los productos alimenticios.

20 [0030] Los patógenos bacterianos gram-negativos *Salmonella*, *Escherichia coli*, *enterobacter sakazakii* y *Campylobacter* y en particular *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* son frecuentemente encontrados en carne fresca.

Se ha descubierto que el uso de glicina y/o sus derivados como agentes antibacterianos en la carne fresca es eficaz contra dichas bacterias sin pérdida de sabor y sin pérdida de textura.

El uso de glicina y/o sus derivados aseguran la seguridad alimenticia incluso en el caso del tratamiento térmico parcial.

25 [0031] La actividad antibacteriana no solo incluye actividad bacterioestática que previene un mayor crecimiento bacteriano sino que también incluye alguna actividad bactericida de bacterias que en realidad reducen el número bacteriano.

30 [0032] Se descubrió que las concentraciones de glicina de 0,5 a 3 % en peso basadas en peso total de producto son agentes antibacterianos eficaces para *E. coli* y se descubrió que las concentraciones de glicina de 0,5 a 1.5 % en peso basadas en peso total de producto son adecuadas para asegurar el sabor del producto.

[0033] Las concentraciones de glicina de 0,2 a 3 % en peso basadas en peso total de producto muestran actividad antibacteriana contra la *Salmonella*, y en particular *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*.

35 Se descubrió que las concentraciones de glicina de 0,2 a 1,5 % en peso basadas en peso total de producto son adecuada para asegurar el sabor del producto.

[0034] Una concentración de glicina por encima de 1,5 % en peso basada en peso total del producto da al producto un sabor dulce.

40 Dependiendo del tipo de producto este sabor dulce es aceptable o no.

Por consiguiente, la máxima concentración de glicina aceptable en cuanto a no afectar negativamente al sabor puede aumentar a concentraciones por encima de 1,5 % en peso de glicina basada en el peso total del producto.

45 [0035] Se ha observado que el uso de glicina y/o sus derivados según la invención como agente antibacteriano en la carne fresca se puede combinar con uno o varios ácidos orgánicos y/o una o varias de sus sales como por ejemplo ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético.

El ácido orgánico y/o su sal se puede aplicar solo con glicina y/o derivados según la invención o se puede aplicar en mezclas de ácidos orgánicos y/o una o varias de sus sales como por ejemplo una mezcla de lactato de potasio y diacetato de sodio en combinación con glicina y/o sus derivados según la invención.

50 [0036] Dichas combinaciones y/o mezclas de por ejemplo ácido láctico y/o sus derivados según la invención suponen un agente antibacteriano con varias propiedades funcionales además de actividad antibacteriana.

Ejemplos de estas propiedades funcionales añadidas son la mejora del sabor, la conservación del color y la regulación del pH.

55 Ejemplos de una sal de ácido láctico son lactato sódico, lactato de calcio, lactato de potasio, lactato ferroso, lactato de zinc, lactato de magnesio.

[0037] Se ha observado que el uso de glicina y/o sus derivados como agentes antibacterianos en la carne fresca se puede combinar con ácido láctico y/o su sal en concentraciones de 0,2 a 3 % en peso basados en dichos alimentos y bebidas.

60

[0038] En algunos casos resulta ventajoso combinar el uso de glicina y/o sus derivados según la invención con una o varias de las técnicas de tratamiento mencionadas anteriormente para conservar como por ejemplo irradiación y/o tratamiento de alta presión.

5 [0039] La presente invención se ilustra con mayor detalle en los ejemplos siguientes, que no deben ser interpretados como limitativos.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

[0040] Carne picada congelada fue descongelada y dividida en partes de 1,7 kg y mezclada con concentraciones diferentes de glicina, 0,5 % en peso, 1,0 % en peso y 1,5 % en peso basado en el peso total de la porción de carne. Posteriormente la carne fue picada una vez a través de un plato de 6 mm en un picador de carne desinfectado.

15 [0041] Cada porción (1,5 kg) fue inoculada con una suspensión de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) a un nivel final de aproximadamente 104 ufc por g de producto.

Antes de la inoculación, el cultivo con *E. coli* O157:H7, mantenido en inclinación, fue pre-cultivado dos veces en la Brain Heart Infusion (BHI ® de Oxoid CM 225) durante 24 horas a 30 °Celsius.

20 El cultivo de plena madurez fue diluido en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para contener el nivel deseado de inoculación.

La carne inoculada fue picada dos veces a través de un plato de 3 mm después de lo cual la carne molida fue envasada en partes de 80 g en una atmósfera modificada (MAP) consistente en 70% O₂ y 30% CO₂ con un volumen de gas de aproximadamente 120 ml.

25 Todos los paquetes fueron almacenados a 12 °Celsius durante 12 días.
La temperatura durante el experimento fue registrada utilizando un registrador de datos.

[0042] Se tomaron muestras de cada porción de carne molida por duplicado para análisis microbiológicos a intervalos de tiempo apropiados.

30 Una muestra de 20 g fue tomada asépticamente de cada porción.

La muestra fue diluida 10-veces en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) y homogeneizada en un stomacher durante 1 minuto.

Diluciones en serie adicionales fueron hechas en PPS.

35 Números de bacterias *E. coli* O157:H7 fueron determinados usando Sorbitol MacConkey agar (SMAC, Oxoid® CM813) tal y como se menciona en NEN-ISO 16649-2:2001.

Los platos fueron incubados a 42 °Celsius durante 1 día.

[0043] La tabla I muestra los resultados (por duplicado) de los análisis microbiológicos de carne picada inoculada con *E. coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina añadida durante el almacenamiento en MAP a 12 °Celsius.

40 Tabla I: resultados de cuenta bacteriana de *E.Coli* O157:H7 en la carne de res picada con concentraciones de glicina diferente en MAP durante el almacenamiento a 12 °Celsius.

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto tras almacenamiento durante					
	0 días	3 días	5 días	7 días	10 días	12 días
Control (sin aditivo)	3,96	5,67	5,46	5,26	5,72	5,54
	4,08	4,94	5,34	5,92	5,53	5,58
0,5 % en peso de glicina	4,03	4,26	3,78	3,90	3,86	3,30
	3,98	-	4,38	4,28	3,73	3,49
1,0 % en peso de glicina	4,00	4,20	4,26	3,36	2,30	2,58
	4,00	3,82	3,95	3,51	-	1,48
1,5 % en peso de glicina	4,03	3,94	2,85	2,30	2,00	1,30
	4,05	3,87	2,85	2,00	1,70	1,78

[0044] Los resultados muestran que una concentración de 0,5 % en peso de glicina basada en peso total de producto tiene actividad antibacteriana contra el *E.Coli* O157:H7.

Concentraciones de 1,0 % en peso de glicina basada en peso total de producto muestran una actividad bactericida clara contra el *E.Coli* O157:H7 e incluso reducen el número bacteriano de 4 a 2 log ufc por g de producto en 7 días de almacenamiento.

Ejemplo 2

[0045] Un cultivo de *E.Coli* O157:H7 (ATCC:700728) fue pre-cultivado en el caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid® CM225) e incubado durante 24 h. a 30 °C.

El cultivo fue diluido 50 veces en la solución fisiológica de peptona (PPS).

[0046] 3000 gramos de carne picada irradiada fueron divididos en 3 muestras y mezclados con glicina íntegramente para preparar muestras con 0, 1,0, y 1,5 % en peso de glicina, respectivamente.

Posteriormente, cada muestra fue dividida en 30 partes de 25 gramos.

Las partes fueron puestas en una bolsa estéril (Interscience® bagfilters, 400 ml, modelo P) e inoculadas con el caldo de cultivo diluido a un nivel final de aproximadamente 10^5 ufc/gr de producto (250 µl cultivo/PPS).

El cultivo y las muestras fueron mezclados íntegramente a mano.

Las bolsas fueron selladas directamente después bajo condiciones aeróbicas.

Finalmente las muestras fueron incubadas a 8 °C.

[0047] A intervalos de tiempo apropiados, partes de cada concentración fueron diluidas 2 veces en PPS y homogeneizadas en un stomacher (Lab Blender® 400) durante 1 minuto.

Diluciones en serie adicionales fueron hechas en PPS.

[0048] Las diluciones fueron llevadas a "Violet Red Bile Glucose Agar" (Oxoid® CM485) e incubadas durante 24 horas a 30 °C.

[0049] En la tabla II son compilados los resultados de los análisis microbiológicos de carne picada irradiada inoculada con *E. coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina añadidas durante el almacenamiento a 8° Celsius.

Tabla II: resultados de cuenta bacteriana de *E.Coli* O157:H7 en la carne de res picada irradiada con concentraciones de glicina diferentes durante el almacenamiento a 8 °Celsius.

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante			
	0 días	3 días	6 días	13 días
Control (sin aditivo)	5,5	5,6	6,2	6,5
1,0 % en peso de glicina	5,4	5,2	4,5	5,5
1,5 % en peso de glicina	5,4	4,1	3,2	0,0

[0050] Un efecto inhibitor pequeño fue observado al añadir 1,0 % de glicina, mientras que la adición de 1,5 % de glicina dio un efecto bactericida.

Ejemplo 3

[0051] Carne fresca del lomo de cerdo fue picada una vez a través de un plato de 12 mm en un picador de carne desinfectado y manualmente homogeneizada.

La carne de cerdo fue dividida en 7 partes de 2,5 kg y mezclada con concentraciones diferentes de glicina, 0,5 % en peso, 1,0 % en peso y 1,5 % en peso basado en el peso total de la porción de carne.

[0052] Posteriormente la carne fue picada una vez a través de un plato de 6 mm.

Cada lote (2,3 kg) fue inoculado con 10 ml de una suspensión de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) a un nivel final de aproximadamente 10^4 ufc por g de producto.

Antes de la inoculación, el cultivo, mantenido inclinado, fue pre-cultivado dos veces en la Brain Heart Infusion (BHI Oxoid® CM225) durante 24 horas a 30°C.

El cultivo completamente maduro fue diluido en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener el nivel deseado.

[0053] La carne inoculada fue picada nuevamente dos veces a través de un plato 3 de mm después de lo cual el cerdo picado fue envasado en 24 partes de 80 g en una atmósfera modificada (MAP) consistente en 80% O² y 20% CO² con un volumen de gas de aproximadamente 120 ml.

Posteriormente 9 paquetes fueron almacenados a 12°C durante hasta 12 días.

5 Durante el experimento las temperaturas fueron registradas utilizando un registrador de datos.

[0054] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron muestras de cerdo picado de cada lote por duplicado para realizar análisis microbiológicos.

10 De cada embalaje único se tomó una muestra de 20 g asépticamente, se diluyó 10 veces en (PPS) y se homogenizó en un stomacher durante 1 minuto.

Diluciones en serie adicionales fueron hechas en PPS.

Números de bacterias de *E. coli* O157:H7 fueron determinados utilizando CT-SMAC (Sorbitol MacConkey Agar, Oxoid® CM813 y suplemento Cefixime-Tellurite, Oxoid® SR172) tal y como se menciona en NEN-ISO 16649-2:2001.

15 Los platos fueron incubados a 42°C durante 1 día.

[0055] La tabla III muestra los resultados (por duplicado) de los análisis microbiológicos de cerdo picado inoculado con *E. coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina añadida durante el almacenamiento a 12 °C.

20 Tabla III: resultados de cuenta bacteriana de *E.Coli* O157:H7 en el cerdo picado con concentraciones de glicina diferentes en MAP durante almacenamiento a 12 °Celsius.

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto tras el almacenamiento durante				
	0 días	3 días	6 días	10 días	12 días
Control (sin aditivo)	3,68	5,28	7,38	7,43	7,29
	3,72	5,57	7,06	7,18	7,14
0,5 % en peso de glicina	3,75	5,65	7,45	7,04	6,56
	3,66	5,80	7,28	7,08	6,66
1,0 en peso de glicina %	3,51	5,01	6,38	6,15	5,18
	3,51	5,05	6,51	5,95	4,70
1,5 % en peso de glicina	3,81	2,30	2,61	1,00	1,00
	3,83	2,00	2,59	1,00	1,00

[0056] Después de 5 días de almacenamiento a 12°C se notaron diferencias menores en la apariencia del cerdo picado. Después de 7 días, muestras de cerdo picado sin aditivos y con cantidades inferiores de glicina mostraron un color gris. Después de 10 días se juzgó que todos productos estaban grises.

25 Ejemplo 4

[0057] Lotes consistentes en dos envases al vacío con pollo picado irradiado, circa 1500 g cada uno, fueron preparados con respectivamente 0,0, 0,5, 1,0, y 1,5 % en peso de glicina como agente antibacteriano.

30 Los lotes de pollo picado fueron almacenados durante 1 día a 0°C hasta el siguiente examen.

[0058] Cada lote de pollo picado fue inoculado con una *Salmonella typhimurium* (M90003246/0550).

Antes de la inoculación, el cultivo, mantenido inclinado en el frigorífico, fue pre-cultivado dos veces en el caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid® CM225) durante 24 horas a 30°C.

35 El cultivo completamente maduro fue diluido en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener una suspensión del nivel deseado.

Una cantidad de pollo picado (ca. 1000 G) de cada composición fue puesta en una bandeja desinfectada e inoculada con 10 ml de suspensión de *S. typhimurium* a un nivel final de aproximadamente 10⁴ ufc por g de producto.

Después de la inoculación, el pollo picado fue homogeneizado manualmente.

40 Posteriormente, el producto fue dividido en partes de 50 g y empaquetado aeróticamente en bolsas de plástico (16 x 11 x 1,5 cm, ca 250 ml).

Los paquetes obtenidos fueron almacenados a 30°C durante hasta 24 horas y a 7°C durante hasta 30 días.

Durante el experimento las temperaturas en el almacenamiento fueron registradas.

[0059] A intervalos de tiempo apropiados, muestras de pollo picado de cada lote se tomaron por duplicado para realizar análisis microbiológicos.

De cada embalaje único se tomó una muestra de 20 g asépticamente, se diluyó 10 veces en PPS y se homogeneizó en un stomacher durante 1 minuto.

5 Se hicieron diluciones en serie adicionales en PPS.

Números de *S. typhimurium* fueron determinados usando Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid® CM485) tal y como se menciona en ISO 5552:1997.

Los platos fueron incubados a 37°C durante 1 día.

10 [0060] Los resultados de los análisis microbiológicos de pollo picado con cantidades diferentes de glicina durante almacenamiento aeróbicamente envasado a 7°C se muestran en la tabla IV

Tabla IV resultados de cuentas de *S. typhimurium* en el pollo picado aeróbicamente envasado con cantidades de glicina durante almacenamiento a 7°C

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto tras el almacenamiento durante				
	0 días	3 días	7 días	14 días	30 días
Control (sin aditivo)	3,73	3,85	3,88	4,45	7,24
	3,88	3,83	3,83	4,20	6,59
0,5 % en peso de glicina	3,69	3,76	3,70	3,63	3,51
	3,86	3,88	3,64	2,60	4,02
1,0 % en peso de glicina	3,72	3,34	2,97	2,18	1,78
	3,74	3,58	2,96	1,85	1,60
1,5 % en peso de glicina	3,85	3,30	3,00	2,04	1,70
	3,83	3,54	3,08	1,85	1,78

15 [0061] Durante el almacenamiento a 7°C, se inhibió el desarrollo de *S. typhimurium* en el pollo picado que contenía glicina en cantidades de 0,5% durante el periodo de almacenamiento entero de 30 días.

En el pollo picado que contenía glicina en cantidades de 1 a 1,5% se observó una reducción de dos logs de *S. typhimurium* durante ese periodo.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la conservación de carne fresca para prevenir intoxicación por los patógenos alimenticios *Escherichia coli*, *Salmonella*, y *Campylobacter* donde se añade glicina y/o un derivado de glicina seleccionado del grupo consistente en sales de metal alcalino (tierra) de glicina, glicinato de amonio, di-y tripéptidos que comprenden glicina y ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 a carne fresca.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 donde la glicina o su derivado se añaden como único agente antibacteriano a carne fresca.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde uno o varios ácidos orgánicos y/o una o varias de sus sales se añaden a la carne fresca.
- 15 4. Método según la reivindicación 3 donde se añaden ácido láctico y/o su sal de lactato a la carne fresca.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde se añaden glicina o su derivado a carne fresca para alcanzar concentraciones de 0,5 a 3 % en peso y preferiblemente de 0,5 a 1,5 % en peso de glicina y/o dicho derivado de glicina en peso en base a dicha carne fresca.
- 20 6. Método según la reivindicación 5 donde uno o varios ácidos orgánicos y/o una o varias de sus sales se añaden a carne fresca para alcanzar concentraciones de 0,5 a 3 % en peso en base al peso total de la carne fresca.
- 25 7. Método según la reivindicación 6 donde ácido láctico y/o su sal se añaden a la carne fresca para alcanzar concentraciones de 0,5 a 3 % en peso en base al peso total de la carne fresca.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las bacterias de *Salmonella* son *Salmonella typhimurium* y/o *Salmonella enteritidis*.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las bacterias de *Escherichia coli* son *Escherichia coli* 0157:H7.