

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 350**

51 Int. Cl.:

A23K 50/40	(2006.01)
A23L 3/3463	(2006.01)
A23L 3/3571	(2006.01)
A23K 40/20	(2006.01)
A23K 40/30	(2006.01)
A23B 7/16	(2006.01)
A23K 10/18	(2006.01)
A23K 40/25	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2013 PCT/US2013/050829**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14018327**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2013 E 13742127 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2877042**

54 Título: **Productos alimenticios recubiertos de bacteriófagos**

30 Prioridad:

25.07.2012 US 201213557828

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

16.04.2019

73 Titular/es:

**THE IAMS COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**TERHAAR, ROBBERT H. y
HANNA, LEIGH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 709 350 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

Productos alimenticios recubiertos de bacteriófagos

5 **Campo de la invención**

Esta divulgación se refiere a productos alimenticios tratados con un bacteriófago.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La intoxicación alimentaria es un problema significativo. Solo en los Estados Unidos, los Centros para el Control de Enfermedades “estima que cada año aproximadamente 1 de cada 6 americanos (o 48 millones de personas) enferman, 128.000 son hospitalizadas, y 3.000 mueren de intoxicaciones alimentarias”. *Estimates of Foodborne Illness in the United States*, www.cdc.gov/foodborneburden/index.html, última visita el 22 de julio, 2012. La intoxicación alimentaria puede estar producida por una variedad de microbios, incluyendo protozoos, bacterias, virus, y hongos. 15 Históricamente, los esfuerzos en la reducción del riesgo se han enfocado en la limpieza, como lavar los ingredientes de alimentos, lavarse las manos para las personas que manejan productos alimenticios, y desinfectar las superficies y equipos de preparación de los alimentos. Estos procedimientos son eficaces cuando se usan apropiadamente, sin embargo, su aplicación a una cadena de alimentos moderna puede requerir el cumplimiento por una variedad de 20 individuos en diferentes instalaciones en diferentes localizaciones. Desviaciones relativamente leves de los procedimientos seguros de manejo de alimentos en cualquier punto de contacto pueden socavar las acciones preventivas tomadas a lo largo del resto de la cadena. Esto es cierto para alimentos crudos, tal como frutas, verduras, y carnes, así como para alimentos procesados o preparados, tal como galletas, galletas saladas, bizcochos, pienso de mascotas, y similares.

25 Recientemente, ha habido interés en usar bacteriófagos para reducir el riesgo de intoxicación alimentaria causada por bacterias. Los bacteriófagos son partículas de tipo virus que infectan selectivamente ciertos tipos de bacterias, con diferentes bacteriófagos que infectan diferentes tipos de bacterias. Un bacteriófago “lítico” produce la ruptura y muerte de las bacterias infectadas. Los bacteriófagos no infectan células eucariotas y, por tanto, son inocuos para plantas y 30 animales, incluyendo los seres humanos. A pesar del potencial para que los bacteriófagos reduzcan el riesgo de intoxicación alimentaria reduciendo la carga bacteriana en productos alimenticios, no se han adoptado ampliamente en la industria alimentaria. Esto es en parte debido a la dificultad de usar bacteriófagos de forma eficaz.

35 El documento US2009246336 (A1) divulga un sistema y método para reducir o prevenir la contaminación bacteriana en alimentos incluye la aplicación de un tratamiento de bacteriófago a cualquier tipo de producto alimenticio en cualquier fase del procesamiento del producto alimenticio. El documento US2007077334 (A1) divulga un proceso de recubrir un pienso animal para obtener un producto de pienso animal recubierto. El proceso incluye la etapa de aplicar un primer recubrimiento al pienso animal, en donde el primer recubrimiento comprende al menos el 20% en peso de 40 azúcar seleccionado del grupo que consiste en monosacárido, disacárido, y cualquier combinación de los mismos en cualquier proporción. El proceso también incluye la etapa de aplicar un segundo recubrimiento al pienso animal, en donde el segundo recubrimiento comprende al menos el 20% en peso de fosfolípido. El documento US2008038322 (A1) divulga composiciones de bacteriófagos estabilizadas, y métodos para preparar composiciones de bacteriófagos estabilizadas.

45 Aplicar bacteriófagos usando procesos convencionales, tal como rociado o nebulización, ha tendido a producir menos reducción en los recuentos de bacterias patógenas de lo deseado. Aún se espera que sumergir o bañar alimentos en bacteriófagos sea eficaz; sin embargo, algunos productos alimenticios no son susceptibles a inmersión o bañado en una solución acuosa. Permanece una necesidad para alimentos tratados con bacteriófagos y procesos para tratar 50 alimentos con bacteriófagos que reduzca o prevenga de forma eficaz el crecimiento bacteriano patógeno en el alimento.

Compendio de la invención

55 La invención se refiere a un alimento tratado con un bacteriófago, el alimento tratado comprende: un producto alimenticio; una primera capa de recubrimiento grasa o cérea sobre el producto alimenticio; y una segunda capa de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófagos, en donde la capa de recubrimiento grasa o cérea es distinta de la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófagos, en donde la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago es la capa de recubrimiento más externa sobre el 60 alimento.

65 La invención se refiere además a un método para aplicar bacteriófago a un alimento, el método comprende: proporcionar un alimento; proporcionar una solución de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófago; aplicar una capa de recubrimiento hidrofóbica, grasa o cérea antes de poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento; y posteriormente poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento para crear una superficie de alimento recubierta; y frotar la superficie del alimento recubierta para distribuir las cepas de bacteriófago a través de la superficie de alimento recubierta.

En algunos aspectos de la divulgación, un alimento se trata con un bacteriófago. El alimento tratado comprende un producto alimenticio. El alimento tratado comprende una primera capa de recubrimiento grasa o cérea sobre el producto alimenticio. El alimento tratado comprende una segunda capa de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófago. La capa de recubrimiento grasa o cérea es distinta de la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago. La capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago es la capa de recubrimiento más externa sobre el alimento. El alimento puede comprender una tercera capa de recubrimiento. La tercera capa de recubrimiento puede comprender una o más cepas de bacteriófago. La tercera capa de recubrimiento puede estar dispuesta sobre la primera capa de recubrimiento. El alimento puede ser un pienso para mascotas.

Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser de la familia Siphoviridae, Podoviridae o Myoviridae. Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias de un género seleccionado del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter* y combinaciones de las mismas. Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser de la familia Myoviridae e infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias *Salmonella*. El recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago puede tener un pH entre 2 y 10. El alimento puede comprender una capa de recubrimiento que comprende digerido animal o ácido, y el digerido animal o ácido puede estar separado de o no dentro de la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para aplicar bacteriófago a un alimento. El método comprende proporcionar un alimento. El método comprende proporcionar una solución de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófago. El método comprende aplicar una capa de recubrimiento hidrofóbica, grasa o cérea antes de poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento. El método comprende posteriormente poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento para crear una superficie de alimento recubierta. El método comprende frotar la superficie de alimento recubierta para distribuir las cepas de bacteriófago a través de la superficie de alimento recubierta. El frotado se puede realizar mezclando una pluralidad de trozos de alimento recubierto de modo que las superficies de alimento recubiertas se froten entre sí.

El frotado y/o poner en contacto se puede realizar en un transportador vibratorio. El transportador vibratorio se puede operar para proporcionar un número de aceleración adimensional mayor de aproximadamente 0,3. El transportador vibratorio se puede operar para proporcionar una amplitud vertical media de vibración entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 20 mm. El transportador vibratorio se puede operar para proporcionar un número de Peclet mayor de aproximadamente 100. El poner en contacto se puede realizar por nebulización con niebla, rociado con aerosol, o una combinación de los mismos. El alimento puede ser un pienso para mascotas o una croqueta de pienso para mascotas.

Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser de la familia Myoviridae. Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias. Al menos una de la una o más cepas de bacteriófago puede ser infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias *Salmonella*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una representación esquemática de una superficie de alimento tratada con bacteriófago según algunas formas de realización ejemplares de la invención.

La figura 1B es una representación esquemática de una superficie de alimento tratada con bacteriófago preparada usando un proceso común, convencional.

La figura 2 es una vista lateral de un transportador vibratorio, espiral, ejemplar.

La figura 3 es una vista superior de un transportador vibratorio, espiral, ejemplar.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, "croqueta" o "croqueta seca" se refiere a un producto alimenticio extruido con un nivel de humedad menor de o igual al 15% en peso del producto alimenticio. "Semihúmedo" se refiere a un producto alimenticio con un nivel de humedad entre el 15% y el 50% en peso del producto alimenticio. "Húmedo" se refiere a un producto alimenticio que tiene un contenido de humedad igual a o mayor del 50% en peso del alimento. Los alimentos semihúmedos o húmedos se pueden preparar al menos en parte usando cocción por extrusión, o se pueden preparar enteramente por otros métodos. Las alternativas a la cocción por extrusión incluyen métodos tales como freír, hornear, asar, a la parrilla, cocción a presión, hervir, calentamiento óhmico, cocción al vapor, y similares.

Como se usa en el presente documento, “alimento” se refiere a cualquier composición pretendida para la ingestión oral, y excluye productos que se pueden tragar, pero en general se consideran no comestibles, tal como rocas o juguetes hechos de polímeros no comestibles como PVC, PVC modificado, o vinilo, ya se traguen enteros o rotos y tragados en piezas.

5 Como se usa en el presente documento, “poroso” se refiere a un alimento que está leudado o expandido. Por tanto, los alimentos porosos incluyen muchas galletas, galletas saladas, bizcochos, y panes (que incluye hogazas, panecillos, barras, etc.). Los alimentos extruidos también pueden ser porosos. Por ejemplo, los piensos para mascotas extruidos con frecuencia comprenden una matriz de almidón gelatinizado que se procesa para expandirse durante el cocinado, proporcionando una croqueta porosa. Otros ejemplos de alimentos extruidos, porosos incluyen bolitas de queso y algunos cereales de desayunos (tal como bolitas con sabor a chocolate o fruta). No todos los alimentos extruidos son porosos. Por ejemplo, la mayoría de la pasta extruida no es porosa.

15 Como se usa en el presente documento, el término “extruir” significa procesar, tal como enviar a través de un extrusor. En una forma de realización de extrusión, el alimento se forma por un proceso de extrusión en donde materias primas, que típicamente incluyen almidón, se pueden extruir con calor y presión para gelatinizar el almidón y formar un alimento particulado, tal como croqueta de pienso para mascotas o aperitivos o bolitas de desayunos. Se puede usar cualquier tipo de extrusor, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen extrusores de husillo único y extrusores de doble husillo.

20 Como se usa en el presente documento, “mascota” significa perros, gatos, y/o otros animales domesticados de necesidades nutricionales similares a un perro o un gato. Por ejemplo, otros animales domesticados de necesidades nutricionales similares a un gato pueden incluir visones y hurones, que pueden sobrevivir indefinida y saludablemente en una composición nutricional diseñada para cumplir las necesidades nutricionales de gatos. El experto en la materia apreciará que los perros y los gatos tienen necesidades nutricionales que se diferencian en aspectos clave. A un nivel
25 fundamental, los perros son omnívoros, mientras que los gatos son carnívoros obligados. Además, las necesidades nutricionales no son necesariamente consistentes con clasificaciones filogenéticas u otras no nutricionales.

30 Como se usa en el presente documento, “completa y nutricionalmente equilibrada” se refiere a una composición que proporciona todas las necesidades nutricionales de un animal típico cuando se alimenta según las directrices de alimentación para esa composición o según el uso común si no se proporcionan directrices de alimentación. Tales necesidades nutricionales se describen, por ejemplo, en los Perfiles de Nutrientes para perros y gatos publicadas por la Asociación de Oficiales Americanos de Control de Piensos (AAFCO).

35 Como se usa en el presente documento, el término “recubrimiento” significa una cobertura parcial o completa que cubre al menos una parte de una superficie, por ejemplo, una superficie de un alimento. En un ejemplo, un alimento se puede recubrir parcialmente con un recubrimiento de modo que solo parte del alimento está recubierto, y parte del alimento no está recubierto y, por tanto, está expuesto. En otro ejemplo, el alimento se puede recubrir por completo con un recubrimiento de modo que el alimento entero esté recubierto y por tanto no expuesto. Por tanto, un recubrimiento puede cubrir desde una cantidad insignificante hasta la superficie entera. Un recubrimiento también
40 puede estar recubierto sobre otros recubrimientos de modo que puede estar presente una estratificación de recubrimientos. Por ejemplo, un alimento se puede recubrir con el recubrimiento A, y el recubrimiento A se puede recubrir con el recubrimiento B, de modo que el recubrimiento A y el recubrimiento B forman cada uno una capa.

45 Como se usa en el presente documento, el término “bacteriófago” se refiere a un bacteriófago que es lítico o de otra manera dañino para bacterias de una o más cepas indeseables. Las bacterias indeseables pueden ser o producir compuestos que son potencialmente patógenos para seres humanos o animales, o pueden estar asociadas con deterioro, mal olor, decadencia estética, u otro deterioro de un producto alimenticio colonizado por las bacterias indeseables. Como se usa en el presente documento, “bacteria” o “bacteria diana” se refiere a un microorganismo indeseable susceptible a infección y lisis, apoptosis, o modos alternativos de muerte celular causados por un
50 bacteriófago. Diferentes cepas de bacteriófagos pueden infectar diferentes cepas de bacterias con diferentes resultados, o pueden infectar algunas cepas de bacterias, pero no otras.

55 Como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra manera para un parámetro particular, el término “aproximadamente” se refiere a un intervalo que abarca un intervalo aceptable para la industria para variabilidad inherente en análisis o controles de procesos, incluyendo el error de muestreo. Consistente con la Dirección Modelo de AAFCO, no se pretende que la variabilidad inherente abarque la variación asociada con trabajo descuidado o procedimientos deficientes, sino más bien, que aborde la variación inherente asociada incluso con buenas prácticas y técnicas.

60 La posibilidad de usar bacteriófagos para reducir o prevenir el crecimiento bacteriano en alimentos se ha considerado previamente. Sin embargo, producir un alimento tratado con bacteriófago que consistentemente reduzca los recuentos de bacterias ha sido más difícil de lo supuesto. Sin querer estar unido por teoría, se propone que esta dificultad puede estar relacionada con la naturaleza no móvil de los bacteriófagos, particularmente cuando los bacteriófagos se incorporan en o aplican sobre alimentos sólidos. Debido a que los bacteriófagos no se mueven después de la aplicación a una superficie sólida (aparte del posible movimiento Browniano), solo son eficaces en reducir el
65 crecimiento bacteriano si resulta que una bacteria viva entra en contacto con el bacteriófago en posición fija. Por tanto,

para ser lo más eficaz, los bacteriófagos se pueden aplicar en una red a pequeña escala, relativamente consistente que “atrapará” o “capturará” bacterias en reproducción antes de que se reproduzcan a niveles inductores de enfermedad.

5 Esto se muestra conceptualmente en las figuras 1A y 1B. La figura 1A muestra un estado ideal, donde la separación media entre bacteriófagos 10 en o sobre alimento 22 es pequeña relativa al tamaño de la bacteria diana 16, y la distribución de bacteriófagos 10 es lo suficiente regular que hay pocos o ningún bolsillo donde las bacterias 16 podrían crecer sin control. Es decir, si la bacteria 16 se fuera a reproducir, la colonia formada por reproducción de la bacteria 16 encontraría un bacteriófago 10 antes de que la colonia pudiera alcanzar un tamaño problemático. En contraste, la figura 1B muestra un estado que puede surgir usando procesos convencionales, como donde el bacteriófago 10 se rocía sobre el alimento 22. Usando un proceso de recubrimiento por rociado típico, los bacteriófagos 10 se aplican más o menos aleatoriamente sobre la superficie del alimento 22 en forma de gotitas irregulares de números irregulares de bacteriófagos 10. Por tanto, se pueden formar bolsillos 24 donde la separación entre gotitas de bacteriófagos 10 permitiría que crecieran bacterias sin control, posiblemente a niveles problemáticos en uno o más bolsillos 24.

15 La distribución irregular del bacteriófago 10 como se muestra en la figura 1B se puede exacerbar en los mismos alimentos que más probablemente se sometan a procesos de aplicación de recubrimiento por rociado. Por ejemplo, los alimentos porosos como galletas saladas, bizcochos, y croqueta de pienso para mascotas podrían no tolerar procesos de inmersión o empapado para aplicar bacteriófagos en solución líquida, ya que la solución tendería a empaparse en un alimento poroso. Esta saturación con solución líquida podría arruinar la textura del alimento. Además, si los bacteriófagos en solución se absorben rápidamente lejos de la superficie del alimento (por ejemplo, arrastradas al menos parcialmente en poros o grietas en la superficie del alimento según se absorbe la solución de recubrimiento en el alimento), los bacteriófagos podrían no estar disponibles en la superficie del alimento, donde es más probable que el alimento encuentre contaminantes.

20 Este entendimiento se desarrolló en parte explorando una manera intuitiva de aplicar bacteriófagos a productos alimenticios porosos. Se pueden recubrir galletas saladas, galletas, bizcochos, croquetas de pienso de mascotas, y similares con otras composiciones para efecto estético o palatabilidad. Por ejemplo, son comunes lavados para dar a los alimentos procesados un color apetecible, como lo son recubrimientos basados en azúcar, proteína o grasa que pueden hacer un alimento más dulce, más salado, o de otra manera más sabroso. Además, con frecuencia un lavado o recubrimiento se diseña para permanecer en la superficie del alimento. Por ejemplo, un alimento puede ser menos poroso y menos inclinado a absorber un lavado líquido antes de que se cocine, y se puede aplicar un lavado poco tiempo antes de que el alimento se cocine, de modo que hay menos oportunidad de que el lavado se empape en el alimento de la que habría para que una solución de bacteriófago líquida se empapara en el alimento después de estar cocinado. Como otro ejemplo, los recubrimientos que aumentan la palatabilidad con frecuencia emplean componentes, tales como azúcares o grasas, que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente. Al incorporar componentes sólidos o semisólidos, se puede reducir cualquier tendencia a que el recubrimiento se empape en un alimento poroso, reteniendo de esta manera una mayor proporción del recubrimiento en la superficie del alimento poroso que si el recubrimiento no contuviera componentes sólidos o semisólidos.

30 Sin embargo, la adición de un bacteriófago a un recubrimiento que contiene grasa para un alimento poroso inesperadamente produjo reducciones inconsistentes y con frecuencia inadecuadas en recuentos de bacterias. En contraste, cuando el bacteriófago se aplicó separado de un recubrimiento sólido o semisólido, los rendimientos eran tanto mejores como más consistentes en y entre lotes. Esto se describe en mayor detalle en la descripción y ejemplos que siguen.

35 En algunas formas de realización, un alimento se puede recubrir con bacteriófagos. El recubrimiento que comprende el bacteriófago puede ser líquido a 20°C según se aplica. Por ejemplo, el recubrimiento que comprende el bacteriófago puede ser una solución acuosa que se evaporará para dar un residuo de bacteriófago sobre el alimento después de recubrir. La solución de recubrimiento, como se aplica, puede comprender bacteriófagos a una concentración entre 1×10^2 unidades formadoras de placas (ufp) por ml, y 1×10^9 ufp/ml o 1×10^{12} ufp/ml. La solución de recubrimiento, después de la aplicación, puede dejar un residuo de fago recuperable en concentraciones entre 0,5 log ufp/gramo de alimento recubierto o 2 log ufp/gramo de alimento recubierto y 5 log ufp/gramo de alimento recubierto o 7 log ufp/gramo de alimento recubierto.

40 El alimento puede tener un recubrimiento estratificado, con una primera capa de recubrimiento más próxima a la superficie del alimento, y una segunda capa de recubrimiento sobre la primera capa de recubrimiento. La primera capa de recubrimiento puede comprender una cera, una grasa, azúcares, proteínas, digeridos animales, o combinaciones de los mismos. La primera capa de recubrimiento puede ser sólida o semisólida a 20°C. La segunda capa de recubrimiento puede comprender una o más cepas de bacteriófago. El recubrimiento que comprende la cepa o cepas de bacteriófago puede ser como se ha divulgado a lo largo de esta descripción. En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, la primera capa de recubrimiento comprende una o más cepas de bacteriófagos; la segunda capa comprende una cera, grasa, azúcares, proteínas, digeridos animales, o combinaciones de los mismos; y una tercera capa comprende una o más cepas de bacteriófago.

65

Si dos o más capas de recubrimiento comprenden cepas de bacteriófago, la cepa o cepas en las diferentes capas de recubrimiento pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, una pieza de fruta se puede recubrir con bacteriófagos para reducir el crecimiento de bacterias que pueden estar en la fruta cuando se recoge, después recubrir con un fino recubrimiento de cera, después recubrir con bacteriófagos para reducir el crecimiento de bacterias que se pueden transferir a la fruta durante el transporte y manejo. Los bacteriófagos en el primer recubrimiento pueden dirigirse a bacterias comunes a huertos, incluyendo suministros de agua y tierra, donde la fruta se cultiva. Los bacteriófagos en el segundo recubrimiento se pueden dirigir a bacterias comunes en las manos humanas o instalaciones de procesamiento, ya que la fruta puede estar expuesta durante la clasificación, embalaje, transporte y exposición para la venta. En esta u otras formas de realización, puede haber algunos tipos de bacteriófagos comunes a dos o más capas de recubrimiento distintas. Por ejemplo, un recubrimiento que comprende bacteriófagos puede comprender 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o más cepas de bacteriófagos distintas, y el segundo recubrimiento que comprende bacteriófagos puede comprender 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o más cepas de bacteriófagos distintas. De las distintas cepas en cada capa de recubrimiento, ninguna o 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o todas las cepas pueden ser iguales de capa a capa.

En algunas formas de realización, una solución acuosa que comprende una o más cepas de bacteriófago se aplica sobre una capa hidrofóbica, tal como una capa grasa o cerosa. Este orden de estratificación puede ayudar a extender la solución de bacteriófago a través de la superficie del alimento, dejando menos bolsillos de área de superficie sin tratar donde las bacterias podrían crecer sin control por los bacteriófagos. En algunas formas de realización, el alimento se puede mezclar, frotar o poner en contacto de otra manera con otras piezas de alimento recubierto con bacteriófago para ayudar a extender el bacteriófago. Los aparatos de recubrimiento/mezcla adecuados para mezclar el alimento recubierto pueden incluir recubridoras/mezcladoras de proceso continuo y por lotes, tal como mezcladoras de cinta, mezcladoras de paletas, recubridoras/mezcladoras de lecho fluido, recubridoras de bombo, recubridoras/mezcladoras vibratorias, y similares. Como se describe en el ejemplo 3, posteriormente, una recubridora/mezcladora vibratoria puede ser particularmente eficaz en aplicar y extender un recubrimiento de bacteriófago de una manera adecuada para alcanzar altos niveles de inhibición de crecimiento bacteriano. El mezclado exhaustivo puede aumentar la eficacia del bacteriófago aplicado, y permitir el uso de ufp de bacteriófago relativamente más bajas por gramo de alimento que si el bacteriófago se aplica sin extensión mecánica, tal como mezclado.

Una recubridora/mezcladora vibratoria, si se usa, se puede modelar adaptando un transportador vibratorio. Un transportador vibratorio puede ser lineal o planar, pero con más frecuencia se presenta como un elevador espiral o hélice vibratoria. Un transportador vibratorio se usa convencionalmente para mover partículas hacia arriba, como desde un camión a un silo. Las partículas se mueven a lo largo del transportador por vibración. El transportador típicamente está configurado para maximizar el movimiento horizontal, y el transportador mismo está configurado para mover partículas en la dirección vertical. Por ejemplo, el transportador puede ser espiral, de modo que el movimiento "horizontal" a lo largo del transportador también mueve las partículas verticalmente sobre la longitud del transportador.

En tal configuración, el transportador y la vibración del transportador están configurados para minimizar el movimiento vertical de las partículas relativo a la superficie del transportador, porque tal movimiento vertical no es productivo con respecto a avanzar las partículas a lo largo del transportador. Por tanto, independientemente de la profundidad del lecho del transportador, hay poco recambio de partículas en la dirección vertical o z según se mueven a lo largo del transportador vibratorio. Las partículas que empiezan en el fondo del lecho tienden a residir en o cerca del fondo del lecho al final del transportador, y las partículas que empiezan en la parte superior del lecho tienden a residir en o cerca de la parte superior del lecho al final del transportador.

En contraste, al cambiar la amplitud vertical de la vibración, la aceleración adimensional, el flujo de pistón (medido por el número de Peclet, descrito posteriormente), y/u otros parámetros, es posible sintonizar la vibración de un transportador vibratorio para conseguir intercambio en la dirección z o vertical regular de partículas que se mueven horizontalmente a lo largo del transportador vibratorio. Combinado con una o más localizaciones de recubrimiento a lo largo de la ruta del transportador vibratorio, este movimiento en la dirección z se puede usar para recubrir partículas en un proceso continuo. Al sintonizar la vibración, se pueden aplicar recubrimientos más o menos uniformes todo alrededor de las partículas. Es decir, puesto que las partículas se mueven en la dirección z, se puede extender un recubrimiento a la mayoría o toda la superficie de las partículas sin mezclar lotes, como en una mezcladora de paletas. Además, puesto que las partículas cambian la posición relativa de una a otra en la dirección z, es posible recubrir múltiples superficies de múltiples capas de partículas, a diferencia del recubrimiento por rociado convencional, que recubre un lado o una superficie de una única capa de partículas.

Por tanto, mediante la reconfiguración del transportador vibratorio para alcanzar el nivel deseado de movimiento en la dirección z e intercambio de partículas, puede ser posible alcanzar recubrimiento uniforme, más regular de un número mayor de partículas de lo que es posible usando un aparato de recubrimiento convencional de tamaño y flujo de masa similares. Esto puede ayudar a proporcionar dosificación consistente, uniforme de ingredientes de recubrimiento activos, tal como bacteriófagos. Si se usan múltiples dispensadores de recubrimiento a lo largo de la ruta del transportador vibratorio, es posible conseguir múltiples capas de recubrimientos predecibles, uniformes sobre la mayoría o toda el área de superficie de una partícula o pieza de alimento. Al ajustar los controles en el transportador vibratorio, este proceso de recubrimiento/mezclado se puede usar incluso con productos relativamente frágiles, tal como fruta fresca o alimentos procesados quebradizos. Además, al variar el tipo, número y colocación de los dispensadores de recubrimiento a lo largo del transportador vibratorio, es posible proporcionar recubrimientos gruesos

(como al aplicar más del mismo recubrimiento en diferentes puntos a lo largo del transportador) y/o recubrimientos complejos (por ejemplo, capas de diferentes recubrimientos en diferentes volúmenes, pesos o espesores).

Para un transportador vibratorio, los parámetros de proceso se pueden variar para proporcionar propiedades de recubrimiento y mezclado deseadas. Estos parámetros de proceso, como se describe posteriormente, pueden incluir, pero no están limitados a, nivel de llenado del lecho vibratorio, velocidad de flujo a través de lecho vibratorio, amplitud de vibración, frecuencia de vibración localización de los puntos de adición del recubrimiento líquido, localización de los puntos de adición del recubrimiento sólido, orden o secuencia de la adición del recubrimiento, patrón de rociado de la boquilla para el recubrimiento líquido, tamaño de gotita del recubrimiento líquido, y tamaño de partícula del sólido.

Se muestra una vista lateral de una forma de realización de un ejemplo no limitante de un transportador vibratorio, espiral en la figura 2, y se muestra una vista superior de una forma de realización de un ejemplo no limitante de un transportador vibratorio, espiral en la figura 3. Un tubo 102 está enrollado en una hélice, o bobina, alrededor de una columna central 101 y montada a la columna por un conjunto de soportes 104a, 104b, 104c, y 104d. La columna central 101 descansa en un conjunto de absorbedores de choque 105a, 105b, 105c, y 105d. Dos motores eléctricos 103a y 103b con pesos giratorios (no mostrado) están montados en cada lado de la columna 101. Los motores 103a y 103b están montados en un ángulo con respecto a la horizontal. Un ángulo típico puede ser 45 grados. Los motores 103a y 103b están desplazados el uno respecto al otro por 90 grados. Los motores 103a y 103b imparten un componente de vibración vertical y un componente de vibración horizontal a la columna 101. La columna 101, a su vez, imparte estos componentes de vibración al tubo helicoidal. La magnitud tanto de la vibración vertical como horizontal se determina por la frecuencia del motor, el tamaño, la forma y la posición de los pesos, la potencia del motor, y el ángulo del motor relativo a la horizontal. Las partículas de alimento se alimentan en el tubo helicoidal en la entrada del producto (106). La vibración vertical del tubo 102 produce que el alimento bote arriba y abajo en el tubo 102, esencialmente fluidificando el alimento (con respecto al movimiento del alimento, no necesariamente con respecto a la constitución del alimento o partículas de alimento). La vibración horizontal del tubo 102 produce que el alimento prosiga arriba y a través del tubo. El alimento sale luego del tubo en la salida del producto 107.

Como se muestra en la figura 2, el tubo 102 proporciona el canal para el flujo de materiales, tal como alimento. Mientras que se muestra un tubo, se puede usar cualquier forma y dimensión de transportador vibratorio. Por tanto, en una forma de realización, el transportador vibratorio comprende un canal que tiene una entrada y una salida. El canal, como se describe, puede ser de varios tipos y secciones transversales. En ciertas formas de realización, el canal puede tener una sección transversal sustancialmente redonda. En ciertas formas de realización, el canal puede tener una sección transversal sustancialmente rectangular. En ciertas formas de realización, el canal puede tener una sección transversal sustancialmente rectangular con un fondo abombado.

En una forma de realización, el canal puede tener un diámetro particular. En una forma de realización, el diámetro del canal puede ser al menos cuatro veces tan grande como el ESD de las partículas de alimento. En una forma de realización en que se usa un tubo para el canal, y en la que un tubo se puede considerar una sección transversal sustancialmente redonda, el tubo puede tener un diámetro de aproximadamente 8 pulgadas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 pulgadas, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 pulgadas. Sin embargo, se puede usar cualquier diámetro de tubo.

En una forma de realización, el transportador vibratorio puede tener un número particular de bobinas, como se muestra en la figura 2. En una forma de realización, el transportador vibratorio puede tener una única bobina. En una forma de realización, el transportador vibratorio puede tener más de una bobina. En una forma de realización, el transportador vibratorio puede tener dos bobinas, o tres bobinas, o cuatro bobinas u ocho bobinas, o hasta aproximadamente 30 bobinas. También se prevén hélices parciales.

El transportador vibratorio puede estar hecho de acero inoxidable. En una forma de realización, el transportador vibratorio puede estar hecho de acero inoxidable 316, o acero inoxidable 304 o acero inoxidable 316L. Se pueden usar otros materiales.

Por tanto, el transportador vibratorio se puede usar para aplicar bacteriófagos u otros recubrimientos al alimento. El alimento se puede introducir en un extremo del transportador. La vibración del lecho del transportador produce que el alimento se fluidifique y, al mismo tiempo, el alimento se mueve hacia adelante a través del transportador. El flujo continuo del alimento en el transportador y el flujo continuo de alimento fuera del transportador se pueden ajustar de modo que los flujos estén equilibrados por masas y en estado estacionario, y la cantidad de alimento en cualquier momento dentro de la mezcladora sea aproximadamente constante. Un transportador vibratorio adecuado se puede obtener, por ejemplo, de Carrier Vibrating Equipment de Louisville, Kentucky, EE UU, y Carman Industries de Jeffersonville, Indiana, EE UU.

El transportador vibratorio se puede operar para ajustar propiedades particulares de las partículas que se transportan a través del transportador vibratorio. En una forma de realización, se puede afectar el número de aceleración adimensional de las partículas. En operación, el número de aceleración adimensional es la proporción de la aceleración hacia arriba de las partículas debida a la vibración del lecho del transportador dividida por la aceleración hacia abajo debido a la gravedad. El número de aceleración adimensional se puede expresar como el producto de la

frecuencia de vibración al cuadrado por la amplitud vertical de la vibración dividida por la constante gravitacional. Por tanto, la ecuación para el número de aceleración adimensional se puede representar como sigue: $\omega^2 a/g$, donde “ ω ” es la frecuencia de vibración, “a” es la amplitud vertical de la vibración, y “g” es la constante gravitacional.

5 En una forma de realización, el transportador se puede operar de modo que el número de aceleración adimensional puede ser mayor de aproximadamente 0,3. En una forma de realización, el transportador se puede operar de modo que el número de aceleración adimensional puede ser mayor de aproximadamente 1. En una forma de realización, el transportador se puede operar de modo que el número de aceleración adimensional puede estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2, o desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1,5, o desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5, o desde aproximadamente 1 hasta 4.

10 En una forma de realización, el transportador se puede operar de modo que la amplitud vertical media de vibración puede ser mayor de aproximadamente 3 mm. En una forma de realización, el transportador se puede operar de modo que la amplitud vertical media de vibración puede ser entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 20 mm, o entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 20 mm, o de aproximadamente 7 mm hasta aproximadamente 15 mm. Una amplitud vertical de vibración mayor produce que las partículas en la capa inferior de flujo circulen hacia arriba en el flujo del material de recubrimiento que se aplica a las partículas. Esta circulación ayuda a proporcionar un recubrimiento más uniforme de las partículas.

15 Como se usa en el presente documento, la profundidad del lecho se define como la distancia entre la parte superior del lecho de partículas en el transportador hasta el fondo del lecho. En el caso de un transportador vibratorio que usa un dispositivo de transporte de tipo depresión, el fondo del lecho se medirá en el punto más profundo en la depresión. En una forma de realización, la profundidad del lecho puede ser desde aproximadamente 0,5 cm hasta aproximadamente 15 cm, o desde aproximadamente 3,5 cm hasta aproximadamente 12 cm, o desde aproximadamente 5 cm hasta aproximadamente 10 cm.

20 En una forma de realización, según aumenta la profundidad del lecho de partículas que fluyen a través del transportador, la amplitud puede aumentar también para ayudar a proporcionar recubrimiento más homogéneo de las partículas. Por tanto, en una forma de realización, la proporción de la amplitud vertical de vibración respecto a la profundidad del lecho puede ser entre aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1. En una forma de realización, la proporción de la amplitud vertical media de vibración respecto a la profundidad del lecho puede ser entre aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5, o desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,3, o aproximadamente 0,2. Sin estar limitado por la teoría, se piensa que mantener esta proporción puede llevar a mejor mezclado y recubrimiento de las partículas.

25 En una forma de realización, la frecuencia de vibración puede ser desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 Hz. En una forma de realización, la frecuencia de vibración puede ser desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 Hz, o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 Hz, o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 Hz o aproximadamente 5 Hz, o desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 Hz o aproximadamente 10 Hz.

30 En una forma de realización, el transportador vibratorio se puede operar de modo que la proporción de la amplitud de la vibración vertical respecto al ESD del alimento puede ser desde aproximadamente 0,5:1 hasta aproximadamente 3:1, o desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 2:1, o desde aproximadamente 1,5:1 de modo que la operación del transportador vibratorio mueve el alimento desde la entrada a la salida del transportador vibratorio.

35 Puede ser deseable que el flujo del material central a través del transportador vibratorio sea sustancialmente flujo de pistón. El flujo de pistón se define como la minimización del mezclado axial. El mezclado axial se define como la tendencia de una alícuota de materiales centrales a expandirse lejos uno de otro en la dirección del flujo de la masa del material central. Cuando el flujo del material central es sustancialmente flujo de pistón, diferentes partículas están cada una en el transportador vibratorio durante aproximadamente la misma cantidad de tiempo. Con mezclado axial creciente, los tiempos que partículas están en el transportador vibratorio pueden variar de alguna manera, posiblemente produciendo recubrimiento más desigual de una partícula a otra. La cantidad de mezclado axial en un transportador vibratorio se puede calcular según el método descrito en “Chemical Reaction Engineering” 3ª edición de Levenspiel. El número de Peclet es una medida de la cantidad de mezclado axial y el grado de flujo de pistón. El número de Peclet es un número adimensional que es la proporción del flujo global de las partículas respecto al mezclado axial a lo largo de la longitud del transportador vibratorio en la dirección del flujo de las partículas. Cuanto mayor sea el número de Peclet, mejor es el flujo de pistón. Números de Peclet mayores pueden producir recubrimiento más uniforme de las partículas. En una forma de realización, el transportador vibratorio se puede operar de modo que el número de Peclet sea mayor de aproximadamente 6. En una forma de realización, el transportador vibratorio se puede operar de modo que el número de Peclet sea mayor de aproximadamente 100. En una forma de realización, el transportador vibratorio se puede operar de modo que el número de Peclet sea mayor de aproximadamente 1000. En una forma de realización, el transportador vibratorio se puede operar de modo que el número de Peclet sea mayor de aproximadamente 10000.

40 En algunas formas de realización, el tamaño de las gotitas de solución que contiene bacteriófago aplicada al alimento está controlada. Por ejemplo, el bacteriófago se puede recubrir por rociado sobre el alimento por nebulización de niebla

o aplicación de aerosol, más que otros métodos de rociado con tamaños de gotitas mayores o menos regulares. Los tamaños de gotitas más pequeños pueden ayudar a dispersar el bacteriófago a través de la superficie del alimento. En algunas formas de realización, se usan nebulización de niebla o aplicación de aerosol en un puerto en un transportador vibratorio u otro aparato de recubrimiento o recubrimiento/mezclado.

En algunas formas de realización, el alimento se calienta antes de la aplicación del bacteriófago. El alimento se puede calentar, por ejemplo, a 100-120°F, o 105-110°F. En algunas formas de realización, el alimento se calienta en un paso de procesamiento anterior, tal como cocción por extrusión, y está aún templado durante la aplicación del bacteriófago. En algunas formas de realización, el alimento no se calienta, o está a temperatura ambiente, durante la aplicación del bacteriófago.

En algunas formas de realización, la solución de recubrimiento de bacteriófago (es decir, antes de la aplicación al alimento) puede tener un pH entre 2 y 12, o entre 5 y 7. En algunas formas de realización, una capa de recubrimiento que comprende un bacteriófago (por ejemplo, después de que el recubrimiento se seque o endurezca sobre el alimento) puede tener un pH entre 2 y 10, o entre 4,0 y 6,5, o entre 2 y 6,5, o entre 4 y 10. Para mantener este pH, puede ser deseable añadir aditivos de bajo pH al alimento mismo más que en una capa de recubrimiento (por ejemplo, como parte de la masa o mezcla en un alimento procesado), o a una capa de recubrimiento que no incluye un bacteriófago. Los aditivos de bajo pH ejemplares incluyen ácidos y algunos digeridos de proteína, como se pueden usar como conservantes o palatantes. Los aditivos de bajo pH ejemplares específicos incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, ácido sórbico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido ascórbico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, o combinaciones de los mismos.

En algunas formas de realización, la solución de recubrimiento que comprende un bacteriófago puede comprender además compuestos cargados positivamente, tal como triptófano, lisina, o ciertos cationes divalentes (por ejemplo, calcio, magnesio), o combinaciones de los mismos. Las bacterias tienden a estar negativamente cargadas, de modo que añadir elementos cargados positivamente a la solución de recubrimiento de bacteriófago puede ayudar a asociar las partículas de bacteriófagos con bacterias huéspedes cercanas. En algunas formas de realización, la solución de recubrimiento que comprende un bacteriófago puede comprender además una fuente de nutrición para la bacteria diana, tal como hidrato de carbono (por ejemplo, monosacáridos), nucleótidos (por ejemplo, purinas, pirimidina), cofactor de polimerasa (por ejemplo, manganeso), o combinaciones de las mismas. Puede ser útil para una bacteria infectada con una partícula de bacteriófago tener recursos adecuados para replicar muchas partículas de bacteriófago antes de que la bacteria se lise y muera. De esta manera, el número de bacteriófagos disponibles para interceptar bacterias potencialmente dañinas puede aumentar en cada interacción bacteriófago-bacteria. A este respecto, el cofactor de polimerasa y los nucleótidos pueden ser particularmente útiles, ya que estos son nutrientes que se requieren específicamente para que la bacteria huésped fabrique nuevas partículas de fago.

Los bacteriófagos adecuados se pueden seleccionar basado en el alimento y las bacterias patógenas de interés. Por ejemplo, para croqueta de pienso para mascotas, *Salmonella* es una preocupación particular. *Salmonella* es común en pollo y harina de pollo, que son ingredientes comunes en croqueta de pienso para mascotas seco o semihúmedo. *Salmonella* típicamente se destruye durante la producción del pienso, pero debido a que con frecuencia los materiales manejados en la planta contienen *Salmonella*, hay un riesgo crónico de contaminar producto acabado. Incluso números minúsculos de bacterias *Salmonella* pueden ser problemáticos, ya que los alimentos ricos en nutrientes, tal como croqueta de pienso para mascotas, pueden ser hospitalario para el crecimiento bacteriano. Los bacteriófagos ejemplares que son líticos para ciertas especies o cepas de *Salmonella* (u otras bacterias) incluyen las descritas en la patente en EE UU No. 7.674.467; patente en EE UU No. 7.211.426; patente en EE UU No. 7.951.575; patente en EE UU No. 8.021.657; y la publicación de la solicitud de patente en EE UU No. 2010/0166709. Otros bacteriófago y su(s) bacteria o bacterias diana se conocen en la bibliografía y las puede seleccionar para un alimento y bacterias diana específicos un experto en la materia.

En algunas formas de realización, los bacteriófagos son o incluyen bacteriófagos de las familias Siphoviridae, Podoviridae o Myoviridae o combinaciones de las mismas. Los bacteriófagos pueden ser de tipo salvaje o genéticamente modificados o combinaciones de los mismos. Los bacteriófagos pueden ser infectivos y líticos o letales de otra manera con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias del género *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter* o combinaciones de las mismas.

El alimento puede ser cualquier alimento que sea susceptible a la colonización por bacterias indeseables. El alimento puede ser un alimento crudo, tal como frutas o verduras frescas, o un alimento procesado, tal como galletas, bizcochos, galletas saladas, pan, o pienso para mascotas. El alimento puede ser poroso. Los recubrimientos y métodos descritos en el presente documento son particularmente, pero no exclusivamente, útiles con alimentos porosos porque los alimentos porosos pueden ser incompatibles con ciertos otros tipos de procesos de recubrimiento, tal como sumergir o bañar. El alimento puede ser extruido. En una forma de realización específica, no limitante, el alimento es un pienso para mascotas extruido, poroso. El pienso para mascotas puede ser completo y nutricionalmente equilibrado, o el pienso para mascotas puede ser un suplemento o premio, tal como un bizcocho, galleta, chuchería, golosina comestible, o similares. El pienso para mascotas puede ser seco o semihúmedo. El alimento puede ser adecuado para consumo humano, o consumo de animales no humanos, o consumo de mascotas, o adecuado para cualquier animal. El alimento puede estar destinado para procesamiento adicional o la aplicación de un recubrimiento de bacteriófago

puede ser la etapa final de procesamiento (excluyendo los posibles envío o manejo adicionales) antes de que el alimento se venda y/o consuma. El alimento puede comprender una variedad de otros recubrimiento o ingredientes de recubrimiento incluyendo, pero no limitado a, palatantes secos o líquidos, grasas, azúcares, sal o alternativas a la sal, probióticos, prebióticos, vitaminas (particularmente, pero no exclusivamente, vitaminas A, C, D o E), minerales, miméticos de restricción calórica (tal como manoheptulosa), l-carnitina, ácido alfa-lipoico, polifenoles, catequinas, carotenoides, aromáticos, conservantes naturales o artificiales, ácidos, aminoácidos, proteínas, digeridos (tal como de fuentes de proteína animal), medicamentos, colorantes, ácidos grasos omega 3 (particularmente, pero no exclusivamente, ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA)) y similares, o combinaciones de los mismos. Otros recubrimientos o ingredientes de recubrimientos se pueden aislar de los bacteriófagos o capa de recubrimiento de bacteriófago, como se ha descrito anteriormente.

Los siguientes ejemplos ilustran algunos aspectos de la invención.

Ejemplo 1

Se midieron por separado grasa, un palatante (digerido de proteína animal) y un compuesto de prueba en una mezcladora de alta cizalla/bomba SILVERSON y se combinaron en una solución de recubrimiento. Hubo cuatro patas en el estudio, cada una con un compuesto de prueba diferente:

- Pata 1: Agua sin fago aplicada al 2% de la croqueta, en peso de agua respecto al peso de la croqueta.
- Pata 2: Una mezcla de bacteriófago en una dilución 1:100 aplicada al 2% de la croqueta, en peso de agua respecto al peso de la croqueta.
- Pata 3: La misma mezcla de bacteriófagos en una dilución 1:10 aplicada al 2% de la croqueta, en peso de agua respecto al peso de la croqueta.
- Pata 4: La misma mezcla de bacteriófagos en una dilución 1:10 aplicada al 1% de la croqueta, en peso de agua respecto al peso de la croqueta.

En cada pata, la potencia inicial de la solución de fago era aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de placa (ufp)/ml de solución. La solución de recubrimiento se transfirió a un sistema de revestimiento APEC, y se aplicó a croqueta de pienso para mascotas cocido por extrusión. Después del recubrimiento, una muestra de 375 gramos de croqueta se inoculó con aproximadamente 25 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de bacterias del género *Salmonella*. Ninguna de las cuatro patas mostró una reducción significativa en la exposición a especies de *Salmonella*, medido por un sistema de identificación MicroSEQ™ según las instrucciones del fabricante. Sin embargo, se recuperaron fases viables de las muestras de las patas 2-4, lo que indica que estaban presentes fagos viables en la croqueta recubierta. Sin querer estar unido por teoría, se hipotetizó que el soporte de grasa y palatante estaba actuando como una barrera física entre los bacteriófagos aplicados y los organismos de exposición.

Ejemplo 2

Se colocó croqueta cocida por extrusión del mismo tipo que en ejemplo 1 en una recubridora de bandeja. En algunos casos, la croqueta se bañó en recubrimiento que contenía grasa, y en algunos casos la croqueta estaba sin bañar (o sin recubrir). La croqueta, incluso si se había bañado previamente, se llevó a la temperatura habitual de baño de 105-110°F y, si era aplicable, se bañó con un recubrimiento de grasa y digerido. La grasa y el digerido eran los mismos que en el ejemplo 1.

Después de bañar, la croqueta se roció con una solución como sigue:

Pata 1: La croqueta previamente bañada se recubrió por rociado con el 2% de agua con ósmosis inversa y desionizada (rodi) y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 5 minutos (condición control)

Pata 2: La croqueta previamente bañada se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 10 minutos.

Pata 3: La croqueta previamente bañada se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 13 segundos.

Pata 4: La croqueta no bañada se bañó con grasa y digerido, se roció con agua rodi al 2%, y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 7 minutos (CONTROL).

Pata 5: La croqueta no bañada se bañó con grasa y digerido, se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 30 segundos, se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 10 minutos.

Pata 6: La croqueta no bañada se bañó con grasa y digerido, se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 30 segundos, se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se muestreó inmediatamente (sin girar adicionalmente después de la aplicación del fago).

Pata 7: La croqueta no bañada se bañó con grasa y digerido, se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 5 minutos, se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 10 minutos.

Pata 8: La croqueta no bañada se bañó con grasa y digerido, se hizo girar en una recubridora de bandeja durante 5 minutos, se recubrió por rociado con el 2% de una solución de fago al 10% y se muestreó inmediatamente (sin girar adicionalmente después de la aplicación del fago).

Pata 9: Un control de laboratorio, en el que 375 g de croqueta se trató con 10,5 ml de solución de fago sin diluir.

Se tomó una muestra de 375 g de croqueta de cada pata, y se mezcló con 25 ufc de *Salmonella* por gramo de croqueta. Una muestra de 25 g de la croqueta tratada con *Salmonella* de cada pata se incubó en 225 ml de agua peptona tamponada (BPW) durante 20 horas a 33°C. Muestras del medio de crecimiento se sometieron después a enumeración cuantitativa. Los resultados se muestran en la figura 2 y se expresan como la recuperación logarítmica media de *Salmonella* por gramo de croqueta después del enriquecimiento.

Sorprendentemente, cuando se comparó con los resultados del ejemplo 1, la enumeración cuantitativa mostró una reducción mayor de 3 log en ufc de *Salmonella* cuando el fago se aplica como se describe en las patas 2-8 comparado con la condición control de la pata 1. La pata 4 también se diseñó para que fuera una condición control. Después de preparar la croqueta de la pata 3, y antes de preparar la croqueta de la pata 4, el equipo de producción se limpió con SurpHase pHresh (pH<1) y alcohol al 70%. Un utensilio pequeño se pasó por alto durante esta etapa de limpieza entre patas experimentales. Se cree que la reducción en *Salmonella* en la pata 4 es atribuible a la transferencia del fago residual en este pequeño utensilio a la croqueta en la pata 4.

Ejemplo 3

Se alimentó croqueta de pienso para mascotas no bañado, a temperatura ambiente en un transportador vibratorio adaptado para uso como un aparato de recubrimiento como se describe en la solicitud de patente en EE UU No. 13/349.816, presentada el 13 de enero, 2012. Se aplicó grasa a través de dos puertos, se aplicó digerido en un tercer puerto, y se aplicó bacteriófago en un cuarto puerto, produciendo un recubrimiento estratificado de grasa, digerido, y bacteriófago. La croqueta recubierta se mezcló y se frotó mediante la vibración del transportador durante aproximadamente dos vueltas (aproximadamente 30 segundos de girado). Se recogieron muestras de croqueta, se inocularon con *Salmonella*, y se enriquecieron como en el ejemplo 2. Se corrieron tres patas:

Pata 1: Se aplicó agua (sin fagos) al 2% del peso de la croqueta.

Pata 2: Se aplicó bacteriófago, 1×10^9 fagos por ml de solución al 2% del peso de la croqueta.

Pata 3: Se aplicó bacteriófago, 1×10^9 fagos por ml de solución al 1% del peso de la croqueta.

Comparada con la pata 1, la pata 2 mostró una reducción 4,01 log en *Salmonella* después del enriquecimiento, y la pata 3 mostró una reducción 2,96 log en *Salmonella* después del enriquecimiento. También se tomó una muestra 5 minutos después de que la aplicación del fago a través del cuarto punto se interrumpiera, y se recuperó fago activo de esas muestras. Además, las muestras tomadas 5 minutos después de que la aplicación del fago se interrumpiera se sometieron a exposición a *Salmonella* y enriquecimiento, y mostró una reducción 1,67 log relativa a la pata 1. Esta observación apoya la hipótesis de que los resultados de la enumeración cuantitativa de la pata 4 del ejemplo 2 se pueden atribuir a fago residual en un instrumento del procesamiento. Esta observación también muestra que concentraciones relativamente bajas de bacteriófago aplicado todavía pueden ser útiles en controlar la carga bacteriana en alimentos. El fago recuperable en la pata 2 fue aproximadamente 4,5 log ufp/g de croqueta recubierta. El fago recuperable en la pata 3 fue aproximadamente 4,0 log ufp/g de croqueta recubierta. El fago recuperable en las muestras tomadas 5 minutos después de la aplicación del fago se interrumpiera era aproximadamente 1,0 log ufp/g de croqueta recubierta.

Las dimensiones y valores divulgados en el presente documento no se deben entender como que están estrictamente limitadas a los valores numéricos exactos enumerados. Más bien, a menos que se especifique de otra manera, se pretende que cada una de tales dimensiones signifique tanto el valor enumerado como un intervalo funcionalmente equivalente que rodea ese valor. Por ejemplo, una dimensión divulgada como "40 mm" se pretende que signifique "aproximadamente 40 mm".

REIVINDICACIONES

1. Un alimento tratado con un bacteriófago, el alimento tratado comprende:
 - 5 un producto alimenticio;
 - una primera capa de recubrimiento grasa o cérea sobre el producto alimenticio; y
 - una segunda capa de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófago,

en donde la capa de recubrimiento grasa o cérea es distinta de la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago,

10 en donde la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago es la capa de recubrimiento más externa sobre el alimento.
2. El alimento de la reivindicación 1, en donde el alimento comprende una tercera capa de recubrimiento, la tercera capa de recubrimiento comprende una o más cepas de bacteriófago.
3. El alimento de la reivindicación 2, en donde la segunda capa de recubrimiento es la más cercana a la superficie del alimento, la primera capa de recubrimiento grasa o cérea, está dispuesta encima de la segunda capa de recubrimiento, y la tercera capa de recubrimiento está dispuesta encima de la primera capa de recubrimiento.
4. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alimento es un pienso para mascotas.
5. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos una o más de las cepas de bacteriófago es de la familia *Siphoviridae*, *Podoviridae* o *Myoviridae*.
6. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos una de la una o más cepas de bacteriófago es infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias de un género seleccionado del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter* y combinaciones de las mismas.
7. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos una de la una o más de las cepas de bacteriófago es de la familia *Myoviridae* y es infectiva y dañina con respecto a al menos una especie o cepa de bacterias *Salmonella*.
8. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago tiene un pH entre 2 y 10.
9. El alimento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alimento comprende una capa de recubrimiento que comprende digerido animal o un ácido, y el digerido animal o ácido no está en la capa de recubrimiento que comprende la una o más cepas de bacteriófago.
10. Un método para aplicar bacteriófago a un alimento, el método comprende:
 - 45 proporcionar un alimento;
 - proporcionar una solución de recubrimiento que comprende una o más cepas de bacteriófago;
 - aplicar una capa de recubrimiento hidrofóbica, grasa o cérea antes de poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento; y
 - posteriormente poner en contacto la solución de recubrimiento con el alimento para crear una superficie de alimento recubierta; y frotar la superficie de alimento recubierta para distribuir las cepas de bacteriófago a través de la superficie de alimento recubierta.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el frotado se realiza mezclando una pluralidad de piezas de alimento recubierto de modo que las superficies de alimento recubiertas se frotran entre sí.
12. El método de la reivindicación 10, en donde poner en contacto y/o el frotado se realiza en un transportador vibratorio.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el transportador vibratorio se opera para proporcionar un número de aceleración adimensional mayor de aproximadamente 0,3, una amplitud vertical media de vibración entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 20 mm, y un número de Peclet mayor de aproximadamente 100.

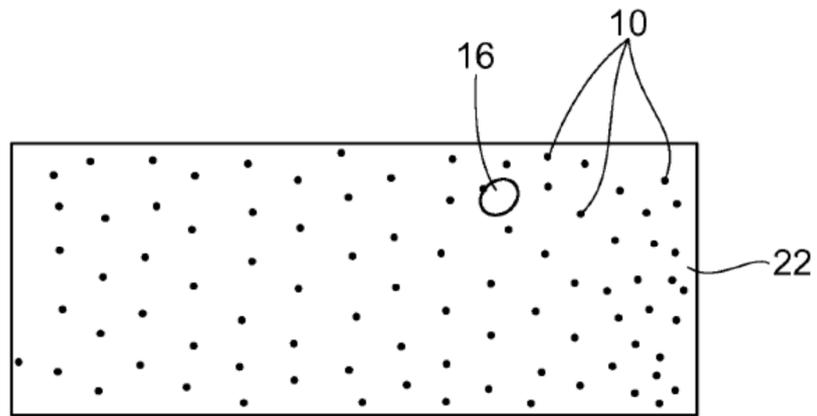


Fig. 1A

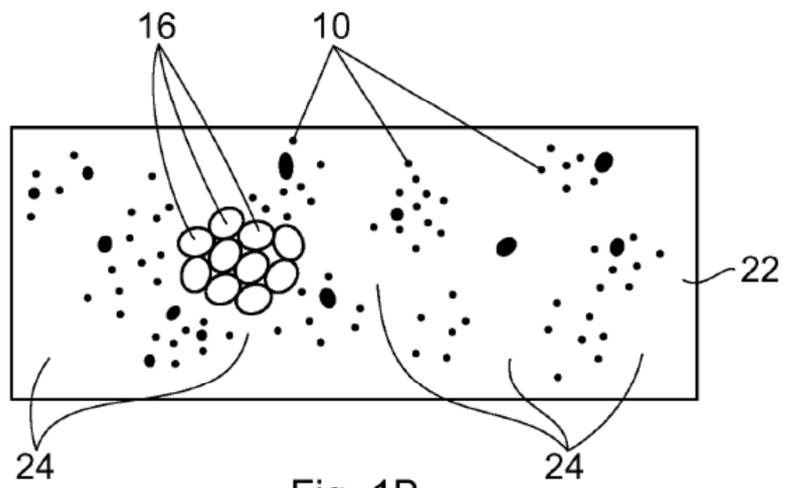


Fig. 1B

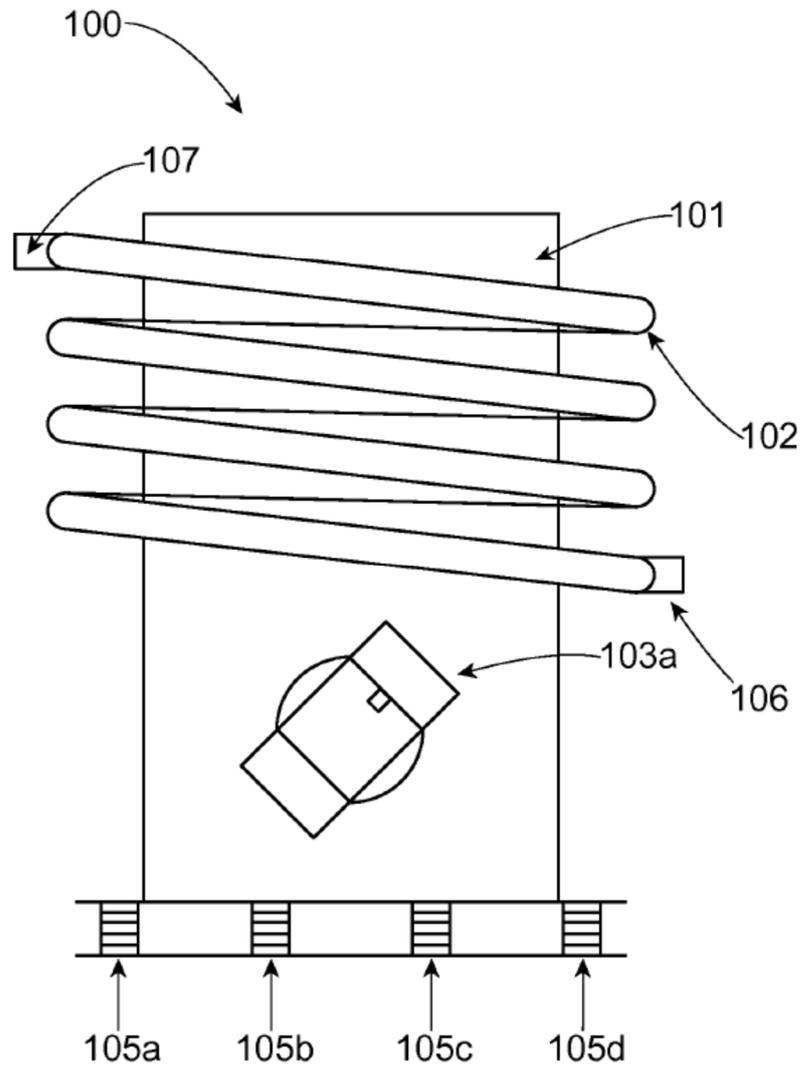


Fig. 2

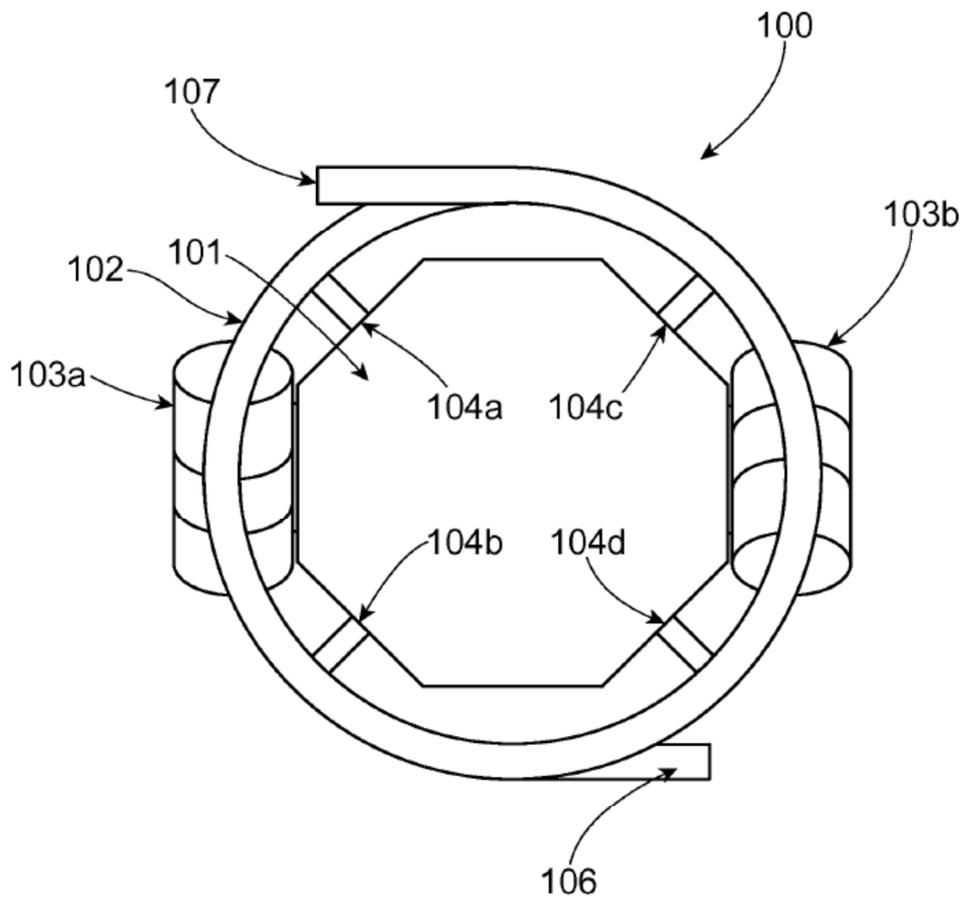


Fig. 3