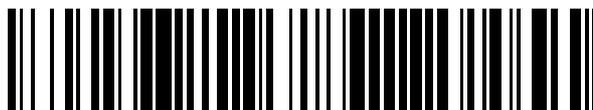


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 097**

51 Int. Cl.:  
**A01N 37/36** (2006.01)  
**A01N 63/02** (2006.01)  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**A01N 37/46** (2006.01)  
**A01N 43/16** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08804295 .7**  
96 Fecha de presentación: **17.09.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2200433**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **NUEVO AGENTE ANTIBACTERIANO BASADO EN ÉSTERES DE ÁCIDO GRASO DE ÁCIDOS HIDROXICARBOXÍLICOS.**

30 Prioridad:  
**17.09.2007 EP 07116552**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.12.2011**

73 Titular/es:  
**PURAC BIOCHEM BV**  
**ARKELSEDIJK 46**  
**4206 AC GORINCHEM, NL**

72 Inventor/es:  
**KREMER, Diderik Reinder;**  
**RAMIREZ, Aldana Mariel y**  
**OTTO, Roel**

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 370 097 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

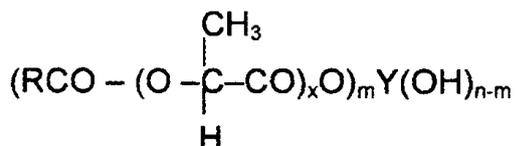
Nuevo agente antibacteriano basado en ésteres de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos

5 [0001] La presente invención se refiere a una composición antibacteriana basada en éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico y a su uso como agente antibacteriano contra las bacterias gram-negativas en varios productos y aplicaciones. La presente invención se refiere además a productos y, en particular, a productos alimenticios que comprenden dicho agente antibacteriano.

10 [0002] Los ésteres de ácido graso de la presente invención comprenden éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico tal como, por ejemplo, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido glucónico y ácido tartárico donde dicho ácido hidroxicarboxílico también puede estar en una forma de sal o de éster. Además, el ácido hidroxicarboxílico puede comprender uno o más monómeros de ácido polimerizados, como es el caso, por ejemplo, en los lactilatos.

15 [0003] La mayoría de estos ésteres de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos se aplican como emulsionante. Por ejemplo, los ésteres de ácido graso de ácido láctico, también referido como lactilatos y lactilatos de acilo, son bien conocidos por su efecto emulsionante. Comúnmente son aplicados en la industria panadera.

[0004] Algunos de los lactilatos de interés son descritos en US 3.275.503, EP 0572271 y EP 1000542 y se representan con la fórmula general:



20 donde RCO es un radical de acilo de un ácido graso con 4 a 12 átomos de carbono, Y es un catión seleccionado de hidrógeno, metal alcalino, metal alcalinotérreo, zinc, plata, amonio o amonio sustituido con uno o más C1-C3 alquilo o grupos hidroxialquilo de; n representa el valor del catión y m es un número entero de 1 a n, x es un número de 1 a 6 y preferiblemente 1 a 3.

25 [0005] Los lactilatos descritos en US 3.275.503 tienen un grupo de acilo RCO con 8 a 12 átomos de carbono y se describe que inhiben el crecimiento y el desarrollo de moho por levaduras y hongos originados de, por ejemplo, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichophyton* y *Saccaromyces*. Los lactilatos en cuestión también muestra alguna actividad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus* y *Bacillus mesentericus*, que son bacterias gram-positivas.

[0006] Los lactilatos descritos en EP 0572271 tienen un grupo de acilo RCO con 4 a 7 átomos de carbono y tienen alguna actividad antibacteriana contra la *Pseudomonas cepacia*, que es una bacteria gram-negativa.

30 [0007] EP 1000542 describe la sal de sodio de capril-lactil-lactilato con alguna actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, que es una bacteria gram-positiva y contra *Candida albicans*, que es un hongo.

[0008] No obstante, no se sabe que los lactilatos, y más en particular los lactilatos de la fórmula anterior con un grupo de acilo RCO con 8 a 12 átomos de carbono, sean eficaces contra las bacterias gram-negativas tal como por ejemplo *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*. Por lo tanto, los mismos tampoco son usados como agentes antibacterianos. De hecho, su estado regulador es su uso como agente emulsionante solamente.

35 [0009] El mismo se aplica a ésteres de ácido graso de otros ácidos hidroxicarboxílicos tal como, por ejemplo, los ésteres de ácido graso de ácido cítrico, ácido málico y ácido tartárico. Estos ésteres son usados principalmente como emulsionantes en diferentes tipos de productos y no para fines antibacterianos.

40 [0010] La presente invención proporciona una solución para superar la falta de eficiencia mencionada anteriormente contra bacterias gram-negativas. La presente invención proporciona un medio para hacer el grupo de ésteres de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos según se describió anteriormente significativamente más activo contra las bacterias gram-negativas, haciéndolos así muy útiles como agentes antibacterianos para su aplicación en una amplia variedad de alimentos, bebidas y otros productos tal como, por ejemplo, en aplicaciones de pienso, en detergentes y productos cosméticos.

45 [0011] Aquí, la presente invención se refiere a una composición antibacteriana que comprende una combinación de éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico y/o la sal y/o el éster de dicho ácido hidroxicarboxílico con uno o más agentes antibacterianos seleccionado de polilisina y sus sales.

[0012] Se ha detectado que los agentes antibacterianos mencionados anteriormente simplemente no mejoran la actividad de ésteres de ácido graso de ácidos hidroxicarboxílicos por la cual dicho efecto de aumento es la suma de las actividades individuales del éster de ácido graso actúan en sinergia dando como resultado una actividad antibacteriana que es significativamente superior a la suma de las actividades de los componentes individuales de la composición antibacteriana. Debido a esta sinergia, el éster de ácido graso de la presente invención puede ser usado muy eficazmente como agente antimicrobiano en una composición que comprende polilisina, sus sales o cualquier combinación de las mismas.

[0013] La polilisina es conocida por ejercer una actividad antibacteriana contra las bacterias gram-negativas. Tanto la  $\alpha$ -polilisina como la  $\epsilon$ -polilisina tienen actividad antibacteriana aunque la última en medida significativamente superior como se describe por Shima et al. (Nov. 1984). El artículo describe que la  $\epsilon$ -polilisina puede utilizarse eficazmente contra bacterias gram-negativas y gram-positivas tal como, por ejemplo, Escherichia coli en concentraciones de aproximadamente 1 ~ 8 microgramos por ml.

[0014] Hiraki et al. (2000) describen combinaciones de  $\epsilon$ -polilisina con agentes antibacterianos tal como glicina, ácido acético/vinagre, etanol o tiamina laurilsulfonato. No obstante, no se hace ninguna mención a una composición en la cual la polilisina se combine con éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico eficaz como agente antibacteriano contra las bacterias gram-negativas.

[0015] JP 2000-270821, JP 7-135943, JP 4-8273 describen composiciones que comprenden  $\epsilon$ -polilisina en combinación con ésteres de ácido graso con glicerol, protaminas, etanol, glicina y/o ácidos hidroxicarboxílicos y sus sales. Se describe que las composiciones mencionadas anteriormente son eficaces contra las levaduras, los hongos y bacterias putrefactivas o de alteración de alimentos como Candida y Luconostoc. La combinación específica de polilisina y/o sales de la presente con éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico, no obstante, no es descrita.

[0016] En una forma de realización, se usa una mezcla de polilisina o un derivado de sal con protamina o un derivado de sal.

[0017] La protamina también es un agente antibacteriano comúnmente aplicado. Muchas solicitudes de patente japonesas describen composiciones antibacterianas que comprenden combinaciones de protamina con otros componentes antibacterianos tales como, por ejemplo, glicéridos, ácidos hidroxicarboxílicos y/o sus sales, aminoácidos, polilisina, etanol, etcétera. No obstante, no se hace ninguna mención de la combinación específica de protamina y/o sales de la misma con éster de ácido graso de ácido hidroxicarboxílico.

[0018] Las combinaciones mencionadas anteriormente de éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico y/o su sal con polilisina en su forma libre y/o en su forma de sal y/o cualquier combinación con protamina en su forma libre o en su forma de sal por tanto no han sido descritas antes. Tampoco se ha reconocido antes la actividad antibacteriana sinérgica de dicha combinación contra las bacterias gram-negativas. La presente invención se refiere al uso de dicho éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico (y/o una sal del mismo) como agente antimicrobiano en una composición que comprende polilisina (y/o una sal de la misma), opcionalmente en cualquier combinación con protamina y/o una sal de ésta.

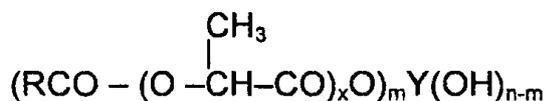
[0019] El éster de ácido graso según se usa en la composición antibacteriana de la presente invención es un éster de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico y/o una sal de éste. Como el experto en la técnica sabe, tal éster puede obtenerse por medio, por ejemplo, de una esterificación o un proceso enzimático. Como se sabe, muchos procesos para la producción de ésteres de ácido graso suponen una mezcla de ésteres de ácido graso por la cual dicha mezcla es, por ejemplo, una mezcla de ésteres de ácido graso de diferentes colas de ácido graso o de diferentes colas de éster. Un ácido graso específico en su forma pura se puede obtener de esta mezcla a través de diferentes medios que son bien conocidos por el experto en la técnica.

[0020] El ácido graso reactivo puede ser un ácido graso saturado o insaturado que comprenda 4 a 18 y preferiblemente 8 a 18 átomos de carbono. Ejemplos no limitativos de éste son ácido butírico (es decir, ácido butanoico (C4)), ácido caproico (es decir, hexanoico (C6)), ácido mirístico (es decir, ácido tetradecanoico (C14)), ácido esteárico (es decir, ácido octadecanoico (C18)), ácido miristoleico (C14) y/o ácido oleico (C18).

[0021] El ácido hidroxicarboxílico puede comprender un monómero de ácido hidroxicarboxílico o diferentes monómeros de ácido hidroxicarboxílico enlazados entre sí por enlaces polimerizados. Dicho monómero de ácido hidroxicarboxílico puede comprender 1 a 6 átomos de carbono tal como, por ejemplo, el monómero de ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico y glucónico. Además, las sales y/o ésteres de dicho ácido hidroxicarboxílico también son muy adecuados para la composición antibacteriana según la presente invención.

[0022] En una forma de realización preferida de la presente invención, la composición antibacteriana comprende éster de ácido graso de ácido láctico y/o la sal de ácido láctico, también denominados lactilatos.

[0023] Los lactilatos de la presente invención tienen la siguiente fórmula:



donde RCO es un radical acilo de un ácido graso con 4 a 18 átomos de carbono, y preferiblemente 8 a 18 átomos de carbono, Y es un catión seleccionado de hidrógeno, metal alcalino, metal alcalinotérreo, zinc, hierro, amonio y amonio sustituido con uno o más C1-C3 alquilo o grupos hidroxilalquilo; n representa el valor del catión y m es un número entero de 1 a n; x representa el número de unidades de monómero y tiene un valor de 1 a 6 y preferiblemente de 1 a 3.

[0024] Los componentes donde x es por ejemplo 1 son denominados monolactilatos (es decir, que comprende sólo 1 molécula de ácido láctico) y donde x es 2 son llamados dilactilatos (que comprenden 2 moléculas de ácido láctico polimerizado/esterificados). Los componentes del lactilato se obtienen frecuentemente como mezclas de, por ejemplo, una mezcla de monolactilatos predominantemente y que además comprenden dilactilatos debido a la manera en que los mismos son preparados. También es muy posible que los también lactilatos polimerizados superiores estén presentes en la mezcla. Los parámetros x, m y n, como se han descrito anteriormente, por lo tanto presentan números medios.

[0025] Los lactilatos se pueden obtener en sus forma pura (p. ej. sólo la mono-forma) mediante por ejemplo separación cromatográfica o por cualquier otro medio conocido por el experto en la técnica.

[0026] Resultados buenos fueron obtenidos con mezclas predominantemente con mono- y/o di-lactilato ésteres de ácido octanoico (C8), o ácido decanoico (C10), o ácido dodecanoico (C12) o ácido tetradecanoico (C14), o ácido palmítico (C16), o ácido oleico (C18:1) y el sodio, potasio y sales de calcio de esto.

[0027] La sal cálcica de un éster mono-lactilato de, por ejemplo, ácido octanoico se representa mediante la fórmula anterior donde RCO es el radical acilo de ácido octanoico, x es 1, Y es calcio y así n que representa el valor del catión es 2, y el parámetro final m puede ser 1 (es decir, la sal de hidróxido cálcico) pero es preferiblemente 2.

[0028] Se ha observado que también ésteres de ácido láctico se pueden utilizar para formar ésteres de ácido graso, que luego se pueden utilizar en la composición antibacteriana de la presente invención. Así, el éster de ácido graso de un ácido graso tal como, por ejemplo, ácido octanoico o ácido dodecanoico con un éster de lactato tal como, por ejemplo, lactato de etilo funciona bien como agente antimicrobiano o antibacteriano en combinación con uno o más agentes antibacterianos tal como polilisina, y/o sales de ésta según la presente invención, opcionalmente en combinación con protamina y/o sales de ésta.

[0029] La polilisina puede estar presente como  $\epsilon$ -polilisina, como  $\alpha$ -polilisina o como una mezcla de las mismas. La  $\epsilon$ -polilisina es preferida puesto que tiene una actividad antibacteriana más alta contra las bacterias gram-negativas que las otras formas de polilisina y, por lo tanto, menos cantidades de este agente antibacteriano se necesitan en las aplicaciones. La  $\epsilon$ -polilisina es un homopolímero con 25 - 35 residuos de L-lisina. El nombre sistemático de  $\epsilon$ -polilisina es poly(imino(2-amino-1-oxo-1,6-hexanedil)). La fórmula empírica para el homopolímero de  $\epsilon$ -polilisina típico es C180H362N60O31 con un peso molecular de aproximadamente 4700 (30 residuos de L-lisina). El número de Servicio de Resumen Químico (CAS, por sus siglas en inglés) para la  $\epsilon$ -polilisina es 28211-04-3. Los ésteres de ácido graso de la presente invención también pueden ser combinados con una o más sales de polilisina. Un ejemplo de esto es la sal de un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc., o de un ácido orgánico tal como ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, etc. Aunque no hay diferencia sustancial en el efecto antibacteriano, polilisina es a veces preferiblemente usada en la forma libre debido a solubilidad limitada de la polilisina en la forma de sal.

[0030] La protamina, una pequeña proteína rica en arginina, también puede ser usada en su forma libre y en forma de una sal. La protamina adecuada es, por ejemplo, sulfato de protamina o hidrocloreuro de protamina.

[0031] Opcionalmente, la composición antibacteriana de la presente invención puede comprender además uno o más agentes quelantes metálicos. El agente quelante se puede seleccionar de, por ejemplo, a partir de ácido tetraacético de etilenodiamina (EDTA) y sales derivadas, ácido dietilenetriaminedipropiónico y sales derivadas, diferentes compuestos a base de fosfato tales como hexametáfosfato de sodio, pirofosfato de ácido de sodio y ácido polifosfórico, organofosfonato, compuestos quelantes tal como: ácido fítico, 1,1-ácido difosfónico, sideróforos y proteínas de unión a hierro tal como enterobacterina y lactoferrina, y ácidos hidroxycarboxílicos y/o sales derivadas tales como, por ejemplo, y no limitado a ácido succínico, ácido ascórbico, ácido glicólico, ácido benzoico, ácido sórbico, ácido octanoico, ácido adípico.

[0032] La composición antibacteriana de la presente invención puede preferiblemente comprender uno o más ácidos orgánicos y/o sus sales o ésteres seleccionados de ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido propiónico, ácido caproico y ácido fítico puesto que estos ácidos mejoran

aún más la actividad antibacteriana al tiempo que no afectan negativamente la calidad de los productos en los que se aplican en cuanto a, por ejemplo, sabor, textura, color y olor.

5 [0033] En una otra forma de realización preferida, la composición antibacteriana de la presente invención comprende además un éster de ácido graso a base de glicerol. Dicho éster de ácido graso de glicerol, también denominado glicérido, puede comprender un monoéster, un di-éster o un triéster de glicerol o mezclas de los mismos. Dichos glicéridos han sido observados para aumentar más el efecto antibacteriano contra las bacterias gram-negativas.

10 [0034] La presente invención además se refiere al uso de la composición antibacteriana de la presente invención como agente antibacteriano contra las bacterias gram-negativas. Se ha determinado que las composiciones antibacterianas de la presente invención en particular muestran una actividad (sinérgica) muy alta contra *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp* y *Campylobacter spp*. Por consiguiente, el éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico (y/o una sal de éster del mismo) puede ser usado eficazmente como agente antibacteriano en una composición según la presente invención contra bacterias gram-negativas y, en particular, contra *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp* y *Campylobacter spp*.

15 [0035] Las diferentes composiciones antibacterianas descritas de la presente invención son aplicables en una gran variedad de productos y aplicaciones, que varían de por ejemplo productos de valores de pH altos y bajos, productos diluidos y altamente concentrados, productos utilizables en el campo técnico (p. ej. en detergentes para uso industrial o doméstico), en el campo farmacéutico (p. ej. para limpieza/desinfección de equipamiento o en la preparación de composiciones farmacéuticas o su embalaje), en el cuidado personal (p. ej. en la producción de cosméticos, champús, cremas y lociones), en la industria de pienso (p. ej. para limpiar de equipamiento, en la producción, almacenamiento, manipulación y preparación de pienso para animales y productos de bebida) y en la industria de alimentos y bebidas.

20 [0036] La presente invención por consiguiente está relacionada con el uso de la composición antibacteriana de la presente invención para la reducción o la prevención de la presencia, el crecimiento o la actividad de bacterias gram-negativas, y en particular bacterias de la familia de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Campylobacter*, en o para la producción, la manipulación, el almacenamiento y la preparación de un producto alimenticio o bebida, un producto de pienso o bebida para animales, un producto cosmético o de cuidado personal, un producto de limpieza o un detergente.

30 [0037] Además, la presente invención se refiere al uso de éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico (y/o una sal de éster del mismo), en particular ésteres mono- y/o di-lactilato de ácido octanoico (C8), o ácido decanoico (C10), o ácido dodecanoico (C12) o ácido tetradecanoico (C14), o ácido palmítico (C16), o ácido oleico (C18:1) y sales de sodio, potasio y calcio de mismo, como agente antibacteriano, en particular contra las bacterias gram-negativas, en una composición que comprende polilisina, y/o cualquier sal derivada. Opcionalmente, en combinación con protamina y/o una sal derivada.

35 [0038] La composición antibacteriana de la presente invención es especialmente muy adecuada para reducir y/o prevenir la presencia, el crecimiento y/o la actividad de cualquier células de bacterias gram-negativas en la producción, la manipulación, la aplicación, el almacenamiento y la preparación de productos de alimento y bebida.

[0039] Es muy adecuado para la aplicación en productos de alimento y bebida tal como bebidas (p. ej. refrescos carbonatados, zumos vegetales a base de fruta), productos con alto contenido de proteínas tal como carne y productos de pez, preparaciones y guarniciones, productos listos para beber y listos para comer, productos refrigerados y tratados a alta temperatura.

40 [0040] Cuando se aplica en producto alimenticio o bebida, el éster de ácido graso de la presente invención tal como, por ejemplo, un lactilato normalmente estará presente en dicho producto en una cantidad de hasta 1 % en peso del producto, preferiblemente de 0,0001 % a 1 %, o incluso de 0,0001 % a 0,1 % y de forma más preferible de 0,0001 % a 0,01 %.

45 [0041] Polilisina y/o protamina puede estar presente en un alimento o producto de bebida en una cantidad de hasta 1 % en peso del producto, preferiblemente de 0.0001 % a 1 % o incluso de 0.0001 % a 0.1%, más preferiblemente de 0.0001 % a 0.01 % y de la forma más preferible de 0.0001 % a 0.001 %.

[0042] EDTA, organofosfatos y polifosfatos normalmente estarán presentes en un producto de alimento o bebida en una cantidad de hasta 1 % en peso del producto, preferiblemente de 0,0001 % a 1 %.

50 [0043] Los ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido glicólico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido málico y ácido adípico pueden estar presentes en un producto de alimento o bebida en una cantidad de hasta 10 % en peso del producto, preferiblemente de 0,0001 % a 10%, preferiblemente de 0,0001 % a 5 %.

[0044] En las aplicaciones mencionadas anteriormente, la composición antibacteriana de la presente invención está presente como ingrediente en el producto de alimento final o bebida.

[0045] La composición antibacteriana puede estar presente en la superficie de dichos productos o dentro de los productos. La presente invención se refiere a un método para la reducción o la prevención de la presencia, el crecimiento o la actividad de bacterias gram-negativas en un producto de alimento o bebida donde dicho método comprende el contacto de dicho producto de alimento o bebida durante una o más de las distintas etapas en el proceso de tratamiento alimenticio incluidas las etapas de la producción, la manipulación, el almacenamiento y/o la preparación de dicho producto de alimento o bebida con las composiciones antibacterianas de la presente invención. Se puede aplicar no sólo en la etapa de producto final pero también durante o en, por ejemplo, la desinfección de carcasas en la producción de productos cárnicos o en el paso de lavado aplicado para frutas y hortalizas. La composición antibacteriana puede ser aplicada o introducida por distintos medios tal como, por ejemplo, como una pulverización, un enjuague o una solución de lavado o como solución donde los distintos productos alimenticios son sumergidos. La composición antibacteriana de la presente invención también puede ser introducida por inyección en el producto alimenticio y/o bebida. Además, la composición antibacteriana se puede utilizar para tratar contenedores con antes de, simultáneamente con o posteriormente después del embalaje de productos de alimento y bebida.

[0046] Según el tipo de aplicación y si la composición antibacteriana de la presente invención se usa como sustancia activa en el producto final o como componente de, por ejemplo, una solución de lavado o solución de pulverización, los componentes de la composición antibacteriana variarán en la concentración y en la proporción interna como será evidente para el experto en la técnica.

[0047] La composición antibacteriana puede estar disponible en forma sólida o líquida. Si la composición antibacteriana está en forma líquida, generalmente está en forma de una composición acuosa, que puede ser una solución o una dispersión. Tal composición antibacteriana acuosa según la presente invención generalmente comprende, según el peso total de la solución, de 0,0001 % en peso a hasta 40 % en peso, más preferiblemente de 0,1 % en peso a 35 % en peso, y de la forma más preferible de 1 a 25 % en peso de un agente antibacteriano de la presente invención tal como, por ejemplo, polilisina y de 0,0001 % en peso hasta 45 % en peso, más preferiblemente de 1 a 40 % en peso, y de la forma más preferible de 5 a 35 % en peso de éster de ácido graso según la presente invención tal como, por ejemplo, lactilato. La composición antibacteriana puede comprender además un glicérido en una cantidad de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 35 % en peso y además un ácido orgánico en el intervalo de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 30 % en peso.

[0048] Los componentes de la composición antibacteriana según la presente invención se pueden introducir en la composición de líquidos antibacterianos mediante portadores. El experto en la técnica sabe qué tipo de portadores pueden utilizarse. Entre distintos portadores bien conocidos, se descubrió que el glicol de polietileno y/o el lactato funcionan muy bien como portador. El portador puede estar presente en concentraciones de aproximadamente 50 a 98 % en peso. Además, se pueden agregar diferentes emulsionantes conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, los emulsionantes tales como polisorbatos (p. ej. polisorbato 60 o 80) y lecitina se aplican en concentraciones de por ejemplo 0,1 a 25%, más preferiblemente 1-10% y de la forma más preferible 2 a 4% basados en 100 % derivado de ácido graso, tal como glicérido y/o lactilato.

[0049] Si la composición antibacteriana está en forma sólida, generalmente será en la forma de un polvo que comprende partículas de los componentes pertinentes. La composición antibacteriana en la forma sólida generalmente comprende, según el peso total del polvo, de 0,0001 % en peso a hasta 40 % en peso, más preferiblemente de 0,1 % en peso a 35 % en peso, y de la forma más preferible de 1 a 25 % en peso de un agente antibacteriano de la presente invención tal como, por ejemplo, polilisina y de 0,0001 % en peso hasta 45 %, más preferiblemente de 1 a 40 % en peso, y de la forma más preferible de 5 a 35 % en peso de derivado de éster de ácido graso según la presente invención tal como, por ejemplo, lactilato.

[0050] Se puede hacer uso de portadores. El sílice y/o la maltodextrina son portadores muy adecuados, que están presentes en concentraciones de hasta 50 a 98 % en peso.

[0051] La composición antibacteriana puede comprender además un glicérido en una cantidad de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 35 % en peso y además un ácido orgánico en el intervalo de 0 a 45 % en peso y más preferiblemente de 0 a 30 % en peso.

[0052] Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran aún más la invención.

#### **Ejemplo 1**

[0053] Se utilizaron los siguientes cultivos en un estudio: Escherichia coli serotype 0157:H7 (ATCC 700728), Salmonella typhimurium (ATCC 13311) y Salmonella enteritidis (ATCC 13076). Todos los cultivos fueron transferidos diariamente en tubos con tapa roscada con 10 ml de caldo infusión cerebro corazón. Los cultivos fueron incubados a 30° C sin agitación. El caldo infusión cerebro corazón fue preparado con cantidades crecientes de lactilato y polilisina. El intervalo de concentración para el lactilato caprílico (C8) fue de 0 a 0,45 % en 10 0,05 % pasos, para el lactilato cáprico (C10) fue de 0 a 0,09 % en 10 0,01 % pasos, para el lactilato láurico (C12) fue de 0 a 0,009 % en 10 0,001 % pasos y para el lactilato tetradecanoico (C14) fue de 0 a 0,009 % en 10 0,001 % pasos. Los lactilatos fueron combinados con polilisina.

El intervalo de concentración para la polilisina fue de 0 a 0,0675 % en 10 0,0075 % pasos. Esto dio como resultado 100 medios diferentes. El pH de los medios fue ajustado a 6.1 – 6.2 con 1 N HCl o 1 N NaOH. Los medios fueron preparados en cantidades de 10 ml y esterilizados por filtración. Se transfirieron 300 µl de cada medio a un panel de una placa Bioscreen® estéril de 100 pocillos tipo nido de abeja. Las placas con pocillos fueron inoculadas con 5 µl de un cultivo que fue cultivado durante toda la noche en el caldo infusión cerebro corazón usando un dispensador de repetición de 5 µl estéril. Los índices de crecimiento se determinaron con un Bioscreen® C que mide cinéticamente el desarrollo de la turbidez por fotometría vertical. Las placas fueron incubadas durante 16 - 24 horas a 37° C, la densidad óptica de los cultivos se midió cada 30 minutos a 420 - 580 nm usando un filtro de banda amplia. El Bioscreen® mide la densidad óptica de los cultivos a intervalos de tiempo establecidos. De estos datos, el Bioscreen® calcula índices de crecimiento máximos específicos. El propósito del procesamiento de datos adicional es averiguar si dos aminoácidos actúan independientemente uno del otro o si se estimulan uno al otro en su acción inhibitoria (sinergia) o neutralizan el efecto inhibitorio (antagonismo) uno al otro. Cuando determinado compuesto no tiene efecto en un organismo, el índice de crecimiento específico de este organismo ( $\mu$ ) se pueden expresar como función (f) de la concentración de sustrato limitadora de crecimiento (S) por, por ejemplo, la ecuación de Monod, que es:  $\mu = \mu_{\max} \cdot s / (K_s + s)$ , donde  $\mu_{\max}$  representa el índice de crecimiento máximo específico, s es la concentración permanente del sustrato limitador de crecimiento en el medio y  $K_s$  es la concentración de sustrato donde  $\mu = 0,5 \mu_{\max}$ . No obstante, cuando la presencia de un inhibidor P afecta crecimiento celular, la función f para  $\mu$  debe ser modificada, es decir,  $\mu = f(s,p)$ , donde p representa la concentración del inhibidor P. Numerosos estudios de cinética de inhibición de crecimiento de bacterias han demostrado que muchos inhibidores se comportan como inhibidores no competitivos. Esto implica que sólo el valor del índice de crecimiento máximo específico ( $\mu_{\max}$ ) es afectado y no la afinidad ( $K_s$ ). Por lo tanto, el índice de crecimiento específico en presencia de inhibidor puede escribirse como:  $\mu = \mu_i \cdot s / (K_s + s)$ , donde  $\mu_i$  es el índice de crecimiento máximo específico en presencia de un inhibidor P. La relación entre  $\mu_i$  y  $\mu_{\max}$  y la concentración del inhibidor P fue descrita usando la ecuación logística de dosis-respuesta que es:  $\mu_i / \mu_{\max} = 1 / (1 + (p / p_{0.5})^b)$  (Jungbauer, A. (2001). The logistic dose response function: a robust fitting function for transition phenomena in life sciences. J. Clinical Ligand Assay 24: 270 - 274 ). En esta ecuación, p representa la concentración de inhibidor P y  $p_{0.5}$  la concentración de P donde  $\mu_i = 0,5 \mu_{\max}$ ;  $\mu_{\max}$  es el índice de crecimiento máximo específico que es el índice de crecimiento específico en ausencia de inhibidor P, b es un magnitud adimensional, que determina la relación entre  $\mu_i$  y p. Combinando la ecuación de Monod y la ecuación logística de dosis-respuesta, se puede escribir como:  $\mu = \mu_{\max} (s / K_s + s) / (1 + (p / p_{0.5})^b)$ . En el cultivo discontinuo, donde s es normalmente muchas veces superior a  $K_s$ , esta ecuación se reduce a  $\mu = \mu_{\max} / (1 + (p / p_{0.5})^b)$ . Al comparar diferentes organismos cultivados bajo las mismas condiciones, o el mismo organismo cultivado bajo condiciones diferentes, es más significativo usar un índice de crecimiento relativo, en lugar de índices de crecimiento absolutos como estándares de comparación. El índice de crecimiento relativo (O) es la proporción de índice de crecimiento ( $\mu$ ) a índice de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ), es decir,  $O = \mu / \mu_{\max}$ . Puede verse que mientras  $\mu$  y  $\mu_{\max}$  tienen las dimensiones de (tiempo)<sup>-1</sup>, su proporción O es adimensional, es decir, un número puro. De forma similar, se puede definir la concentración inhibitoria relativa  $\epsilon$  como  $p / p_{0.5}$ . La ecuación de Monod y la ecuación logística de dosis-respuesta ahora puede escribirse como:

$$O = 1 / (1 + \epsilon b).$$

Para dos inhibidores X e Y, por ejemplo, pueden definirse las siguientes dos expresiones para O:  $O_x = 1 / (1 + \epsilon b_1)$  y  $O_y = 1 / (1 + \epsilon b_2)$ .  $O_x$  y  $O_y$  pueden ser evaluados experimentalmente examinando los efectos inhibitorios de X o Y en el índice de crecimiento del organismo objetivo. Sabiendo las funciones evaluadas para  $O_x$  y  $O_y$ , el efecto teórico independiente es definido como:  $O_x \cdot O_y$ . El efecto observado experimentalmente de combinaciones de X e Y en el índice de crecimiento relativo se define como  $O_{xy}$ . La hipótesis de que X e Y actúan independientemente una de la otra en un organismo determinado se traduce matemáticamente en  $O_{xy} / O_x \cdot O_y = 1$ . El rechazo de esta hipótesis implica que el efecto combinado de X e Y no es un efecto independiente sino antagonístico o sinérgico. En aquellos casos en que los inhibidores, X e Y actúan sinérgicamente sobre organismo objetivo  $O_{xy} / O_x \cdot O_y < 1$  (pero  $> 0$ ). En los casos en que el efecto combinado de los inhibidores X e Y es antagonístico  $O_{xy} / O_x \cdot O_y > 1$ .

[0054] La sinergia, el efecto independiente y el antagonismo se pueden visualizar en un gráfico de  $O_{xy}$  contra  $O_x \cdot O_y$ . Esto se ejemplifica en las figuras 1 - 8, donde se ofrecen diferentes gráficos de  $O_{C_{xL} p_{Lys}}$  (índice de crecimiento relativo experimentalmente observado en presencia de mezclas de un lactilato y polilisina) contra  $O_{C_{xL}} \cdot O_{p_{Lys}}$  (índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de un lactilato y polilisina) para *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) y *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) que muestran la sinergia en la inhibición entre lactilatos y polilisina. La línea continua en estos gráficos representa la línea donde el índice de crecimiento relativo experimentalmente observado ( $O_{C_{xL} p_{Lys}}$ ) es igual al índice de crecimiento relativo predicho ( $O_{C_{xL}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) y donde el lactilato y la polilisina actúan como inhibidores independientes.

La Figura 1 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella typhimurium* en presencia de mezclas de un C8-lactilato y polilisina ( $O_{C_{8L} p_{Lys}}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C8-lactilato y polilisina ( $O_{C_{8L}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ).

La Figura 2 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella*

entritidis en presencia de mezclas de un C8-lactilato y polilisina ( $O_{C8L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C8-lactilato y polilisina ( $O_{C8L \cdot O_{pLys}}$ ).

5 La Figura 3 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella typhimurium* en presencia de mezclas de un C10-lactilato y polilisina ( $O_{C10L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C10-lactilato y polilisina ( $O_{C10L \cdot O_{pLys}}$ ).

La Figura 4 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella entritidis* en presencia de mezclas de un C10-lactilato y polilisina ( $O_{C10L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C10-lactilato y polilisina ( $O_{C10L \cdot O_{pLys}}$ ).

10 La Figura 5 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella typhimurium* en presencia de mezclas de un C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot O_{pLys}}$ ).

La Figura 6 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella entritidis* en presencia de mezclas de un C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot O_{pLys}}$ ).

15 La Figura 7 representa un gráfico del índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella typhimurium* en presencia de mezclas de un C14-lactilato y polilisina ( $O_{C14L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C14-lactilato y polilisina ( $O_{C14L \cdot O_{pLys}}$ ).

20 La Figura 8 representa un gráfico de índice de crecimiento relativo experimentalmente observado de *Salmonella entritidis* en presencia de mezclas de un C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot pLys}$ ) contra el índice de crecimiento relativo predicho en presencia de mezclas de C12-lactilato y polilisina ( $O_{C12L \cdot O_{pLys}}$ ).

Las Figuras 1-8 demuestran que la polilisina y los lactilatos en las diferentes combinaciones evaluadas actúan sinérgicamente sobre el organismo objetivo como  $O_{xy} / O_x \cdot O_y < 1$  y  $> 0$  (representado por los puntos por debajo de la línea continua).

25 [0055] Más ejemplos de sinergia se dan en la tabla 1 tal como, por ejemplo, la sinergia entre 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,45 % (p/p) C8-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,09 % (p/p) C10-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,009 % C12-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,009 % C14-lactilato. Como puede observarse en la tabla, el índice de crecimiento relativo de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* de serotipo 0157: H7 (ATCC 700728), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) o *Salmonella entritidis* (ATCC 13076) en un cultivo con 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,45 % (p/p) C8-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,09 % (p/p) C10-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,009 % C12-lactilato o 0,0225 % (p/p) polilisina y 0,009 % C14-lactilato es inferior al que puede esperarse sobre la base del índice de crecimiento relativo de estos organismos en medios con polilisina o uno de los ésteres lactilatos.

Tabla 1: Ejemplos de sinergia

Índice de crecimiento relativo observado			
Compuesto	C8-lactilato	polilisina	C8-lactilato más polilisina
Concentración (p/p)	0.45%	0.0225%	0.45% / 0.0225%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.5625	0.68	0.0000
<i>E.coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	0.657	0.838	0.0403
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 1	0.47625	0.943	0.0000
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0.58	0.9645	0.0000

Índice de crecimiento relativo observado			
Compuesto	C10-lactilato	Polilisina	C10-lactilato más polilisina
Concentración (p/p)	0.09%	0.0225%	0.09% / 0.0225%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.721	0.4935	0.0171

<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 700728	0.766	0.489	0.0000
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0.904	0.9725	0.0000
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0.912	0.971	0.0000
Compuesto	C12-lactilato	Polilisina	C12-lactilato más polilisina
Concentración (p/p)	0.009%	0.0225%	0.009 % / 0.0225 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.7820	0.7370	0.0027
<i>E.coli</i> O157: H7 ATCC 700728	0.9230	0.6070	0.0000
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0.9525	0.9520	0.2663
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0.9475	0.9035	0.0000
Índice de crecimiento relativo observado			
Compuesto	C14-lactilato	Polilisina	C14-lactilato más polilisina
Concentración (p/p)	0.009%	0.0225%	0.009% / 0.0225%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.4750	0.4395	0.0000
<i>E.coli</i> O157:H7 ATCC 700728	0.8850	0.2800	0.0000

Ejemplo 2: efecto antimicrobiano en el filete de pollo y leche contaminados

5 Materiales y métodos

**Cultivo y condiciones de cultivo**

[0056] *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 y *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700728 fueron cultivados en tubos de tapa roscada estériles con caldo infusión cerebro corazón durante 18 - 24 horas a 30 °C.

**Preparación de filetes de pollo**

- 10 [0057] Filetes de pollo (150 - 200 g) fueron recortados, envasados al vacío y almacenados a 4 - 7° C. Los filetes posteriormente fueron esterilizados por irradiación gama (dosis de radiación media: 12 kiloGray).

**Inoculación de filetes de pollo con *Salmonella Typhimurium***

- 15 [0058] 1 ml de un cultivo durante toda la noche de *Salmonella Typhimurium* en caldo infusión de cerebro corazón se diluyó 1000 veces con NaCl al 0,8 % (p/v) estéril y peptona al 0,1 % (w/p). Se transfirieron 0,5 ml de este cultivo diluido a un lado del filete. El inóculo fue distribuido fregando suavemente toda la superficie del filete. Esto se repitió para el otro lado del filete. La inoculación se efectuó a 6° C. Se dejaron reposar los filetes inoculados durante 60 - 120 min a 6° C para permitir la fijación de las células.

**Descontaminación de filetes de pollo**

- 20 [0059] Los filetes de pollo fueron bañados brevemente y completamente sumergidos en 1 l de una solución con la formulación apropiada y luego fueron transferidos a bolsas de filtro laterales de Bagfilter® de 400 ml (Interscience, St Nom, Francia) con 5 ml de la formulación apropiada. Las bolsas fueron de selladas al vacío e incubado a 12° C por hasta 7 días hasta análisis posterior. Muestras de tiempo cero fueron colocadas en placas dentro de 30 min después de la inmersión.

**Análisis microbiano de filetes de pollo**

- 25 [0060] Las *Salmonella Typhimurium* supervivientes en los filetes de pollo fueron contados de la siguiente manera: se

abrió una bolsa sellada y se le agregó 2 veces el fluido de dilución estéril de peso neto (8,5 % (p/v) NaCl y (p/v) peptona bacteriológica al 0,1 % ). Los filetes duplicados fueron homogenizados durante 1 min. en una licuadora de laboratorio de paleta Bagmixer® 400 (Interscience, St Nom, Francia). 50 µl de los homogenizados o diluciones de los mismos fueron colocados en las placas de agar cromogénico de Salmonella duplicadas (CM1007) con cefsulodina, suplemento de novobiocina (SR0194) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) usando un plaquador en espiral Eddijet tipo 1.23 (IUL Instruments, Barcelona, España). Las placas fueron incubadas durante 24 - 48 horas a 30° C y luego fueron contadas. Los números de Salmonella fueron expresados como log10 unidades formadoras de colonias por ml homogeneizado.

**Inoculación de leche tratada con formulaciones antimicrobianas**

[0061] Se adquirió leche estéril baja en grasa en un supermercado local y cantidades de 100 ml fueron transferidas a una serie de botellas estéril de boca roscada. Se agregó ε-polilisina, la sal de sodio de octanoilactilato (C8-lactilato) y decanoilactilato (C10 lactilato) a una concentración como se muestra en la tabla 2. Las diferentes preparaciones de la leche fueron inoculadas con un cultivo durante toda la noche de Escherichia coli O157:H7. La densidad de célula inicial fue log10 2,5 – 3,0.

**Análisis microbiano de cultivos de leche**

[0062] *Escherichia coli* O157:H7 supervivientes fueron contadas de la siguiente manera: muestras de cultivos de leche de 50 µl duplicadas o diluciones de las mismas fueron colocadas en placas de agar Agar biliado rojo violeta glucosa (VRBG, por sus siglas en inglés) duplicadas (CM0485 Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) usando un plaquador en espiral Eddijet de tipo 1.23 (IUL Instruments, Barcelona, España). Las placas fueron incubadas durante 24 - 48 horas a 30° C y luego fueron contadas. Los números de *Escherichia coli* fueron expresados como log10 unidades formadoras de colonias por ml homogeneizado.

**Preparación de formulaciones antimicrobianas**

[0063] Las composiciones de las formulaciones que fueron estudiadas se muestran en la tabla 2. La ε-polilisina y los lactilatos fueron disueltos en el agua desmineralizada y esterilizada durante 20 min a 120° C.

Tabla 2. Composición de formulaciones antimicrobianas

Formulación	Blanc	a	b
ε-polilisina		0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)
C8-Lactilato		0,2 % (p/v)	
C10-lactilato			0,05 % (p/v)
NaCl	0,8 % (p/v)	0,8% (p/v)	0,8% (p/v)

**Productos químicos**

[0064] La ε-polilisina fue comprada en Chisso America Inc (Nueva York, EE. UU.). La sal de sodio de octanoilactilato (C8-lactilato) y el decanoilactilato (C10 lactilato) fueron compradas en Caravan Ingredients (Lenexa, Kansas, EE. UU.).

**Descontaminación de resultados de filetes de pollo**

[0065] La exposición de *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 presente en los filetes de pollo ea combinaciones de ε-polilisina con ésteres de ácido láctico de ésteres de ácido graso de cadena media dio como resultado una reducción casi inmediata del número de células viables por aproximadamente 90 % (tabla 3). Después de día a 12° C, la reducción en números es más que un 4log10. La supresión del crecimiento por las combinaciones evaluadas no es permanente; después de 4 días, los números han aumentado aunque después de 7 días tras la incubación la diferencia entre las formulaciones y la formulación Blanc no es nunca menos que 2log10 y la composición de la presente invención por lo tanto todavía ejercita actividad antimicrobiana.

Tabla 3: Efecto de las combinaciones de ε-polilisina (ε - PL) con ésteres de ácido láctico de ésteres de ácido graso de cadena media en Salmonella Typhimurium en los filetes de pollo a 12° C; expresado en log10 unidades formadoras de colonias (CFU) / ml

	Formulación		
Tiempo (días)	Blanc	0,1 % (p/v) ε - PL + 0,2 %	0,1 % (p/v) ε - PL + 0,05 % (p/v) C10-

		(p/v) C8-Lactilato	lactilato
0	3.74	2.40	2.62
1	5.91	1.3	1
4	6.01	3.03	2.64
5	6.89	4.26	4.25
6	7.36	3.68	3.96
7	7.46	5.46	4.66

[0066] Individualmente, los lactilatos no mostraron ningún efecto de eliminación ni supresión del crecimiento en ausencia de  $\epsilon$ -polilisina como se puede observar en la tabla 4. La  $\epsilon$ -polilisina misma redujo los números celulares aunque el efecto fue menor que si hubiera sido combinada con uno de los derivados de ácido graso. Esto fue particularmente evidente después de un día de incubación. Mientras que la reducción en números para las combinaciones variaron de 4log10 a 5log10 (tabla 3), la reducción para la  $\epsilon$ -polilisina como una adición única fue sólo 2log10 (tabla 4). Esto sugiere que hay una forma de sinergia en la inhibición entre la  $\epsilon$ -polilisina y los derivados de ácido graso. Este se confirma por estudios in vitro en los que los efectos de estas combinaciones fueron estudiados en el caldo (experimento 1).

5

10 Tabla 4: Efecto individual de la  $\epsilon$ -polilisina y ésteres de ácido láctico C8 y C10 de ésteres de ácido graso de cadena media en Salmonella Typhimurium en los filetes de pollo a 12° C; expresado en log10 unidades formadoras de colonias (CFU) / ml

Tiempo (días)	Formulaciones			
	Blanc	0,1 % (p/v) $\epsilon$ -polilisina	0,2 % (p/v) C8-Lactilato	0,05 % (p/v) C10-lactilato
0	3.8	3.04	3.85	3.75
1	4.05	2.04	4.1	3.95
2	4.82	2.15	4.29	4.45
5	7.2	4.04	6.27	6.87
6	7.6	4.26	7.35	6.83
7	7.68	5.35	7.42	7.52

15

Resultados de inhibición de Escherichia coli O157:H7 en leche

[0067] También se observó una fuerte inhibición del crecimiento por combinaciones de  $\epsilon$ -polilisina con ésteres de ácido láctico de ésteres de ácido graso de cadena media para el crecimiento de Escherichia coli O157:H7 en leche sin grasa (tabla 5).

20

[0068] Tabla 5: Efecto de las combinaciones de  $\epsilon$ -polilisina ( $\epsilon$  - PL) con ésteres de ácido láctico de ésteres de ácido graso de cadena media en Escherichia coli O157:H7 en la leche a 12° C; expresados en log10 unidades formadoras de colonias (CFU) / ml (ND: sin datos)

ES 2 370 097 T3

	Formulaciones		
Tiempo (días)	Blanc	0,2% (p/v) $\epsilon$ - PL + 0,2 % (p/v) C8-Lactilato	0,1 % (p/v) $\epsilon$ - PL + 0,05 % (p/v) C10-lactilato
0	2.85	3.0	2.9
1	3.48	1.7	1.95
2	6.12	1.9	3.37
3	7.42	2.75	4.24
6	ND	5.6	5.89

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antibacteriana que comprende la combinación de
- a. éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico de una sal o un éster de la misma
- y
- b. un agente antibacteriano seleccionado a partir de polilisina y su sal.
- 10 2. Composición antibacteriana según la reivindicación 1 donde el ácido graso comprende de 4 a 18 átomos de carbono.
3. Composición antibacteriana según la reivindicación 1 o 2 caracterizada por el hecho de que el ácido hidroxicarboxílico puede comprender uno o varios monómeros de ácido hidroxicarboxílico.
4. Composición antibacteriana según la reivindicación 1, 2 o 3 donde dicho ácido hidroxicarboxílico puede comprender de 1 a 6 átomos de carbono.
- 15 5. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicho ácido hidroxicarboxílico es seleccionado a partir de ácido láctico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico y cualquier mezcla de los mismos.
6. Composición antibacteriana de cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada por el hecho de que el éster de ácido graso es lactilato o una mezcla de lactilatos presentada por la siguiente fórmula:
- 20  $(RCO - (O - CH(CH_3) - CO)_x O)_m Y(OH)_{n-m}$
- donde RCO es un radical acilo de un ácido graso con 4 a 18 átomos de carbono, Y es un catión seleccionado a partir de hidrógeno, metal alcalino, metal alcalinotérreo, zinc, hierro, amonio o amonio sustituido con uno o más grupos C1-C3 alquilo o hidroxialquilo; n representa el valor del catión; m es un número entero de 1 a n, x es un número de 1 a 6 y donde x, m y n representan números medios.
- 25 7. Composición antibacteriana según la reivindicación 6 caracterizada donde x tiene un valor de 1 a 3 y el lactilato es seleccionado a partir de octanoillactilato, decanoillactilato, dodecanoillactilato, tetradecanoilo-lactilato, oleico-lactilato, en sus forma libre o como sal, y cualquier mezcla de los mismos.
8. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la polilisina es  $\epsilon$ -polilisina.
- 30 9. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el agente antibacteriano es seleccionado a partir de polilisina y su sal en combinación con protamina y/o una sal de la misma.
10. Composición antibacteriana de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprenden además uno o más aditivos seleccionados a partir de un agente quelante de metal, ácido orgánico o una sal o éster del mismo, éster de ácido graso a base de glicerol o una mezcla de los mismos.
- 35 11. Composición antibacteriana según la reivindicación 10 en la que dicho ácido orgánico se selecciona a partir de ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido propiónico, ácido caproico y ácido fítico.
- 40 12. Composición antibacteriana según la reivindicación 10 en la que dicho éster de ácido graso de glicerol es un mono- o di-éster de glicerol o una mezcla de los mismos.
13. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada por el hecho de que dicha composición está en forma líquida o sólida y caracterizada por el hecho de que la composición comprende de 0,0001 a 40 % en peso del agente antibacteriano, 0,0001 a 45 % en peso del éster de ácido graso de ácido graso y ácido hidroxicarboxílico o una sal o un éster del mismo, 0 a 45 % en peso de éster de ácido graso a base de glicerol, 0 a 45 % en peso de ácido orgánico o una sal o del mismo y 0-98 % en peso de un portador.
- 45 14. Método para reducción o prevención de la presencia, el crecimiento o la actividad de bacterias gram-negativas en o sobre un producto o superficie que comprende el contacto de dichas bacterias en o sobre un producto o

superficie con una composición antibacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Método según la reivindicación 14 precedente en el que dichas bacterias son bacterias de la familia de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Campylobacter*.
16. Un producto de alimento o bebida, un producto cosmético, un producto para el cuidado personal, un producto de limpieza, un detergente o un producto de pienso o bebida para animales que comprende la composición antibacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5

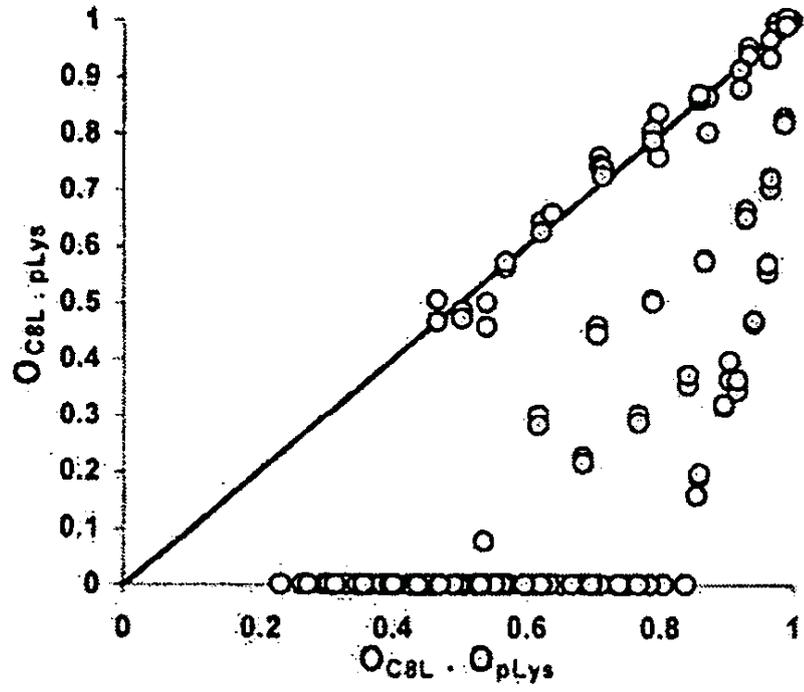


FIG.1 :

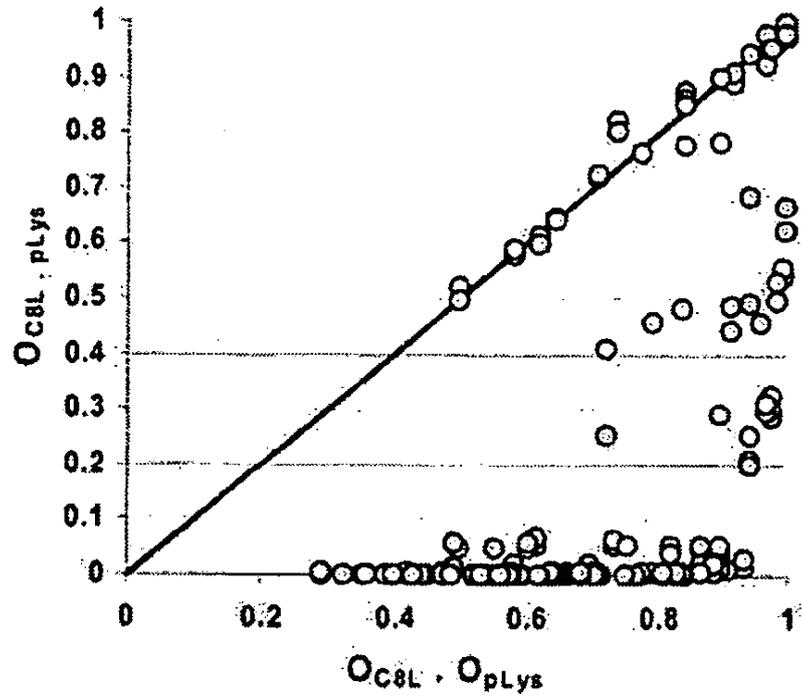


FIG.2 :

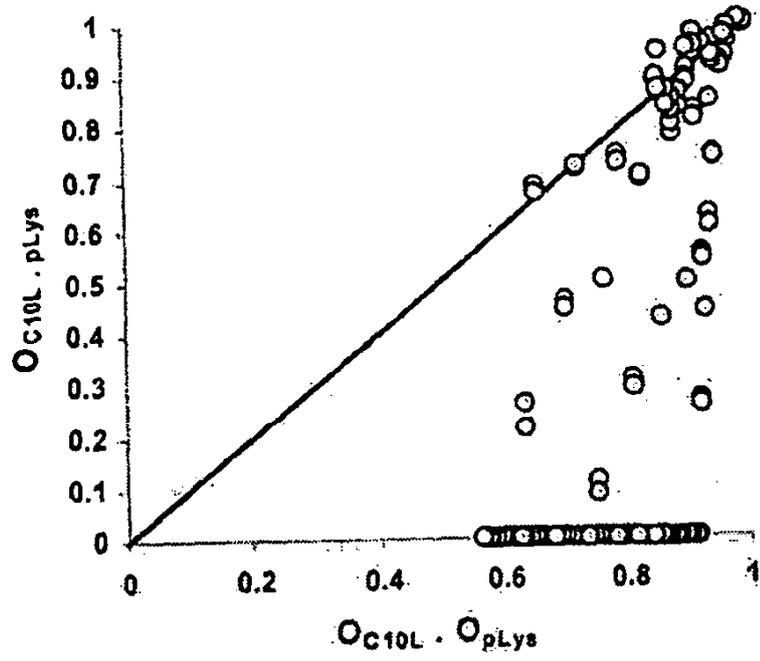


FIG.3.

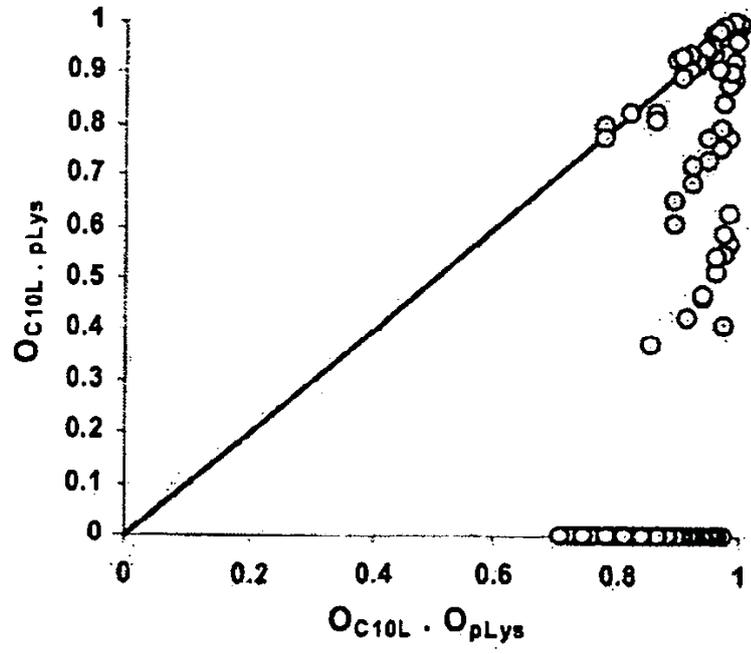


FIG.4.

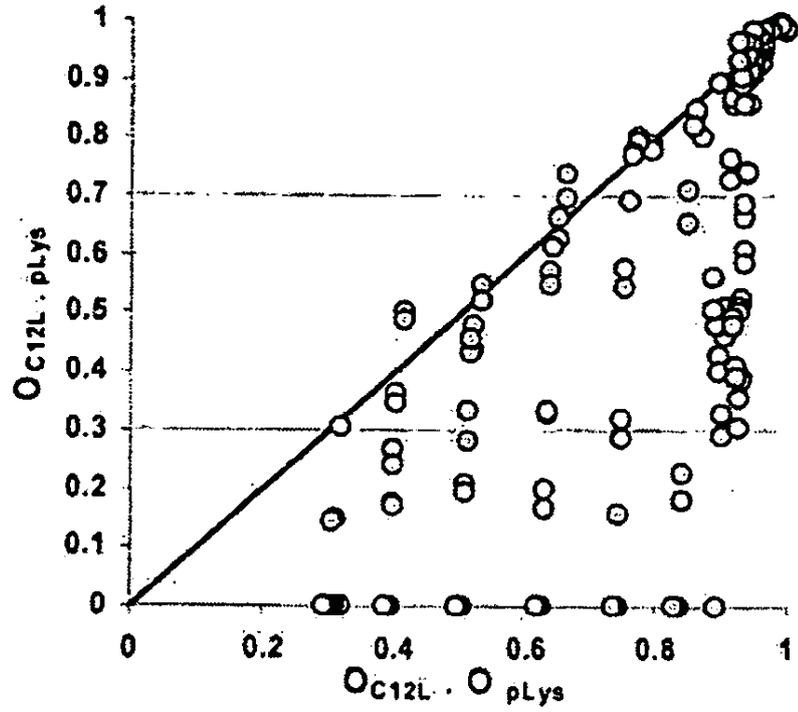


FIG.5.

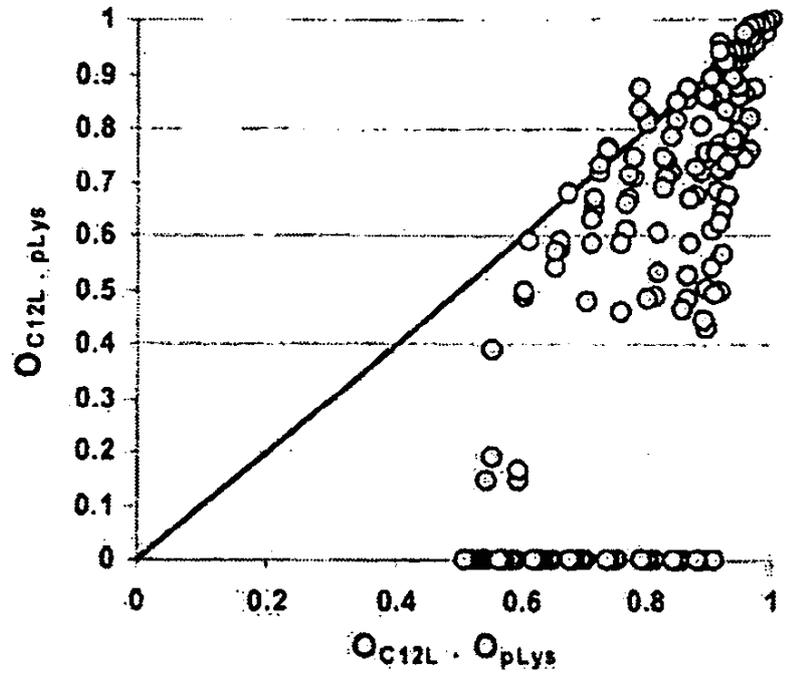


FIG.6.

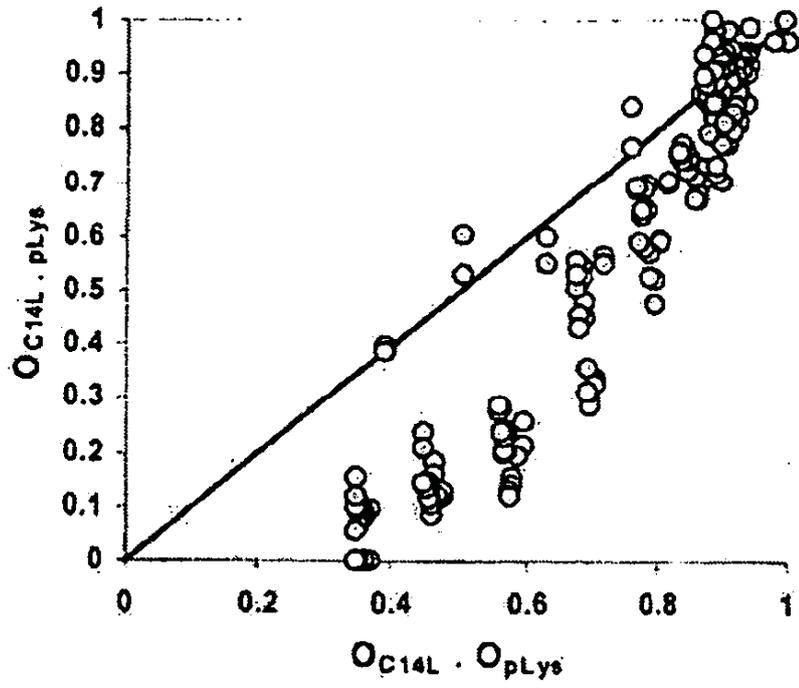


FIG.7

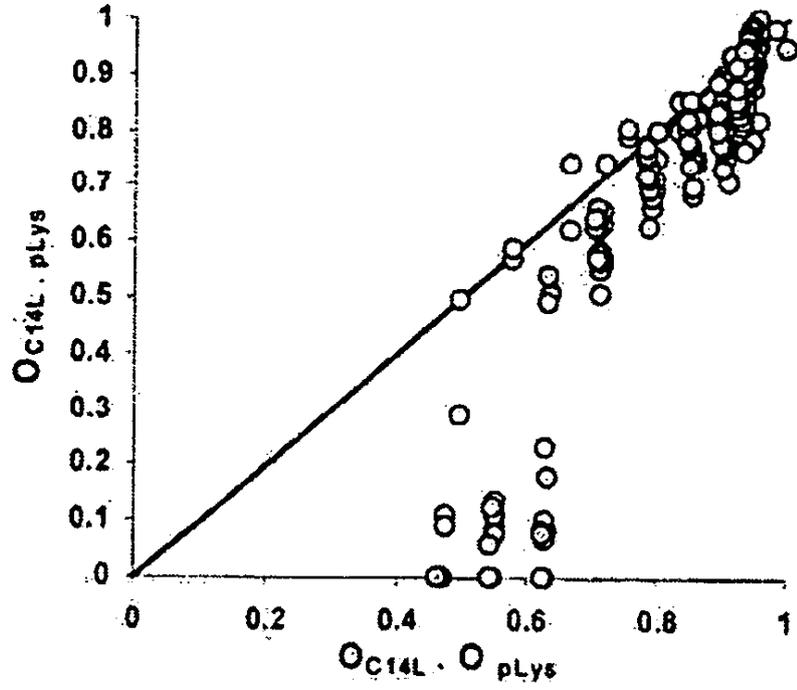


FIG.8.