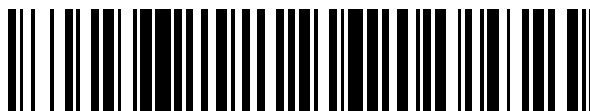


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 552**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/22** (2006.01)

**A23B 4/20** (2006.01)

**A23L 3/3463** (2006.01)

**A23L 3/3508** (2006.01)

**A23L 3/3526** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2005 E 05792086 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1796487**

54 Título: **Uso de glicina y/o derivados de glicina como agentes antibacterianos contra patógenos bacterianos gram-negativos en comidas y/o bebidas**

30 Prioridad:

**27.08.2004 EP 04104118**

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

**04.12.2013**

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)**

**ARKELSEDIJK 46**

**4206 AC GORINCHEM, NL**

72 Inventor/es:

**BONTENBAL, EDWIN ELIZE WILLEM y**

**VEGT DE, BERT THEO**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 432 552 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

Uso de glicina y/o derivados de glicina como agentes antibacterianos contra patógenos bacterianos gram-negativos en comidas y/o bebidas

[0001] Esta invención se refiere al uso de un agente antibacteriano contra los patógenos bacterianos gram-negativos en alimentos y bebidas. Dicho agente antibacteriano se aplica en particular a alimentos refrigerados y bebidas y más en particular a productos de carne frescos o cocinados (incluyendo ave y pescado). Además, dicho agente antibacteriano se utiliza en particular contra las bacterias del género *Escherichia Coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella*, y *Campylobacter* en dichos productos de alimento y de bebida.

[0002] De forma convencional, el crecimiento bacteriano en el alimento y aplicaciones de bebida se controla y/o evita mediante regulación del pH, control de la actividad del agua, adición de agentes conservantes de la calidad como por ejemplo nitrito y/o utilizando varias técnicas de tratamiento como por ejemplo tratamiento térmico, irradiación o tratamiento de alta presión. No obstante, cuando se controlan patógenos bacterianos gram-negativos las medidas descritas anteriormente son frecuentemente o bien insuficientes, indeseables, o bien inadecuadas para el tipo de alimento o producto de bebida.

[0003] Por ejemplo, el control de la actividad del agua en productos es posible mediante por ejemplo la adición de sal. El control o prevención del crecimiento bacteriano en productos mediante la adición de sal no obstante requiere altas concentraciones de sal. Dichas altas concentraciones frecuentemente llevan a una pérdida de sabor debido a que el producto se vuelve demasiado salado. Además, una dosis de sal demasiado alta no es deseada tampoco respecto a aspectos de salud como por ejemplo enfermedades del corazón y vasculares o presión sanguínea. Además, en productos con proteínas como por ejemplo carne (esto es, incluyendo pescado y aves de corral) dichas altas concentraciones de sal pueden conllevar un deterioro de la textura del producto. Como los patógenos bacterianos gram-negativos tales como *Escherichia Coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella*, y *Campylobacter* están notoriamente presentes en productos con proteínas tales como leche, carne, queso etcétera, el control de la actividad del agua no es frecuentemente una solución viable.

[0004] También, la regulación del pH como medio para el control del crecimiento bacteriano puede causar pérdida de sabor del producto y/o pérdida de textura del producto, especialmente en alimentos ricos en proteína y productos de bebida. Además, algunas bacterias patógenas gram-negativas son relativamente insensibles a la adición de ácido. Por ejemplo el crecimiento de bacterias *Campylobacter* y bacterias de *Salmonella* se puede detener a un pH inferior a 4.0 y 3.8 respectivamente, que es un pH indeseable para algunas aplicaciones alimenticias debido a su efecto en el sabor y la textura.

[0005] Se añade nitrito a las aplicaciones de carne curada (incluyendo ave y pescado) con el objetivo de preservar la calidad del producto. El nitrito es capaz de parar el crecimiento bacteriano de algunos tipos de bacterias como por ejemplo *Clostridium*. En algunos casos el nitrito se añade como agente colorante para mantener un color determinado en el producto de carne. Debido a este efecto colorante del nitrito éste no es deseable para todas las aplicaciones de carne. Ejemplos de aplicaciones de productos sin curar, sin nitrito, son salchichas (alemanas), pollo y carne de pavo y rosbif. Como se ha mencionado anteriormente, especialmente los patógenos bacterianos gram-negativos están frecuentemente presentes en estos productos alimenticios. Actualmente la legislación aspira a la minimización del uso de nitrito en aplicaciones alimenticias. Se sobreentiende que técnicas de tratamiento como por ejemplo tratamiento térmico, irradiación o tratamiento de alta presión como métodos para la conservación de productos no son siempre aplicables a las aplicaciones alimenticias y de bebida tales como ensaladas y otros productos vegetales, bebidas y productos lácteos, comidas listas para tomar y algunos tipos de pescado como por ejemplo gambas, debido a la velocidad de procesamiento, costes, preferencias del consumidor y la influencia en la textura y/o el sabor.

[0006] Así, dichos métodos anteriormente mencionados de adición de sal, regulación de pH, adición de nitrito y técnicas de tratamiento como por ejemplo tratamiento térmico no son siempre satisfactorios para el propósito de conservación de alimentos y bebidas, especialmente cuando se controlan patógenos bacterianos gram-negativos. Por consiguiente, la conservación de productos alimenticios con proteínas, productos alimenticios sensibles al pH y productos alimenticios refrigerados tales como bebidas y productos lácteos, ensaladas y otros productos vegetales, alimentos secos y platos precocinados como por ejemplo comidas listas para comer, y especialmente productos cárnicos (incluyendo pescado y aves de corral) todavía prueban ser un problema, especialmente si el producto alimenticio necesita ser protegido contra la intoxicación como consecuencia por ejemplo de temperaturas indebidas y/o contaminación del alimento y productos de bebida. Es conocido que una de las causas más importantes de intoxicación es la contaminación debido a la incorrecta manipulación de los alimentos y productos de bebida. Además, los productos se almacenan frecuentemente en condiciones inapropiadas. Temperaturas indebidas (p. ej. almacenamiento incidental a alta temperatura) pueden causar el crecimiento de nuevo en el producto de las bacterias ya presentes pero inactivadas dando como resultado una intoxicación por bacterias

patógenas. La invención proporciona una alternativa eficaz para superar los problemas anteriormente mencionados en la conservación de alimentos y bebidas contra la intoxicación y además proporciona un medio para combatir la intoxicación por bacterias patógenas de alimentos y productos de bebida debido a por ejemplo una temperatura indebida y/o contaminación debido a por ejemplo una manipulación inapropiada y/o preparación inapropiada.

[0007] Es conocido que se puede utilizar glicina para prevenir el crecimiento de bacterias que causan el deterioro alimenticio, también llamado putrefacción. Normalmente éstas son bacterias del ácido láctico, es decir bacterias gram-positivas. Cuando el alimento se deteriora, el sabor y/o su apariencia se ve afectada, pero la salud de los consumidores no está en juego. La presente invención, no obstante, se refiere a la prevención de la intoxicación. La intoxicación está provocada por patógenos bacterianos gram-negativos tales como *Escherichia Coli* y *Enterobacter Sakazakii*, *Salmonella* y *Campylobacter*. Dichos patógenos producen toxinas y/o causan infecciones. Por ejemplo *Enterobacter Sakazakii* es abundante en leche de bebé y puede causar serios problema de salud para bebés. Debido a la presencia de una pared celular y como consecuencia propiedades químicas y físicas totalmente diferentes, generalmente, los patógenos bacterianos gram-negativos son más difíciles de combatir que las bacterias gram-positivas.

[0008] Existen varias publicaciones que describen el efecto antibacteriano de la glicina contra el deterioro alimenticio: El documento JP2000-224976 describe un conservante alimenticio que utiliza lactato de calcio y glicina en combinación con sales de ácidos orgánicos tales como por ejemplo ácido cítrico, ácido acético o ácido glucónico. Además, la publicación describe que dicho conservante tiene efectos contra microorganismos tales como bacterias del ácido láctico. La publicación se refiere al uso de glicina en combinación con dichas sales de ácidos orgánicos contra la corrupción alimenticia más que a la intoxicación con patógenos bacterianos gram negativos.

[0009] El documento JP2001-245644 describe un método de mejora de un periodo conservable de un alimento procesado tal como carnes procesadas o platos diarios comestibles usando al menos una sal de ácido láctico y una sal de ácido acético. La glicina se puede adicionar según sea necesaria. La publicación describe que dicho método es capaz de suprimir el crecimiento de microorganismos asociado a la putrefacción o el deterioro. La publicación no se refiere en ningún efecto al método en bacterias patógenas alimenticias.

[0010] El documento UK 1510942 describe el uso simultáneo de maltosa y glicina para prevenir la putrefacción en productos alimenticios tales como confiterías de estilo japonés, mermeladas, gelatinas, postres servidos en frío, productos lácteos y conservas de fruta. Se describe una prueba donde dicha combinación de maltosa y glicina se evalúa contra la putrefacción de un medio de extracto de carne bovina por bacterias de *Bacillus*. La publicación se refiere a la alteración alimenticia por bacterias del ácido láctico más que a intoxicación por patógenos bacterianos gram-negativos.

[0011] El documento US 2711976 describe que la glicina se puede usar contra la alteración alimenticia por "flora natural o indígena resistente al calor que resiste al cocinado habitual u operación de tratamiento de calor" y además contra los brotes de intoxicación por microorganismos enterotoxigénicos tales como *Micrococcus pyogenes* o más comúnmente denominada como *Staphylococcus*.

[0012] El documento JP 57-008747 divulga que la adición de glicina a materias primas para fideos deshidratados tiene un efecto antibacteriano en el grupo general de bacilli coliformes, y no revela el uso de glicina como agente antibacteriano en un alimento refrigerado.

[0013] Stonsaovapak et al. (Food 30th year Vol. 4 October - December 2000 ; XP002315133) divulga que la glicina afecta al crecimiento de dos cepas de *E. coli* en caldo nutritivo TSB. Además, la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en tres alimentos listos para comer conservados a 4°C se mide, no obstante, sin la adición de glicina.

[0014] Tsutsumi y Ohtaka (Japan Journal of Zootech. Sci. 56 (1985), 571-576 ; XP002315134) revelan la acción antimicrobiana contra *S. typhimurium* de una solución de encurtido (una solución que contiene sacarosa, sal y nitrato para uso en el tratamiento de carne) con y sin glicina. La adición de glicina a la solución de encurtido difícilmente conlleva ninguna mejora de la acción antimicrobiana contra la *Salmonella typhimurium* en comparación con la solución de encurtido sin glicina.

[0015] El documento EP.1290955 divulga ciertas aplicaciones alimenticias con mezclas de conservantes, alguna de las cuales contienen glicina. La figura 22 representa los resultados de la única prueba donde *E. coli* se especifica como un microorganismo de prueba. La prueba particular fue hecha en repollo triturado envasado en una bolsa de plástico, almacenado durante 24 horas a 30 °C.

[0016] El documento JP 04-295431 divulga que la nisina y la glicina se evalúan en cuanto a actividad bactericida contra *S. typhimurium* en tampón citrato a 37°C. El uso en alimentos no es mencionado. La glicina sola parece no proporcionar ninguna reducción sustancial en el recuento de células viables.

[0017] Tsutsumi and Lee (J. of Japanese Society of Food Science and Technology 35 (1988), 545-551 ; XP002315135) revelan las pruebas del efecto combinado de la pasteurización y la adición de glicina, etanol y cloruro sódico en el crecimiento de por ejemplo *S. typhimurium* y *E. coli* en el caldo nutritivo. No se evalúa ningún producto alimenticio.

[0018] El documento EP 1366664 divulga la esterilización por inmersión de brotes de judía utilizando una solución de un quelato de glicina con óxido de calcio. La cantidad de bacterias del grupo de *E. coli* fue medida en los brotes después de un periodo de inmersión de 30 o 60 minutos.

[0019] Se encontraron algunas publicaciones que describen el efecto antibacteriano de la glicina, pero no queda claro en la publicación qué bacterias fueron combatidas:

El documento JP 08-154640 A divulga el uso de un agente antimicrobiano en alimentos para mejorar la conservación donde dicho agente contiene un 1-30 % en peso de ácido acético, preferiblemente con un 1-30 % en peso de glicina y preferiblemente un 0.05-1 % en peso de calcio horneado. El Gyoza (bollo relleno de carne) y Harumaki (masa de huevo envuelto alrededor de verduras desmenuzadas, carne etc. en un rollo pequeño y frito en grasa profunda) se han descrito como aplicaciones alimenticias en las que se utiliza dicho agente antibacteriano. La publicación no se refiere a bacterias específicas contra las que dicho agente es eficaz.

El documento JP 03 290174 A describe la incorporación de un alimento no calentado o calentado a bajas temperaturas con glicina y además un ácido orgánico tal como ácido acético, ajustado a pH 5,5 o menos y que es consecuentemente colocado en un contenedor para ser sometido a tratamientos de alta presión por un medio de presión acuosa para la esterilización. La publicación no se refiere a las bacterias patógenas del alimento contra las que la glicina es eficaz. La publicación no se refiere al alimento específico y/o aplicaciones de bebida en las que la glicina es evaluada.

[0020] Otra publicación describe el uso de glicina contra los mohos y levadura y coliforme: International Food Information, XP002315132, Hozova et al., "Prolonging the storage life of foods by non-traditional preservation methods", Slovak. Inst. Of Tech., Checoslovaquia, 1989; este artículo describe el efecto de la glicina en la prolongación del tiempo máximo de almacenamiento de productos conservados. Se utilizó estofado húngaro de cerdo crudo como producto de prueba. Todas las muestras fueron procesadas por tratamiento térmico. Los resultados muestran que la adición de glicina tiene un efecto en el crecimiento de mohos y levaduras que están presentes en el cerdo crudo que ha sido termotratado posteriormente y pasteurizado. La parte de los microorganismos que implica microorganismos coliformes y microorganismos aeróbicos formadores de esporas no se ve influenciada significativamente por la presencia de glicina.

[0021] La presente invención se refiere al uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 como agentes antibacterianos contra los patógenos bacterianos gram-negativos *Escherichia Coli*, *Enterobacter Sakazakii*, *Salmonella*, y *Campylobacter* en alimentos refrigerados o bebidas refrigeradas con la condición de que además de dicha glicina y/o derivado de glicina no se utilice ninguna macromolécula conteniendo heterosacáridos, ni se utilice 1,5-D-anhidrofructosa como agente antibacteriano en dichos alimentos y bebidas.

[0022] Mientras que en algunos documentos de la técnica se mencionan compuestos de glicina complicados y se declara que tienen propiedades antibacterianas, la presente invención se refiere al uso de compuestos "simples" de glicina tales como glicina y sales alcalinas/alcalinotérreas de glicina, glicinato de amonio y ésteres de glicina y alcoholes C1-C8. Con ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 se entiende: ésteres de glicina y alcoholes que contienen desde 1 hasta 8 átomos de carbono. Dichas cadenas de átomos de carbono pueden estar ramificadas o rectas. Ejemplos de glicinatos alcalinos son glicinato de sodio y glicinato de potasio; ejemplos de glicinatos alcalinotérreos son glicinato de magnesio y glicinato de calcio; ejemplos de ésteres de glicinato de alcoholes C1-C8 son glicinato de metilo, glicinato de etilo, glicinato de butilo y glicinato de hexilo. El glicinato de sodio por ejemplo resultó ser muy eficaz como agente antibacteriano para los patógenos bacterianos gram-negativos según la invención.

[0023] Mientras que experimentos en los que aditivos tales como ácidos, conservantes (p. ej. sorbatos) etcétera se adicionaron a un caldo se utilizan frecuentemente como una predicción de su efecto en un alimento y bebida reales, hemos encontrado que el efecto de la glicina en un caldo no da ninguna indicación de su efecto en alimentos y productos de bebida reales. El medio presente en alimentos y bebidas reales comprende proteínas y grasas, tiene una movilidad específica de los líquidos presentes, puede existir adsorción o incorporación de la glicina en el producto alimenticio. Sin estar comprometido con una teoría, se piensa que el hecho de que glicina sea un aminoácido y un bloque de construcción natural de alimentos y productos de bebida y esté presente abundantemente en constituyentes alimenticios, causa que éste interfiera de un modo bastante impredecible en productos alimenticios y de bebida reales.

[0024] En los documentos US 6200619, EP 1252827A1 y US 4820520 se mencionan los usos combinados de agentes antibacterianos complicados tales como macromoléculas conteniendo heterosacáridos y 1,5-D-anhidrofructosa y glicina. La

presente invención excluye el uso de estos agentes antibacterianos complicados.

[0025] Hemos encontrado que la glicina y/o las sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 pueden utilizarse eficazmente como agente antibacteriano exclusivo en concentraciones que son todavía aceptables en los productos alimenticios y de bebida sin afectar negativamente a la calidad del producto respecto por ejemplo al sabor y la textura. Hemos encontrado que la glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 se pueden usar como agente antibacteriano exclusivo con fines de conservación y además para prevenir las consecuencias de la contaminación de los productos alimenticios y productos de bebida como la intoxicación por bacterias patógenas debido a temperaturas indebidas y/o contaminación. No se necesita añadir un agente antibacteriano auxiliar para conseguir el efecto de conservación deseado a diferencia de los resultados descritos en las patentes mencionadas anteriormente. Este tiene como resultado no sólo costes inferiores de material si no también una calidad de producto más alta. Los productos se obtienen con menos ingredientes auxiliares adicionados mientras que se mantiene e incluso se mejora la calidad y tiempo de conservación de dichos productos. Además, esto está de acuerdo con la legislación que aspira a la minimización del uso de aditivos en aplicaciones alimenticias y de bebida. Además, los productos obtenidos están también protegidos contra las consecuencias de temperaturas indebidas o contaminación.

[0026] Hemos encontrado que la glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 se pueden usar idóneamente en alimentos refrigerados y productos de bebida. Se consideran alimentos refrigerados y productos de bebida aquellos alimentos y productos de bebida que requieren ser mantenidos a baja temperatura para aumentar la estabilidad microbiana antes del (preparación para) consumo. Esto es normalmente a una temperatura entre 4 y 7 °C con picos ocasionales a 12 °C. El uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 tiene ventajas específicas en productos refrigerados, ya que frecuentemente no se desea aplicar otros métodos para la conservación de este tipo de productos debido al deterioro de la calidad del producto (gusto, textura, sabor). El uso de glicina y sus derivados según la invención es conveniente para el control de Salmonella en productos refrigerados ya que es bien reconocido que la Salmonella permanece viable durante periodos largos de tiempo en alimentos congelados y que la supervivencia mejora conforme aumenta la temperatura de almacenamiento. Además, los productos refrigerados son especialmente sensibles a las temperaturas indebidas y/o a contaminación debido a la manipulación inapropiada de los productos. Una temperatura indebida se puede dar durante el transporte del producto del proveedor al depósito (p. ej. enfriamiento inapropiado del contenedor de camión) pero frecuentemente también ocurre durante el transporte del producto del depósito al hogar. Incluso en el caso de un aumento de temperatura incidental del producto refrigerado, la seguridad alimenticia se asegura cuando se aplica la glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8. Ejemplos de tales productos refrigerados son los productos cárnicos, (curados y/o sin curar, frescos y/o cocinados), ensaladas y otros productos vegetales, bebidas y productos lácteos, alimentos semi-procesados, platos precocinados como por ejemplo comidas listas para comer y productos alimenticios deshidratados.

[0027] Se ha encontrado que la glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 son muy eficaces como agentes antibacterianos en las aplicaciones de carne incluyendo pescado y aves de corral, tanto carne sin curar y curada y carne fresca. Los patógenos bacterianos gram-negativos *Salmonella*, *Escherichia Coli*, *enterobacter sakazakii* y *Campylobacter* y en particular contra la *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* se encuentran frecuentemente en estos tipos de aplicaciones. Las bacterias mencionadas anteriormente son relativamente insensibles al control del pH, de la actividad del agua o la adición de nitrito. Se debería adicionar ácido, sal o nitrito en concentraciones altas para conseguir algún efecto en el crecimiento de bacterias, pero estas altas concentraciones afectan negativamente a la calidad de producto en cuanto a un sabor malo y una pérdida de textura de la carne. Se encuentra que el uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 como agentes antibacterianos es eficaz contra dichas bacterias sin pérdida de sabor y sin pérdida de textura. Además, los métodos mencionados anteriormente y técnicas de tratamiento alternativo como por ejemplo tratamiento térmico para la conservación no previenen la intoxicación como consecuencia de temperaturas indebidas y/o contaminación.

[0028] Ejemplos de carne fresca son carne bovina, filete de carne bovina, rabo de buey, pescuezo, costillas cortas, asados de carne bovina, carne de estofado, costillas de carne bovina, cerdo, chuletas de cerdo, bistecs de cerdo, costeletas, asados de cerdo, cordero, carne de ternero, caza, cabra, filete americano, filete tártaro, sushi, o carpaccio, pollo, pavo, pato y otras aves de corral. Algunas de estas aplicaciones de carne fresca se deben consumir crudas, mientras que otras se consumen después de aplicar o aplicar parcialmente un tratamiento térmico, intencionalmente aplicado como por ejemplo para un bistec medio hecho o involuntariamente aplicado debido a una preparación inapropiada o manipulación inapropiada de los productos alimenticios. El uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 como agentes antibacterianos garantiza la seguridad alimenticia incluso en el caso de tratamiento térmico parcial.

[0029] La actividad antibacteriana no sólo incluye la prevención de actividad bacteriostática para prevenir además el crecimiento bacteriano si no que también incluye alguna actividad bactericida de bacterias que en realidad reduce el número bacteriano.

5 [0030] Se encontró que concentraciones de glicina de 0,5 a 3 % en peso en base al peso total de producto eran eficaces como agente antibacteriano para *E. Coli* y se encontró que concentraciones de glicina de 0,5 a 1,5 % en peso en base al peso total de producto eran adecuadas para asegurar el sabor del producto.

10 [0031] Se encontró que concentraciones de glicina de 0,5 a 3 % en peso en base al peso total de producto eran eficaces como agente antibacteriano para *E. Sakazakii* y se encontró que concentraciones de glicina de 0,5 a 1,5 % en peso en base al peso total de producto eran adecuadas para asegurar el sabor del producto.

15 [0032] Se encontró que concentraciones de glicina de 0,2 a 3 % en peso en base al peso total de producto mostraban actividad antibacteriana contra la *Salmonella*, y en particular *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. Se encontró que concentraciones de glicina de 0.2 a 1.5 % en peso en base al peso total del producto eran adecuadas para asegurar el sabor del producto.

20 [0033] Las pruebas han mostrado que una concentración de aproximadamente 1 a 1,5 % en peso de glicina en base al peso total de producto comienza a afectar el sabor de dicho producto. En dicho producto ningún agente antibacteriano auxiliar y ningún otro ingrediente que afecte al sabor estaba presente. Una concentración de glicina por encima de un 1,5 % en peso en base al peso total del producto da un sabor dulce el producto. Dependiendo del tipo de producto este sabor dulce es aceptable o no. En bebidas dulces por ejemplo el efecto edulcorante de la glicina no se considera un problema. Por consiguiente la máxima concentración de glicina aceptable en cuanto a no afectar negativamente al sabor se puede aumentar hasta concentraciones por encima de 1,5 % en peso de glicina en base al peso total del producto. Además, 25 dependiendo de la presencia de otros ingredientes que afectan al sabor del producto como por ejemplo agentes enmascarantes, la concentración máxima de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 también puede ser aumentada hasta un punto en el que el sabor comienza a estar afectado negativamente por la presencia de glicina y/o dicho derivado de glicina. Se descubrió que el uso de glicina y/o sus derivados según la invención como agente antibacteriano en alimentos refrigerados y bebidas refrigeradas se puede 30 combinar con uno o más ácidos orgánicos y/o uno o más de sus sales como por ejemplo ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético. El ácido orgánico y/o su sal se puede aplicar solo con glicina y/o derivados según la invención o se puede aplicar en mezclas de ácidos orgánicos y/o uno o más de sus sales como por ejemplo una mezcla de lactato de potasio y diacetato de sodio en combinación con glicina y/o sus derivados según la invención.

35 [0034] Dichas combinaciones y/o mezclas de por ejemplo ácido láctico y/o sus derivados según la invención suponen un agente antibacteriano con varias propiedades funcionales además de la actividad antibacteriana. Ejemplos de estas propiedades funcionales adicionadas son el enriquecimiento (mineral) o fortificación en general que tiene diferentes beneficios positivos para la salud, mejora de sabor, conservación de color y regulación del pH. Ejemplos de una sal de ácido 40 láctico son el lactato sódico, lactato de calcio, lactato de potasio, lactato ferroso, lactato de zinc, lactato de magnesio.

[0035] Se descubrió que el uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 como agente antibacteriano en alimentos refrigerados y bebidas refrigeradas se puede combinar con ácido láctico y/o su sal en concentraciones de 0,2 a 3 % en peso en base a dichos alimentos y bebidas.

45 [0036] En algunos casos es ventajoso combinar el uso de glicina y/o sus derivados según la invención con una o varias de las técnicas de tratamiento para la conservación mencionadas anteriormente como por ejemplo el tratamiento térmico, la irradiación y/o el tratamiento de alta presión. La presente invención es posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos, que no deben ser interpretados como limitativos.

## 50 Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

### 55 A. el efecto inhibidor de glicina en la *Listeria monocitogenes* en un caldo

[0037] Se preparó un cultivo de *Listeria monocitogenes* (ATCC 7644). El cultivo fue transferido diariamente en tubos con tapa de rosca (100 x 16 mm) que contienen 10 ml caldo infusión cerebro-corazón (Oxoid ® CM0225, Basingstoke, Reino Unido). Los cultivos fueron incubados a 30 °C sin agitación.

### 60 Preparación del caldo



[0038] El caldo infusión cerebro-corazón se preparó con cantidades crecientes de glicina (ex Sigma ® G 7126). La concentración de glicina varía de 0 a 400 mM en pasos de 50 mM. Esto tuvo como resultado 90 medios diferentes. El pH del medio se encontraba en el rango de 7 a 7,4 dependiendo de la composición y no se ajustó. Se prepararon los medios en cantidades de 10 ml y se esterilizaron por filtración (Membranas de nitrato de celulosa Sartorius ® de 0.45 µm de diámetro de poro). Se transfirieron 300 µl de cada medio a un panel de una placa estéril de 100 pocillos Bioscreen honeycombe. Las placas de pocillos completas fueron congeladas a -20 °C, selladas al vacío en las bolsas de polietileno y finalmente almacenadas a -20 °C hasta un posterior uso.

#### Experimentos de crecimiento Bioscreen

[0039] Las placas de pocillos se descongelaron rápidamente y se inocularon posteriormente con 5 µl de un cultivo que se creció durante toda la noche en el caldo infusión cerebro-corazón utilizando un dispensador repetitivo de 5 µl Hamilton estéril (Hamilton ®, Bonaduz, Suiza). Los índices de crecimiento se determinaron con un Bioscreen C (Labsystems ®, Helsinki, Finlandia) que mide cinéticamente el desarrollo de la turbidez por fotometría vertical. Las placas se incubaron durante 16 - 24 horas a 37 °C, la densidad óptica de los cultivos fue medida cada 30 minutos a 420 - 580 nm utilizando un filtro de banda amplia.

[0040] El Bioscreen mide la densidad óptica de los cultivos a intervalos de tiempo fijos. A partir de estos datos el Bioscreen calcula los índices máximos de crecimiento específico. En la figura 1, se representa el efecto de las concentraciones crecientes de glicina en el índice máximo de crecimiento específico de *Listeria monocitogenes*. Los datos muestran que el valor P0,5 (la concentración que causa la mitad de la inhibición máxima) de *Listeria monocitogenes* para glicina fue 0,20. Así, en un caldo la glicina muestra un efecto inhibitor para *Listeria monocitogenes*.

#### **B1. El efecto inhibitor de glicina en la *Listeria monocitogenes* en salchichas cocinadas A**

[0041] Se prepararon lotes que consisten en tres salchichas cocinadas, circa 500 g cada una. La composición básica de las salchichas cocinadas A fue la que se muestra a continuación:

##### Composición básica salchichas cocinadas A

Ingrediente	%
Carne bovina (10% grasa)	7,00
Cerdo (8% grasa)	0,20
Tocino (40% grasa)	69,00
Agua/hielo	9,00
Sal colorado	2,00
Especias	0,35
Fosfato	0,35
Ascorbato de sodio	0,05
Glutamato sódico	0,05
Almidón de trigo	2,00

Las salchichas se almacenaron durante 1 día a 0 °C hasta el posterior examen.

[0042] Las salchichas cocinadas se colocaron en el bol de un cuchillo de laboratorio desinfectado (Scharf®), se cortaron en trozos pequeños y se inocularon con una suspensión de las bacterias mencionadas *Listeria monocitogenes*, tipo 4a (ATCC 19114) a un nivel final de aproximadamente  $10^2$  y  $10^4$  por g de producto respectivamente. Después de la inoculación, las salchichas se desmenuzaron y se homogeneizaron durante 2 minutos. Posteriormente, el producto desmenuzado se dividió en porciones de 40 g y se empaquetó al vacío en bolsas de plástico con una permeabilidad al oxígeno inferior a  $5.0 \times 10^{-11}$  m<sup>3</sup> · m<sup>-2</sup> · Pa<sup>-1</sup> · día<sup>-1</sup> a 20°C. Los paquetes obtenidos fueron almacenados a 7° C durante hasta 21 días. Durante el experimento se registraron las temperaturas utilizando un registrador de datos.

[0043] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron muestras de salchichas cocinadas desmenuzadas de cada lote por duplicado para los análisis microbiológicos. De cada embalaje individual se tomó asepticamente una muestra de 20 g, se diluyó en 10 veces en solución salina de peptona fisiológica (PPS) y se homogeneizó en un homogeneizador stomacher durante 1 minuto. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS. Los números de *L. monocitogenes* fueron determinados utilizando agar Palcam (Oxoid ® CM877 y SR150). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 días

[0044] Los resultados de los análisis microbiológicos de las salchichas cocinadas A durante el almacenamiento envasadas a vacío a 7°C se dan en la TABLA I.

TABLA I Resultados del recuento de *L. monocitogenes* en salchichas cocinadas envasadas a vacío con aditivos de glicina durante el almacenamiento a 7°C

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante						
	0 Días	4 Días	7 Días	10 Días	14 Días	17 Días	21 Días
Control (sin aditivo)	4,71	4,79	5,30	6,17	7,36	6,26	6,72
	4,64	4,84	5,18	6,21	7,19	6,90	7,17
1,0 % en peso de glicina	4,53	4,78	5,28	5,75	7,18	6,91	7,21
	4,49	4,73	5,12	6,12	6,86	7,00	7,01

- 5 [0045] La adición de un 1 % en peso de glicina a salchichas cocinadas no tiene un efecto inhibitor en la *Listeria monocitogenes*, mientras que se encontró este efecto en un caldo.

## B2 El efecto inhibitor de glicina en la *Listeria monocitogenes* en salchichas cocinadas B

- 10 [0046] Los mismos experimentos que se describen en B1 fueron conducidos en salchichas con una composición diferente: salchichas B. La composición básica de las salchichas cocinadas B fue la que se muestra a continuación:

Composición básica salchichas cocinadas B	
Ingrediente	%
Carne bovina (20% de grasa)	7
Cerdo (8% grasa)	10,2
Tocino (30% de grasa)	69
Agua/hielo	9,00
Colorozo	2,0
Especias	0,35
Fosfato	0,35
Ascorbato de sodio	0,05
Glutamato sódico	0,05
Almidón de trigo	2,00

- 15 [0047] Los resultados de los análisis microbiológicos de las salchichas cocinadas B durante el almacenamiento envasadas a vacío a 7°C se dan en la TABLA II.

TABLA II Resultados del recuento de *L. monocitogenes* en las salchichas cocinadas B envasadas a vacío con aditivo de glicina durante el almacenamiento a 7°C

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante						
	0 Días	7 Días	12 Días	18 Días	27 Días	41 Días	60 Días
Control (sin aditivo)	2,32	2,34	2,78	3,52	4,51	6,74	8,81
	2,20	2,49	2,77	3,69	4,77	6,53	8,72
1,0 % en peso de glicina	2,36	2,45	2,52	3,10	4,20	6,40	8,15
	2,28	2,43	2,63	2,98	4,36	6,45	8,15

- [0048] De nuevo, la adición de un 1 % en peso de glicina a salchichas cocinadas no tiene un efecto inhibitor en *Listeria monocitogenes*, mientras que este efecto se encontró en un caldo.

## Ejemplo 2

- [0049] Se descongeló carne picada congelada y se dividió en porciones de 1,7 kg y se mezcló con diferentes concentraciones de glicina, 0,5 % en peso, 1,0 % en peso y 1,5 % en peso en base al peso total de la porción de carne. Posteriormente la carne se desmenuzó una vez a través de una placa de 6 mm en un picador de carne desinfectado.

- [0050] Cada porción (1,5 kg) fue inoculada con una suspensión de *E. Coli* O157:H7 (ATCC 43895) a un nivel final de aproximadamente 104 ufc por g de producto. Antes de la inoculación del cultivo con *E. Coli* O157:H7, mantenido en agar inclinado, se pre-cultivó dos veces en infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid® CM 225) durante 24 horas a 30 °Celsius. El cultivo crecido se diluyó en solución salina de peptona fisiológica (PPS) para contener el nivel deseado de inoculación. La



carne inoculada fue desmenuzada dos veces a través de una placa de 3 mm después de la cual la carne molida se envasó en porciones de 80 g en una atmósfera modificada (MAP) que consiste en 70% O<sub>2</sub> y 30% CO<sub>2</sub> con un volumen de gas de aproximadamente 120 ml. Todos los paquetes se almacenaron a 12 °Celsius durante 12 días. La temperatura durante el experimento fue registrada utilizando un registrador de datos.

[0051] Se tomaron muestras por duplicado de cada porción de carne picada para los análisis microbiológicos a intervalos de tiempo apropiados. Se tomó asépticamente una muestra de 20 g de cada porción. La muestra se diluyó en 10 veces en solución salina de peptona fisiológica (PPS) y se homogeneizó en un homogeneizador stomacher durante 1 minuto. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS. Los números de bacterias *E. Coli* O157:H7 se determinaron utilizando agar Sorbitol MacConkey (SMAC, Oxoid ® CM813) tal y como se menciona en NEN-ISO 16649-2:2001. Las placas se incubaron a 42 °Celsius durante 1 día.

[0052] La TABLA III muestra los resultados (por duplicado) de los análisis microbiológicos de carne picada inoculada con *E. Coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina adicionada durante el almacenamiento en MAP a 12 °Celsius.

TABLA III: resultados de las cuentas bacterianas de *E. Coli* O157:H7 en carne picada con concentraciones de glicina diferentes en MAP durante almacenamiento a 12 °Celsius.

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

[0053] Los resultados muestran que una concentración de un 0,5 % en peso de glicina en base al peso total de producto tiene actividad antibacteriana contra el *E. Coli* O157:H7. Concentraciones de un 1,0 % en peso de glicina en base al peso total de producto muestran una clara actividad bactericida contra *E. Coli* O157:H7 e incluso reduce el número bacteriano de 4 a 2 log ufc por g de producto en 7 días de almacenamiento.

#### Ejemplo 3

[0054] Un cultivo de *E. Coli* O157:H7 (ATCC:700728) se pre-cultivó en caldo BHI (infusión de cerebro-corazón, Oxoid ® CM225) y se incubó durante 24 h. a 30 °C. El cultivo se diluyó en 50 veces en la solución fisiológica de peptona (PPS).

[0055] 3000 gramos de carne picada irradiada se dividieron en 3 muestras y se mezclaron íntegramente con glicina para preparar muestras con 0, 1,0, y 1,5 % en peso de glicina, respectivamente. Posteriormente, cada muestra fue dividida en 30 porciones de 25 gramos. Las porciones se colocaron en una bolsa estéril (Interscience ® bagfilters, 400 ml, Modelo P) y se inocularon con el caldo de cultivo diluido a un nivel final de aproximadamente 10<sup>5</sup> ufc/gr de producto (250 µl cultivo/PPS). El cultivo y las muestras se mezclaron íntegramente a mano. Las bolsas se sellaron directamente después bajo condiciones aeróbicas. Finalmente las muestras fueron incubadas a 8 °C.

[0056] A intervalos de tiempo apropiados, porciones de cada concentración se diluyeron 2 veces en PPS y se homogeneizaron en un homogeneizador stomacher (Lab Blender ® 400) durante 1 minuto. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS.

[0057] Las diluciones se produjeron en "Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa" (Oxoid ® CM485) y se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

[0058] En la TABLA IV se compilan los resultados de los análisis microbiológicos de carne picada irradiada inoculada con *E. Coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina adicionadas durante el almacenamiento a 8 °Celsius.

TABLA IV: Resultados de cuentas bacterianas de *E. Coli* O157:H7 en carne picada irradiada con concentraciones de glicina diferentes durante el almacenamiento a 8 °Celsius.

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante			
	0 Días	3 Días	6 Días	13 Días
Control (sin aditivo)	5.5	5.6	6.2	6.5
1.0 % en peso de glicina	5.4	5.2	4.5	5.5
1.5 % en peso de glicina	5.4	4.1	3.2	0.0

[0059] Se observó un efecto inhibitor pequeño con la adición de un 1,0 % de glicina, mientras que la adición de un 1,5 % de glicina dio un efecto bactericida.

#### 5 Ejemplo 4

[0060] Carne fresca de paleta de cerdo se desmenuzó una vez a través de una placa de 12 mm en un picador de carne desinfectado y se homogeneiza manualmente. La carne de cerdo se dividió en 7 porciones de 2,5 kg y se mezcló con concentraciones diferentes de glicina, 0,5 %, 1,0 % y 1,5 % en peso en base al peso total de la porción de carne.

[0061] Posteriormente la carne se desmenuzó una vez a través de una placa de 6 mm. Cada lote (2,3 kg) se inoculó con 10 ml de una suspensión de *E. Coli* O157:H7 (ATCC 43895) a un nivel final de aproximadamente  $10^4$  ufc por g producto. Antes de la inoculación del cultivo, mantenido en agar inclinado, se pre-cultivó dos veces en infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid® CM225) durante 24 horas a 30°C. El cultivo crecido completo se diluyó en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener el nivel deseado.

[0062] La carne inoculada se desmenuzó nuevamente dos veces a través de una placa 3 mm después de la cual la carne de cerdo picada fue envasada en 24 porciones de 80 g en una atmósfera modificada (MAP), consistiendo en 80% O<sub>2</sub> y 20% CO<sub>2</sub> con un volumen de gas de aproximadamente 120 ml. Posteriormente 9 paquetes se almacenaron a 12°C durante hasta 12 días. Durante el experimento las temperaturas fueron registradas utilizando un registrador de datos.

[0063] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron muestras de carne picada de cerdo de cada lote por duplicado para análisis microbiológicos. Para cada envase individual se tomó una muestra de 20 g asépticamente, se diluyó en 10 veces en (PPS) y se homogeneizó en un homogeneizador stomacher durante 1 minuto. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS. Los números de bacterias *E. Coli* O157:H7 se determinaron utilizando CT-SMAC (Agar MacConkey con Sorbitol, Oxoid® CM813 y suplemento Cefixime-Tellurite, Oxoid® SR172) tal y como se menciona en NEN-ISO 16649-2:2001. Las placas se incubaron a 42°C durante 1 día.

[0064] La TABLA V muestra los resultados (por duplicado) de los análisis microbiológicos de carne picada de cerdo inoculada con *E. Coli* O157:H7 y con tres concentraciones diferentes de glicina adicionada durante el almacenamiento a 12 °C.

TABLA V: Resultados de cuentas bacterianas de *E. Coli* O157:H7 en la carne picada de cerdo con concentraciones de glicina diferentes en MAP durante el almacenamiento a 12 °Celsius.

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

[0065] Después de 5 días de almacenamiento a 12°C se notaron diferencias menores en la apariencia de la carne picada de cerdo. Después de 7 días muestras de carne picada de cerdo sin aditivos y con cantidades inferiores de glicina mostraron un color gris. Después de 10 días se juzgó que todos productos eran grises.

#### 40 Ejemplo 5

[0066] El efecto de un 0,5, 1,0, 1,5 % (w/t) de glicina fue evaluado en *E. Coli* O157:H7 en leche esterilizada. Un cultivo *E. Coli*

O157:H7 (ATCC 700728) se pre-cultivó dos veces en caldo BHI (Oxoid® CM225) y se incubó durante 24 h a 30 °C. El cultivo se diluyó en 10 veces por duplicado en solución fisiológica de peptona (PPS).

[0067] Se prepararon 4 muestras de 250 gramos mezclando 0, 0,5, 1,0, 1,5 % (w/t) de glicina con leche esterilizada (semidesnatada Landhof®). Las muestras se colocaron en una bolsa de vacío (Hevel®, S.E. plus 0,1, 300 x150 mm). 0,5 ml de los medios de cultivo diluido se añadieron a las muestras. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador stomacher durante 1 minuto (Lab Blender ® 400). Cada muestra se dividió en 8 porciones de 5 ml y se colocaron en un tubo estéril (150 x 17/18 mm). Finalmente, los tubos fueron almacenados a 11 °C durante varios días.

[0068] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron 2 tubos de cada muestra para los análisis microbiológicos. Cada tubo se mezcló bien usando un vortex (Scientific Industries®, Vortex Genie 2). Se realizaron diluciones en serie (en 10 veces) en PPS.

[0069] La leche y las diluciones en serie se portaron en placas VRBG (Oxoid®, CM485). Las cuentas de colonias de E.Coli se hicieron después de 24 horas de incubación a una temperatura de 30 °C.

[0070] En la TABLA VI se da el resultado de las cuentas de placa de *E. Coli* O157:H7 (agar VRBG) inoculada en la leche esterilizada con concentraciones diferentes de glicina.

TABLA VI: cuenta de placa de *E. Coli* O157:H7 (VRBG agar) inoculado en la leche esterilizada con concentraciones diferentes de glicina a 11 °C

	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante			
concentración	0 Días	2 Días	6 Días	16 Días
Control (0%)	4,18	5,71	7,78	8,37
1% Gly	4,20	5,06	3,84	5,97
1,5% Gly	4,15	0,00	0,00	0,00

[0071] Los resultados muestran que *E.Coli* se controla eficazmente en la leche esterilizada cuando se añade al menos un 1 % en peso de glicina.

#### Ejemplo 6

[0072] En este experimento se realiza un estudio de inoculación con *E. Coli* O157:H7 en un "plato listo para tomar" comercial (Tagliatelle con salsa carbonara) comprado a un restaurante de comida para llevar.

[0073] Cuatro platos de pasta listos para tomar (Tagliatelle con salsa carbonara) se compraron en un restaurante de comida para llevar. El pH y Aw (actividad del agua) medidos del producto fueron 5,93 y 0,996 respectivamente. Se utilizó glicina de calidad alimenticia como agente antibacteriano.

[0074] Un cultivo de *E. Coli* O157:H7 (ATCC 700728) se pre-cultivó dos veces en caldo BHI (infusión de cerebro-corazón, Oxoid® CM225) y se incubó durante 24 h a 30 °C. Los cultivos se diluyeron en 10 veces por duplicado y en 11 veces en una ocasión en solución fisiológica de peptona (PPS).

[0075] La pasta (1200 gramos) se congeló durante 3 horas a -20 °C y se homogeneizó después con una mezcladora de cocina (Moulinex®, Ovatio 3). La pasta se dividió en muestras y se mezcló con glicina íntegramente para preparar muestras de 240 g cada una con 0,0, 0,5, 1,0, y 1,5 % en peso de glicina respectivamente.

[0076] Cada muestra se esterilizó durante 20 minutos a 121 °C y se enfrió después hasta 11 °C. Posteriormente, cada muestra se dividió en 10 porciones de 20 gramos y se colocaron en bolsas estériles (Interscience® bagfilters, 400 ml, Model P).

[0077] Las porciones fueron inoculadas con caldo de cultivo diluido (1100 veces) a un nivel final de aproximadamente 10<sup>4</sup> ufc/gramo producto (~200 µl PPS). Las porciones se sellaron aeróbicamente y se almacenaron a 11 °C durante hasta 11 días.

[0078] De cada concentración se diluyeron dos porciones en dos veces en PPS y se homogeneizaron en un stomacher (Lab Blender® 400) durante 1 minuto. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS.

[0079] Las diluciones se produjeron en placas de "Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa" (Oxoid®, CM485) y se incubaron durante

24 horas a 30 °C.

[0080] Los resultados de los análisis microbiológicos de *E. Coli* O157:H7 en Tagliatelle con salsa carbonara a 11 °C se dan en la TABLA VII.

5

TABLA VII: cuentas en placa de *E. Coli* O157:H7 inoculada en un "plato listo para tomar" preparado con concentraciones diferentes de glicina a 11 °C.

	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante				
concentración	0 Días	1 Día	4 Días	7 Días	11 Días
Control (0%)	3,96	4,24	7,12	7,90	9,35
0,5% Gly	4,06	4,21	6,96	7,95	8,69
1,0% Gly	4,13	4,07	5,39	6,11	5,78
1,5 % Gly	4,10	3,96	5,27	3,13	0,00

10 [0081] Se midió un efecto bacteriostático de glicina a una concentración de un 1,0% (p/p) de glicina. La glicina a una concentración de un 1,5% (p/p) dio aún un efecto de bactericida.

Ejemplo 7

15 [0082] Seis lotes de fórmula infantil en polvo, circa 1500 g cada una, se almacenaron durante 4 días a temperatura ambiente antes de un examen posterior. Para cada lote de fórmula infantil en polvo se adicionaron cantidades específicas de glicina para formar muestras con 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, y 3,0 % en peso de glicina respectivamente. Las muestras se inocularon con una mezcla de dos cepas de *Enterobacter sakazakii* (ATCC 29544 (LMG 5740) y LMG 2759). Antes de la inoculación el cultivo, mantenido en agar inclinado en el frigorífico, se pre-cultivó dos veces en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid  
20 ® CM225) durante 24 horas a 30°C. El cultivo crecido completo se diluyó en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener una suspensión al nivel deseado.

25 [0083] Una muestra de fórmula infantil (aprox. 1000 ml) de cada composición fue inoculada con 10 ml de suspensión de *E. sakazakii* a un nivel final de aproximadamente  $10^3$  ufc por g de producto. Después de la inoculación, la fórmula infantil se homogeneizó por agitación. Posteriormente, el producto fue dividido en 12 porciones de 50 ml en las bandejas de muestra de plástico (180 ml) con una capa de aire suficiente para alegar condiciones aeróbicas después del cierre. Las bandejas de muestra obtenidas fueron almacenadas a 12°C durante hasta 14 días. Durante el experimento se registraron las temperaturas en el almacenamiento.

30 [0084] A intervalos de tiempo apropiados, muestras de fórmula infantil de cada lote fueron tomadas por duplicado para análisis microbiológicos. Cada bandeja de muestra simple fue homogeneizada por agitación. Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS.

Los números de *E. sakazakii* se determinaron utilizando "Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBGA, Oxoid ® CM485) tal y como se menciona en ISO 5552:1997. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 día.

35 Los resultados de los análisis microbiológicos de la fórmula infantil reconstituida con concentraciones diferentes de glicina durante el almacenamiento aeróbicamente envasado a 12°C se dan en la TABLA VIII.

TABLA VIII: Resultados de cuentas de *E. sakazakii* de una fórmula de bebé reconstituida con concentraciones diferentes de glicina durante el almacenamiento aeróbico a 12°C

40

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante				
	0 Días	3 Días	5 Días	7 Días	14 Días
Control (sin aditivo)	2,76	3,23	5,12	7,40	8,28
	2,92	3,15	5,30	7,28	8,24
0,5 % en peso de glicina	2,93	1,85	1,95	3,38	5,79
	2,74	1,85	2,47	3,45	5,23
1,0 % en peso de glicina	2,95	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5 % en peso de glicina	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,65	0,00	0,00	0,00	0,00
3,0 % en peso de glicina	2,59	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00

[0085] Los resultados muestran que *E. sakazakii* se inhibieron en la fórmula infantil que contiene glicina empezando en una cantidad de 0,5%. Una inactivación de *E. sakazakii* a niveles no detectables fue observada a cantidades de un 1% o más altas.

#### Ejemplo 8

[0086] Se prepararon seis lotes que consisten en tres salchichas de pollo cocinadas, circa 500 g cada una, con la siguiente composición:

Composición básica de la salchicha cocinada	
Ingrediente	%
Pechuga de pollo (1% de grasa)	91,15
Fosfato	0,35
Sal (NaCl)	1,50
Agua/hielo	7,00

[0087] Cada salchicha de pollo cocinada fue inoculada con un cóctel de *Salmonella typhimurium* (M90003246/0550). Antes de la inoculación de los cultivos, mantenido en agar inclinado, se pre-cultivó dos veces en infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid® CM225) durante 24 horas a 30 °C. Los cultivos crecidos completos se diluyeron en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener una mezcla a nivel deseado. Dos salchichas (aprox. 1000 g) de cada composición se colocaron en el bol de un cuchillo de laboratorio desinfectado (Scharf®), se cortaron en trozos pequeños y se inocularon con 10 ml de una suspensión de *L. monocitogens* y *Salmonella* a un nivel final de aproximadamente  $10^2$  o  $10^3$  por g de producto respectivamente. Después de la inoculación, las salchichas de pollo cocinadas se desmenuzaron y homogeneizaron durante 2 minutos. Posteriormente, el producto desmenuzado se dividió en porciones de 40 g y se empaquetó al vacío en bolsas de plástico con una permeabilidad de oxígeno inferior a  $5.0 \times 10^{-11} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  a 20°C. Los paquetes obtenidos se almacenaron a 12°C durante hasta 21 días. Durante el experimento se registraron las temperaturas utilizando un registrador de datos.

[0088] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron muestras de salchichas de pollo cocinadas desmenuzadas de cada lote por duplicado para análisis microbiológicos. De cada embalaje único se tomó una muestra de 20 g asépticamente, se diluyó 10 veces en PPS y se homogenizó en un stomacher durante 1 minuto.

[0089] Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS. Los números de *Salmonella* fueron determinados utilizando Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (Oxoid® CM485). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 día.

[0090] Los resultados de los análisis microbiológicos de las salchichas de pollo cocinadas con aditivos diferentes durante el almacenamiento envasadas al vacío a 12°C se dan en la TABLA XIV

TABLA XIV Resultados de cuentas de *Salmonella* spp. en las salchichas de pollo cocinadas envasadas al vacío con aditivos diferentes durante almacenamiento a 12°C.

Aditivo	Cuentas bacterianas en log ufc por g de producto después del almacenamiento durante				
	0 Días	4 Días	7 Días	14 Días	20 Días
Control (sin aditivo)	2,32	5,72	7,40	8,29	8,58
	2,54	5,82	7,41	8,27	8,46
0,5 % en peso de glicina	2,38	1,00	0,48	2,28	1,00
	2,32	1,00	0,60	1,71	2,23
0,5 % en peso de glicinato de sodio	2,36	1,00	0,48	0,00	0,00
	2,43	1,00	0,30	0,00	0,00
1,0 % en peso de glicina	2,40	1,00	0,30	0,00	0,00
	2,38	1,00	0,00	0,00	0,00
1,0 % en peso de Glicinato de sodio	2,18	1,00	0,00	0,00	0,00
	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00
2,5 % en peso de glicina	2,40	1,00	0,60	0,30	0,00
	2,34	1,00	0,30	0,30	0,00

[0091] Los resultados muestran que concentraciones de glicina de un 0,5 % en peso o más alto en base al peso total de producto tienen actividad antibacteriana contra la *Salmonella typhimurium* en el pollo cocinado. El Glicinato de sodio claramente actúa como agente antibacteriano en concentraciones de 0,5 % en peso o más altas en base al peso total de producto. El glicinato de sodio tiene un efecto bactericida fuerte y reduce el número bacteriano por debajo de 1 log ufc por g de producto en sólo 4 días de almacenamiento a 12 °Celsius.

#### Ejemplo 9

[0092] Se prepararon lotes que consisten en dos paquetes al vacío con carne picada de pollo irradiada, circa 1500 g cada una, con respectivamente 0,0, 0,5, 1,0, y 1,5 % en peso de glicina como agente antibacteriano. Los lotes de carne picada de pollo fueron almacenados durante 1 día a 0°C hasta un examen posterior.

[0093] Cada lote de carne picada de pollo fue inoculada con una *Salmonella typhimurium* (M90003246/0550). Antes de la inoculación del cultivo, mantenido en agar inclinado, se pre-cultivó dos veces en infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid ® CM225) durante 24 horas a 30 °C. El cultivo crecido completo se diluyó en la solución salina de peptona fisiológica (PPS) para obtener una suspensión al nivel deseado.

Una cantidad de carne picada de pollo (aprox. 1000 g) de cada composición se colocó en una bandeja desinfectada y se inoculó con 10 ml de suspensión *S. typhimurium* a un nivel final de aproximadamente  $10^4$  ucf por g de producto. Después de la inoculación, la carne picada de pollo fue homogeneizada manualmente. Posteriormente, el producto se dividió en porciones de 50 g y se empaquetó aeróbicamente en bolsas de plástico (16 x 11 x 1,5 cm, aprox 250 ml). Los paquetes obtenidos fueron almacenados a 30°C durante hasta 24 horas y a 7°C durante hasta 30 días. Durante el experimento se registraron las temperaturas en el almacenamiento.

[0094] A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron muestras de carne picada de pollo de cada lote por duplicado para análisis microbiológicos. De cada embalaje único se tomó una muestra de 20 g asépticamente, se diluyó en 10 veces en PPS y se homogeneizó en un stomacher durante 1 minuto.

Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS. Los números de *S. typhimurium* fueron determinados utilizando Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBGA, Oxoid ® CM485) tal y como se menciona en ISO 5552:1997. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 día.

[0095] Los resultados de los análisis microbiológicos de la carne picada de pollo con cantidades diferentes de glicina durante el almacenamiento aeróbicamente envasada a 7°C se dan en la TABLA X

TABLA X Resultados de cuentas de *S. typhimurium* en la carne picada de pollo aeróbicamente envasada con cantidades de glicina durante almacenamiento a 7°C

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

[0096] Durante el almacenamiento a 7°C se inhibió el desarrollo de *S. typhimurium* en la carne picada de pollo que contiene glicina en cantidades de 0,5% durante el periodo total de almacenamiento de 30 días.

En la carne picada de pollo que contiene glicina en cantidades de 1 a 1.5% se observó una reducción 2 log de *S. typhimurium* durante ese periodo.

#### Ejemplo 10

[0097] En el ejemplo 10 se realiza un estudio de inoculación con *Salmonella Enteritidis* en la yema de huevo pasteurizado. Con este fin, aproximadamente 2 kilogramos de yemas de huevo se separaron de 300 huevos y se filtraron. Se añadió glicina a la yema de huevo de modo que se prepararon muestras de 400 gramos cada una en una jarra estéril que contiene



0,0, 0,5, 1,0 y 1,5 % en peso de glicina. La glicina y yema de huevo se mezclaron bien por agitación. Las muestras fueron pasteurizadas 60 min. a 60 °C.

[0098] La yema de huevo fue inoculada con una mezcla de dos cepas de *Salmonella Enteritidis* (ATCC: 13076 y RKI 01-02637). De un cultivo madre de *S. Enteritidis*, 4 ml se pre-cultivaron en 100 ml TSB (Biokar ® BK046HA) a 30 °C durante 24 horas. De este cultivo, 0.1 ml se pre-cultivaron otra vez en 100 ml TSB a 30°C durante 18 horas. Cada muestra de 400 gramos de yema de huevo se inoculó con 1 ml de TSB y se mezcló manualmente por agitación (5 minutos). Posteriormente, cada muestra fue dividida en porciones de 20 gramos y almacenada aeróbicamente en cajas plásticas a una temperatura de 7°C, 11 °C y 12°C.

[0099] Las muestras incubadas a 7 °C y a 12 °C fueron analizadas en cuanto a cuentas microbiológicas después de varios días.

[0100] Para cada muestra, 20 gramos de yema de huevo se pesaron de una caja y se colocaron en una bolsa stomacher. Posteriormente, la muestra fue homogeneizada con 90 ml de BPW (Biokar ® BK018HA) usando un stomacher (Colwort ®, 20 seg). Se realizaron diluciones en serie adicionales en PPS (Biokar ® BK014HA).

[0101] Las diluciones se produjeron en placas de agar verde brillante (Biokar ® BK091HA) según ISO 6579:2002. Los resultados de los análisis microbiológicos de *S. Enteritidis* en la yema de huevo a 7 °C, y 12 °C se compilan en las TABLAS XI y XII.

TABLA XI. Recuento en placa de *Salmonella Enteritidis* inoculada en la yema de huevo con concentraciones diferentes de glicina a 7°C.

Concentración	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21
Glicina	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL
0%	6,7	6,2	5,8	5,7	5,8
0,5%	6,6	5,4	4,8	3,7	4,0
1,0%	6,5	4,9	4,1	3,7	3,7
1,5%	6,5	5,0	4,1	4,2	3,8

TABLA XII: Recuento en placa de *Salmonella Enteritidis* inoculada en la yema de huevo con concentraciones diferentes de glicina a 12°C.

Concentración	Día 0	Día 1	Día 3	Día 7	Día 14
glicina	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL
0%	6,7	8,3	7,6	-	8,8
0,5%	6,6	7,3	7,0	-	7,6
1,0%	6,5	5,0	3,9	3,4	3,3
1,5%	6,5	5,0	3,5	3,1	3,0

[0102] A 7 °C el índice de supervivencia de *Salmonella Enteritidis* se debilita cuando se añade un 0,5 % de glicina. A 12 °C se observa un ligero efecto inhibitor cuando se añade 0,5 % de glicina. A concentraciones más altas la inhibición fue más fuerte.

#### Ejemplo 11

[0103] En el ejemplo se realiza un estudio de inoculación con *Salmonella Enteritidis* en yema de huevo pasteurizada. Con este fin, aproximadamente 1 kilogramo de yema de huevo se separó de 70 huevos y se filtró. Se añadió glicina a la yema de huevo de modo que se prepararon muestras de 150 ml cada una en una jarra estéril que contiene 0,0, 0,5, 1,0 y 1,5 % en peso de glicina. La glicina y la yema del huevo se mezclaron bien por agitación. Las muestras fueron pasteurizadas 60 min. a 60 °C.

[0104] La yema de huevo se inoculó con una *Salmonella Enteritidis* (ATCC: 13076). Un cultivo de *S. Enteritidis* se pre-cultivó en BHI (Oxoid ® CM 225) a 30 ° durante 24 horas. Los cultivos se diluyeron en 10 veces en la solución fisiológica de peptona (PPS). Cada muestra fue inoculada con 0,6 ml de medio de cultivo en tubo mezclado manualmente por agitación (5 minutos).

Posteriormente, cada muestra se dividió en porciones de 5 ml almacenadas a una temperatura de 11 °C.

[0105] Las muestras incubadas a 11 °C fueron analizadas en cuanto a cuentas microbiológicas después de varios días.

[0106] A partir de cada concentración se realizó una dilución en 10 veces en PPS. Las diluciones se produjeron en placas "Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa" (Oxoid®, CM485) y se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

Los resultados de los análisis microbiológicos de *S. Enteritidis* en la yema de huevo a 11 °C se compilan en la TABLA XIII.

5

TABLA XIII: Recuento en placa de *Salmonella Enteritidis* inoculada en la yema de huevo con concentraciones diferentes de glicina a 11°C.

Concentración	Día 0	Día 4	Día 11
glicina	Log UFC/mL	Log UFC/mL	Log UFC/mL
0%	5,32	7,23	8,33
0,5%	5,28	7,23	6,98
1,0%	5,31	3,08	0,00
1,5%	5,33	0,00	0,00

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 como agente antibacteriano contra los patógenos alimenticios bacterianos gram-negativos *Escherichia Coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella*, y *Campylobacter* en alimentos refrigerados y/o bebidas refrigeradas con la condición de que además de dicha glicina y/o derivado de glicina no se utiliza ninguna macromolécula conteniendo heterosacáridos, ni se usa 1,5-D-anhidrofructosa como agente antibacteriano en dichos alimentos y bebidas.
- 10 2. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 1 como único agente antibacteriano en alimentos y/o bebidas.
- 15 3. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 1 o 2 como agente antibacteriano en aplicaciones de carne.
- 20 4. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 1 o 2 como agente antibacteriano en las aplicaciones de carne fresca.
- 25 5. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como agente antibacteriano contra las bacterias de *Salmonella* y preferiblemente contra la *Salmonella typhimurium* y/o *Salmonella enteritidis*.
- 30 6. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como agente antibacteriano contra las bacterias de *Escherichia Coli* y preferiblemente contra *Escherichia Coli* O157:H7.
- 35 7. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como agente antibacteriano en alimentos y/o bebidas combinado con uno o más ácidos orgánicos y/o una o más de sus sales.
- 40 8. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 7 como agente antibacteriano en alimentos y/o bebidas combinado con ácido láctico y/o su sal de lactato.
- 45 9. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como agente antibacteriano en concentraciones de 0,5 a 3 % en peso y preferiblemente de 0,5 a 1,5 % en peso de glicina y/o dicho derivado de glicina en peso en base a dichos alimentos o bebidas.
10. Uso de glicina y/o sales de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 7 o 9 como agente antibacteriano en concentraciones de 0,5 a 3 % en peso de uno o más ácidos orgánicos y/o una o más de sus sales en base al peso total del producto.
11. Uso de glicina y/o sales alcalinas/alcalinotérreas de glicinato, glicinato de amonio y/o ésteres de glicina y alcoholes C1-C8 según la reivindicación 8 como agente antibacteriano en concentraciones de 0,5 a 3 % en peso de ácido láctico y/o su sal en base al peso total del producto.

FIGURA 1

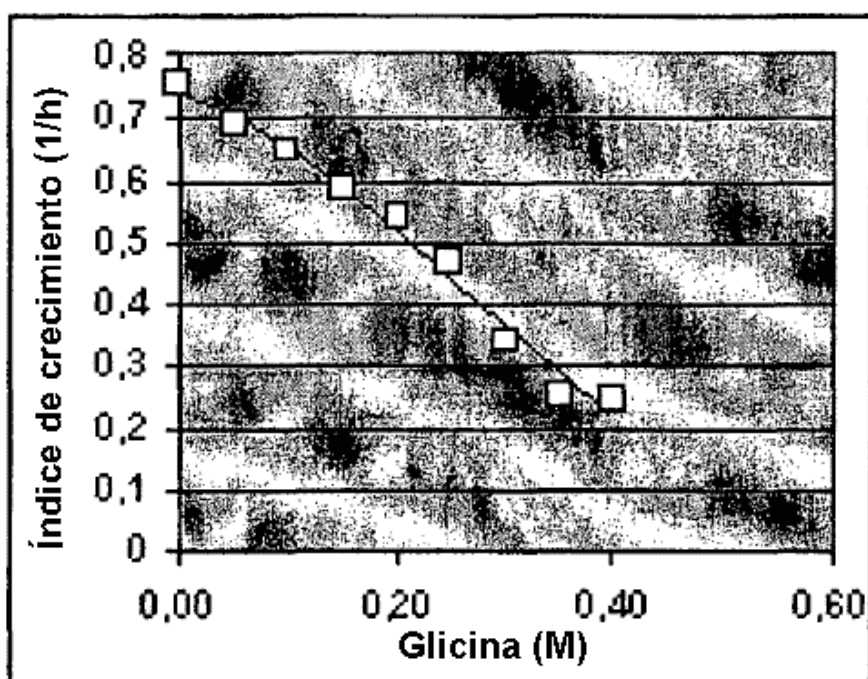


Fig 1. Efecto de las concentraciones crecientes de glicina en el índice máximo de crecimiento específico de *Listeria monocytogenes*.