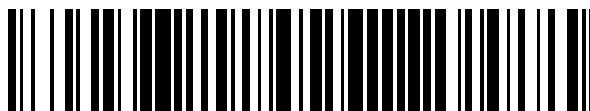


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 167**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02	(2006.01) A23L 1/318	(2006.01)
A01N 65/22	(2009.01) A23C 19/11	(2006.01)
A01N 45/00	(2006.01) A23L 2/52	(2006.01)
A01N 37/38	(2006.01) A23L 3/34	(2006.01)
A01N 37/36	(2006.01) A21D 2/00	(2006.01)
A01N 35/06	(2006.01) A23B 4/10	(2006.01)
A01N 31/16	(2006.01) A23B 4/12	(2006.01)
A01N 31/08	(2006.01) A23B 4/22	(2006.01)
A23L 1/00	(2006.01) A23B 5/06	(2006.01)
A23L 1/30	(2006.01) A23B 5/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2004 E 04768009 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 1656026**

54 Título: **Composición que comprende una bacteriocina y un extracto de una planta de la familia Labiatae**

30 Prioridad:

22.08.2003 GB 0319817
22.08.2003 US 497409 P
06.10.2003 GB 0323335
30.12.2003 US 533053 P
08.04.2004 US 560270 P
08.04.2004 US 820147

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2014

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK

72 Inventor/es:

COYNE, BOB;
FARAGHER, JOHN;
GOUIN, SÉBASTIEN;
HANSEN, CARSTEN BJORN;
INGRAM, RICHARD;
ISAK, TORBEN;
THOMAS, LINDA VALERIE y
TSE, KATHRYN LOUISE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 481 167 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende una bacteriocina y un extracto de una planta de la familia Labiatae

La presente invención se refiere a una composición que presenta una acción microbicida o microbiostática.

Antecedentes

5 Las bacteriocinas son proteínas o péptidos antimicrobianos que pueden ser producidos por determinadas bacterias, que pueden matar o inhibir el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas. Las bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico tienen una importancia particular, puesto que tienen un gran potencial para la conservación de alimentos y para el control de patógenos transmitidos por los alimentos. (Wessels et al. 1998.)

10 La bacteriocina mejor conocida es la nisina, que es la única bacteriocina actualmente autorizada como aditivo alimentario. La nisina se produce por fermentación de la bacteria láctea de cultivo iniciador *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, y se vende como el extracto comercial Nisaplin® Natural Antimicrobial (Danisco). La nisina tiene un espectro antimicrobiano inusualmente amplio para una bacteriocina, siendo activa contra la mayoría de las bacterias Gram positivas (p. ej., especies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, bacterias del ácido láctico). Normalmente es eficaz contra bacterias Gram negativas, levaduras o mohos. La nisina está permitida como conservante alimentario en todo el mundo, pero sus niveles de uso y las aplicaciones alimentarias aprobadas están estrictamente reguladas, variando de un país a otro.

15 Se han descubierto posteriormente otras bacteriocinas con potencial como conservantes alimentarios, p. ej., pediocina, lacticina, sakacina, lactococcina, enterococina, plantaricina, leucocina. Estas también son activas, aunque normalmente con un espectro más estrecho, contra bacterias Gram positivas. Su uso alimentario actualmente está restringido a la producción de la bacteriocina in situ, es decir, por crecimiento del organismo productor dentro del alimento.

20 Los antioxidantes se usan ampliamente en productos alimenticios susceptibles a la degeneración oxidativa. La Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (21CFR 170.3) define un antioxidante como "una sustancia usada para conservar alimentos retrasando su deterioro, rancidez o decoloración debido a la oxidación". Se pueden usar especias o extractos de plantas en los alimentos como antioxidantes y para impartir aroma. Una ventaja de dichos extractos es que se perciben como ingredientes naturales comparados con los antioxidantes químicos tales como el butilhidroxianisol (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Las plantas de la familia Labiatae contienen varias hierbas bien conocidas. Se ha mostrado que los extractos de estas plantas tienen actividad antioxidante y, en algunos casos, antimicrobiana (Nychas & Skandamis, 2003; Smid and Gorris, 1999; Loliger, 1989). Dichos extractos pueden ser aceites esenciales y oleorresinas (extractos con contenido de aceite esencial usados como aromas y fragancias) o extractos "desodorizados" que tienen un alto contenido de diterpenos fenólicos y un nivel bajo de compuestos que inducen aroma.

35 Los aceites esenciales se extraen por simple destilación por arrastre de vapor del material vegetal. Se ha descrito que los compuestos antioxidantes más eficaces en el romero y la salvia son el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico (Cuvelier et al. 1996). El ácido carnósico, un diterpeno fenólico ($C_{20}H_{28}O_4$), se encuentra de forma natural en las hojas de plantas de la familia Labiatae, en particular el romero y la salvia, pero también en el tomillo y la mejorana. Las hojas secas de romero o salvia contienen 1,5 - 2,5% de ácido carnósico y 0,3 - 0,4% de carnosol (documento US6231896). El carnosol es un artefacto oxidante del ácido carnósico (Wenkert et al. J. Org. Chem 30:2931, 1965). La oxidación se produce en la cosecha en las hojas dejadas secar al aire y si las hojas se someten a extracción con disolventes. El rosmanol también puede ser un producto de la oxidación del ácido carnósico.

40 El uso de extractos de material vegetal para inhibir el crecimiento de microorganismos se ha enseñado en la técnica. Los ejemplos de dichas enseñanzas incluyen: el documento WO 02/069741 enseña extractos de hierbas Labiatae y extractos de lúpulo para prolongar el estado de color e inhibir el crecimiento de microorganismos en la carne, pescado y aves de corral frescos. Periago et al. 2001. *Food Science & Technology International*. 7: 487-492, se refieren al uso de carvacrol y timol con 0,3 mmol/litro en combinación con nisina. Se enseña que se observa sinergia. El documento JP 2001172159 se refiere a cosméticos que comprenden una variedad de componentes incluyendo agente antimicrobiano y extractos de disolvente de labiadas. El documento WO 98/56395 enseña una mezcla de aceite de árbol de té y aceite esencial de tomillo. El documento GB 2275 194 A expone un desinfectante de extracto vegetal. El documento US 6083921 expone una combinación de extractos vegetales que incluyen una labiada: *Scutellaria*, preferiblemente raíz (Raíz de *scutellaria*). El documento US 5472684 enseña una composición oral para la placa y la gingivitis que contiene timol y eugenol.

45 La seguridad alimentaria y la prevención de la descomposición de los alimentos es un problema siempre presente en todo el mundo, en particular con la tendencia creciente de la comida rápida tales como comidas precocinadas, sopas, salsas o aperitivos. La descomposición de los alimentos es un problema económico importante para el fabricante de alimentos. Los fabricantes de alimentos necesitan proteger la salud y la seguridad del público suministrando productos que sean seguros para comer. Dichos alimentos deben tener una vida en anaquel garantizada, sea en almacenamiento refrigerado o a temperatura ambiente. Los consumidores prefieren alimentos de buen sabor de alta calidad, y esto es difícil de lograr con conservantes químicos, regímenes de calentamiento

duros y otras medidas de procesamiento. La seguridad y protección alimentaria se logra mejor con un sistema de conservación múltiple usando un procedimiento combinado de procesamiento más suave y conservantes naturales. Los microorganismos transmitidos por los alimentos también tienen menos capacidad de adaptarse y crecer en alimentos conservados con diferentes medidas conservantes.

5 Hay una gran preocupación sobre la seguridad alimentaria y la proliferación de patógenos en alimentos, tales como de *Listeria monocytogenes*. Este patógeno particular puede crecer a bajas temperaturas, que a menudo se usan como una medida conservante adicional. Los patógenos transmitidos por los alimentos a veces se adaptan a diferentes conservantes y condiciones de almacenamiento, por lo tanto, una combinación de medidas conservantes puede tener más éxito que medidas individuales.

10 Hay una necesidad creciente de desarrollar sistemas conservantes de alimentos económicos, naturales y eficaces, que satisfagan la demanda del público de productos alimenticios de buena calidad, saludables, seguros, naturales, cómodos con vida en anaquel garantizada. Las bacteriocinas tales como la nisina se pueden usar como conservantes en alimentos para ayudar a satisfacer esta necesidad. La nisina es un conservante natural, demostrado seguro con estatus GRAS. Se pueden usar otras bacteriocinas para la conservación si se producen in situ, por crecimiento del organismo productor de bacteriocina en el alimento.

15 En algunos casos, los niveles de bacteriocina requeridos para asegurar la conservación o seguridad del alimento pueden resultar poco rentables, o están por debajo de los niveles eficaces debido a restricciones normativas y legislativas. Cuando las bacteriocinas se producen in situ, los niveles de bacteriocina resultantes pueden no ser suficientemente altos para lograr el efecto conservante deseado.

20 La presente invención mitiga los problemas de la técnica anterior.

En un aspecto la presente invención proporciona la reivindicación 1.

En un aspecto la presente invención proporciona la reivindicación 34.

En un aspecto la presente invención proporciona la reivindicación 41.

En un aspecto la presente invención proporciona la reivindicación 45.

25 Los aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

De la familia de plantas Labiatae, el romero y la salvia tienen actividad antioxidante en alimentos, que está principalmente relacionada con diterpenos fenólicos tales como ácido carnósico y canosol, así como otros compuestos fenólicos, incluyendo triterpenos fenólicos tales como ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico; y ácido rosmarínico. La actividad antimicrobiana se ha atribuido a algunos de estos compuestos, todos los cuales se pueden obtener por extracción selectiva de plantas. Los diterpenos fenólicos, triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico son distintos de los aceites esenciales y oleorresinas que se usan con frecuencia en aromas y fragancias. Los niveles altos de aroma y olor de los aceites esenciales no son favorables para su uso en alimentos. Un experto en la técnica esperaría que una combinación de un material antimicrobiano y un extracto de la familia de plantas Labiatae proporcionara un simple efecto aditivo bactericida o bacteriostático. Sin embargo, estudios in vitro

30 descritos en la presente memoria han demostrado potenciación sinérgica de la actividad de las bacteriocinas mediante un extracto desodorizado de *Rosmarinus officinalis*. Esta actividad potenciada se observó también en un modelo de alimento, aumentando la muerte y el control del crecimiento por las bacteriocinas (por ejemplo nisina) de bacterias Gram positivas. La actividad potenciada de bacteriocinas también se observó con extractos de romero preparados específicamente para contener niveles altos de los diterpenos fenólicos carnosol y ácido carnósico,

35 indicando que estos compuestos tienen una función importante en la sinergia. También se observó la actividad potenciada de bacteriocinas con el ácido rosmarínico.

La presente invención proporciona una combinación sinérgica de componentes para prevenir y/o inhibir el crecimiento y/o la muerte de un microorganismo en un material, tal como un producto alimenticio. Esta combinación de componentes permite usar niveles menores del material antimicrobiano para proporcionar una acción eficaz y

40 prevenir el desarrollo de tolerancia al material antimicrobiano. Esto es particularmente importante en aplicaciones de alimentos donde se desea la reducción de la dosificación y/o evitar el desarrollo de tolerancia por razones comerciales y normativas.

Para facilidad de referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se exponen ahora bajo los títulos de sección adecuados. Sin embargo, las enseñanzas en cada sección no están necesariamente limitadas a cada

50 sección particular.

Aspectos preferidos

Material antimicrobiano

El material antimicrobiano es al menos nisina.

Preferiblemente, el material antimicrobiano consiste en nisina.

La nisina es una bacteriocina que contiene lantionina (documento US 5691301) derivada de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* (anteriormente conocida como *Streptococcus-lactis*) (documento US 5573801). En un aspecto preferido de la presente invención, la bacteriocina usada en la presente invención es al menos nisina.

- 5 Como se comenta en el documento US 5573801 la nisina es una bacteriocina polipeptídica producida por la bacteria del ácido láctico *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* (anteriormente conocida como *Streptococcus lactis* del grupo N).

Nisina es un nombre que se usa de forma colectiva que representa varias sustancias estrechamente relacionadas que se han denominado compuestos nisina A, B, C, D y E (De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Eds.: De Vuyst and Vandamme. Blackie Academic and Professional, London). La estructura y propiedades de la nisina también se exponen en el artículo de E. Lipinska, titulado "Nisin and its Applications.", The 25th Proceedings of the Easter School in Agriculture Science at the University of Nottingham, 1976, pp. 103-130 (1977), cuyo artículo se incorpora en la presente memoria por referencia. En 1969 el Comité mixto FAO/WHO de expertos en aditivos alimentarios estableció especificaciones para la pureza e identidad de la nisina (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives. 1969. Specifications for identity and purity of some antibiotics. 12th Report. WHO Technical Report Series No. 430). Este comité reconoció la nisina como un conservante seguro y legal basado en ensayos toxicológicos amplios. La nisina tiene el número de aditivo alimentario E234 y está clasificada como GRAS (generalmente reconocida como segura) (Food and Drug Administration. 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human ingredient. Federal Regulations 53: 11247). La unidad de actividad internacional (en lo sucesivo UI) se definió como 0,001 mg de una preparación de referencia de nisina internacional. Nisaplin® Natural Antimicrobial es la marca de producto para un concentrado de nisina que contiene 1 millón de UI por g, que está disponible en el comercio en Danisco.

La nisina es un conservante alimentario reconocido y aceptado con un historial largo de uso alimentario seguro y eficaz. Ha habido varias revisiones sobre la nisina, p. ej., Hurst 1981; 1983; Delves-Broughton, 1990; De Vuyst and Vandamme, 1994; Thomas et al. 2000; Thomas & Delves-Broughton, 2001). La nisina se descubrió hace unos 50 años y la primera preparación comercial, hecha en 1953, fue Nisaplin®. La nisina tiene varias características que la hacen particularmente adecuada como conservante alimentario. Se ha sometido a amplios ensayos toxicológicos para demostrar su seguridad. Es estable al calor, estable frente a ácido y eficaz frente a un amplio espectro de bacterias Gram positivas. Normalmente es eficaz contra bacterias Gram negativas, levaduras o mohos pero la actividad contra bacterias Gram negativas y levaduras se ha descrito en presencia de agentes quelantes (documentos PCT/US 8902625. WO 89/12399). La nisina es un conservante eficaz en alimentos pasteurizados y tratados con calor (p. ej., queso procesado, queso, leches pasteurizadas, postres lácteos, nata, mascarpone y otros productos lácteos, púdines tales como semolina, tapioca, etc., huevo líquido pasteurizado, productos de patata pasteurizados, productos de soja, buñuelos, tortitas, tortas, productos cárnicos procesados, bebidas, sopas, salsas, comidas preparadas, alimentos en lata, bebidas vegetales) y alimentos de baja acidez tales como aderezos de ensalada, salsa, mayonesa, cerveza, vino y otras bebidas.

Aunque se puede esperar algo de pérdida de actividad cuando se usa con alimentos procesados, esto se puede mejorar, por ejemplo, aumentando la cantidad de nisina aplicada. Los niveles eficaces de nisina para conservar productos alimenticios están, supuestamente, en el intervalo de 25-500 UI/g o más. Los expertos en la técnica apreciarán otros niveles eficaces. Por ejemplo, se pueden usar niveles de 50-400 UI/g.

Desde el descubrimiento de la primera bacteriocina, la nisina, ahora se han encontrado muchas otras bacteriocinas (Hoover, 1993; Ray & Daeschel, 1994; Axelsen, 1998; Naidu, 2000; Ray et al. 2001; Ray & Miller, 2003). La bacteriocina pediocina, producida por *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, o *Lactobacillus plantarum*, se puede usar en la presente invención. Como la nisina, se han descrito diferentes estructuras de la pediocina. Actualmente la pediocina y otras bacteriocinas no están permitidas como aditivos alimentarios, pero su actividad antibacteriana se puede lograr por la producción de la bacteriocina in situ, como consecuencia del crecimiento del organismo productor en el alimento. Este es el propósito de cultivos protectores comerciales tales como HOLDBAC™ *Listeria* (Danisco). La pediocina tiene un espectro antibacteriano más estrecho comparado con la nisina, pero existe un gran interés en su capacidad para matar, prevenir o controlar el crecimiento del patógeno de alimentos *Listeria monocytogenes* para la seguridad alimentaria (Ray & Miller, 2000). Se pueden usar otras bacteriocinas en la presente invención, además de la nisina, incluyendo las denominadas en general divercina, leucocina, mesentericina, sakacina, curvacina, bavaricina, acidocina, bifidocina, carnobacteriocina, piscicocina, piscicolina, mundticina, enterocina, termofilina, lacticina, plantaricina, lactococina, divercina, diplococina, mesenterocina, leuconosina, carnosina, acidofilina, lactacina, brevicina, lactocina, helevticina, reutericina, propionicina.

55 Extracto

Como se expone en la presente memoria, el material antimicrobiano consiste en nisina y la composición comprende cada uno de timol, carbona y carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.

En un aspecto preferido, la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,05% en peso basado en la composición, preferiblemente menor que 0,04% en peso, preferiblemente menor que 0,02% en peso, preferiblemente menor que 0,01% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, basado en la composición.

5 En un aspecto preferido, la composición comprende carvona en una cantidad menor que 0,05% en peso, preferiblemente menor que 0,04% en peso, preferiblemente menor que 0,02% en peso, preferiblemente menor que 0,01% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, basado en la composición.

10 En un aspecto preferido, la composición comprende timol en una cantidad menor que 0,05% en peso, preferiblemente menor que 0,04% en peso, preferiblemente menor que 0,02% en peso, preferiblemente menor que 0,01% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, basado en la composición.

15 En un aspecto preferido, la composición comprende eugenol en una cantidad menor que 15% en peso basado en la composición, preferiblemente menor que 10% en peso, preferiblemente menor que 7% en peso, preferiblemente menor que 5% en peso, preferiblemente menor que 2% en peso, preferiblemente menor que 1% en peso, preferiblemente menor que 0,75% en peso, preferiblemente menor que 0,5% en peso, preferiblemente menor que 0,2% en peso, preferiblemente menor que 0,1% en peso, preferiblemente menor que 0,075% en peso, preferiblemente menor que 0,05% en peso, preferiblemente menor que 0,04% en peso, preferiblemente menor que 0,02% en peso, preferiblemente menor que 0,01% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, basado en la composición.

20 En un aspecto preferido, la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, y cada uno de carvona y timol en cantidades menores que 0,05% en peso, preferiblemente menores que 0,04% en peso, preferiblemente menores que 0,02% en peso, preferiblemente menores que 0,01% en peso, preferiblemente menores que 0,004% en peso, basado en la composición.

25 En un aspecto preferido, la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, y cada uno de carvona, timol y eugenol en cantidades menores que 0,05% en peso, preferiblemente menores que 0,04% en peso, preferiblemente menores que 0,02% en peso, preferiblemente menores que 0,01% en peso, preferiblemente menores que 0,004% en peso, basado en la composición.

En un aspecto preferido, la composición comprende cada uno de carvacrol y carvona en una cantidad menor que 0,05% en peso, preferiblemente menor que 0,04% en peso, preferiblemente menor que 0,02% en peso, preferiblemente menor que 0,01% en peso, preferiblemente menor que 0,004% en peso, basado en el extracto.

30 En un aspecto preferido, la composición comprende cada uno de carvacrol, carvona y timol en cantidades menores que 0,05% en peso, preferiblemente menores que 0,04% en peso, preferiblemente menores que 0,02% en peso, preferiblemente menores que 0,01% en peso, preferiblemente menores que 0,004% en peso, basado en el extracto.

35 En un aspecto preferido, la composición comprende cada uno de carvacrol, carvona, timol y eugenol en cantidades menores que 0,05% en peso, preferiblemente menores que 0,04% en peso, preferiblemente menores que 0,02% en peso, preferiblemente menores que 0,01% en peso, preferiblemente menores que 0,004% en peso, basado en el extracto.

El extracto usado en la presente invención se obtiene o se puede obtener de una planta de la familia Labiatae.

En un aspecto, el extracto usado en la presente invención se obtiene de una planta de la familia Labiatae.

40 El experto en la técnica apreciará que por el término "extracto" o "extractos" se entiende cualquier constituyente de la planta que se puede aislar de la planta entera.

45 En un aspecto, el extracto usado en la presente invención se puede obtener de una planta de la familia Labiatae. El experto en la técnica apreciará que un extracto que se puede obtener de una planta, se puede obtener de una planta o aislar de una planta, identificar y después obtener de una fuente alternativa, por ejemplo, por síntesis química o producción enzimática. Por ejemplo, el extracto se puede producir por una fermentación eucariota o procariota, por un procedimiento de manipulación genética. Los autores de la presente invención han reconocido que los productos presentes en una planta de la familia Labiatae pueden aumentar de forma sinérgica la actividad de un material antimicrobiano, preferiblemente una bacteriocina. Estos productos se pueden obtener de cualquier fuente y estarán dentro del alcance de la presente invención.

50 La invención comprende el uso de una combinación de nisina y un extracto de planta de la familia Labiatae, tal como romero (*Rosmarinus officinalis*) o salvia (*Salvia officinalis*), que juntos dan un control potenciado de las bacterias Gram positivas en un sistema alimenticio. Los extractos responsables de la sinergia en la presente invención, preferiblemente se refieren a extractos de la planta de la familia Labiatae que se ha extraído selectivamente ("extractos desodorizados") para aumentar su contenido de diterpenos fenólicos (tales como carnosol y ácido carnósico), contenido de triterpenos fenólicos (tales como ácido ursolínico, ácido betulínico y ácido oleanólico) o contenido de ácido rosmarínico. Estos extractos desodorizados se pueden distinguir por su alto contenido en

diterpenos fenólicos (por ejemplo mayor que 3,5% en peso) y su bajo nivel (menor que 1% en peso) de compuestos que inducen aroma de aceites esenciales y oleorresinas de plantas que se usan como aromas y fragancias. Los aceites esenciales se extraen típicamente por simple destilación por arrastre de vapor del material vegetal.

5 Los aceites esenciales comprenden los diferentes aceites esenciales de plantas que tienen el olor o al aroma de la planta de la que se han extraído. Los aceites esenciales son típicamente terpenoides que a menudo comprenden monoterpenos. Por ejemplo, un tipo de antioxidante de extracto de romero, que se pudiera describir como extraído selectivamente o desodorizado, contiene >3,5% de diterpenos fenólicos pero menos de 1% en peso de aceites esenciales. Un extracto aromatizante no selectivo, contiene 10-30% en peso de aceites esenciales y un contenido de diterpenos fenólicos de 2->3,5% en peso.

10 Un aceite esencial habitualmente se describe como la fracción etérea volátil obtenida de una planta o parte de la planta por un procedimiento de separación físico tal como destilación o separación cromatográfica. Los aceites esenciales también se han descrito como un "grupo de principios olorosos, solubles en alcohol y en agua en una medida limitada, que consisten en una mezcla de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos". Los aceites esenciales se obtienen típicamente por destilación de plantas con agua; el aceite que se separa del destilado, visualmente tiene características altas de olores identificados con el origen de la planta. En la época de los alquimistas, la mezcla resultante de compuestos orgánicos se pensaba que era la esencia de la planta, de ahí la expresión "aceite esencial".

15 En un aspecto preferido, el extracto es un extracto desodorizado. Preferiblemente, el extracto "desodorizado" contiene de 1,0 a 70% en peso de diterpenos fenólicos, preferiblemente de 3,5 a 70% en peso de diterpenos fenólicos y menos de 1% en peso de aceite esencial.

El extracto comprende un diterpeno fenólico. Preferiblemente, el diterpeno fenólico se selecciona de ácido carnósico, carnosol o ácido metilcarnósico. Preferiblemente, el diterpeno fenólico se selecciona de ácido carnósico y carnosol.

25 En un aspecto preferido, la cantidad combinada de diterpenos fenólicos y triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico, basado en el extracto, es mayor que 3,5% en peso. En un aspecto preferido, la cantidad combinada de diterpenos fenólicos y triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.

La cantidad de diterpenos fenólicos, basado en el extracto, es mayor que 1,0% en peso, por ejemplo mayor que 5,0% en peso, mayor que 10,0 % en peso, mayor que 20,0% en peso, o mayor que 25,0% en peso. La cantidad de diterpenos fenólicos, basado en la composición, es mayor que 1,0% en peso.

30 En un aspecto preferido, la cantidad de diterpenos fenólicos, basado en el extracto, es mayor que 3,5% en peso. En un aspecto preferido, la cantidad de diterpenos fenólicos, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.

La cantidad de diterpenos fenólicos, basado en la composición, es mayor que 1,0% en peso, preferiblemente mayor que 2,0% en peso, preferiblemente mayor que 3,0% en peso, preferiblemente mayor que 3,5% en peso, preferiblemente mayor que 5,0 % en peso, preferiblemente mayor que 10,0 % en peso, preferiblemente mayor que 20,0 % en peso, preferiblemente mayor que 40,0 % en peso, preferiblemente mayor que 50,0 % en peso.

35 En un aspecto preferido, la cantidad de diterpenos fenólicos, basado en la composición, es de 2,0 a 2,5% en peso, tal como 2,3% en peso.

En un aspecto preferido, la cantidad de diterpenos fenólicos, basado en la composición, es de 4,0 a 4,5% en peso, tal como 4,2% en peso.

40 La cantidad de diterpenos fenólicos, basado en el extracto, es mayor que 1,0% en peso, preferiblemente mayor que 2,0% en peso, preferiblemente mayor que 3,0% en peso, preferiblemente mayor que 3,5% en peso, preferiblemente mayor que 5,0 % en peso, preferiblemente mayor que 10,0 % en peso, preferiblemente mayor que 20,0 % en peso, preferiblemente mayor que 40,0 % en peso, preferiblemente mayor que 50,0 % en peso.

En un aspecto muy preferido, el extracto contiene uno o más triterpenos fenólicos. Preferiblemente, los triterpenos fenólicos se seleccionan de ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.

45 En un aspecto muy preferido, la cantidad de triterpenos fenólicos, basado en el extracto, es mayor que 3,5% en peso. En un aspecto muy preferido, la cantidad de triterpenos fenólicos, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.

En un aspecto preferido, el extracto es o comprende ácido rosmarínico.

50 En un aspecto preferido, la cantidad de ácido rosmarínico, basado en el extracto, es mayor que 3,5% en peso. En un aspecto preferido, la cantidad de ácido rosmarínico, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.

En un aspecto preferido, el extracto contiene compuestos que inducen aroma y/o aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en el extracto. En un aspecto preferido, el extracto contiene compuestos que inducen aroma y/o aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en la composición.

Típicamente, los compuestos que inducen aroma y/o aceites esenciales son alcanfor, verbenona, borneol y alfa-terpineol.

5 En un aspecto preferido, la cantidad combinada de alcanfor presente en el extracto es menor que 1% en peso (preferiblemente menor que 0,2% en peso, más preferiblemente menor que 0,15% en peso, más preferiblemente menor que 0,1% en peso) basado en el extracto.

En un aspecto preferido, la cantidad combinada de verbenona presente en el extracto es menor que 1% en peso (preferiblemente menor que 0,2% en peso, más preferiblemente menor que 0,15% en peso, más preferiblemente menor que 0,1% en peso) basado en el extracto.

10 En un aspecto preferido, la cantidad combinada de borneol presente en el extracto es menor que 1% en peso (preferiblemente menor que 0,2% en peso, más preferiblemente menor que 0,15% en peso, más preferiblemente menor que 0,1% en peso) basado en el extracto.

En un aspecto preferido, la cantidad combinada de alfa-terpineol presente en el extracto es menor que 1% en peso (preferiblemente menor que 0,2% en peso, más preferiblemente menor que 0,15% en peso, más preferiblemente menor que 0,1% en peso) basado en el extracto.

15 En un aspecto preferido, la cantidad combinada de alcanfor, verbenona, borneol y alfa-terpineol presente en el extracto es menor que 1% en peso (preferiblemente menor que 0,2% en peso, más preferiblemente menor que 0,15% en peso, más preferiblemente menor que 0,1% en peso) basado en el extracto.

20 En un aspecto preferido, el extracto contiene menos de 1% en peso de aceites esenciales y/u oleorresinas de plantas, basado en el extracto. En un aspecto preferido, el extracto contiene menos de 1% en peso de aceites esenciales y/u oleorresinas de plantas, basado en la composición.

En un aspecto preferido, el extracto contiene aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en el extracto. En un aspecto preferido, el extracto contiene aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en la composición.

25 En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero, salvia, orégano, mejorana, menta, melisa, ajedrea y tomillo. En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero, salvia, orégano, mejorana, menta, melisa y ajedrea. Se entenderá que estos nombres cubren todas las especies y variedades conocidas para estos nombres.

30 En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), marjorana (*Origanum marjorana* L.), menta (*Mentha* spp.), melisa (*Melissa officinalis* L.), ajedrea (*Satureia hortensis*), tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), marjorana (*Origanum marjorana* L.), menta (*Mentha* spp.), melisa (*Melissa officinalis* L.) y ajedrea (*Satureia hortensis*).

35 En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), marjorana (*Origanum marjorana* L.), menta (*Mentha* spp.), melisa (*Melissa officinalis* L.) y ajedrea (*Satureia hortensis*).

En un aspecto preferido, la planta de la familia Labiatae es romero.

En un aspecto preferido adicional, los diterpenos fenólicos, triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico se obtiene por síntesis química.

40 Microorganismo

Como se expone en la presente memoria, la presente invención puede prevenir y/o inhibir el crecimiento, y/o matar un microorganismo en un material. Esto puede ser ralentizar o detener un microorganismo, tal como una bacteria, o matar el microorganismo presente en contacto con la presente composición.

45 En un aspecto, el material antimicrobiano y/o el extracto están presentes en una cantidad para proporcionar un efecto microbicida o microbiostático.

En un aspecto, la bacteriocina y el extracto están presentes en una cantidad para proporcionar un efecto microbicida o microbiostático.

En un aspecto, la bacteriocina y el extracto están presentes en una cantidad para proporcionar un efecto sinérgico microbicida o microbiostático.

En un aspecto, la bacteriocina y el extracto están presentes en una cantidad para proporcionar un efecto sinérgico microbicida.

En un aspecto muy preferido, el efecto microbicida o microbiostático es un efecto bactericida o bacteriostático.

5 Es ventajoso que el efecto bactericida o bacteriostático sea con respecto a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Preferiblemente, el efecto bactericida o bacteriostático es con respecto a las bacterias Gram positivas.

10 En un aspecto preferido el efecto bactericida o bacteriostático es con respecto a un organismo seleccionado de bacterias Gram positivas asociadas con la descomposición de alimentos o enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo especies de *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, bacterias del ácido láctico, bacterias descomponedoras del ácido láctico, especies de *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Clostridium*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*.

En un aspecto preferido, el efecto bactericida o bacteriostático de la invención en combinación con un agente quelante, es con respecto a un organismo seleccionado de otros microorganismos asociados con la descomposición de alimentos o enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo levaduras, mohos y bacterias Gram negativas incluyendo *Escherichia coli*, especies de *Salmonella* y especies de *Pseudomonas*.

15 En un aspecto preferido, el efecto bactericida o bacteriostático es con respecto a un organismo seleccionado de *Bacillus cereus* 204, *B. cereus* Campden, *B. cereus* NCTC2599, *B. subtilis* Campden, *Clostridium sporogenes* cepa Campden, *Clostridium sporogenes* cepa 1.221, *Clostridium sporogenes* NCIMB1793, *Listeria monocytogenes* 272, *L. monocytogenes* NCTC12426, *L. monocytogenes* S23, *Lactobacillus sake* 272, *Escherichia coli* S15, *E. coli* CRA109, *Salmonella* Typhimurium S29, *Pseudomonas fluorescens* 3756.

20 En un aspecto preferido, el efecto bactericida o bacteriostático es con respecto a *Listeria monocytogenes*.

Producto alimenticio

25 La composición, el procedimiento y uso de la presente invención pueden prevenir y/o inhibir el crecimiento, y/o matar un microorganismo en cualquier material. Sin embargo, en vista de los problemas asociados con la descomposición y contaminación de los productos alimenticios, y en vista de la particular eficacia de la presente invención en productos alimenticios, preferiblemente la composición es un producto alimenticio o se puede añadir a un producto alimenticio. El experto en la técnica apreciará que cuando la presente composición es un producto alimenticio, los componentes esenciales (a) nisina y (b) extracto que se obtiene o se puede obtener de una planta de la familia Labiatae, ya están presentes en el producto alimenticio. Se pueden haber proporcionado por uno o más medios. Por ejemplo, se pueden haber añadido en forma de una composición que contiene la nisina y el extracto. Los dos

30 componentes (la nisina y el extracto mencionado antes) se pueden haber añadido al producto alimenticio de forma secuencial. En un aspecto adicional, uno o más de los componentes se pueden haber formado in situ en el producto alimenticio. Por ejemplo, la nisina se puede formar in situ en el producto alimenticio por fermentación de la bacteria láctea de cultivo iniciador *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*.

35 En un aspecto, la composición de la presente invención es una composición protectora adecuada para la adición a un producto alimenticio.

40 Se pueden proteger muchos productos alimenticios mediante la presente invención. Los productos alimenticios típicos son carne cruda, carne cocinada, productos avícolas crudos, productos avícolas cocinados, productos de pescados y mariscos crudos, productos de pescados y mariscos cocidos, comidas precocinadas, salsas para pastas, sopas pasteurizadas, mayonesa, aderezos para ensaladas, emulsiones de aceite en agua, margarinas, productos para untar bajos en grasas, emulsiones de agua en aceite, productos lácteos, productos para untar de queso, queso procesado, postres lácteos, leches saborizadas, nata, productos lácteos fermentados, queso, mantequilla, productos lácteos condensados, mezclas para helados, productos de soja, huevo líquido pasteurizado, productos de panadería, productos de pastelería, productos de frutas y alimentos con rellenos que contienen agua o a base de grasa.

45 Componentes adicionales

50 La composición de la presente invención o la composición para usar en la presente invención, puede contener uno o más componentes adicionales. Sin embargo, en algunos aspectos, la composición protectora de la presente invención (adecuada para la adición a un producto alimenticio) no contiene componentes adicionales o no contiene componentes adicionales que afecten materialmente a las propiedades de la composición. En estos aspectos, la presente invención proporciona

- una composición que consiste esencialmente en (a) nisina; y
- una composición que consiste en (b) un extracto obtenido o que se puede obtener de una planta de la familia Labiatae,

en donde (a) y (b) son diferentes

en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 1,0% en peso basado en la composición,

y en donde la composición comprende

- 5 carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición,
 carvona en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, y
 timol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.

10 En un aspecto preferido, la composición comprende además un emulsionante. Preferiblemente, el emulsionante se selecciona de ésteres de sorbitán polioxitilénicos (E432-E436) conocidos por otra parte como polisorbatos (p. ej., Tween 80, Tween 20), monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de ácido acético y mono-diglicéridos, ésteres de ácido tartárico y mono-diglicéridos, y ésteres de ácido cítrico y mono-diglicéridos.

En un aspecto preferido, la composición comprende además un agente quelante. Preferiblemente, el agente quelante se selecciona de EDTA, ácido cítrico, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos y polifosfatos.

15 Se enseñan agentes quelantes adecuados adicionales en el documento US 5573801 e incluyen ácidos carboxílicos, ácidos policarboxílicos, aminoácidos y fosfatos. En particular, pueden ser útiles los siguientes compuestos y sus sales.

20 ácido acético, adenina, ácido adípico, ADP, alanina, B-alanina, albúmina, arginina, ácido ascórbico, asparagina, ácido aspártico, ATP, ácido benzoico, ácido n-butírico, caseína, ácido citracónico, ácido cítrico, cisteína, ácido deshidracético, desferri-ferricrisina, desferri-ferricromo, desferri-ferrioxamina E, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), dimetilglioxima, o,o-dimetilpurpurogalina, EDTA, ácido fórmico, ácido fumárico, globulina, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glutárico, glicina, ácido glicólico, glicilglicina, glicisarcosina, guanosina, histamina, histidina, 3-hidroxi flavona, inosina, inosina trifosfato, ferricromo sin hierro, ácido isovalérico, ácido itacónico, ácido kójico, ácido láctico, leucina, lisina, ácido maleico, ácido málico, metionina, salicilato de metilo, ácido nitrilotriacético (NTA), ornitina, ortofosfato, ácido oxálico, oxiestearina, b-fenilalanina, ácido fosfórico, fitato, ácido pimélico, ácido piválico, polifosfato, prolina, ácido propiónico, purina, pirofosfato, ácido pirúvico, riboflavina, salicilaldehído, ácido salicílico, sarcosina, serina, sorbitol, ácido succínico, ácido tartárico, tetrametafosfato, tiosulfato, treonina, trimetafosfato, trifosfato, triptófano, uridina difosfato, uridina trifosfato, ácido n-valérico, valina, y xantósina.

30 Muchos de los agentes secuestrantes anteriores son útiles en el procesamiento de alimentos en sus formas de sal, que normalmente son sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como sales de sodio, potasio o calcio o de amonio cuaternario. Los compuestos secuestrantes con múltiples valencias se pueden usar de forma beneficiosa para ajustar el pH o introducir o retirar selectivamente iones metálicos, p. ej., en un recubrimiento de sistema alimenticio. Se describe información adicional de agentes quelantes en T. E. Furia (Ed.), CRC Handbook of Food Additives, 2nd Ed., pp. 271-294 (1972, Chemical Rubber Co.), y M. S. Peterson and A. M. Johnson (Eds.), Encyclopaedia of Food Science, pp. 694-699 (1978, AVI Publishing Company, Inc.) cuyos artículos se incorporan
 35 ambos en la presente memoria por referencia.

40 La expresión "agente quelante" se define como compuestos orgánicos o inorgánicos capaces de formar complejos de coordinación con metales. Además, como se usa en la presente memoria la expresión "agente quelante" incluye compuestos de encapsulación moleculares tales como ciclodextrina. El agente quelante puede ser inorgánico u orgánico, pero preferiblemente es orgánico.

45 Los agentes quelantes preferidos no son tóxicos para los mamíferos e incluyen ácidos aminopolicarboxílicos y sus sales, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sus sales (en particular sus sales de di y trisodio) y ácidos hidrocarboxílicos y sus sales tales como ácido cítrico. Sin embargo, se cree que los agentes quelantes de ácido hidrocarboxílico no cítricos y no citratos también son útiles en la presente invención, tales como el ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido tartárico y sus sales.

50 Como se ha indicado antes, la expresión "agente quelante" se define y usa en la presente memoria como un sinónimo de agente secuestrante y se define también incluyendo compuestos de encapsulación moleculares tales como ciclodextrina. Las ciclodextrinas son moléculas de hidratos de carbono cíclicas que tienen 6, 7 u 8 monómeros de glucosa dispuestos en un anillo con forma de rosquilla, que se denominan alfa, beta o gamma ciclodextrina, respectivamente. Como se usa en la presente memoria, ciclodextrina se refiere a monómeros y polímeros de ciclodextrina tanto no modificados como modificados. Los encapsuladores moleculares de ciclodextrina están disponibles en el comercio en American Maize-Products of Hammond, Ind. Se describen además ciclodextrinas en el capítulo 11 titulado, "Industrial Applications of Cyclodextrin", de J. Szejtli, páginas 331-390 de *Inclusion Compounds*, Vol. III (Academic Press, 1984) cuyo capítulo se incorpora en la presente memoria por referencia.

Preferiblemente, el agente quelante potencia la actividad antimicrobiana y/o el espectro antimicrobiano de la bacteriocina. Más preferiblemente, el agente quelante potencia la actividad antimicrobiana y/o el espectro antimicrobiano de la bacteriocina con respecto a bacterias Gram-negativas y otros microorganismos.

- 5 En un aspecto preferido, la composición comprende además una enzima lítica. Preferiblemente, la enzima lítica es una lisozima.

Procedimiento

Como se expone en la presente memoria, en un aspecto la presente invención se proporciona según la reivindicación 34.

En un aspecto, la nisina y el extracto se añaden juntos al material.

- 10 En un aspecto, la nisina y el extracto se añaden de forma secuencial al material.

Por lo tanto, la presente invención proporciona en un aspecto una composición conservante/protectora que se puede añadir a una variedad de materiales tales como sistemas alimenticios, y en otro aspecto, una combinación de dos productos separados que se pueden añadir de forma secuencial a materiales tales como productos alimenticios.

En un aspecto, el extracto se añade al material.

- 15 En un aspecto, la nisina se añade al material.

En un aspecto, el extracto se forma in situ en el material.

En un aspecto, la nisina se forma in situ en el material. Preferiblemente, la nisina se puede formar in situ en el producto alimenticio por fermentación de la bacteria láctea de cultivo iniciador *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*.

- 20 La presente invención ahora se describirá con más detalle a modo de ejemplo solo con referencia a los dibujos que acompañan en los que:

La figura 1 es una gráfica que muestra la potenciación sinérgica de la actividad biocida de la nisina contra *Listeria monocytogenes* en sopa de pollo a 25°C, por un extracto de romero extraído selectivamente.

La figura 2 es una gráfica que muestra la potenciación sinérgica del control por la nisina del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en sopa de pollo fría, por un extracto de romero extraído selectivamente (GRE09)

- 25 La figura 3 es una gráfica que muestra la potenciación sinérgica por un extracto de romero extraído selectivamente, del control por la nisina del crecimiento de esporas de *B. cereus* en sopa de pollo fría.

El límite de detección mínimo era 100 ufc/g. Para la duración del periodo de ensayo, las muestras que contienen la combinación de nisina y romero tenían recuentos de *Bacillus* de o inferiores a 100 ufc/g.

- 30 La figura 4 es una gráfica que muestra el efecto combinado de nisina, extractos de romero extraídos selectivamente y componentes de extracto de romero contra *L. monocytogenes* en sopa de pollo a 20°C (Límite de detección mínimo de 100 ufc/g)

La figura 5 es una gráfica que muestra la potenciación sinérgica de la actividad de nisina por extractos de romero extraídos selectivamente o ácido rosmarínico contra *Listeria monocytogenes* en una sopa de pollo a temperatura ambiente.

- 35 La figura 6 es una gráfica que muestra una demostración de la sinergia entre la nisina y el extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos. Inhibición de *L. monocytogenes* a 8°C.

La figura 7 es una gráfica que muestra una demostración de la sinergia entre la nisina y el extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos. Inhibición de *B. cereus* a 15°C.

- 40 La figura 8 es una gráfica que muestra la actividad inhibidora del crecimiento potenciada de la nisina por el extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos. Control de *L. monocytogenes* en salsa carbonara a 8°C.

La figura 9 es una gráfica que muestra la actividad inhibidora del crecimiento potenciada de la nisina por el extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos. Control de esporas de *B. cereus* en salsa carbonara a 15°C.

La figura 10 es una gráfica que muestra el efecto biocida potenciado de un extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos y nisina contra *L. monocytogenes* en sopa de pollo a 20°C. a) pH 4,5

- 45 La figura 11 es una gráfica que muestra el efecto biocida potenciado de un extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos y nisina contra *L. monocytogenes* en sopa de pollo a 20°C. b) pH 6,7

La presente invención ahora se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Prueba experimental del beneficio

5 Los estudios in vitro descritos en la presente memoria han mostrado sinergia entre la nisina y extractos de Rosmarinus officinalis que contienen > 3,5% de diterpenos fenólicos, aumentando la eficacia de la nisina significativamente. Esta actividad potenciada también se observó en modelos de alimentos, aumentando la muerte y el control del crecimiento por la lisina de bacterias Gram positivas. Los estudios experimentales también demostraron que los diterpenos fenólicos ácido carnósico y carnosol estaban implicados en esta sinergia. Los resultados también indicaban que el ácido rosmarínico también puede potenciar la actividad de la nisina, aunque este efecto sinérgico no era tan fuerte como el observado con los diterpenos fenólicos.

I) Demostración in vitro de la sinergia de la nisina y extracto de romero desodorizado

15 Materiales: Extracto de romero 09 GUARDIAN™ (Danisco) (GRE09). Este es un extracto de romero desodorizado dispersable en agua que contiene 4% de diterpenos fenólicos y < 1% de aceites esenciales, extraídos de hojas de romero, combinado con los vehículos monooleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 80) y propilenglicol. Un extracto comercial de nisina de concentración 1×10^6 UI/g: Nisaplin® Natural Antimicrobial (Danisco).

Cepas de ensayo: Bacillus cereus 204, B. cereus Campden, B. cereus NCTC2599, B. subtilis Campden, Listeria monocytogenes 272, L. monocytogenes NCTC12426, L. monocytogenes S23, Lactobacillus sake 272, Escherichia coli S15, E. coli CRA109, Salmonella Typhimurium S29, Pseudomonas fluorescens 3756.

20 Método de análisis de la curva de crecimiento microbiano. Se preparó una disolución de GRE09 de 100.000 ppm en agua y se esterilizó por filtración (0,2 mm). Se prepararon más diluciones en agua estéril desionizada de 1.250 - 20.000 ppm. Se preparó caldo de infusión de cerebro y corazón (Oxoid) y se añadieron disoluciones madre de GRE09 para dar las siguientes disoluciones de ensayo de GRE09; 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 ppm. Se preparó una disolución de nisina de 10.000 UI/ml, se esterilizó por filtración y después se preparó un intervalo de disoluciones madre. Se preparó un intervalo de concentraciones de nisina en el caldo de infusión de cerebro y corazón. Se usó un analizador de crecimiento microbiano totalmente automatizado para determinar las curvas de crecimiento microbiano (analizador Microbiology Reader Bioscreen C conectado a un PC con el software instalado BioLink v 5.30; LabSystem Oy, Finlandia). Los ensayos se prepararon en placas de microvaloración/cubetas Honeycomb 2 (HC 2) con una capacidad de 100 pocillos por placa. Los pocillos se cargaron con 270 ml del medio preparado y se inocularon con un nivel de 10^3 UFC (unidades formadoras de colonia)/ml con 30 ml de suspensión microbiana. El tiempo y la temperatura de incubación eran los adecuadas para el organismo de ensayo. Este ensayo permitía niveles de ensayo adecuados para los compuestos que se iban a determinar. Después se ensayaron el extracto de romero y la nisina en combinación, usando el mismo procedimiento. Se prepararon disoluciones de nisina de 50 -1000 UI/ml en caldo como antes. Se prepararon disoluciones de GRE09 de 250, 500 y 1000 ppm como antes. Se prepararon combinaciones de todos estos niveles de ensayo y se ensayaron en el dispositivo Bioscreen como antes.

35 Resultados: La concentración mínima inhibidora de la nisina sola, el extracto de romero GRE09 solo y los dos en combinación en el dispositivo Bioscreen después de 48 h a 30°C se muestra en la tabla 1. La inhibición mínima se consideró como la concentración más baja que producía la inhibición total de las bacterias después de 48 h a 30°C. Se observó sinergia entre la nisina y el extracto de romero GRE09 contra bacterias Gram positivas, pero no se observó efecto significativo contra bacterias Gram negativas. Esto se puede determinar a partir de la tabla, comparando la columna de los datos que muestran los niveles de CMI de nisina sola, GRE09 solo y los dos combinados. La última columna daba niveles mucho menores que las otras dos para bacterias Gram positivas (Bacillus, Listeria), pero no para bacterias Gram negativas (E. coli, Salmonella).

ES 2 481 167 T3

Tabla 1: Ensayos de sinergia de nisina y extracto de romero GRE09

Organismo de ensayo	CMI en caldo después de 48 h a 30°C (inhibición total)			Otros niveles de ensayo de la combinación que producen inhibición total
	Nisina (UI/ml)	GRE09 (ppm)	CMI de nisina (UI/ml) + GRE09 (ppm)	Nisina (UI/ml) + GRE09 (ppm)
B. cereus 204	500	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
B. cereus NCTC2599	500	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
B. subtilis Campden	100	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
L. monocytogenes S23	> 500	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
L. monocytogenes 272	> 500	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
L. monocytogenes 12426	> 500	> 1000	50 + 250	50 + 500 50 + 1000 100 + 250 100 + 500 100 + 1000 200 + 250 200 + 500 200 + 1000
E. coli S15	> 500	> 1000	> 1000 + > 1000	-
E. coli CRA109	> 500	> 1000	> 1000 + > 1000	-
S. Typhimurium S29	> 500	> 1000	> 1000 + > 1000	-
Ps. fluorescens 3756	> 500	> 1000	> 1000 + > 1000	-

II) Demostración de la sinergia de la nisina y el extracto de romero GRE09 en alimentos

A) Sinergia contra *Listeria monocytogenes*

Compuestos de ensayo: GRE09 al 0,1%, 0,5%, Nisaplin® (Danisco).

5 Cepas de ensayo: se preparó un cóctel de las cepas de *L. monocytogenes* NCTC12426, NCTC5105, NCC FSM60 y CRA3930. Las cepas de *Listeria* se cultivaron a 30°C en agar infusión de cerebro y corazón durante la noche, y después se inocularon en caldo a 30°C durante la noche. Se mezclaron entre sí un volumen de cada caldo para dar un cóctel de cepas con una concentración de células de aproximadamente 10⁹ UFC/ml.

10 Medio: Se usó una sopa de pollo pasteurizada fría como un modelo de alimento porque era una buena mezcla de diferentes componentes de alimentos que incluía verduras, productos lácteos y carne de ave. Estaba compuesta de un caldo de pollo con la adición de pollo, nata, verduras, harina y condimentos. El pH era 6,12. Después de añadir nisina y extracto de romero GRE09, la sopa se pasteurizó a una temperatura central de 80°C durante 2 min. El cóctel de *Listeria* se diluyó a 10⁴ UFC/ml y se inoculó en los ensayos de sopa para dar un recuento celular final de aproximadamente 10² UFC/g (ensayos inhibidores de crecimiento) y 10⁷ UFC/ml (ensayos biocidas). Este último ensayo se incubó a 25°C durante 2 h y después se ensayó por enumeración y recuento de células viables para calcular la extensión de la actividad biocida. El ensayo de crecimiento se incubó a 8°C con toma de muestra regular para calcular la actividad bacteriostática.

20 Resultados: El extracto de romero GRE09 solo al 0,5% no mostró actividad listericida. La nisina 250 UI/g produjo una disminución de 1 log en las cifras de *Listeria* después de 2 h, pero solo un ligero retraso en el crecimiento después de 24 h (Figura 1). En comparación, la combinación de los dos productos de ensayo a estos niveles, produjo una disminución de 2-3 log en las cifras de *Listeria* después de 2 h. Después de 24 h, las células todavía no se habían recuperado a su nivel de inoculación inicial. Este era un ensayo particularmente riguroso para cualquier sistema conservante, puesto que el medio de ensayo era un modelo de alimento rico, la temperatura de incubación era la ambiente y las cifras de bacterias altas. Por lo tanto, cualquier actividad potenciada de la nisina era una buena indicación de sinergia.

25 La incubación para el ensayo bacteriostático era durante 43 días: los resultados de este se muestran en la figura 2 y la tabla 2. La sinergia de nisina/romero se demostró de nuevo claramente en el modelo de alimento contra el cóctel de *Listeria*. Por ejemplo, el crecimiento de *Listeria* alcanzó 10⁶ UFC/ml después de 13 días en presencia de 100 UI/ml de nisina; después de 10 días en presencia de GRE09 al 0,1%, pero solo después de un periodo mucho más largo, 34 días, en presencia de la combinación de estos dos ingredientes. Igualmente, el crecimiento de *Listeria* alcanzó 10⁶ UFC/ml después de 13 días en presencia de 100 UI/ml de nisina; después de 20 días en presencia de GRE09 al 0,5%. La combinación de los dos componentes dio como resultado que no se observara crecimiento al final del periodo de ensayo.

Tabla 2. Resumen de la inhibición del crecimiento de *Listeria* en sopa de pollo fría (El ensayo duró 43 días)

Condiciones del ensayo	Días hasta que el crecimiento alcanzó 10 ⁶ UFC/ml
Testigo	6
Nisina 100 UI/ml	13
Nisina 250 UI/ml	27
Extracto de romero GRE09 al 0,1 %	10
Extracto de romero GRE09 al 0,5 %	20
Nisina (100 UI/ml) + GRE09 al 0,1%	34
Nisaplin (100 UI/ml) + GRE09 al 0,5%	> 43
Nisaplin (250 UI/ml) + GRE09 al 0,1%	> 43
Nisaplin (250 UI/ml) + GRE09 al 0,5%	> 43

35 Durante el periodo de ensayo (a) Nisaplin (100 UI/ml) + GRE09 al 0,5%, (b) Nisaplin (250 UI/ml) + GRE09 al 0,1%, y (c) Nisaplin (250 UI/ml) + GRE09 al 0,5%, no dieron ningún recuento total de viables aerobios superior a 100 ufc/g.

B) Sinergia contra *Bacillus cereus*

Cepas de ensayo: se preparó un cóctel de esporas de *Bacillus* como inóculo, usando la cepa de *Bacillus* 204, cepa de *Bacillus cereus* 199, *B. cereus* strain Campden, y cepa de *B. cereus* ABC 4/9.

40 Se hicieron adiciones de los compuestos de ensayo a sopa de pollo, preparada como antes. La sopa se pasteurizó a 70°C durante 2 min, se enfrió y se inocularon aproximadamente 10³ UFC/g de un cóctel de esporas de *Bacillus cereus*. La incubación fue durante 56 días. Los resultados se muestran en la figura 3 y se resumen en la tabla 3. La sinergia bacteriostática entre la nisina y el extracto de romero GRE09 era evidente. Por ejemplo, se produjo descomposición (es decir, 10⁶ UFC/ml) después de 13 días en presencia de 25 UI/ml de nisina, y después de 10 días en presencia de 300 ppm de GRE09. En presencia de ambos ingredientes, no se había producido descomposición al final del ensayo (56 días).

Tabla 3. Resumen de los resultados del ensayo de sopa de pollo fría inoculada con esporas de *Bacillus cereus* (El ensayo duró 70 días).

Condiciones del ensayo	Días hasta que el crecimiento alcanzó 10 ⁶ UFC/ml
Testigo	6
Nisina 25 UI/ml	13
Extracto de romero GRE09 300 ppm	10
Extracto de romero GRE09 600 ppm	13
Nisina (25 UI/ml) + GRE09 300 ppm	> 70
Nisaplin (25 UI/ml) + GRE09 600 ppm	> 70

C) Sinergia contra *Clostridium sporogenes*

- 5 Cepas de ensayo: se preparó un cóctel de esporas de *Clostridium* como un inóculo, usando la cepa de *Clostridium sporogenes* Campden, *Clostridium sporogenes* 1.221, y *Clostridium sporogenes* NCIMB1793.

10 Se hicieron adiciones de los compuestos de ensayo a sopa de pollo, preparada como antes. La sopa se pasteurizó a 70°C durante 2 min, y se transfirió a tubos de ensayo estériles. Se inoculó en estos un cóctel de esporas de *Clostridium sporogenes* tratadas por choque térmico, en un nivel de $2,2 \times 10^2$ UFC/g, y después se crearon condiciones anaerobias taponando los tubos con agar. Las muestras se incubaron a 37°C y se comprobó diariamente la producción de gas (observado desprendiendo el tapón de gas y por el olor de *Clostridium* característico). Los resultados para un periodo de incubación de 27 días, que demuestran la sinergia, se muestran en la tabla 4. Por ejemplo, la sinergia se vio claramente por el efecto combinado de 50 UI/ml de nisina y 300 ppm de GRE09, que previnieron el crecimiento durante 27 días (la duración del ensayo), mientras que los ingredientes individuales previnieron ambos el crecimiento de *Clostridium* durante 2 días (igual que el testigo).

Tabla 4. Resumen de los resultados del ensayo de sopa de pollo inoculada con *Clostridium sporogenes* incubada a 37°C (El ensayo duró 27 días).

Condiciones del ensayo	Días hasta el crecimiento observado (producción de gas)
Testigo	2
Nisina 25 UI/ml	2
Nisina 50 UI/ml	2
Nisina 100 UI/ml	7
Extracto de romero GRE 09 300 ppm	2
Extracto de romero GRE 09 600 ppm	2
Nisina (25 UI/ml) + GRE 09 300 ppm	3
Nisina (50 UI/ml) + GRE 09 300 ppm	> 27
Nisina (100 UI/ml) + GRE 09 300 ppm	> 27
Nisaplin (25 UI/ml) + GRE 09 600 ppm	10
Nisaplin (100 UI/ml) + GRE 09 600 ppm	> 27

- 20 III) Demostración de la sinergia in vitro con diferentes extractos de romero extraídos selectivamente, desodorizados y ácido rosmarynico (no es según la invención)

25 Se analizaron las curvas de crecimiento de cepas de *Listeria monocytogenes* y *B. cereus* en medio de laboratorio como se ha descrito antes, usando el analizador Bioscreen C. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los compuestos de ensayo usados solos o en combinación después de 24 h a 30°C. Los resultados se muestran en la tabla 5. Los compuestos de ensayo comprendían nisina (como Nisaplin®; Danisco), GRE09 (Danisco), ácido rosmarynico puro (RA; Sigma) y una variedad de extractos de romero desodorizados. Estos se habían preparado por extracción seleccionada con disolventes orgánicos o CO₂ para obtener extractos que contenían 28% de diterpenos fenólicos (28RE; Danisco) y un extracto de romero que contenía 6% de ácido rosmarynico (6RA; Danisco). La actividad potenciada de la nisina era evidente con una combinación de nisina combinada con ácido rosmarynico puro (RA; esto puede deberse en parte a niveles de pH bajos), una combinación de nisina con un extracto de romero que contiene 6% de ácido rosmarynico (6RA) y una combinación de nisina con un extracto de romero desodorizado que contiene 28% de diterpenos fenólicos y < 1% de aceites esenciales (28RE). También se observó la sinergia conocida de nisina con Tween 80. El otro vehículo de propilenglicol no potencia la actividad de la nisina. Las sinergias se pueden observar, como antes, comparando los niveles de CMI para la nisina sola, el otro compuesto de ensayo y los dos juntos (véase la tabla 5).

Tabla 5. CMI después de cultivo a 30°C en medio de laboratorio

Organismo de ensayo	CMI en Bioscreen después de 24 h a 30°C	
	Componentes individuales	Combinación con nisina
L. monocytogenes cepa S23	Nisina 1000 UI/ml	-
	GRE09 al 0,1%	GRE09 al 0,05% + nisina 50 UI/ml
	RA al 1%	RA al 0,25% + nisina 250 UI/ml RA al 0,5% + nisina 100 UI/ml RA al 0,75% + nisina 50 UI/ml
Organismo de ensayo	CMI en Bioscreen después de 24 h a 30°C	
	Componentes individuales	Combinación con nisina
	6RA al 1%	6RA < 0,1% + nisina 250 UI/ml 6RA al 0,5% + nisina 50 UI/ml
L. monocytogenes cepa 272	nisina 500 UI/ml	-
	GRE09 al 0,25%	GRE09 <0,05% + nisina 50 UI/ml
	1% de RE28	RE28 <0,05% + nisina 50 UI/ml
	Tween 80 > 2%	Tween 80 al 0,5% + nisina 250 UI/ml
L. monocytogenes cepa NCTC12426	nisina 250 UI/ml	-
	GRE09 al 0,25%	GR 09 < 0,05% + nisina 50 UI/ml
	1% de RE28	RE28 al <0,05% + nisina 50 UI/ml
	Tween 80 > 2%	Tween 80 al 0,5% + nisina 100 UI/ml
Esporas de B. cereus Campden	nisina 500 UI/ml	-
	GRE09 al 0,1%	GRE09 al 0,05% + 50 UI/ml
	RA al 1%	RA al 0,5% + nisina 250 UI/ml RA al 0,75% + nisina 100 UI/ml RA al 0,75% + nisina 50 UI/ml
	6RA al 1%	6RA al 0,25% + nisina 100 UI/ml 6RA al 0,5% + nisina 50 UI/ml

IV) Demostración de la sinergia para la actividad de la nisina con diferentes componentes del extracto de romero desodorizado en alimentos

5 Cepas de ensayo: *Listeria monocytogenes* cepas 272, CRA3930 y NCTC12426

Se usó el modelo de sopa de pollo como antes. Se ensayaron las siguientes muestras: GRE09, extractos de romero desodorizados que contienen 28% o 70% de diterpenos fenólicos (RE28 y RE70; Danisco), un extracto de romero soluble en agua que contiene 6% de ácido rosmarínico (6RA; Danisco) y ácido rosmarínico puro (RA; Sigma). Se hicieron adiciones a la sopa según fuera adecuado. La sopa se pasteurizó (70°C/ 2 minutos), se registró el pH y después se inoculó en la sopa un cóctel de células de *Listeria* preparadas como se ha descrito antes. Los ensayos se incubaron a 20°C y se llevó a cabo la enumeración del recuento de células viables después de 0, 2, 4 y 24 h a 20°C. Los niveles iniciales de *Listeria* eran $1,3 \times 10^5$ UFC/ml. El ensayo se repitió con dos niveles de nisina y a lo largo de diferentes periodos de tiempo. El pH de la sopa sin adición era pH 6,06 - 6,20. La adición de ácido rosmarínico al 0,1% produjo una ligera disminución del pH a pH 5,75. La adición de RA al 6% produjo un pH de la sopa de pH 5,75-5,78. La adición de RE28 al 0,5% produjo un pH de la sopa de pH 5,98. La adición de RE70 al 0,5% produjo un pH de la sopa de pH 6,10. La adición de GRE09 al 0,5% produjo un pH de la sopa de pH 6,02-6,09.

Los resultados, mostrados en las figuras 4 y 5, indican que todos los extractos desodorizados ensayados y el ácido rosmarínico contribuían a la sinergia con la nisina para lograr la muerte de las células de *Listeria*. Esto no se podía atribuir a la disminución del pH producida por algunas adiciones. Se observó sinergia adicional con Tween 80 en GRE09. Los resultados indican que los compuestos antioxidantes carnosol y ácido carnósico, presentes al 28 y 70% en dos de los extractos ensayados, potenciaban de forma sinérgica la actividad biocida e inhibidora del crecimiento de la nisina contra *Listeria monocytogenes*. Era evidente una sinergia de la nisina con el ácido rosmarínico, pero no tan fuerte.

V) Demostración de la potenciación sinérgica de la actividad inhibidora del crecimiento de nisina en diferentes sistemas alimenticios usando una mezcla de nisina con un extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos

A) Ensayos de sopa de pollo pasteurizada

Método: Se añadieron diferentes adiciones de nisina (como Nisaplin®, Danisco), un extracto de romero que contenía 28% de diterpenos fenólicos (RE28), y una mezcla de nisina con el extracto de romero con niveles de 50 UI/mg y 4,2% de diterpenos fenólicos, a sopa de pollo comercial que no contenía otros conservantes. Después de añadir los compuestos, la sopa (pH 5,8) se pasteurizó a una temperatura central de 70°C durante 2 min. La sopa se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó un cóctel de células en fase estacionaria de cepas de *Listeria monocytogenes* o esporas de *Bacillus cereus*. Los cócteles de cepas comprendían: *L. monocytogenes* cepas NCIMB12426, cepa 358,

cepa 272, cepa CRA3930. El cóctel de *B. cereus* comprendía cepas 204, 199, ABC4/9 y 3.046. Los niveles de inoculación iniciales eran aproximadamente 10^2 - 10^3 UFC/g. Los ensayos de *Bacillus* se incubaron a 15°C, los ensayos de *Listeria* se incubaron a 8°C. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo a intervalos regulares (Milk Plate count Agar, agar selectivo para *Listeria* de Oxford).

- 5 Resultados: Los resultados, mostrados como el tiempo que tarda en alcanzarse cifras bacterianas de 10^6 UFC/g, se resumen en la tabla 5. Los datos completos se muestran en las figuras 6 y 7. Los resultados muestran que el extracto de romero solo no tenía actividad contra *Bacillus*, y solo una pequeña actividad contra *Listeria*. El extracto de romero potenciaba significativamente la actividad inhibidora del crecimiento de la nisina.

- 10 Tabla 5. Resumen de los resultados que demuestran la sinergia de nisina/diterpeno fenólico contra *Listeria* y *Bacillus* en una sopa de pollo pasteurizada

Ensayo	Contenido de nisina	Contenido de diterpenos fenólicos	Días hasta que el crecimiento alcanzó 10^6 UFC/g	
			<i>L. monocytogenes</i> a 8°C	<i>B. cereus</i> a 15°C
Testigo	0		3	2
RE28 a 75 ppm	0 UI/g	21 ppm	5	2
Nisaplin 100 mg/kg	100 UI/g	0 ppm	6	3
Nisaplin 250 mg/kg	250 UI/g	0 ppm	16	6
Mezcla A de nisina/romero	100 UI/g	8,4 ppm	15	> 26
Mezcla B de nisina/romero	250 UI/g	21 ppm	52	> 26

B) Ensayos de salsa de carne para pasta pasteurizada

- 15 Método: La salsa se preparó a partir de ternera picada magra (50%), tomates y jugo (48,9%), almidón (0,5%), sal (0,4%) y sacarosa (0,2%). La ternera se frió durante 5 min hasta estar dorada, y después se mezcló con los ingredientes secos seguido de los tomates con el jugo. La salsa se cocinó a fuego lento durante 10 min y se dejó enfriar antes de mezclar hasta una consistencia fina. El pH final era 5,13. Se hicieron adiciones de nisina, extracto de romero y mezclas. La salsa se pasteurizó a una temperatura central de 80°C durante 2 min. Se inoculó un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes* (como antes) después de la pasteurización y los ensayos se incubaron a 8°C.

- 20 Resultados: Los resultados, mostrados como el tiempo que tarda en alcanzarse cifras bacterianas de 10^6 UFC/g, se resumen en la tabla 6. Estos muestran que el extracto de romero solo no tenía actividad contra *Bacillus*, y solo una pequeña actividad contra *Listeria*. El extracto de romero potenciaba significativamente la actividad inhibidora del crecimiento de la nisina.

Tabla 6. Resumen de los resultados que demuestran la sinergia de nisina/diterpeno fenólico contra *Listeria* en una salsa de carne pasteurizada, a 8°C

Ensayo	Nisina	Diterpenos fenólicos	Días hasta 10^6 UFC/g
Testigo	0	0	4
RE28 60 ppm	0 UI/g	16,8 ppm	5
Nisaplin 100 mg/kg	100 UI/g	0 ppm	11
Mezcla A de nisina/romero	100 UI/g	8,4 ppm	> 76

- 25

C) Ensayos de salsa carbonara para pasta

- 30 Método: Se usó una salsa pasteurizada fría comercial, que contenía puré de nata, bacón ahumado, queso, mascarpone, mantequilla, almidón, cebolla, ajo. Proteínas 7 g, hidratos de carbono 6 g, grasas 17 g. Las adiciones de los compuestos de ensayo se hicieron antes de la pasteurización (temperatura central de 70°C durante 10 minutos). Las inoculaciones se hicieron una vez se había enfriado la salsa. Se analizaron regularmente en las muestras las cifras microbianas.

- Resultados: Estos se muestran en las figuras 8 y 9. Como antes, el extracto que contenía diterpenos fenólicos (8,4 ppm) potenció de forma sinérgica la actividad inhibidora del crecimiento de nisina contra las células de *Listeria* y esporas de *Bacillus*. El extracto de romero solo no mostraba actividad.

- 35 VI) Demostración de la potenciación sinérgica de la actividad biocida de la nisina en un sistema alimenticio usando una mezcla de nisina con extracto de romero que contiene diterpenos fenólicos

- 40 Método: La sopa de pollo diluida (pH 6,2) se preparó como antes, y se dividió en 2 lotes, ajustándose uno de los lotes a pH 4,5 con HCl. Se hicieron adiciones adecuadas de nisina, extracto de romero y mezclas, y después la sopa se pasteurizó. Se inoculó un cóctel de cepas de *Listeria* para dar un inóculo inicial de 10^5 UFC/g. Se contaron las células viables por análisis microbiológico a las 0 y 2 h.

Las mezclas de ensayó contenían 1) nisina 100 UI/g + extracto de romero 30 ppm (es decir, diterpenos fenólicos 8,4), y 2) nisina 150 UI/g + extracto de romero 45 ppm (es decir, diterpenos fenólicos 12,6).

Resultados: Los resultados demostraron que la presencia del extracto de romero que contenía diterpenos fenólicos potenciaba de forma sinérgica la actividad biocida de la nisina (figuras 10 y 11), en particular en condiciones más ácidas (figura 10). El extracto de romero solo no tenía efecto biocida significativo.

Referencias

Combinación de bacteriocina + romero

JP 07-039365 & JP 3042573 (Asam Kasei KK, Lion Corp) JP 3040282 (Asam Kasei KK)

Sinergia de nisina + Tween 80

- 10 Jung, D. -S, Bodyfelt, F. W. and Daeschel, M. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 75: 387-393

Sinergia entre aceites esenciales y nisina

Pol, I. E., Krommer, J., and Smid, E. 2002. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3: 55-61.

- 15 Pol, I. E. and Smid, E. J. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 166- 170.

Pol, I. E. 2001. Improved applicability of nisin in novel combinations with other food preservation factors. Ph.D thesis Wageningen University, The Netherlands ISBN 90-5808-382-9

- 20 Periago, P. M., Palop, A., Fernandez, P. S. 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7: 487-492.

Periago et al. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 68: 141-148

Ettayebi et al. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 183: 191-195

- 25 Olasupo et al. 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology* 36: 448-451.

Actividad antimicrobiana del romero

Aureli, P., Constantini, A., and Zolea, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55:344-348.

- 30 Azzouz, M. A. and Bullerman, L. B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection* 45: 1298-1301

Collins, M. A., and Charles, H. P. 1987. Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology* 4: 311-315

- 35 Deans, S. G. and Ritchie, G. 1987. Antibacterial activity of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5: 165-180.

Del Campo, J., Amiot, M. -J., and Nguyen-The, C. 2000. Antimicrobial effect of Rosemary extracts. *Journal of Food Protection*. 63:1359-1368.

- 40 Del Campo, J., Amiot, M. -J., Lapierre, C., and Nguyen-The, C. 1998. Antimicrobial activity of phenolic extracts from rosemary. 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECS)C-2), <http://www.mdpi.org/ecsoc/>, September 1-30, 1998

Eiserle, R. J. 1971. Gemini rising - a natural flavouring and stabilisation system for food. *Food Prod. Dev.* 10: 70 - 71

Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52: 665-667

- 45 Farbood, M. I., MacNeil, J. H. and Ostovar, K. 1976. Effect of Rosemary spice extractive on growth of micro-organisms in meat. *Journal of Milk Food Technology*. 39:675-679

- MacNeil, J. H., Dimick, P. S., and Mast, M. G. 1973. Use of chemical compounds and a rosemary spice extractive in quality maintenance of deboned poultry meat. *Journal of Food Science* 38: 1080-1081
- MacNeil, J. H., and Mast, M. G. 1973. Frankfurters without nitrates and nitrites. *Food Prod. Dev.* 7: 36- 40
- Pandit, V. A. and Shelef, L. A. 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary. *Food Microbiology* 11: 57-63
- 5 Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6:29-44
- Shelef, L. A., Naglik, O. A., and Bogen, D. W. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *Journal of Food Science* 45:1042-1044
- Valero, M. and Salmeron, M. C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 85: 73-81
- 10 Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety* 9:97-118
- Actividad antimicrobiana de la salvia
- Akgul, A. and Kivanc, M. 1989. Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel. *J. Sci. Food Agric.* 47: 129 -132
- Aureli, P., Constantini, A., and Zolea, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55:344-348
- 15 Azzouz, M. A. and Bullerman, L. B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection* 45: 1298-1301
- Deans, S. G. and Ritchie, G. 1987. Antibacterial activity of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5: 165-180
- 20 Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52: 665-667
- Haq, I. 1982. *Bull. Islamic Med.* 2: 496
- Ikram, M. and Haq, I. 1980. Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part I. *Fitoterapia* 51: 231- 235.
- Leslie, G. B. 1978. *Medita B* 10: 3
- 25 Moujir, L., Gutierrez-Navarro, A. M., Andres, L. S. Luis, J. G. 1993. Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry* 34: 1493-1495
- Ross, S. A., El-Ketawi, N. E. and Megalla, S. E. 1980. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia* 51: 201-205.
- 30 Shelef, L. A., Naglik, O. A., and Bogen, D. W. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *Journal of Food Science* 45:1042-1044
- Diterpenos fenólicos en salvia y romero
- Brieskorn, C., and H. J. Domling. 1969. Carnosolsaure, der Wichtige Antioxidative Wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes. *Z. Lebensmittel Unters. Forsch.* 41: 10 -16
- 35 Cuvelier, M. O.E., Richard, H., and Berset, C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCS* 73: 645-652
- Ford, B. A. and Hill, V. A. 2001. Chewing gum base stabilized with carnosic acid. & US 6231896 B1
- Lamaison, J. -L., C. Petitjean-Freytet, and A. Carnat. 1991. Lamiacées Médicinales à Propriétés Antioxydantes, source Potentielles d'acide Rosmarinique. *Pharm. Acta Helv.* 66: 185-188
- 40 Loliger, J. 1989. Natural Antioxidants. In: *Rancidity in Food*, edited by J. Allen and R. Hamilton. Elsevier Applied Science, New York, pp 105-124
- Schuler, P. 1990. Natural Antioxidants Exploited Commercially. In *Food Antioxidants*, edited by B. Hudson. Elsevier Applied Science, New York. Pp. 99-170
- Potenciación de la nisina mediante agentes emulsionantes o quelantes
- US5217950

US5691301

Actividad antimicrobiana de extractos de plantas: revisiones generales

Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. In: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Ed: S. Roller. CRC Press. Washington, USA.

- 5 Smid, E. J. and Gorris, L. G. M. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. In: Handbook of Food Preservation. Ed: M. S. Rahman. Marcel Dekker Inc. New York.

Potenciación de la nisina con enzima lítica (lisozima)

US 5458876

EP 0427912

- 10 EP 0374823

Uso de nisina en alimentos

Thomas, L. V., Clarkson, M. R., Delves-Broughton, J. 2000. Nisin. In: Natural food antimicrobials systems. pp. 463-524. CRC Press, Boca Raton, USA

- 15 Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. Food Technology 44: 100, 102, 104, 106, 108, 111-112, 117.

De Vuyst, De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Eds: De Vuyst and Vandamme. Blackie Academic and Professional. London.

- 20 Thomas, L. V. and Delves-Broughton, J. 2001. New advances in the application of the food preservative nisin. Research Advances in Food Science 2: 11-22.

Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123

Hurst, A. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In. Antimicrobials in Foods, eds. A. L. Branen and P. M. Davidson, pp 327-351. New York: Marcel Dekker.

Normativa para la nisina

- 25 Turtell, A. and Delves-Broughton, J. 1998. International acceptance of nisin as a food preservative. Bull. Int. Dairy Fed. 329: 20-23

Bacteriocinas

Naidu, A. S. (Ed.) 2000. Natural Food Antimicrobial Systems. USA: CRC Press.

- 30 Ray, B., and Miller, K. W. 2003. Bacteriocins other than nisin: the pediocin-like cystibiotics of lactic acid bacteria. In: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Ed: Sibel Roller. CRC Press, USA.

Ray, B. and Daeschel, M. A. 1994. Bacteriocins of starter culture bacteria. In: Natural Antimicrobial Ssystems and Food Preservation. 1994. Ed: Dillon, V. M. and Board, R. G. CAB International, UK, pp 133 -166.

- 35 Axelsen, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology'. In: Salminen, S. and von Wright, A. In: Lactic Acid Bacteria. 2nd Ed. New York, Marcel Dekker, pp 1-72. Ray, B., Miller, K. W. and Jain, M. K. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Indian Journal of Microbiology 41: 1-21.

Hoover, D. G. 1993. Bacteriocins with potential for use in foods. In: Antimicrobials in Foods. Ed: P. M. Davidson and A. L. Branen. Marcel Dekker, USA.

Vessels, S., Jelle, B., and Nes, I. F. 1998. Bacteriocins of the Lactic Acid Bacteria. Danish Toxicology Centre, Denmark.

- 40 Pediocina

Ray, B., and Miller, K. W. 2000. Pediocin. In: Natural Food Antimicrobial Systems, ed. A. S. Naidu. Pp. 525-566. USA: CRC Press

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende
 - (a) nisina; y
 - (b) un extracto obtenido o que se puede obtener de una planta de la familia Labiatae,
- 5 en donde (a) y (b) son diferentes

en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 1,0% en peso basado en la composición,

y en donde la composición comprende

carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición,
- 10 carvona en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, y
- timol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.
2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,04% en peso basado en la composición.
3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,02% en peso basado en la composición.
- 15 4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende carvona en una cantidad menor que 0,04% en peso basado en la composición.
5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende carvona en una cantidad menor que 0,02% en peso basado en la composición.
- 20 6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende timol en una cantidad menor que 0,1% en peso basado en la composición.
7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende timol en una cantidad menor que 0,05% en peso basado en la composición.
- 25 8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto se obtiene de una planta de la familia Labiatae.
9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero, salvia, orégano, mejorana, menta, melisa, ajedrea y tomillo.
10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la planta de la familia Labiatae se selecciona de romero, salvia, orégano, mejorana, menta, melisa y ajedrea.
- 30 11. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la planta de la familia Labiatae es romero.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 2,0% en peso basado en la composición.
- 35 13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 3,0% en peso basado en la composición.
14. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 3,5% en peso basado en la composición.
15. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el diterpeno fenólico se selecciona de ácido carnósico, carnosol, ácido metilcarnósico y mezclas de los mismos.
- 40 16. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto comprende diterpenos fenólicos, triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico.
17. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto comprende un triterpeno fenólico.
- 45 18. Una composición según la reivindicación 11, en donde la cantidad de triterpenos fenólicos, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.

19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10, 11 o 12, en donde el triterpeno fenólico se selecciona de ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.
20. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto comprende un ácido rosmarínico.
- 5 21. Una composición según la reivindicación 14, en donde la cantidad de ácido rosmarínico, basado en la composición, es mayor que 3,5% en peso.
22. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad combinada de diterpenos fenólicos, triterpenos fenólicos y ácido rosmarínico, basado en la composición, es mayor que 3,5 % en peso.
- 10 23. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto contiene compuestos que inducen aroma y/o aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en la composición.
24. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto contiene aceites esenciales en una cantidad menor que 1% en peso basado en la composición.
- 15 25. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es un producto alimenticio.
26. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es una composición protectora para añadir a un producto alimenticio.
- 20 27. Una composición según la reivindicación 25 o 26, en donde el producto alimenticio se selecciona de carne cruda, carne cocinada, productos avícolas crudos, productos avícolas cocinados, productos de pescados y mariscos crudos, productos de pescados y mariscos cocidos, comidas precocinadas, salsas para pastas, sopas pasteurizadas, mayonesa, aderezos para ensaladas, emulsiones de aceite en agua, margarina, productos para untar bajos en grasas, emulsiones de agua en aceite, productos lácteos, productos para untar de queso, queso procesado, postres lácteos, leches saborizadas, nata, productos lácteos fermentados, queso, mantequilla, productos lácteos condensados, mezclas para helados, productos de soja, huevo líquido pasteurizado, productos de panadería, productos de pastelería, productos de frutas y alimentos con rellenos que contienen agua o a base de grasa.
- 25 28. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende además un emulsionante.
- 30 29. Una composición según la reivindicación 28, en donde el emulsionante se selecciona de polisorbato, monoglicéridos, diglicéridos, ésteres de ácido acético y mono-diglicéridos, ésteres de ácido tartárico y mono-diglicéridos, y ésteres de ácido cítrico y mono-diglicéridos.
30. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende además un agente quelante.
- 35 31. Una composición según la reivindicación 30, en donde el agente quelante se selecciona de EDTA, ácido cítrico, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos y polifosfatos.
32. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende además una enzima lítica.
33. Una composición según la reivindicación 32, en donde la enzima lítica es una lisozima.
- 40 34. Un procedimiento para prevenir y/o inhibir el crecimiento, y/o matar un microorganismo en un material, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el material con
- (a) nisina; y
- (b) un extracto obtenido o que se puede obtener de una planta de la familia Labiatae,
- en donde (a) y (b) son diferentes
- 45 en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 1,0% en peso, basado en la composición,
- en donde la composición comprende
- carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición,

carvona en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, y timol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.

35. Un procedimiento según la reivindicación 34, en donde la nisina y el extracto se añaden al material juntos.

5 36. Un procedimiento según la reivindicación 34, en donde la nisina y el extracto se añaden al material de forma secuencial.

37. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en donde la nisina se añade al material.

38. Un procedimiento según la reivindicación 34, en donde la nisina se forma in situ en el material.

39. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 38, en donde el material es un producto alimenticio.

10 40. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, caracterizado por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 33.

15 41. Uso de una composición que comprende (a) nisina; y b) un extracto obtenido o que se puede obtener de una planta de la familia Labiatae, para prevenir y/o inhibir el crecimiento, y/o matar un microorganismo en un material; en donde (a) y (b) son diferentes; en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 1,0% en peso, basado en la composición, y en donde la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, carvona en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición y timol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.

42. Uso según la reivindicación 41, en donde el material es un producto alimenticio.

20 43. Uso según la reivindicación 41 o 42, para prevenir y/o inhibir el crecimiento, y/o matar de forma sinérgica un microorganismo en un material.

44. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, caracterizado por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 36.

45. Un kit para preparar una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, comprendiendo el kit

25 (a) nisina; y

(b) un extracto obtenido o que se puede obtener de una planta de la familia Labiatae,

en donde (a) y (b) son diferentes

en envases o recipientes separados; opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o el contacto y/o el uso;

30 en donde la composición contiene diterpenos fenólicos en una cantidad mayor que 1,0% en peso, basado en la composición, y en donde la composición comprende carvacrol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición, carvona en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición y timol en una cantidad menor que 0,075% en peso basado en la composición.

46. Un producto alimenticio que comprende una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.

35

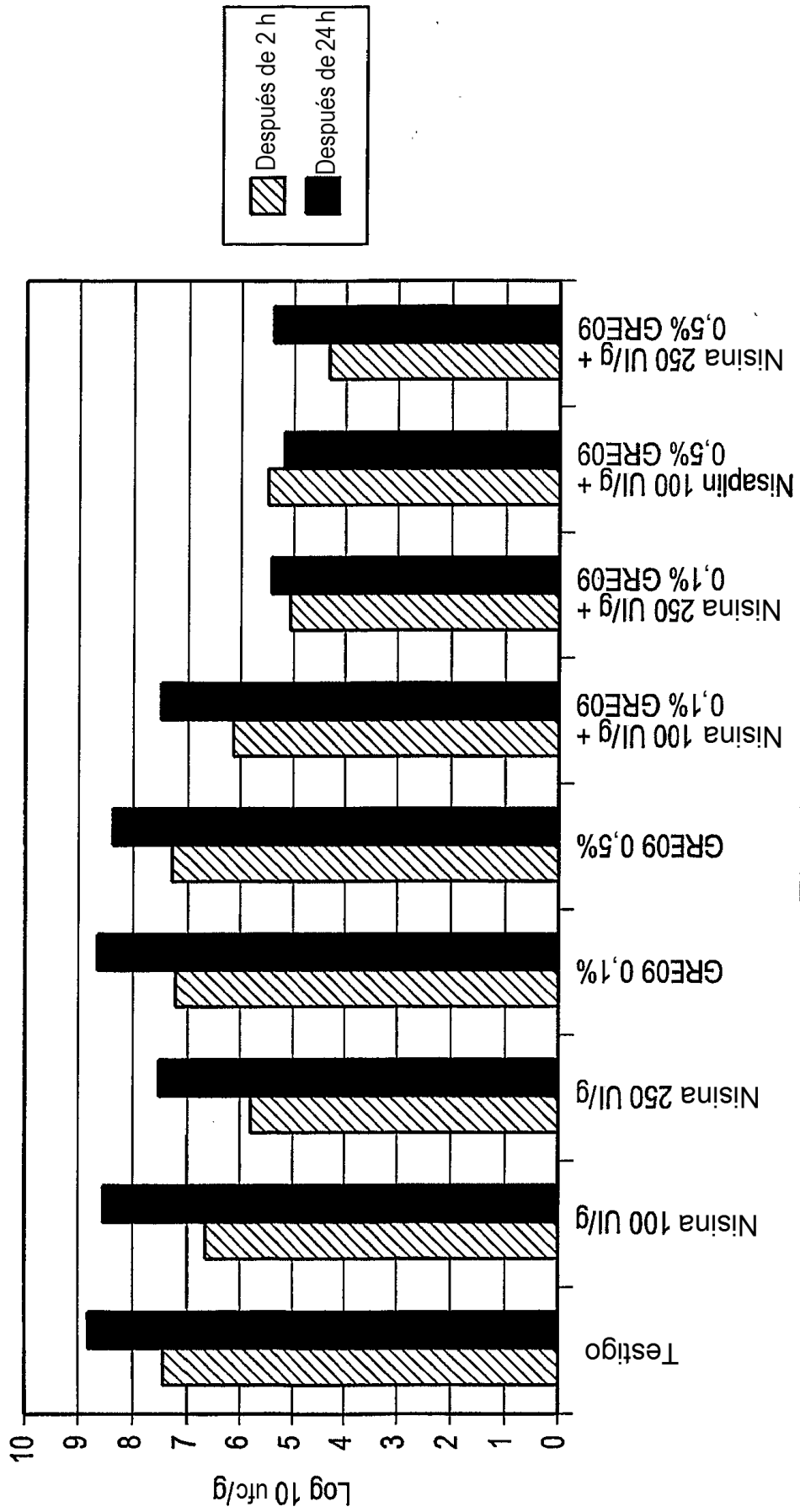


Fig. 1

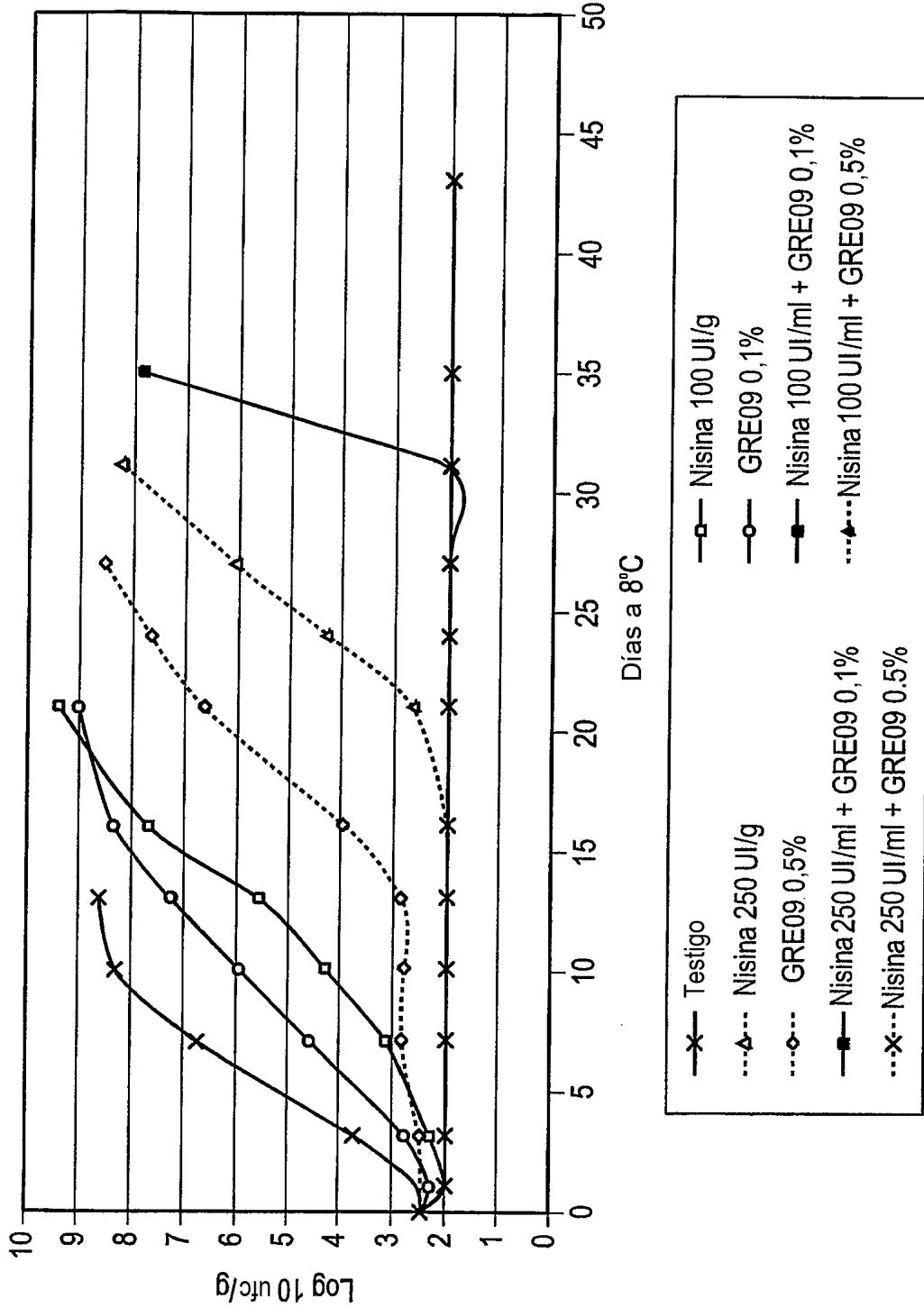


Fig. 2

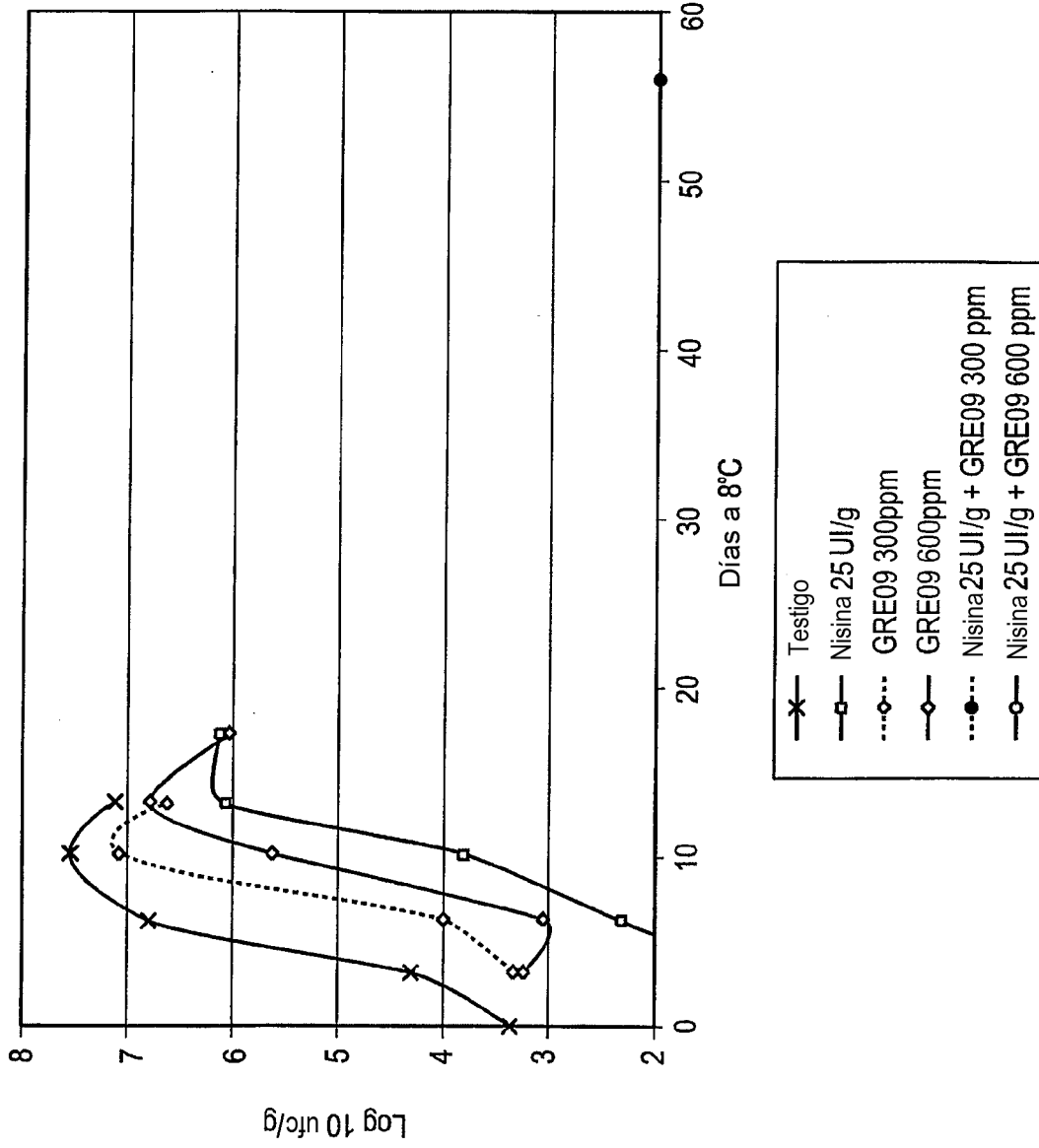


Fig. 3

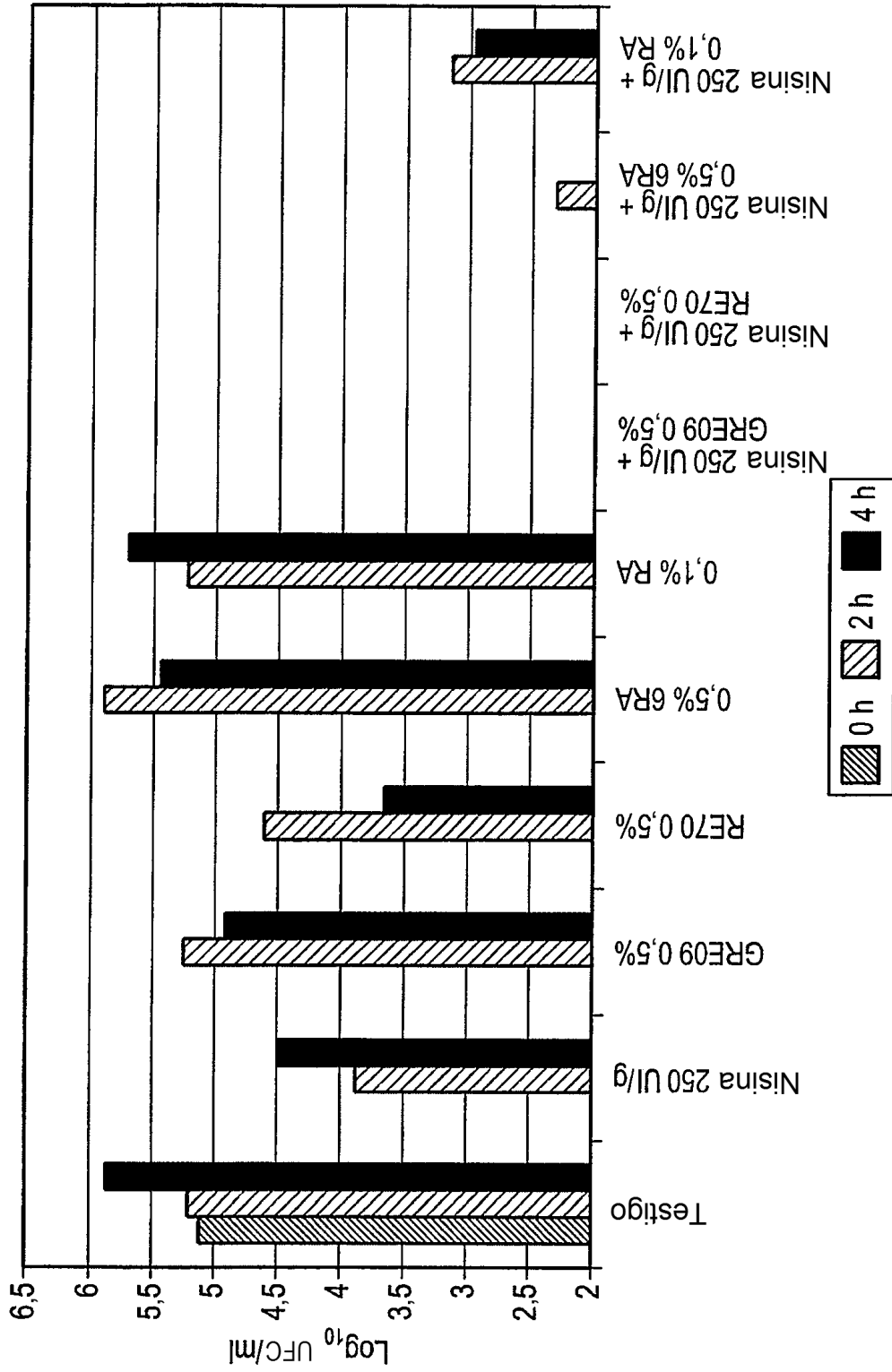


Fig. 4



Fig. 5

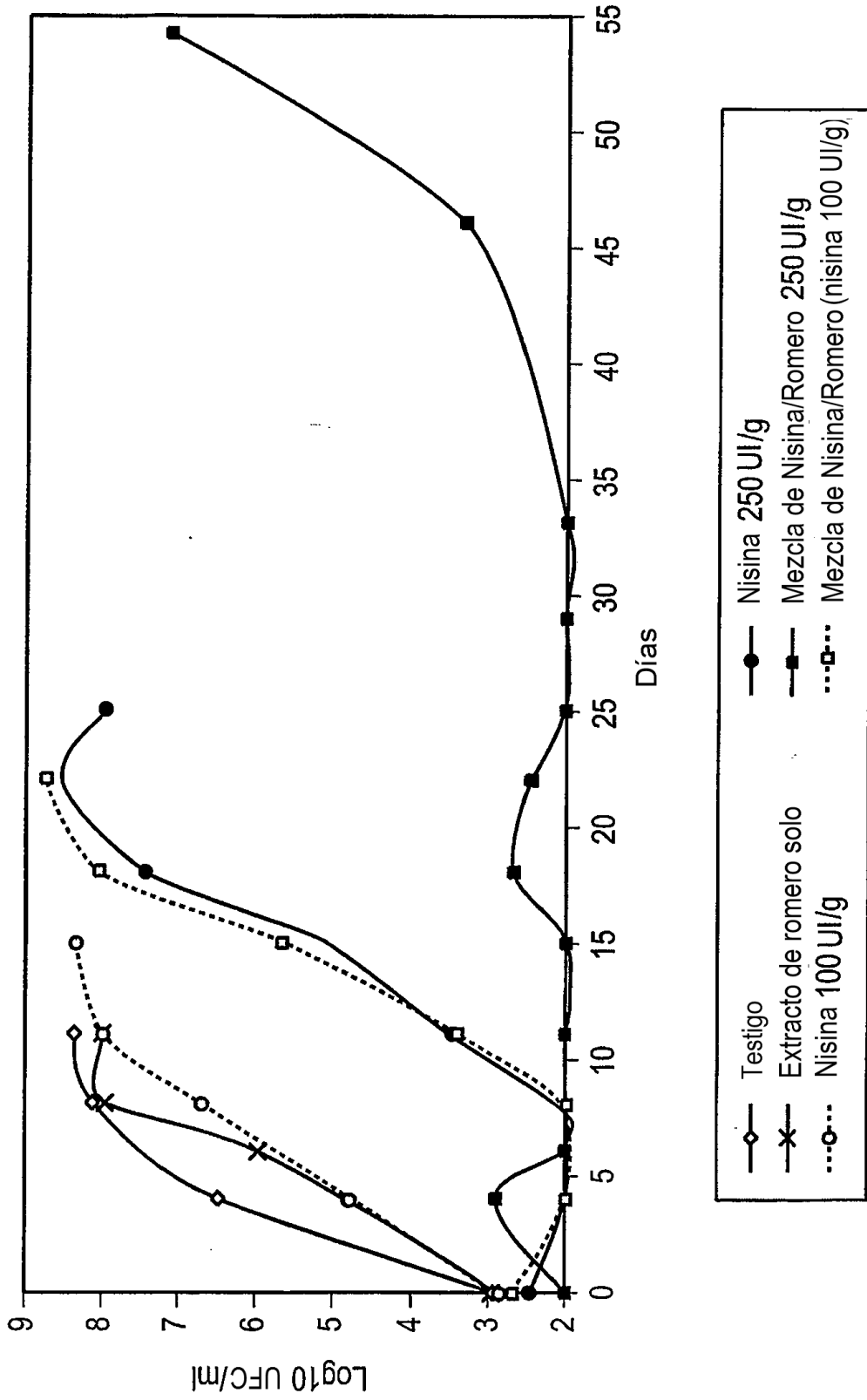


Fig. 6

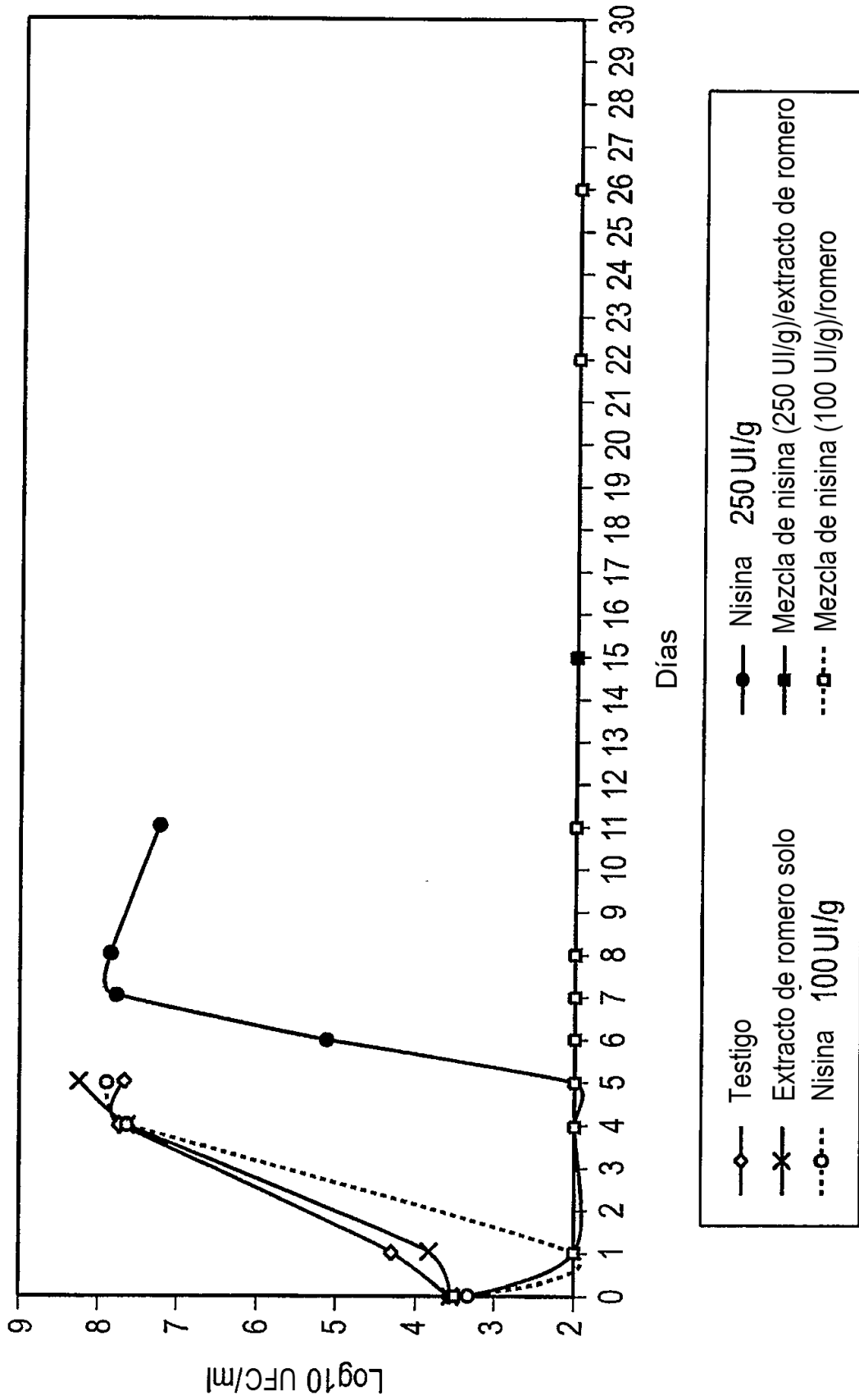


Fig. 7

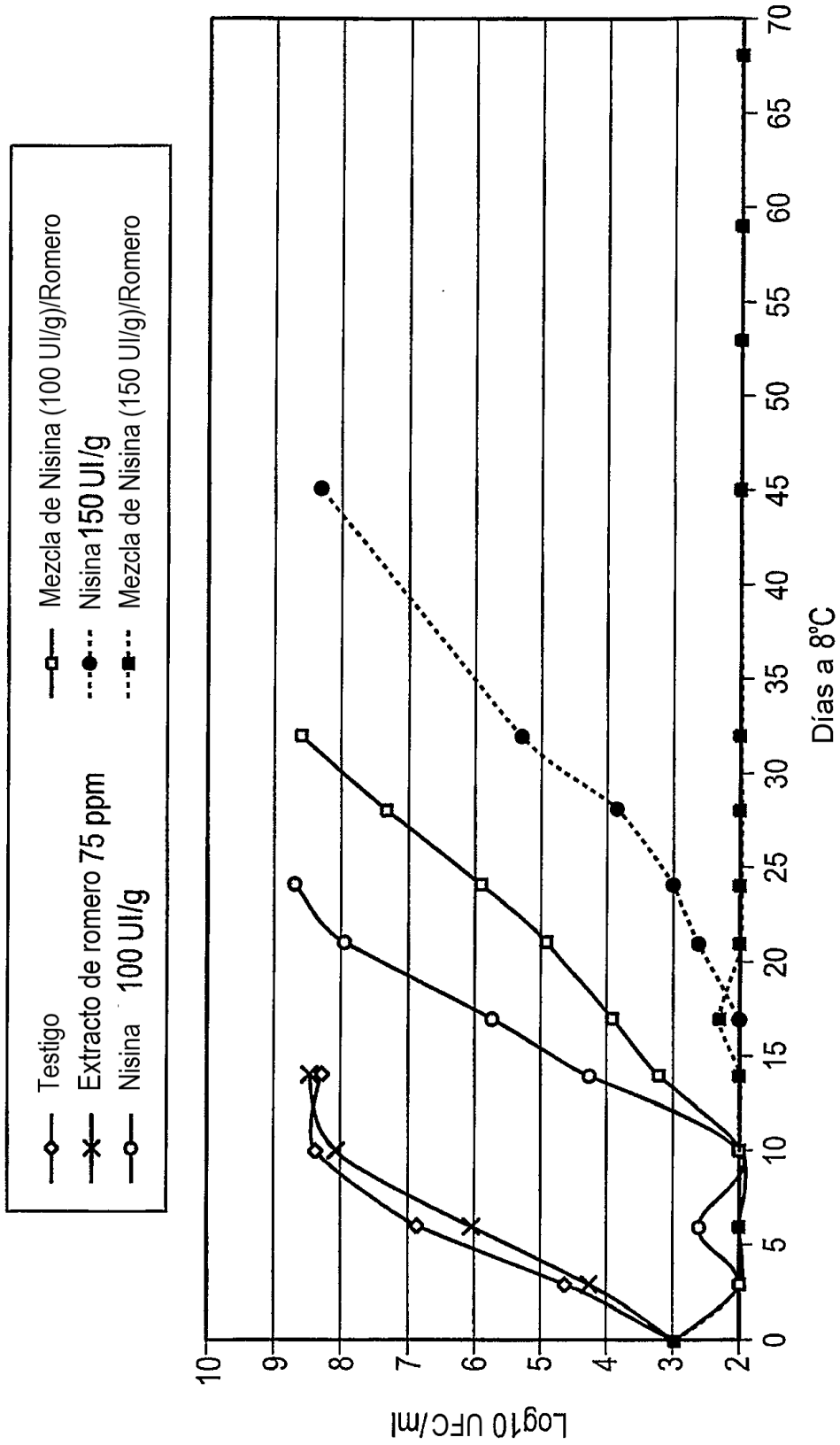


Fig. 8

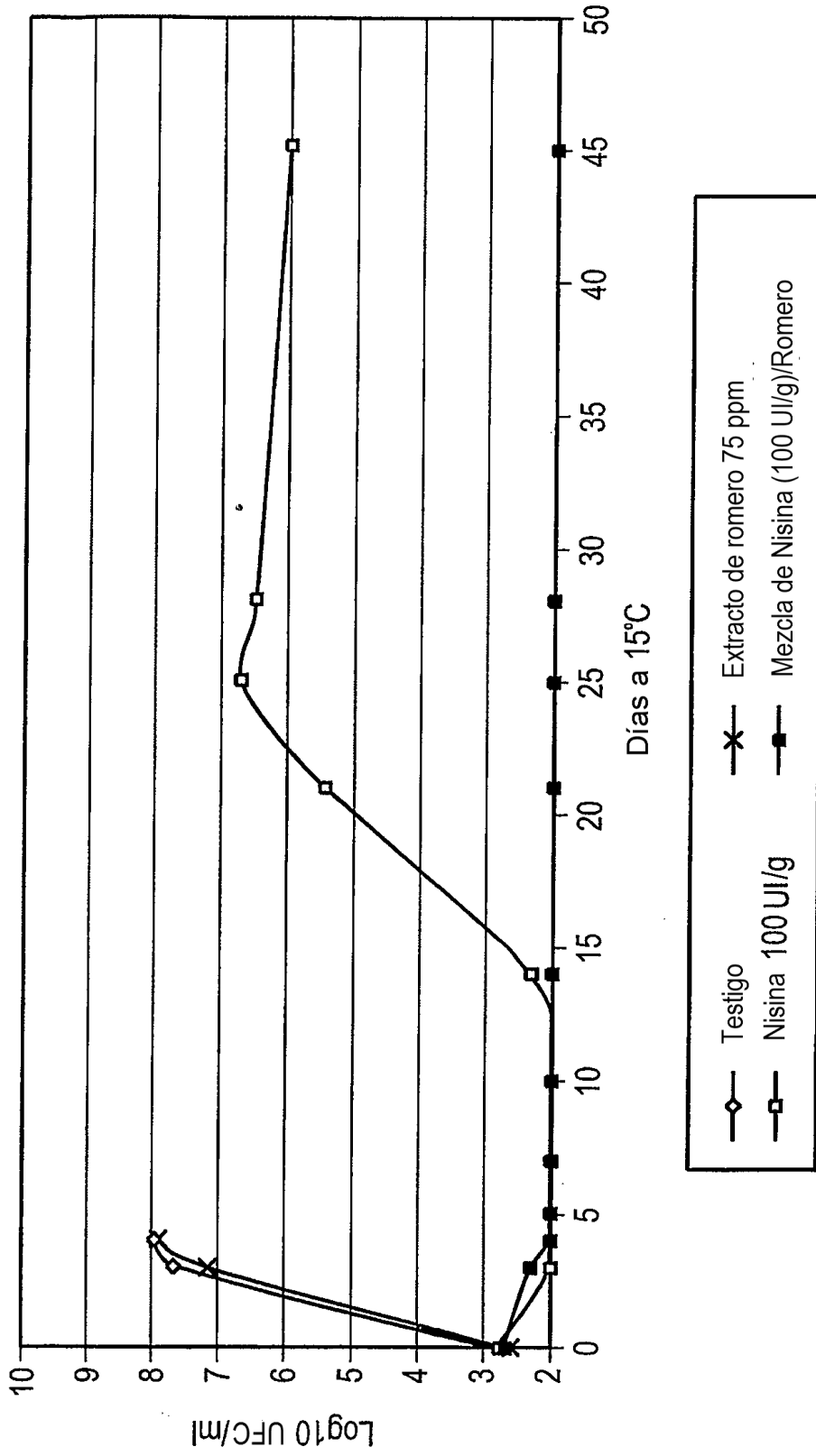


Fig. 9

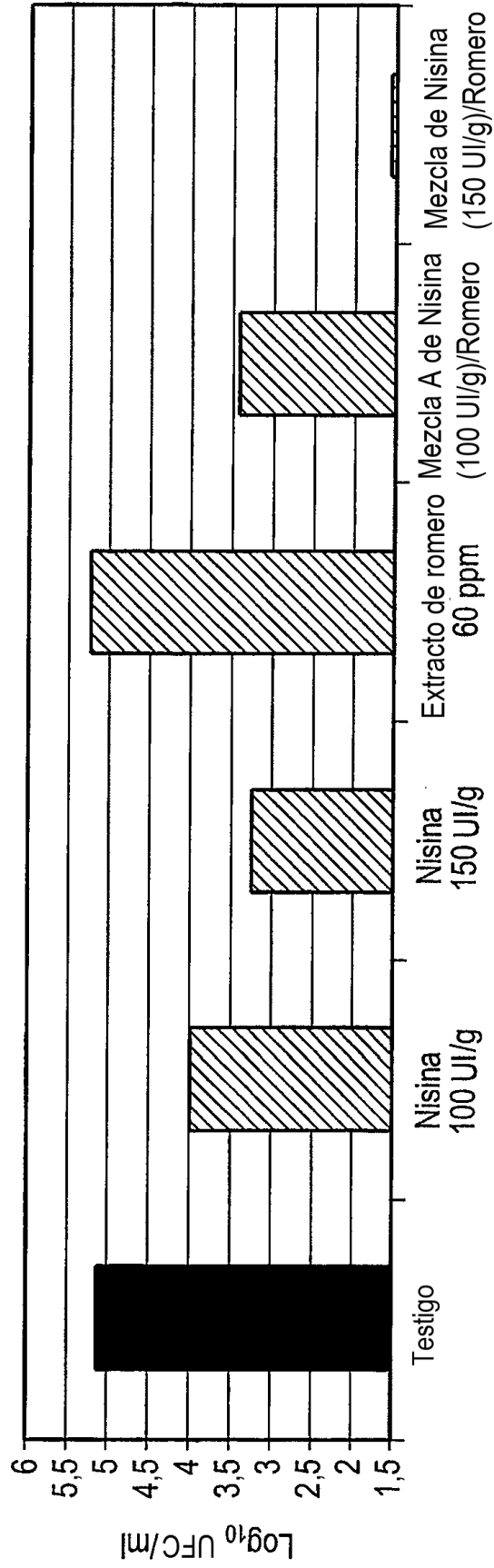


Fig. 10

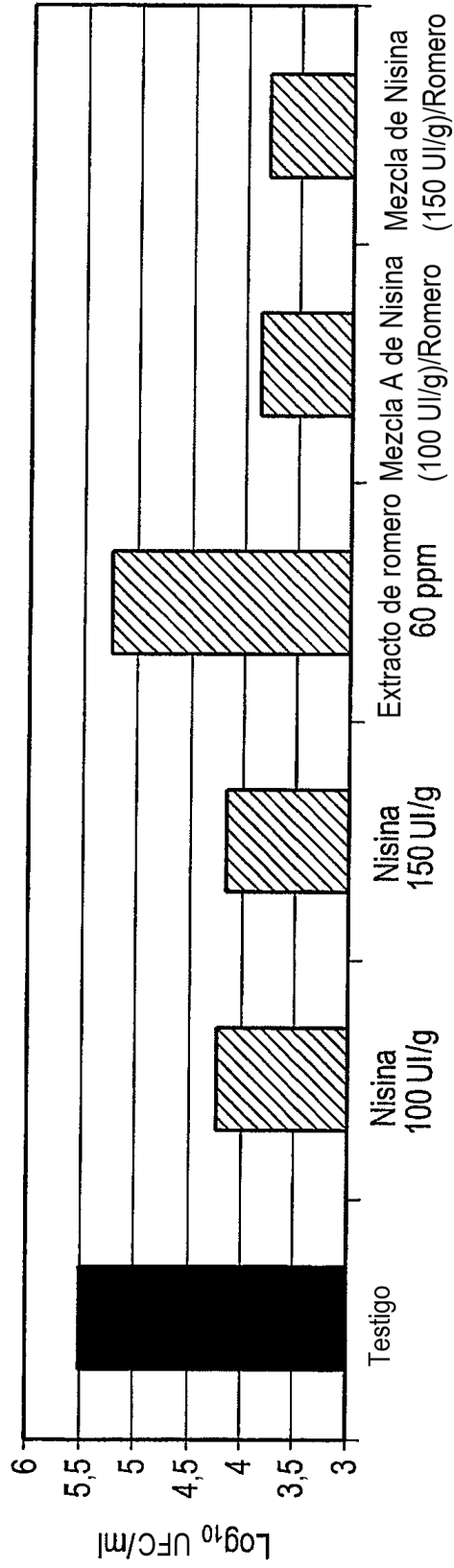


Fig. 11