

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 265**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3508 (2006.01)
A61L 2/16 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007 E 07727875 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2001313**

54 Título: **Preparaciones antimicrobianas**

30 Prioridad:

06.04.2006 EP 06112286

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

12.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OTTO, ROELF y
RAMIREZ, ALDANA MARIEL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 521 265 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

Preparaciones antimicrobianas.

- 5 [0001] La invención se refiere a una preparación antimicrobiana y a un proceso de conservación de alimentos. En particular, se refiere a un proceso de conservación de alimentos con una combinación de, al menos, dos aminoácidos. Además, la invención se refiere al uso de tales preparaciones para el control de la flora intestinal en seres humanos y animales.
- 10 [0002] La morbilidad y mortalidad asociada al consumo de alimentos contaminados por microorganismos infecciosos y productores de toxinas no debería ser subestimada. Es por esta razón que la calidad microbiana y la seguridad de los alimentos es una causa de interés constante para los procesadores de alimentos, consumidores y organismos del gobierno. Además, la alteración y putrefacción de un producto alimenticio por microorganismos pueden poner en peligro su valor nutricional y pueden conllevar pérdidas económicas sustanciales. La alteración microbiana de los alimentos es el resultado de la proliferación descontrolada o las actividades de microorganismos. Para prevenir esto, han sido desarrolladas tecnologías de conservación que aseguran la calidad y la seguridad microbiológica de los alimentos. Estas tecnologías son varias e incluyen (i) procedimientos que previenen el acceso de microorganismos en los alimentos; (ii) procedimientos que inactivan los microorganismos; y (iii) procedimientos que previenen o atrasan el crecimiento de los microorganismos. Los cambios en las demandas del consumidor y en la legislación alimentaria motivan a los tecnólogos alimenticios para que constantemente modifiquen y mejoren las tecnologías de elaboración de alimentos existentes e inventen y desarrollen otras nuevas. La tendencia es producir alimentos que, no solo parecen más atractivos, más frescos y más naturales, sino que combinan todo esto con la comodidad de uso como una fecha de caducidad larga y la facilidad de preparación. Además, el cliente también establece niveles altos respecto al sabor, la textura, la apariencia y la seguridad. Conseguir todo esto supone un gran desafío para los tecnólogos alimenticios. Con respecto a la ralentización o prevención del crecimiento de microorganismos en alimentos, continuamente se están creando nuevas aplicaciones para nuevas sustancias químicas antimicrobianas más naturales. Estos nuevos conservantes químicos, no obstante, deberían satisfacer varias necesidades: (i) deberían tener actividad bacteriostática o bactericida eficaz contra un amplio rango de diferentes organismos contaminantes y agentes patógenos procedentes de los alimentos; (ii) no deberían afectar a la apariencia, el gusto, el sabor o la textura del alimento; y (iii) tampoco deberían ser tóxicos para el consumidor. Se sabe que ciertos aminoácidos poseen propiedades bacteriostáticas o bactericidas (por ejemplo Shive,W.; C.G.Skinner (1963) "*Amino acid analogues*". En: *Metabolic Inhibitors. A comprehensive treatise* (Hochster,R.M.; J.H.Quastel eds). Academic Press. Nueva York. Volumen I, págs 1 - 73).
- 20 [0003] Además, muchos aminoácidos se producen de forma natural en los alimentos y se consideran generalmente seguros y se aprueba su uso en productos alimenticios. Es exactamente por estas razones que a algunos aminoácidos, particularmente la glicina, se les ha encontrado una aplicación comercial como conservantes.
- 25 [0004] Los procesos para conservar productos alimenticios con serina fueron descritos en US 2,711,976 y US 6,602,532. En US 3,615,703, el sabor de los productos alimenticios o bebidas que comprenden fruta o zumo de frutas, verdura o zumo de verdura, o cerveza se conserva mediante el sellado hermético del producto alimenticio o bebida en un recipiente con lisina, ornitina, histidina, o una sal de estos. GB 1,510,942 divulga un proceso para la conservación de productos alimenticios, particularmente aquellos que contienen un 10-60% de azúcar, por ejemplo gelatinas, mermeladas y natillas, que se protegen contra el putrefacción mediante la incorporación de maltosa y glicina en los productos alimenticios. La glicina está adecuadamente presente en una cantidad de 0.3 a 2%. Aunque la glicina es ahora ampliamente usada como un conservante comercial, se reconoce también que este compuesto no es un fuerte conservante y se necesitan concentraciones relativamente altas para provocar la inhibición del crecimiento bacteriano. Estas altas concentraciones, no obstante, crean un nuevo conjunto de problemas. Se sabe que la glicina, la alanina, la serina y la treonina todas poseen, en diferente grado, un sabor dulce; la lisina y la ornitina ambas poseen notas amargas y dulces; mientras que la arginina es intensamente amarga. El impacto de los aminoácidos en el sabor limita la aplicación de estos compuestos como conservantes alimenticios.
- 30 [0005] Para que la glicina se use más eficazmente como conservante alimenticio, hay para ello una demanda de otras sustancias que se pueden usar en combinación con la glicina y que ayudan a aumentar su efecto antimicrobiano. Lee et al. han examinado el efecto antimicrobiano de la glicina en combinación con hexametáfosfato, EDTA, ácido cólico, y glicerol monocaprato en varias especies de bacterias Gram positivas y negativas (Lee,J.K.; K.Tatsuguchi; M. Tsutsumi; T.Watanabe, J. Food Hyg. Soc. Japón 26: 279 - 284 (1985)). En WO 01/56408, la alanina o la glicina fue usada junto con 1,5-D-anhidrofructosa para obtener un agente conservante del alimento que contiene sustancias antibacterianas altamente seguras y de este modo se pueden mejorar las cualidades de conservación de los alimentos sin propiciar ninguno de los efectos indeseados sobre el sabor o el gusto de los alimentos.
- 35 [0006] Aunque los procesos fueron descritos utilizando mezclas antimicrobianas consistentes en un único aminoácido con uno o más compuestos de aminoácido no esencial (ver arriba), se sabe mucho menos acerca de las propiedades antimicrobianas de las mezclas de aminoácidos.

- 5 [0007] JP 2000-224976 divulga un proceso para la inhibición de microorganismos como la bacteria de ácido láctico *Enterococcus faecalis* dentro de una región de pH de ≥ 6.5 del alimento, y además apenas perjudica la calidad del alimento utilizando una mezcla de lactato de calcio y glicina y una sal de algún otro ácido orgánico. Aunque en la misma aplicación también se divulgaba que parte de la glicina se puede sustituir por alanina, los datos muestran que la alanina y mezclas de alanina y glicina son inhibidores menos eficaces contra el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* que la glicina sola. El hecho que la alanina sea capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio de la glicina no solo se ha demostrado en casos en que la bacteria Gram positiva *Enterococcus hirae* está estrechamente relacionada con *Lactococcus lactis*, sino también en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (Snell, E.E.; B.M. Guirard (1943) Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 29: 66 - 73, Hishinuma, F.; K. Izaki; H. Takahashi (1969) *Effects of glycine and D-amino acids on the growth of various micro organisms* Agr.Biol.Chem. 33: 1577 - 1586). El hecho que un aminoácido pueda neutralizar la inhibición ejercida por otro aminoácido es bien conocido y ha sido observado en varias especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, como por ejemplo en las bacterias Gram positivas: *Bacillus anthracis* y *Listeria monocytogenes*, y en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (Gladstone, G.P. (1939) Brit. J. Exp. Pathol. 20: 189 - 200; Friedman, M.E.; W.G. Roessler (1961) J. Bacteriol. 82: 528 - 533; de Felice et al. (1979) Microbiol. Rev. 43: 42 - 58).
- 10 [0008] En US 2001/033884, se usa una preparación que contiene glicina y serina para proteger el alimento contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- 20 [0009] Composiciones antimicrobianas que comprenden glicina, combinada con, por ejemplo, alanina o ácidos orgánicos se describen en US 2004/127535 y EP 16 29 724, respectivamente.
- 25 [0010] El resumen de J-53050361 también divulga composiciones que comprenden glicina y serina para el ajuste del pH del alimento.
- [0011] US 2001/039264 y US 2002/144946 describen otras composiciones que comprenden al menos 5 o más aminoácidos para otros usos como reducir los niveles de aminoácidos en sangre asociados al ejercicio intenso o para reducir la fatiga, y para usar en la hemodiálisis, respectivamente.
- 30 [0012] Se descubrió que la combinación de glicina y alanina, donde la alanina es D-alanina ejerce sorprendentemente una sinergia en la inhibición de bacterias Gram negativas.
- [0013] Con este fin, la invención se refiere a una preparación antimicrobiana dirigida contra las bacterias Gram negativas que comprende, al menos, glicina y alanina.
- 35 [0014] De este modo, la presente preparación antimicrobiana que comprende la combinación de glicina y alanina, donde la alanina es D-alanina es especialmente adecuada para la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* 0157:H7 y especies de *Salmonella*.
- 40 [0015] Se insiste en que la combinación de estos dos aminoácidos puede ser además combinada con un tercer aminoácido. Se ha observado que estas combinaciones tienen un efecto antibacteriano que es mayor de lo que se podía esperar a partir de los aminoácidos aislados de otros aminoácidos, es decir muestran un efecto sinérgico.
- [0016] La alanina es D-alanina. De la forma más preferible, la preparación antimicrobiana contiene DL-alanina. Si además otros aminoácidos están presentes, estos son, de la forma más preferible, DL-aminoácidos.
- 45 [0017] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para proteger el alimento contra las bacterias añadiendo al alimento las preparaciones antimicrobianas mencionadas más arriba que comprenden glicina y alanina.
- 50 [0018] El método según la invención es particularmente útil para la protección del alimento contra al menos uno de los siguientes: *Salmonella enterica*, y *Escherichia coli* 0157:H7.
- 55 [0019] Ejemplos de tales productos alimenticios son productos cárnicos (polimerizados y/o sin curar, frescos y/o cocinados), ensaladas y otros productos vegetales, bebidas y productos lácteos, alimentos semiprocados, platos precocinados como por ejemplo comidas listas para comer y productos alimenticios secos. El método es de particular interés puesto que algunos productos de carne fresca se usan para el consumo directo (por ejemplo, el filete tártaro, sushi o carpaccio) sin ningún tratamiento térmico o con un tratamiento térmico insuficiente para matar las bacterias. Otros productos cárnicos se consumen después de la aplicación de un tratamiento térmico solo parcial, intencionadamente aplicado, como por ejemplo para un bistec medio hecho, o inintencionadamente aplicado debido a la preparación inapropiada o a la manipulación inapropiada de los productos alimenticios.
- 60 [0020] Las preparaciones antimicrobianas de la invención, incluyendo las preparaciones que comprenden glicina/alanina, donde la alanina es D-alanina además también pueden aplicarse en otras aplicaciones como el control de la flora intestinal mediante la inhibición de bacterias Gram negativas como *Salmonella* y *Escherichia* para proporcionar una ventaja selectiva para las bacterias Gram positivas como *Lactobacilli*, por ejemplo por
- 65

administración junto con bacterias probióticas.

5 [0021] Los siguientes cultivos fueron usados en un estudio: serotipo de *Escherichia coli* 0157:H7 (ATCC 700728), *Salmonella enterica* (ATCC 13311). Todos los cultivos fueron transferidos a diario en tubos de tapón de rosca (100 x 16 mm) que contienen 10ml caldo de infusión cerebro-corazón (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los cultivos fueron incubados a 30 °C sin agitación. El caldo de infusión cerebro-corazón se preparó con cantidades crecientes de los dos aminoácidos. El intervalo de concentración de los aminoácidos fue a partir de 0 a 450 mM en 10 50 mM pasos. Este dio como resultado 100 medios diferentes. El pH de los medios fue ajustado a 6.1 - 6.2. Los medios fueron preparados en cantidades de 10 ml y fueron esterilizados por filtración (membranas de nitrato de celulosa Sartorius de 0.45 µm de diámetro de poro). 300 µl de cada medio fueron transferidos a un panel de un placa de 100 pozos Bioscreen esterilizada. Las placas de pocillos fueron inoculadas con 5 µl de un cultivo que había crecido durante toda la noche en el caldo de infusión cerebro-corazón utilizando un dispensador repetitivo esterilizado Hamilton de 5 µl (Hamilton, Bonaduz, Suiza). Los índices de crecimiento fueron determinados con un Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia) que mide cinéticamente el desarrollo de turbidez por fotometría vertical. Las placas fueron incubadas durante 16 - 24 horas a 37 °C, la densidad óptica de los cultivos fue medida cada 30 minutos a 420 - 580 nm utilizando un filtro de banda amplia. El Bioscreen mide en los intervalos de tiempo establecidos la densidad óptica de los cultivos. A partir de estos datos, el Bioscreen calcula los índices de crecimiento específico máximo.

20 [0022] El propósito de otro procesamiento de datos es averiguar si dos aminoácidos actúan independientemente el uno del otro o si ellos se estimulan el uno al otro en su acción inhibitoria (sinergia) o si se neutralizan uno al otro el efecto inhibitorio (antagonismo). Cuando un determinado compuesto no tiene efecto en un organismo, el índice de crecimiento específico de este organismo (μ) se puede expresar como función (f) del crecimiento limitando el sustrato de concentración (s) mediante por ejemplo la ecuación de Monod, que dice: $\mu = \mu_{\max} \cdot s / (K_s + s)$, donde μ_{\max} representa el índice de crecimiento específico máximo, s el nivel de concentración del crecimiento limitando el sustrato en el medio y K_s la concentración del sustrato donde $\mu = 0.5 \mu_{\max}$. No obstante, cuando la presencia de un inhibidor P afecta al crecimiento celular, la función f para μ debe ser modificada, es decir $\mu = f(s,p)$, donde p representa la concentración de inhibidor P. Numerosos estudios de cinética de inhibición de crecimiento de bacterias han mostrado que muchos inhibidores se comportan como inhibidores no competitivos. Esto implica que solo el valor del índice de crecimiento específico máximo (μ_{\max}) y no la afinidad (K_s) se ve afectado. Por lo tanto, el índice de crecimiento específico en presencia del inhibidor puede ser escrito como: $\mu = \mu_i \cdot s / (K_s + s)$, donde μ_i es el índice de crecimiento específico máximo en presencia de un inhibidor P. La relación entre μ_i y μ_{\max} y la concentración del inhibidor P fue descrita utilizando la ecuación logística de dosis-respuesta, que dice: $\mu_i / \mu_{\max} = 1 / (1 + (p / p_{0.5})^b)$ (Jungbauer, A. (2001). *The logistic dose response function: a robust fitting function for transition phenomena in life sciences*. J. Clinical Ligand Assay 24: 270 - 274). En esta ecuación, p representa la concentración del inhibidor P y $p_{0.5}$ la concentración de P donde $\mu_i = 0.5 \mu_{\max}$; μ_{\max} es el índice de crecimiento específico máximo, es decir el índice de crecimiento específico en ausencia del inhibidor P, b es una magnitud adimensional que determina la relación entre μ_i y p. Combinando la ecuación de Monod y la ecuación logística de dosis-respuesta se puede escribir como: $\mu = \mu_{\max} (s / (K_s + s)) / (1 + (p / p_{0.5})^b)$. En el grupo de cultivos, donde s es normalmente muchas veces superior a K_s , esta ecuación se reduce a $\mu = \mu_{\max} / (1 + (p / p_{0.5})^b)$.

45 [0023] Cuando se comparan diferentes organismos cultivados bajo las mismas condiciones, o el mismo organismo cultivado bajo diferentes condiciones, es más significativo usar el índice de crecimiento relativo, antes que los índices de crecimiento absoluto como criterio de comparación. El índice de crecimiento relativo (O) es la proporción entre el índice de crecimiento (μ) y el índice de crecimiento máximo (μ_{\max}), es decir $O = \mu / \mu_{\max}$. Se puede observar que mientras μ y μ_{\max} tienen las dimensiones de (tiempo)⁻¹, su proporción O es adimensional, es decir un número puro. De forma similar, nosotros podemos definir la concentración relativa de inhibidores ϵ como $p / p_{0.5}$. La ecuación de Monod y la ecuación logística de dosis-respuesta se pueden escribir ahora como: $O = 1 / (1 + \epsilon^b)$. Se pueden definir para dos inhibidores X e Y por ejemplo las siguientes dos expresiones para O: $O_x = 1 / (1 + \epsilon_x^{b1})$ y $O_y = 1 / (1 + \epsilon_y^{b2})$. O_x y O_y pueden ser experimentalmente evaluados examinando los efectos inhibitorios de X o Y en el índice de crecimiento del organismo objetivo. Sabiendo las funciones evaluadas para O_x y O_y , el efecto independiente teórico es definido como: $O_x \cdot O_y$. El efecto experimentalmente observado de las combinaciones de X e Y en el índice de

crecimiento relativo se define como O_{xy} . La hipótesis de que X e Y actúan independientemente la una de la otra en un organismo determinado es matemáticamente traducida a $O_{xy} / O_x \cdot O_y = 1$. El rechazo de esta hipótesis implica que el efecto combinado de X e Y no es un efecto aditivo pero tampoco sinérgico ni antagónico. En el caso de que los inhibidores X e Y afecten sinérgicamente el organismo objetivo, $O_{xy} / O_x \cdot O_y < 1$ (pero > 0). En esos casos que el efecto combinado de inhibidores X e Y es antagónico, $O_{xy} / O_x \cdot O_y > 1$. La sinergia, efecto independiente, y el antagonismo se pueden visualizar en un gráfico de O_{xy} frente a $O_x \cdot O_y$.

[0024] Esto se ejemplifica en la Fig. 1, donde se da un gráfico de $O_{Gly,Ala}$ (índice de crecimiento relativo experimentalmente observado) frente a $O_{Gly} \cdot O_{Ala}$ (índice de crecimiento relativo predicho) para *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) mostrando la sinergia en la inhibición entre glicina y DL-alanina. La línea continua en este gráfico representa la línea donde el índice de crecimiento relativo experimentalmente observado ($O_{Gly,Ala}$) iguala el índice de crecimiento relativo predicho ($O_{Gly} \cdot O_{Ala}$) y donde la Gly y la Ala hacen de inhibidores independientes.

[0025] La combinación de DL-alanina y glicina es particularmente eficaz contra la *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7 (sinergismo).

[0026] La competencia entre *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174) (cultivo mezclado A), y entre *Salmonella enterica* (ATCC 13311) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174) (cultivo mezclado B) fue estudiada en los cultivos de caldo. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, y *Lactobacillus plantarum* fueron transferidos a diario en tubos de tapón de rosca (100 x 16 mm) que contenían 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los cultivos fueron incubados a 30 °C sin agitación. 500 µl de cultivo "overnight" de *Escherichia coli* y 5 µl de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* fueron transferidos a tubos de tapón de rosca que contenían 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón recién preparado o a 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón que contenían 200 mM de DL-alanina y 200 mM de glicina o 400 mM de DL-alanina y 400 mM de glicina (cultivo mezclado A, primera transferencia). 500 µl de un cultivo "overnight" de *Salmonella enterica* y 5 µl de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* fueron transferidas a tubos de tapón de rosca que contenían 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón recién preparado o a 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón que contenían 200 mM de DL-alanina y 200 mM de glicina o 400 mM de DL-alanina y 400 mM de glicina (cultivo mezclado B, primera transferencia). Ambos cultivos mezclados fueron incubados a 30 °C. Después de 24 horas, los cultivos fueron transferidos a medios frescos (segunda transferencia) y también fueron colocados en placas de agar Violet Red Bile (Oxoid, Basingstoke, CM0485) y placas de agar MRS (Oxoid Basingstoke, CM0361). La segunda transferencia fue incubada durante 24 horas a 30 °C y posteriormente fue colocada en placas de agar Violet Red Bile y placas de agar MRS. Los resultados de este análisis, que se resumen en la tabla 1, demuestran la ventaja competitiva de *Lactobacillus plantarum* en un cultivo mezclado con *Escherichia coli* o bien *Salmonella enterica* en un medio que contiene DL-alanina y glicina.

Añadidos al BHI	Mezcla de cultivo A UFC/ml en la primera transferencia		Mezcla de cultivo B1 UFC/ml en la primera transferencia	
	<i>E.Coli</i> O157:H7 ATCC 700728	<i>Lb. Plantarum</i> DSM 20174	<i>Salmonella</i> ATCC 13311	<i>Lb. Plantarum</i> USM 20174
Nada	390.10 ⁶	268. 10 ⁶	60. 10 ⁶	277. 10 ⁶
200 mM de glicina 200 mM de DL- alanina	25. 10 ⁶	264. 10 ⁶	15. 10 ⁶	660. 10 ⁶
400 mM de gly 400 mM de DL- alanina	0	246. 10 ⁶	0	322. 10 ⁶

Añadidos al BHI	Mezcla de cultivo A UFC/ml en la segunda transferencia		Mezcla de cultivo B UFC/ml en la segunda transferencia	
	<i>E. Coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	<i>Lb. Plantarum</i> DSM 20174	<i>Salmonella</i> ATCC 13311	<i>Lb. Plantarum</i> USM 20174
Nada	291.10 ⁶	630. 10 ⁶	40. 10 ⁶	780. 10 ⁶
200 mM de glicina 200 mM de DL- alanina	16. 10 ⁶	690. 10 ⁶	0	750. 10 ⁶
400 mM de glicina 400 mM de DL- alanina	0	610. 10 ⁶	0	940. 10 ⁶

Tabla 1. Unidad de formación de colonias (UFC) por ml de caldo en la primera y segunda transferencia .

5 [0027] La invención fue usada para conservar el alimento. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención. Cultivos madre de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 y *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700728 que fueron usados para inocular cultivos líquidos fueron rutinariamente guardados en placas de agar que contenían infusión cerebro-corazón (Oxoid CM225, Basingstoke, Reino Unido) fortificado con un 1.5% de agar. Cultivos de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* fueron cultivados en tubos de tapón de rosca (100 x 16 mm) que contenían 10 ml de
10 caldo de infusión cerebro-corazón y fueron incubados durante toda la noche a 30 °C. Justo antes de la inoculación de los alimentos, los cultivos fueron diluidos con una solución que contenía 0.1% de peptona y 0.85% de NaCl.

Leche

15 [0028] Se obtuvo leche esterilizada sin grasa de un supermercado local. Se añadieron cantidades apropiadas de aminoácidos.

Pasta (Lasaña)

20 [0029] Se obtuvo Lasaña Boloñesa precocinada de un supermercado local y fue completamente homogeneizada utilizando una batidora de mesa. Se añadieron cantidades apropiadas de aminoácidos a 500 g de lasaña homogeneizada. Esta mezcla fue cerrada al vacío y posteriormente irradiada (10 kGray). La lasaña irradiada fue almacenada a -30 °C hasta nuevo uso.

25 Carne fresca

[0030] Carne bovina recién cortada (pecho) que contiene aproximadamente un 20% de grasa fue molida utilizando un triturador de carne Primus MEW 613 (Maschinenfabrik Dornhan, Dornhan, Alemania) equipado con un disco triturador de 1/8". La temperatura fue mantenida a 10 °C durante todo el procedimiento. Se añadieron cantidades apropiadas de aminoácidos a 500 g de carne molida. La mezcla de aminoácidos y carne fue posteriormente irradiada (10 kGray). La carne irradiada fue almacenada a -30 °C hasta nuevo uso.
30

Inoculación de la lasaña y la carne fresca

35 [0031] El jamón de pavo ultracongelado, la lasaña o la carne fresca fueron descongelados durante toda la noche a -4 (±1) °C. 500 g del producto aún congelado fueron rápidamente cortados en piezas de 2 - 4 cm que fueron transferidas al cubo de un robot de cocina (robot de cocina Tefal Kaleo tipo 67604). Se añadieron 1,5 ml de un cultivo bacteriano adecuadamente diluido y la mezcla total fue mezclada durante aproximadamente 30 - 60 segundos. En esta etapa, la temperatura de la mezcla estaba todavía por debajo de 0 °C. Después de haber
40 mezclado aproximadamente 25 g de la misma, esta fue rápidamente transferida por duplicado a filtros de mangas (Interscience, St Nom, Francia). Los productos inoculados con *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium* fueron incubados durante un período de hasta dos semanas a 12 °C.

Inoculación de la leche

45 [0032] La leche fue enfriada hasta 10 °C y posteriormente fue inoculada con un cultivo apropiadamente diluido de *Salmonella typhimurium*. Muestras de la leche inoculada fueron incubadas a 12 °C.

Análisis microbiano

50 [0033] El análisis microbiano de las muestras de alimento fue realizado de la siguiente forma: se abrió una bolsa de sellado y se le añadió 2 veces el peso neto del fluido de dilución esterilizado (8.5% (p/p) NaCl y 0.1% (p/v) peptona bacteriológica). Las muestras fueron homogeneizadas durante 1 minuto en una batidora de laboratorio Stomacher 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra) y 50 µl de las muestras homogeneizadas fueron colocadas en una placa

de medio de agar adecuada utilizando un sembrador espiral Eddyjet tipo 1.23 (IUL instrumentos, Barcelona, España). La *Escherichia coli* O157:H7 y la *Salmonella typhimurium* fueron colocadas en una placa de agar VRBG (Oxoid, CM0485, Basingstoke, Reino Unido). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 30 °C y luego registradas.

5

Resultados

[0034] El efecto de las adiciones individuales de la glicina, la DL-alanina y una mezcla de glicina (0.67%) y DL-alanina (0.8%) en el crecimiento de *Salmonella typhimurium* en la leche a 12 °C se muestra en la Tabla I:

10

Días	UFC/ml			
	0	2	4	6
Control	5.10 ³	5.10 ⁴	4.10 ⁵	9.10 ⁴
0.67% Gly	5.10 ³	5.10 ⁴	1.10 ⁵	8.10 ⁴
0.8% Ala	5.10 ³	5.10 ⁴	4.10 ⁵	1.10 ⁵
0.67% Gly + 0.8% Ala	5.10 ³	2.10 ³	1.10 ³	1.10 ³

[0035] La tabla muestra que en el caldo de cultivo, la glicina en una concentración de 100 mM y la DL-alanina en una concentración de 100 mM tienen poco o ningún efecto en el índice de crecimiento de la *Salmonella typhimurium*. Por otro lado, las combinaciones demostraron ser muy eficaces impidiendo el crecimiento de este organismo en la leche.

REIVINDICACIONES

1. Método para conservar alimentos contra bacterias Gram negativas que comprende añadir al alimento una preparación antimicrobiana que comprende glicina y alanina, donde la alanina es D-alanina.
- 5 2. Método según la reivindicación 1 donde la preparación antimicrobiana comprende DL-alanina.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el alimento se protege contra al menos uno de *Salmonella* y *Escherichia coli*.
- 10 4. Método según la reivindicación 3 donde el alimento se protege contra al menos uno de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* 0157:H7.
- 15 5. Preparación antimicrobiana que comprende dos aminoácidos elegidos entre al menos glicina y alanina usada para controlar la flora intestinal de un humano o animal mediante la inhibición de bacterias Gram negativas, donde alanina es D- alanina.
6. Preparación antimicrobiana según la reivindicación 5 que comprende una bacteria probiótica y dos aminoácidos elegidos entre al menos glicina y alanina, donde la alanina es D-alanina.

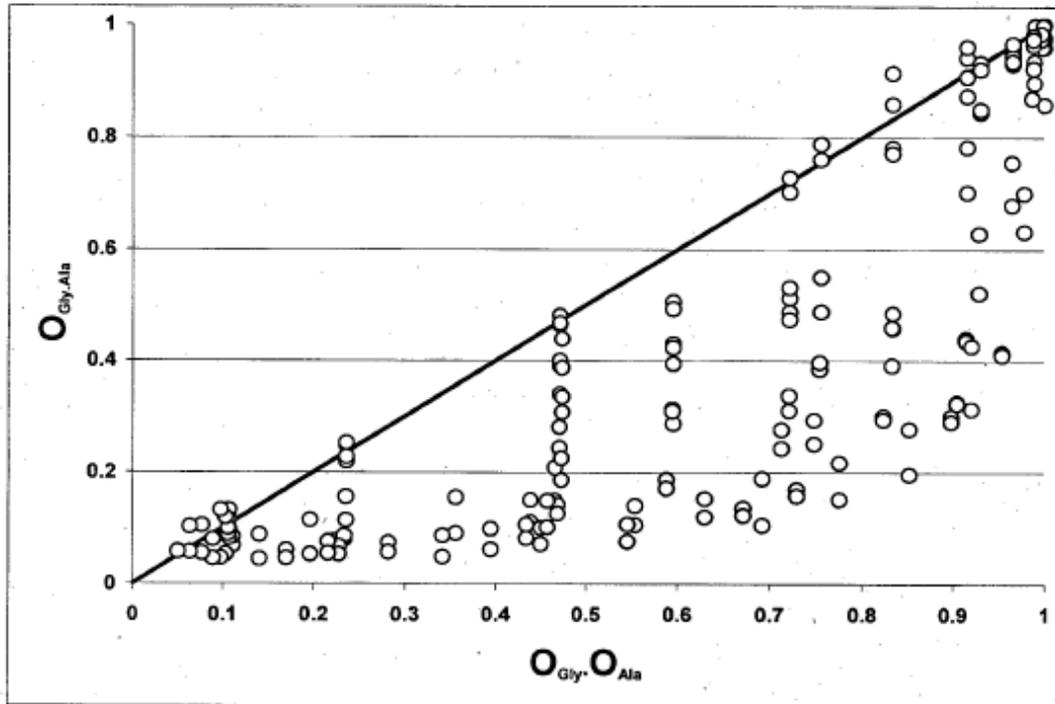


Fig. 1