

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 474 832

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 80 23206

(54) Agent antimicrobien pour la conservation d'aliments pour animaux, à base d'acide pyroligneux.

(51) Classification internationale (Int. Cl.⁸). A 23 L 3/34; A 23 K 3/00.

(22) Date de dépôt..... 30 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA*, 4 février 1980, n° 118.484.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 32 du 7-8-1981.

(71) Déposant : TRIBBLE Talmadge B., résidant aux EUA.

(72) Invention de : Talmadge B. Tribble et Gordon W. Rose.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Langner-Parry,
7, rue de la Paix, 75002 Paris.

Cette invention concerne de manière générale le traitement antifongique et antibactérien et la conservation des aliments pour animaux comme les grains à teneur élevée en humidité, le foin et le fourrage, et elle concerne également des améliorations apportées aux agents antimicrobiens utilisables dans un tel traitement.

L'infection et la contamination des aliments pour animaux par les moisissures, les champignons et les excès de bactéries réduisent de façon générale la valeur nutritionnelle des aliments en nuisant à l'aptitude de l'animal à transformer et assimiler les produits nutritifs, en diminuant l'appétit de l'animal et en créant une toxicité potentielle pour le cheptel vivant et une contamination possible des produits alimentaires obtenues à partir de l'animal.

L'importance du problème des aliments infectés, de la nature mentionnée précédemment, dépend généralement du type de moisissure et de champignons présents, de la quantité ou densité de la population infectante et de l'âge et de l'espèce de l'animal qui consomme ces aliments. Bien qu'indubitablement des quantités importantes de grains infectés soient consommées sans aucune perte apparente en ce qui concerne les caractéristiques des animaux, des études plus récentes laissent à penser que l'infection des denrées alimentaires peut représenter plus qu'un facteur mineur dans la diminution des caractéristiques du cheptel vivant. Il est également évident, en plus de la toxicité potentielle vis-à-vis du cheptel, que les produits finals produits par l'animal à partir d'aliments contaminés constituent un potentiel réel d'intoxication du consommateur humain également.

Par exemple, Gibberella zeae est une moisissure que l'on trouve sur le maïs et certains autres grains cultivés et, bien qu'il s'agisse d'un champignon naturel, il est particulièrement gênant pendant les saisons de croissance chaudes et humides et les périodes de récolte. On sait que sa présence dans l'alimentation fait que les

animaux refusent de manger, provoque des vomissements et produit un effet oestrogène qui peut aboutir à des avortements et une stérilité, en particulier chez les porcs. Cette moisissure engendre également des toxines T-2 qui sont dangereuses tant vis-à-vis de l'homme que des animaux. L'aflatoxine, un produit métabolique du champignon Aspergillus flavus, peut également être présent sur une grande variété d'aliments et, dans certaines conditions, produira des mycotoxines qui sont particulièrement nuisibles pour les mammifères, les poissons et les volailles. Les champignons qui produisent les aflatoxines sont très largement répandus et leur maîtrise a une signification économique importante car leurs effets généralisés sur les animaux de ferme comprennent l'inhibition de la croissance, la diminution de l'efficacité alimentaire et une augmentation du poids des organes internes.

Alors que les exemples précédents servent à indiquer l'importance du problème microbien dans les aliments pour animaux, il suffit de dire qu'aucune solution totalement satisfaisante n'a été présentée jusqu'à présent.

Le but de l'invention est donc de fournir un agent antifongique, antibactérien et antimicrobien amélioré.

La présente invention fournit un agent antimicrobien destiné à conserver les denrées alimentaires pour animaux, comprenant de l'acide pyroligneux.

Les propriétés de conservation de l'agent de cette invention peuvent être potentialisées, modifiées et tamponnées en le complexant avec des additifs sélectionnés pour obtenir une activité antimicrobienne améliorée. Cette invention fournit un agent antimicrobien efficace, efficient et économique, pouvant supprimer et attaquer les bactéries, champignons, moisissures et populations microbiennes contaminantes similaires.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront d'après la description suivante des modes de réalisation de l'invention.

On sait que certains acides organiques faiblement dissociés comme les acides formique , acétique , propionique , butyrique , valérique , benzoïque et sorbique , par exemple, présentent une activité microbienne dont on pense qu'elle dépend largement des molécules non dissociées, ainsi que des anions ; les molécules non dissociées agissant en améliorant l'activité antimicrobienne des ions hydrogènes ou en fournissant une activité antimicrobienne indépendante.

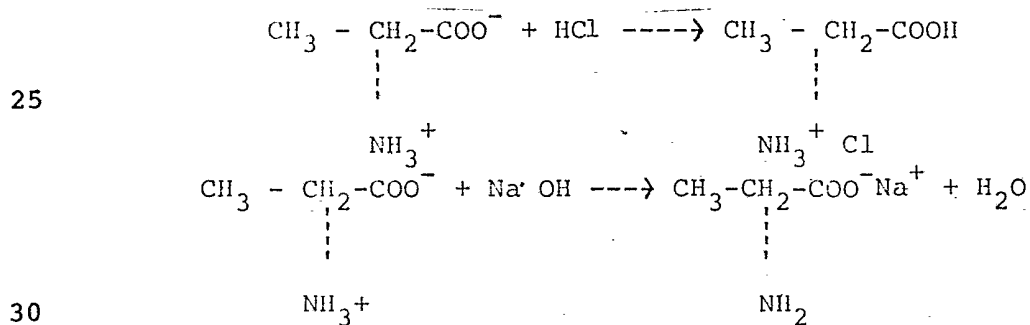
On sait en outre que l'activité antimicrobienne de monoacides organiques, par exemple les acides acétique , propionique , butyrique , etc..., augmente lorsque le poids moléculaire augmente au contraire de ce qui se passe avec les diacides organiques, comme les acides oxalique , malonique , succinique , etc... Mc Calla a suggéré que les effets inhibiteurs des ions hydrogènes sont dus à leur pouvoir d'adsorption élevé qui empêche l'adsorption des ions nutritifs essentiels de plus faible pouvoir d'adsorption par les cellules microbiennes (bactériennes ou fongiques). ANTIMICROBIAL AGENTS. Lloyd W. Hedgecock. Lea et Febiger, Phila. Pa., 1967, pages 78-80] . Ainsi, les ions nutritifs essentiels de plus faible pouvoir d'adsorption peuvent être déplacés depuis leur site d'adsorption par les ions hydrogènes plus actifs, conduisant à une déficience des ions essentiels nécessaires à la croissance microbienne. On pense en outre que les concentrations intracellulaires accrues en ions hydrogènes peuvent modifier l'intégrité de structure et la solubilité des protéines et gêner les fonctions des groupes prosthétiques métalliques des enzymes et/ou peuvent également produire des dégâts létaux aux composants de surface de la cellule bactérienne par l'intermédiaire de réactions d'hydrolyse.

On sait également que les amino-acides et les protéines se comportent à la fois comme acides faibles et comme bases faibles car ils contiennent au moins un groupement carboxy et un groupement amino. Les substances qui s'ionisent à la fois comme acides et comme bases en

solutions aqueuses sont appelées amphotères, et un exemple est l'acide aminé la glycine, dans lequel les groupements acides et basiques sont ionisés en solutions en formant des ions bipolaires ou zwitterions :



La molécule de glycine est électriquement neutre car elle contient un nombre égal d'ions positifs et négatifs et sa forme zwitterion doit donc être isoélectrique ; le pH auquel le zwitterion ne migre pas dans un champ électrique étant appelé son point isoélectrique. Un tel point isoélectrique diffère pour chaque protéine (par exemple, pH 4,7 pour la sérumalbumine, 5,6 pour le fibrinogène, etc...). Les composés amphotères, par exemple les acides aminés et les protéines du cytoplasme des microbes, réagissent avec les acides ou les bases en formant des sels :



D'après ce qui précède, on verra que, avec l'addition de H^+ à une molécule isoélectrique, il résulte une charge positive accrue (NH_3^+), car l'acide diminue l'ionisation du groupement carboxy. Ainsi, on peut dire que les protéines microbiennes passent de la forme zwitterion à une forme se dissociant comme un groupement amino chargé lorsqu'elles viennent en contact avec des acides ou des

bases qui changent le pH du point isoélectrique. Le résultat peut être une ionisation, une solubilité et une disponibilité réduites des protéines. Essentials of Organic and Biochemistry. Donald J Burton et Joseph I. Routh. W. B. Saunders Company, Phila. Pa., 1974, pages 166-182 ; Introduction to Physiological and Pathological Chemistry. L. Earle Arnow et Marie C. Logan. The CV Mosby Company, St. Louis, Missouri, 6th Edition, 1961, pages 145-167 .

En raison de ce qui précède, la présente invention est basée sur la proposition qu'un agent de conservation antimicrobien efficace serait un agent qui donne un milieu ("climat" ou "atmosphère") acide (pH 4 - 6) dans lequel la protéine est moins soluble et donc moins disponible à l'attaque par les populations microbiennes.

L'acide pyroligneux, également appelé "fumée liquide" ou "vinaigre de bois", est un condensat de carbonisation de fumée naturelle dans un véhicule ou diluant aqueux. La source de la vapeur (fumée) de carbonisation se trouve dans la combustion ou carbonisation de matériaux fibreux cellulosiques, principalement les fibres de bois dur, comme le noyer blanc d'Amérique, l'érable et d'autres bois durs. La solution résultante, appelée acide pyroligneux, a une concentration qui est facilement quantifiable et maîtrisée par dilution, et a une composition chimique qui, bien que ne pouvant pas être totalement définie, comprend généralement les composés organiques naturels suivants :

1. L'acide acétique, qui est un acide organique monocarboxylique, à raison de 5,0 à 12,0 %.
2. Des composés à groupements carbonyles, par exemple, des aldéhydes, des cétones, des esters et des acides carboxyliques ; de la butanone-2 et de l'heptaldéhyde comme groupements carbonyles de fumée.
3. Des composés phénoliques (phénols de fumée) comme le diméthoxyphénol.
4. De l'acide propionique en petites quantités.

La densité de l'acide pyroligneux est similaire à celle de l'eau (1,024 à 1,030 à 25°C) ; le pH non tamponné est de l'ordre de 2,0 à 3,0 et l'acide est soluble et miscible dans l'eau et l'alcool. On obtient facilement des valeurs de pH en cours d'utilisation de 4 - 6, selon l'humidité du substrat. Sa principale utilisation jusqu'à présent était le fumage des viandes.

Lors de l'étude de l'acide pyroligneux comme agent antimicrobien, on a évalué le spectre large de ses propriétés, avec et sans additifs d'amélioration, vis-à-vis des bacilles aérobies générateurs de spores et résistants à la chaleur, les bacilles gram-négatifs associés à l'entérite avienne et humaine et diverses moisissures saprophytes (champignons mycéliens) associées aux aliments pour animaux, à la décomposition et, dans certains cas, aux mycotoxicoses humaines et animales.

Dans chaque cas, on a trouvé que cette substance réduit de façon efficace et irréversible les contaminants microbiens naturels et/ou expérimentaux associés aux aliments pour animaux.

Pour déterminer l'efficacité générale de l'activité antimicrobienne de l'acide pyroligneux, on a effectué des essais comparatifs de cet acide avec des acides organiques couramment utilisés comme agents antimicrobiens, à savoir l'acide propionique et l'acide acétique, avec les résultats suivants :

Exemple 1 : ACIDE PYROLIGNEUX par rapport à
l'ACIDE PROPIONIQUE

On applique par pulvérisation un inoculum mixte de *Salmonella typhimurium*, ATCC 14028 et une souche associée au maïs d'*Aspergillus flavus*, à quatre substrats différents polysaccharide/cellulose à une densité de 50.000 organismes/spores par gramme de substrat. L'acide pyroligneux est utilisé à un taux d'utilisation de 250 grammes par tonne de substrat d'essai.

SUBSTRATS D'ESSAI : DENSITE MICROBIENNE
 (SPORES BACTERIENNES ET DE
 TRAITES, NON TRAITES MOISSURES) PAR GRAMME
 5 (ECHANTILLONS APRES 1 SEMAINE D'INCUBATION A
 D'ESSAI 26 - 28°C
 - 100 G/SUBSTRAT)

	<u>S. typhimurium</u>		<u>A. flavus</u>	
	Acide pyroligneux	Acide propionique	Acide pyroligneux	Acide propionique
10				
1. Farine de maïs	1.000	5.000	15.000	22.000
Témoin non traité :..	(40.000)		(50.000)	
2. Farine de blé	6.000	8.000	20.000	25.000
Témoin non traité :..	(45.000)		(50.000)	
3. Ecorces de riz	12.000	18.000	22.000	30.000
Témoin non traité :..	(50.000)		(50.000)	
4. Farine grossière de soja	10.000	15.000	20.000	25.000
Témoin non traité :..	(50.000)		(50.000)	

Selon les découvertes précédentes, il apparaît que, quand on applique par pulvérisation des concentrations et des volumes égaux d'acides pyroligneux et propionique à des substrats celluloseux contaminés de façon expérimentale, l'acide pyroligneux est plus efficace de 20 à 30 % pour réduire les densités des inoculum expérimentaux.

Exemple 2 : ACIDE PYROLIGNEUX par rapport à l'ACIDE ACETIQUE

Méthode d'évaluation par disques d'essai de sensibilité : On imprègne par immersion des disques de 2,5 cm
 35 de papier chromatographique Whatman N° 1 (épaisseur 0,16 mm, débit d'écoulement moyen), dans des concentrations de 100 % des acides d'essai et on les place sur des plaques de gélose d'essai de sensibilité (Mueller-Hinton avec 5 % de sang de mouton) préalablementensemencées par les organismes d'essai.

ORGANISMES D'ESSAI	ZONE D'ACTIVITE
UTILISES SUR LES PLAQUES	ANTIMICROBIENNE
DE GELOSE ENSEMENCEES	OBSERVEE (mm)

5

	Acide pyroligneux	Acide acétique
Bacillus stearothermophilus,		
ATCC 7953	15,0	12,0
Salmonella typhimurium,		
10 ATCC 14028	10,0	9,0
Candida albicans,		
ATCC 10231	14,0	13,0
* Aspergillus flavus,		
ATCC 9643	10,00	9,0
15 * Aspergillus niger,		
ATCC 9642	9,0	9,0
* Chaetomium globosum,		
ATCC 6205	12,0	11,0
* Penicillium funiculosum,		
20 ATCC 11797	13,0	13,0
* Satisfait aux Normes Militaires US pour l'essai de résistance fongique		

25 D'après les résultats obtenus dans l'Exemple 2 ci-dessus, on voit que l'acide pyroligneux égale ou surpasse l'acide acétique dans son aptitude à maîtriser ou inhiber l'activité antimicrobienne, quand on l'évalue sur une méthode de plaques de sensibilité comme indiqué.

30 Alors que les deux exemples précédents, démontrant l'efficacité de l'acide pyroligneux comme agent antimicrobien, sont significatifs par rapport à l'activité correspondante de l'acide propionique et de l'acide acétique, tous deux connus et utilisés comme agents antimicrobiens pour la conservation de denrées destinées aux animaux, on a en outre découvert qu'une telle activité

35 bénéfique observée de l'acide pyroligneux peut être encore améliorée en le complexant avec certains additifs chimiques.

On a par exemple trouvé que l'on peut obtenir une potentialisation sans risque et efficace des propriétés

antimicrobiennes de l'acide pyroligneux et un tamponnage efficace et une modification efficace de sa vitesse d'activité, en le complexant avec l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) non toxique, ses sels de sodium (EDTA disodique ou Na_2 EDTA, EDTA trisodique ou Na_3 EDTA et/ou EDTA tétrasodique ou Na_4 EDTA) et/ou son sel de calcium, Ca EDTA, ainsi qu'avec un certain nombre de composés proches, qui forment des complexes chélatés peu ou faiblement dissociables avec de nombreux cations divalents et trivalents. Ce même additif chimique agit également comme agent séquestrant, adoucissant de l'eau, agent pénétrant et agent réducteur de la tension superficielle.

En plus des effets d'amélioration bénéfiques fournis par le EDTA supplémentaire comme indiqué précédemment, on a en outre découvert que l'aptitude de l'acide pyroligneux à pénétrer efficacement à travers les membranes des cellules ou des spores est améliorée en lui incorporant des détergents synthétiques non ioniques à faible taux de moussage comme les éthers glycoliques, qui agissent en étalant uniformément le composé de conservation sur le substrat traité.

Les données de laboratoire suivantes démontrent les observations et conclusions précédentes.

En utilisant un inoculum d'essai de cultures mélangées de Pseudomonas Sp., Proteus Sp. et Enterobacter Sp. en densités égales, jusqu'à un total de 1×10^6 par gramme, on applique par pulvérisation de l'acide pyroligneux à diverses concentrations, avec ou sans additifs d'amélioration, sur des grains de maïs entiers contaminés de façon expérimentale. On utilise la composition préférée suivante de l'acide pyroligneux avec des additifs constituant une composition de base pour le complexe antimicrobien de l'invention.

FORMULE I

1. 4,0 grammes d'un sel de sodium et/ou calcium sec d'EDTA, dissous dans 100 grammes d'isopropanol.
2. 4,0 grammes d'un détergent synthétique non ionique, par

exemple un éther glycolique ; et

3. suffisamment d'acide pyroligneux pour amener le volume total à 18,900 l (environ 18 900 g).

5

5	<u>Concentrations</u> <u>(ppm) en acide</u> <u>pyroligneux</u>	Densité bactérienne /gramme d'inoculum de cultures d'essai mélangées après une semaine d'exposition	Pourcentage de réduction de la densité initiale de l'inoculum (1×10^6 /g)
10	avec et sans additifs		
	d'amélioration,		
	appliqué à des		
	grains de maïs		
	entiers conta-		
15	minés de façon		
	expérimentale		
	500 ppm avec 100 ppm d'EDTA tétrasodique et 100 ppm de déter- gents synthétiques non ioniques	25.000	97,5
	500 ppm sans additifs	200.000	80,0
	400 ppm avec additifs	50.000	95,0
	400 ppm sans additifs	150.000	85,0
	300 ppm avec additifs	100.000	90,0
	300 ppm sans additifs	200.000	80,0
	200 ppm avec additifs	300.000	70,0
	200 ppm sans additifs	600.000	40,0

D'après ce qui précède, on voit qu'en complexant l'acide pyroligneux avec les additifs spécifiés qui sont un détergent synthétique non ionique et le sel tétrasodique de

l'EDTA, on augmente l'activité antimicrobienne de l'acide pyroligneux d'environ 20 % ou plus.

On a en outre observé que l'incorporation de faibles concentrations d'acides organiques, comme l'acide propionique, produit une amélioration supplémentaire de l'activité antimicrobienne de l'acide pyroligneux, en substance suivant la formule suivante.

10

FORMULE II

1. 4,0 grammes d'un sel de sodium et/ou de calcium sec d'EDTA, dissous dans 100 grammes d'isopropanol,
2. 4,0 grammes d'un détergent synthétique non ionique, par exemple un éther glycolique ;
- 15 3. Environ 224 grammes d'un acide organique, comme l'acide propionique ; et
4. Suffisamment d'acide pyroligneux pour amener le volume total à 18,900 l (environ 18 900 g).

20

Les deux complexes ou formules précédentes peuvent être appliqués en pratique à divers aliments nutritifs pour animaux à des concentrations d'utilisation comprises entre environ 500 et 2.500 grammes par tonne, la concentration variant avec la teneur en eau du substrat à traiter. En outre, on peut substituer des formes solubles dans l'eau de l'EDTA aux formes solubles dans les alcools indiquées précédemment.

25

Pour vérifier les observations précédentes, on a essayé les trois compositions complexées suivantes d'acide pyroligneux :

30

1. Acide pyroligneux plus sel trisodique de l'acide N-hydroxy-éthylène-(diamine triacétique)*
2. Acide pyroligneux plus acide diamine triacétique plus détergent synthétique non ionique (éther glycolique)*
- 35 3. Acide pyroligneux plus acide diamine triacétique plus éther glycolique comme détergent synthétique non ionique plus acide propionique.

* Les concentrations des ingrédients et additifs indiqués ci dessus sont les mêmes que pour les formules I et/ou II.

METHODE D'ESSAI

On utilise la méthode des DISQUES D'ESSAI DE SENSIBILITE vis-à-vis des microbes, en utilisant des carrés de 2,5 cm de papier chromatographique Whatman N° 1 d'une épaisseur de 0,16 mm donnant un débit d'écoulement moyen. On imprègne par immersion une triple épaisseur du papier d'essai dans chacune des compositions proposées, on les centre à la surface de plaques de gélose de 100 mm (Meuller-Hinton avec 5,0 % de sang de mouton) préalablement ensemencées au tampon par les organismes d'essai, et on détermine la zone d'activité.

RESULTATS :

ORGANISMES D'ESSAI ZONE D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE
 UTILISES POUR INOCULER OBSERVEE (mm) APRES UNE INCUBATION
 (ENSEMENCER) LA SURFACE DE 72 HEURES A 37°C (BACTERIES) ET
 DE LA PLAQUE D'ESSAI UNE INCUBATION DE 96 HEURES A 28°C
 (CHAMPIGNONS)

	1. Acide pyroligneux + EDTA	2. Acide pyroligneux + EDTA + détergent	3. Acide pyroligneux + EDTA + détergent + acide propionique
Aspergillus flavus, ATCC 9643	13,0	15,0	21,0
Aspergillus niger, ATCC 9642	12,0	14,0	22,0
Candida albicans, ATCC 10231	7,0	10,0	16,0
Chaetomium globosum, ATCC 6205	16,0	18,0	21,0
Gibberella zeae, ATCC 24688	15,0	17,0	19,0
Trichoderma viride, QM 9123	13,0	14,0	22,0
Bacillus cereus, aerobie formant des spores	12,0	15,0	22,0
Bacillus stearothermophilus, aérobie formant des spores ATCC 7953	16,0	18,0	21,0

Enterobacter aerogenes, fait fermenter le lactose, gram-négatif	15,0	16,0	18,0
Serratia marcescens, positif à la lysine et à l'ornithine-décarboxylase	10,0	15,0	22,0
Salmonella typhimurium ATCC 14028	17,0	18,0	20,0

Les découvertes précédentes montrent que l'addition du détergent synthétique, à savoir l'éther glycolique, augmente la zone de l'activité antimicrobienne d'une moyenne de 16 %, attribuée principalement à l'augmentation de la pénétration et de la migration des ingrédients actifs par suite d'une tension superficielle diminuée. En outre, le renforcement du complexe d'acide pyroligneux par l'acide propionique selon la formule II apparaît augmenter l'activité antimicrobienne du complexe d'acide pyroligneux de formule I d'une moyenne d'environ 23 % par rapport aux organismes d'essai utilisés.

D'après la description précédente, l'homme de l'art verra facilement que l'acide pyroligneux est un agent de conservation antimicrobien unique en son genre fournissant une prescription naturelle d'ingrédients dont chacun a une efficacité antimicrobienne prouvée. Il est important de noter que cet agent, avec ou sans additifs d'amélioration, est un complexe chimique non corrosif, non toxique et non caustique qui est plus sûr à manipuler que les acides acétique et propionique antimicrobiens plus couramment utilisés. Alors que ces derniers acides sont utilisés à des concentrations élevées (50 - 100 %) à des taux d'application donnés (c'est-à-dire 5 à 10 kg par tonne) dans et sur les ingrédients alimentaires pour animaux, comme le maïs à teneur élevée en eau, l'acide pyroligneux est en fait un produit chimique non caustique, moins concentré et présentant donc moins de risque pour la conservation des aliments pour les animaux. Il a en outre été démontré que des additifs sélectionnés, comme décrit ici, rehaussent

effectivement l'activité antimicrobienne normale de cet agent dans des proportions surprenantes. De toute façon, l'acide pyroligneux, avec ou sans additifs, réduit
5 effectivement et combat les contaminants microbiens naturels ou expérimentaux associés aux ingrédients d'aliments pour animaux.

REVENDECATIONS

1. Agent antimicrobien pour la conservation des denrées alimentaires destinées aux animaux, caractérisé en ce qu'il comprend de l'acide pyroligneux.

2. Agent antimicrobien selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient également des acides diaminetriacétiques ou tétracétiques en plus de l'acide pyroligneux.

3. Agent antimicrobien selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient de l'acide éthylène-diaminetétracétique en plus de l'acide pyroligneux.

4. Agent antimicrobien selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend également un agent d'amélioration choisi dans le groupe comprenant l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), son sel sodique, son sel disodique, son sel trisodique, son sel tétrasodique et/ou son sel de calcium.

5. Agent antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 2, 3 et 4, caractérisé en ce qu'il contient un détergent synthétique non ionique.

6. Agent antimicrobien selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit détergent synthétique est un éther glycolique.

7. Agent antimicrobien selon l'une ou l'autre des revendications 5 et 6, caractérisé en ce qu'il contient de l'acide propionique.

8. Agent antimicrobien selon la revendication 6, caractérisé en ce que le détergent synthétique est utilisé de façon à obtenir les proportions suivantes approximatives :

4 grammes d'EDTA ;
4 grammes d'éther glycolique ; et
18 900 grammes d'acide pyroligneux.

9. Agent antimicrobien selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'acide propionique est utilisé de façon à obtenir les proportions suivantes approximatives :

4 grammes d'EDTA ;
4 grammes d'éther glycolique ;
224 grammes d'acide propionique ; et
18 900 grammes d'acide pyroligneux.