



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101801223 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200880107457.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.09.17

A23L 3/3517(2006.01)

(30) 优先权数据

A23L 3/3526(2006.01)

07116555.9 2007.09.17 EP

A61L 2/16(2006.01)

A01N 37/44(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/062342 2008.09.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/037270 EN 2009.03.26

(71) 申请人 普拉克生化公司

地址 荷兰霍林赫姆

(72) 发明人 D·R·克莫尔 A·M·拉米雷斯

R·奥托

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

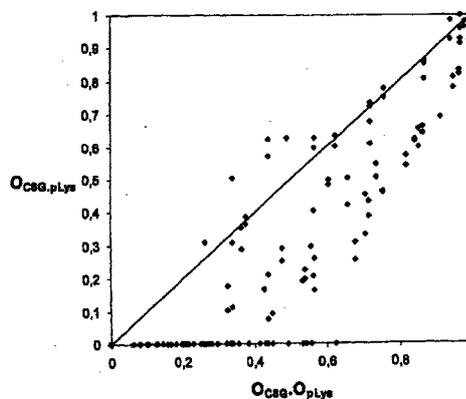
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

甘油的脂肪酸酯结合多聚赖氨酸用于抗革兰氏阴性细菌的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于阻止和 / 或减少革兰氏阴性细菌的存在、生长和 / 或活性的方法,包括应用包括基于甘油的脂肪酸酯和多聚赖氨酸和 / 或多聚赖氨酸的盐的组合物,其中所述甘油的脂肪酸酯用作抗菌试剂。本发明进一步涉及所述组合物在多种产品中用作抗菌试剂的用途,所述产品从技术产品和个人护理产品到用于动物和人消费的食物和饮品产品。



1. 用于减少或阻止产品之中或表面之上的革兰氏阴性细菌的活性、生长或存在的方法,包括将所述产品或表面与包括

a) 甘油的酯和脂肪酸以及

b) 多聚赖氨酸或多聚赖氨酸的盐或其混合物的组合物接触,其中所述甘油的酯和脂肪酸用作抗菌试剂。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述甘油的脂肪酸酯为甘油的单 - 或二 - 酯或其混合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中所述脂肪酸选自:己酸、辛酸、癸酸、十二酸、十四酸及其混合物。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 的方法,其中多聚赖氨酸为  $\epsilon$ -多聚赖氨酸。

5. 根据权利要求 1-4 中任何一项的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种有机酸或其盐或酯,或者其混合物。

6. 根据权利要求 1-5 中任何一项的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种金属螯合试剂。

7. 根据权利要求 1-6 中任何一项的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种乳酸酯(盐)。

8. 根据权利要求 1-7 中任何一项的方法,其中所述组合物为液体或固体的形式,并且其中组合物包括从 0.0001 到 45wt% 的甘油的酯和脂肪酸,从 0.0001 到 40wt% 的多聚赖氨酸或其盐或其混合物,从 0 到 45wt% 的乳酸酯(盐),从 0 到 45wt% 的有机酸或其盐或酯或其混合物,从 0 到 98wt% 的载体及从 0 到 20wt% 的乳化剂。

9. 根据权利要求 1-8 中任何一项的方法,其中所述组合物与来自大肠埃希氏菌、沙门氏菌属、弯曲杆菌属或假单胞菌属家族的细菌接触。

10. 根据权利要求 1-9 中任何一项的方法,其中产品在制造、处理、储存或制备产品的一个或多个阶段中与组合物接触。

11. 根据权利要求 1-10 中任何一项的方法,其中产品为用于人类消费的食物或饮品产品、用于动物消费的饲料或食物产品、清洁产品、去污剂、化妆品产品或个人护理产品。

12. 在包括多聚赖氨酸或多聚赖氨酸的盐或其混合物的组合物中,甘油的酯和脂肪酸作为抗革兰氏阴性细菌的抗菌试剂,用于减少或阻止产品或表面之中或之上的革兰氏阴性细菌的活性的用途。

13. 根据权利要求 12 的甘油脂肪酸酯的用途,用于抗大肠埃希氏菌、沙门氏菌属、弯曲杆菌属或假单胞菌属家族的革兰氏细菌。

14. 根据权利要求 12 或 13 的甘油脂肪酸酯的用途,其中产品是用于动物或用于人类消费的食物或饮品产品,或者清洁产品或去污剂,或者化妆品或个人护理产品。

## 甘油的脂肪酸酯结合多聚赖氨酸用于抗革兰氏阴性细菌的用途

[0001] 本发明涉及使用基于甘油的脂肪酸酯的组合物用于减少或阻止产品之中或之上的革兰氏阴性细菌的活性的方法。本发明进一步针对使用此方法得到的产品。

[0002] 甘油的脂肪酸单酯因其抗酵母、真菌和食物腐败细菌的抗菌活性而为人所知。其还有抗特定的革兰氏阳性食物病原性细菌如李斯特菌属 (*Listeria*) 和梭菌属 (*Clostridium*) 的抗菌活性。然而,其独自对革兰氏阴性细菌没有或几乎没有效果。

[0003] US 2005/0084471 描述了增强剂用于使甘油单酯对革兰氏阴性细菌如大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 有活性的用途。该专利申请提供了所有可能的增强剂的广泛清单。增强剂可以是:  $\alpha$ -羟基酸、 $\beta$ -羟基酸、其他羧基酸、除了羧基酸之外的螯合试剂、酚类化合物(例如,特定的抗氧化剂和尼泊金(paraben))或 C1-C10-单羟基乙醇。其他合适的增强剂是对结合亚铁或铁离子有高度特异性的化合物如铁载体(例如,肠杆菌素、绿脓杆菌螯铁蛋白)及铁结合蛋白质(例如,乳铁蛋白、转铁蛋白)。还包括在内的是螯合剂如细菌素、抗菌酶、糖、糖乙醇及其组合。以上提到的螯合试剂被描述为能够在溶液中与金属离子具有多重配位位点的有机化合物。典型地,这些螯合试剂为多聚阴离子化合物,与多价金属离子最好地配对。实例为乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)及其盐,多种基于磷酸盐和/或磷酸的化合物、己二酸、琥珀酸、二亚乙基三胺五-乙酸、1-羟基乙烯以及特定羧基酸如  $\alpha$ -和  $\beta$ -羟基酸、苹果酸和酒石酸。

[0004] 本发明提供了一种完全不同的方式以增强甘油的脂肪酸酯抗革兰氏阴性细菌的抗菌活性。本发明产生了抗革兰氏阴性细菌的一种非常有效的方式,其可在多种产品中广泛应用,应用范围为从技术产品和应用到用于消费和/或个人护理的产品。对此,本发明针对的是用于减少和/或阻止产品中或表面上的革兰氏阴性细菌的活性、生长和/或存在的方法,包括将所述的产品或表面与包含 a) 甘油的脂肪酸酯和 b) 多聚赖氨酸和/或多聚赖氨酸的盐的组合接触,其中所述甘油的脂肪酸酯作为抗菌或抗微生物试剂应用,而非乳化剂。

[0005] 甘油的脂肪酸酯通常作为乳化剂应用,但现在已经惊奇地发现通过在包含多聚赖氨酸和/或其盐的组合物中使用甘油的脂肪酸,其可作为特异性抗革兰氏阴性细菌的抗菌试剂而应用。

[0006] 据发现,多聚赖氨酸和/或盐与甘油的脂肪酸酯的组合不仅能够简单地增强两种组分的活性,使得所述的增强效果是多聚赖氨酸和甘油的脂肪酸酯二者单个活性的总和,而是出人意料地显示出对于抗菌活性的协同效果,两种组分协同作用产生了比组合物的单个组分的活性总和显著更高的抗菌活性。

[0007] 在上述现有技术中提到的许多增强剂没有显示出这种协同性,且在与甘油脂肪酸单酯组合时不具有像根据本发明的甘油的脂肪酸酯与多聚赖氨酸和/或其盐的组合的协同效果。

[0008] 进一步地,许多所述的增强剂自身对于抗革兰氏阴性细菌不是非常有效,因此要以高量应用以显示任何增强抗菌作用。以需要达到该抗菌作用的量,所述的增强剂在口味、

颜色、气味及 / 或质地方面负面影响其所应用的食物产品。

[0009] 例如,有机酸自身对于抗革兰氏阴性细菌不那么有效,并且为了有增强作用,需要相当大量的有机酸。然而,该酸负面影响许多产品的口味、质地和其他属性,因为其以具有任何抗菌作用所需的量,降低了所述食物产品的 pH。例如,已知酸负面影响富含蛋白质产品(例如,肉类产品)的质地,因为其导致了例如蛋白质的变性。

[0010] 另一个实例是在现有技术中提到的蛋白质、铁载体及细菌素,这些在其用途方面受限制是因为其对于食物产品中的 pH 变化非常敏感,或者是因为其具有对食物产品的口味和质地有不希望的影响。

[0011] 如现有技术中提到的,这也是许多 C1-C10- 单羟基乙醇的情况,其缺点是具有强烈、不希望的气味特征,使其不适合于在食物和饮品产品中的许多应用。

[0012] 用于根据本发明的方法中的甘油的脂肪酸酯独自对于抗革兰氏阴性细菌也不是很有效,但是在与多聚赖氨酸和 / 或其盐组合中,在许多食物和饮品产品能接受的甘油脂肪酸酯浓度,得到了协同增加的抗菌活性。

[0013] 已知多聚赖氨酸发挥抗革兰氏阴性细菌的抗菌活性。 $\alpha$ -多聚赖氨酸和  $\epsilon$ -多聚赖氨酸二者都具有抗菌活性,尽管后者的程度显著更大,如 Shima 等人(1984 年 11 月)描述的。如该文章中描述的, $\epsilon$ -多聚赖氨酸可以以大约 1-8 微克 /ml 的浓度有效地用于抗革兰氏阳性和阴性细菌。

[0014] Hiraki 等人(2000)描述了当  $\epsilon$ -多聚赖氨酸与抗菌试剂如甘油、乙酸(以醋的形式)、乙醇或硫胺素十二烷基磺酸盐一同使用时,其抗菌活性被极大地增强了。然而却没有提到一种方法,其中将甘油的脂肪酸酯与  $\epsilon$ -多聚赖氨酸组合以实现抗革兰氏阴性细菌的抗菌活性,很可能是由于甘油脂肪酸酯对这种类型的革兰氏阴性细菌活性很弱这一点深深为人所知。

[0015] JP 2000-270821、JP 7-135943、JP 4-8273、JP 2001-587465、JP 2001-094794、JP 1999-321013、JP 11113779、JP 1994-298780、JP 2001-384674 描述了包含与单-和二-甘油酯以及其他抗菌组分(如鱼精蛋白、乙醇、甘氨酸、溶菌酶等)组合的  $\epsilon$ -多聚赖氨酸的组合物。以上提到的组合物描述为对于抗形成孔的以及产生乳酸的细菌、抗腐败性细菌如明珠串菌属(*Leuconostoc*)(革兰氏阳性)以及抗酵母和真菌如念珠菌属(*Candida*)有效。

[0016] 现有技术,包括以上提到的专利文献,没有描述甘油的脂肪酸酯与多聚赖氨酸和 / 或其盐组合能非常有效地应用于抗革兰氏阴性细菌,尤其是抗大肠埃希氏菌、沙门氏菌属(*Salmonella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)及假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

[0017] 进一步地,现有技术针对的是甘油的脂肪酸酯在可能包含抗菌试剂如多聚赖氨酸和其他的混合物中作为乳化剂或表面活性剂的用途,例如在 JP 2002-274742 中。没有发现有现有技术描述了甘油的脂肪酸酯已经在包含多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物中用作抗革兰氏阴性细菌的抗菌试剂。现有技术没有描述甘油的脂肪酸酯可以用于协同增加多聚赖氨酸和 / 或其任何盐的抗微生物作用。

[0018] 因此本发明包括用于减少或阻止革兰氏阴性细菌的活性、生长和 / 或存在的方法,包括将所述细菌与包含 a) 甘油的脂肪酸酯和 b) 多聚赖氨酸和 / 或多聚赖氨酸的盐的组合物接触,其中所述甘油的脂肪酸酯作为抗菌试剂使用。

[0019] 多聚赖氨酸可以以  $\epsilon$ -多聚赖氨酸、 $\alpha$ -多聚赖氨酸或其混合物存在。 $\epsilon$ -多聚赖

氨酸是优选的,因为其相比于多聚赖氨酸的其他形式具有更高的抗革兰氏阴性细菌的抗菌活性,因此需要更少量的这种抗菌试剂以在应用中实现抗革兰氏阴性细菌的抗菌活性的满意的协同性。进一步, $\epsilon$ -多聚赖氨酸优选地包含通过自由羧基基团及 $\epsilon$ -氨基基团之间的肽键连接的30-50个L-赖氨酸单体。本发明的脂肪酸酯还可以与一种或多种多聚赖氨酸的盐组合。

[0020] 本发明的甘油脂肪酸酯(也称为甘油酯或甘油或基于甘油的脂肪酸酯)可以包括甘油的单酯、二酯或三酯或者其混合物。生产这些酯的方式常常产生多种单-、二或三酯的混合物,可能如通常已知的。通过本领域技术人员已知的不同的技术能从这些混合物中分离出这些酯。因此,当指的是单酯时,这些甘油的单酯包括纯组分以及主要包括单酯却还包括二-和三-酯(作为所述的混合物的进一步组分)的混合物。

[0021] 当细菌或含有所述细菌的产品以及表面与包括多聚赖氨酸和甘油的单-和二酯的组合物接触时,得到了非常好的结果。在包括与甘油的脂肪酸酯和脂肪酸结合的多聚赖氨酸和/或其盐的组合物中观察到有产生高抗菌活性的高度协同性,其中所述的脂肪酸包括饱和脂肪酸例如但不限于己酸(C6)、辛酸(C8)、癸酸(C10)、十二酸(C12)、十四酸(C14)、十六酸(C16)、十八酸(C18)和其混合物。

[0022] 当本申请中指的是例如C8-甘油酯或C10-甘油酯时,意为甘油的脂肪酸酯,并且分别是辛酸和癸酸。

[0023] 据发现,如果细菌或含有细菌的产品或表面与包括甘油脂肪酸酯、多聚赖氨酸和/或其盐以及进一步的一种或多种乳酸酯(盐)(lactylate)的组合物接触,根据本发明的方法甚至更有效。乳酸盐(酯)为乳酸(和/或乳酸的盐)的脂肪酸酯且对本领域技术人员已知。这些组分以其乳化作用已知,因此作为乳化剂使用。单乳酸酯(盐)和二乳酸酯(盐)二者都与其混合物一样合适。乳酸酯(盐)组分常常作为例如主要是单乳酸酯(盐)的混合物获得,并且由于其制备方式而进一步包括二乳酸酯(盐)的混合物。极有可能混合物中还存在有更高聚合的多聚乳酸酯(盐)。乳酸酯(盐)可以通过例如色谱分离的方式或通过本领域技术人员已知的任何其他方式以纯的形式(例如,只有单聚的形式)获得。

[0024] 用于根据本发明的方法的抗菌组合物进一步可以包括一种或多种有机酸和/或其盐或酯,因为这些成分进一步增强抗菌活性。优选地,使用选自乳酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、酒石酸、葡萄糖酸、丙酸和己酸的一种或多种有机酸和/或其盐或酯,因为这些酸对产品质量在例如产品口味、气味和颜色上没有负面影响。

[0025] 可选地,用于根据本发明的方法的抗菌组合物进一步包括一种或多种金属螯合试剂。螯合试剂选自例如乙二胺四乙酸(EDTA)及其盐,二亚乙基三胺五-乙酸及其盐,多种基于磷酸的化合物如六偏磷酸钠、焦磷酸钠和多聚磷酸、有机膦酸盐螯合化合物如:植酸、1,1-二膦酸、铁载体及铁结合蛋白质如肠杆菌素和乳铁蛋白,以及羧基酸和羟基羧酸以及/或其盐,例如但不限于琥珀酸、抗坏血酸、乙醇酸、苯甲酸、辛酸和脂肪酸。

[0026] 据发现,根据本发明的方法对大肠埃希氏属(例如大肠埃希氏菌)、沙门氏菌属(例如沙门氏菌属多个种)、弯曲杆菌属(例如弯曲杆菌属多个种)和假单胞菌属(例如假单胞菌属多个种)家族的革兰氏阴性细菌非常有效,因为多聚赖氨酸组分和甘油酯组分在组合物中对这些特异性靶标生物体协同作用,从而达到了足以阻止和/或减少这些革兰氏

阴性细菌的存在、生长和 / 或活性的抗菌活性。

[0027] 进一步,根据本发明的方法可应用于多种产品和应用中,范围从例如低和高 pH 值的产品、高度浓缩或稀释的产品、可用于技术领域品(例如,在用于工业或家居用途的去垢剂中)、药用领域(例如,用于清洁和消毒设备或制备药物组合物或其包装)、个人护理(例如,在制造化妆品、香波、霜剂和乳液)、饲料工业(例如,用于清洁设备、制造、储存、处理及制备动物饲料和饮品产品)到食物和饮品工业的产品。

[0028] 因此,本发明涉及在包括多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物中,甘油脂肪酸酯作为抗革兰氏阴性细菌的抗菌试剂用于减少和 / 或阻止革兰氏阴性细菌的存在、生长或活性的用途,具体而言是之前提到的去垢剂、化妆品产品和个人护理产品的制造、处理、储存和制备中的细菌。

[0029] 对此,根据本发明的用于减少或阻止去垢剂产品、化妆品产品和个人护理产品中革兰氏阴性细菌的存在、生长或活性的方法包括在所述产品的制造、处理、储存或制备的一个或多个阶段中根据本发明的多种实施方式将所述产品与包括甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物接触,其中所述的甘油脂肪酸酯用作抗菌试剂。

[0030] 进一步发现包括甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸和 / 或盐的组合物对于清洁表面非常有用。因此根据本发明的方法还针对减少或阻止表面上的革兰氏阴性细菌的存在、生长或活性,具体而言是之前提到的细菌,所述方法包括将所述的表面与包括甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸和 / 或盐的组合物接触,其中所述的甘油脂肪酸酯用作抗菌试剂。

[0031] 本发明进一步针对甘油脂肪酸酯在包括多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物中,在用于饲料工业的食物和饮品产品以及用于人类消费的食物和饮品产品的制造、处理、储存和制备中,作为抗革兰氏阴性细菌的抗菌试剂的用途。

[0032] 对此,根据本发明的用于减少或阻止在用于动物或人类消费的食物和饮品产品中革兰氏阴性细菌的存在、生长或活性的方法包括在食物加工过程如所述产品的制造、处理、储存或制备的一个或多个阶段中,将所述产品与包括甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物接触,其中所述的甘油脂肪酸酯作为抗菌试剂应用。

[0033] 食物和饮品产品的实例为饮品例如碳酸和非碳酸饮料,基于水果或蔬菜的果汁、富含蛋白质的产品例如多种肉类和鱼类产品、调味品、酱和配料、即食及即饮产品、冷藏和高温处理产品等。这些产品能用根据本发明的方法非常好地制造或处理。所得的产品在例如口味、质地和颜色方面的感官质量上没有受到负面影响,同时产品受到针对革兰氏阴性细菌存在和活性造成的食物腐败及 / 或食物中毒的保护。

[0034] 正常地,甘油脂肪酸酯以多至产品重量 5% 的量存在于食物或饮品产品中,优选地从 0.0001% 到 5%,优选地从 0.0001% 到 2%,优选地从 0.0001% 到 1%。

[0035] 正常地,多聚赖氨酸以多至产品重量 1% 的量存在于食物或饮品产品中,优选地从 0.0001% 到 1%,优选地从 0.0001% 到 0.1%,优选地从 0.0001% 到 0.01%,优选地从 0.0001% 到 0.001%。

[0036] 正常地,EDTA、有机磷酸盐和多聚磷酸盐以多至产品重量 1% 的量存在于食物或饮品产品中,优选地从 0.0001% 到 1%。

[0037] 正常地,乳酸酯(盐)以多至产品重量 1% 的量存在于食物或饮品产品中,优选地从 0.0001% 到 1%,甚至从 0.0001% 到 0.1%,最优选地从 0.0001% 到 0.01%。

[0038] 正常地,有机酸例如乳酸、延胡索酸、琥珀酸、酒石酸、抗坏血酸、羟基乙酸、苯甲酸、醋酸、丙酸、辛酸、苹果酸及己二酸可以多至产品重量 10% 的量存在于食物或饮品产品中,优选地从 0.0001% 到 10%,优选地从 0.0001% 到 5%。

[0039] 根据本发明的方法中,以上提到的食物和饮品产品与包括甘油脂肪酸酯及多聚赖氨酸和 / 或其盐的本发明的组合物接触。在根据本发明的方法的一个优选实施方式中,食物和饮品产品与以上提到的组合物一并进行注射。组合物然后存在于产品的内部部分或产品内。

[0040] 在本发明的另一个优选的实施条件中,所述方法包括了用包括甘油脂肪酸酯及多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物对产品进行表面处理。这可能不仅在最后的产品阶段,还在过程中完成,例如肉类产品制造中兽体消毒过程中或在应用于水果和蔬菜的洗涤步骤中。所述抗菌组合物可通过多种方式例如作为喷洒、冲洗或洗涤溶液或作为多种食物产品浸入其中的溶液与待处理产品接触或引入待处理产品中。

[0041] 依据应用的类型以及本发明组合物是否在最终产品中用作活性成分或者是作为例如洗涤溶液或喷剂的组分使用,所述组合物的组分在浓度上和内部比例上有变化,这些对本领域技术人员是明显的。

[0042] 包括甘油脂肪酸酯及多聚赖氨酸和 / 或其盐的组合物可以以固体或液体形式得到。如果所述组合物是以液体形式的,其通常是水性组合物的形式,可以是溶液或者分散液。根据本发明,基于溶液的总重量,这种水性组合物通常包括从 0.0001wt% 到多至 40wt%;更优选地从 0.1wt% 到 35wt%,最优选地从 1 到 25wt% 的多聚赖氨酸以及从 0.0001wt% 到多至 45wt%,更优选地从 1 到 40wt%,最优选地从 5 到 35wt% 的甘油脂肪酸酯。所述组合物可以进一步包括乳酸酯(盐),其量为 0 到 45wt%,更优选地为从 5 到 35wt%,并且进一步含有机酸,范围是 0 到 45wt%,更优选地为从 0 到 30wt%。

[0043] 甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸或其盐可通过载体引入液体组合物中。本领域技术人员知道何种载体可以使用。在多种熟知的载体中,发现聚乙二醇和 / 或乳酸酯(盐)很好地以载体发挥功能。载体可以以大约 50-98wt% 的浓度存在。进一步地,可添加本领域技术人员已知的多种乳化剂。优选地,乳化剂如聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯 60 或 80) 和卵磷脂的应用浓度为例如 0.1-25%,更优选地为 1-10%,最优选地为 2-4%,基于 100% 脂肪酸衍生物如甘油脂肪酸酯和 / 或乳酸酯(盐),如果除甘油脂肪酸酯及多聚赖氨酸或其盐之外还在组合物中使用了后者组分。

[0044] 如果包括甘油脂肪酸酯和多聚赖氨酸或其盐的组合物为固体形式,那么其通常为包括相关组分颗粒的粉末形式。根据本发明,基于粉末的总重量,固体形式的组合物通常包括从 0.0001wt% 到多至 40wt%,更优选地从 0.1wt% 到 35wt%,最优选地从 1 到 25wt% 的多聚赖氨酸,以及从 0.0001wt% 到多至 45wt.%,更优选地从 1 到 40wt%,最优选地从 5 到 35wt% 的甘油脂肪酸酯。

[0045] 可以用到载体。非常合适的载体为二氧化硅和 / 或麦芽糖糊精,其存在浓度为多至从 50 到 98wt%。

[0046] 所述组合物可进一步包括乳酸酯(盐),量为从 0 到 45wt%,更优选地为从 0 到 35wt%,进一步包括有机酸,范围是从 0 到 45wt%,更优选地为从 0 到 30wt%。

[0047] 以下非限制实例进一步说明了本发明。

## [0048] 实施例 1

[0049] 在研究中使用以下培养物质：大肠埃希氏菌 (ATCC 8739)，大肠埃希氏菌血清型 0157:H7 (ATCC 700728)，鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonellatyphimurium*) (ATCC 13311) 和肠炎沙门氏菌 (*Salmonellaentiridis*) (ATCC 13076)。每天将所有培养物转移到含有 10ml 脑心浸剂肉汤的螺旋盖试管中。培养物在 30°C 下孵育，不搅拌。随着单 / 二甘油酯和多聚赖氨酸的量增加，制备脑心浸剂肉汤。辛酸 (C8) 单 / 二甘油酯的浓度范围为以 10 步每步 0.02% 从 0 到 0.18%，对癸酸 (C10) 单 / 二甘油酯为以 10 步每步 0.01% 从 0 到 0.09%，对十二酸 (C12) 单 / 二甘油酯为以 10 步每步 0.001% 从 0 到 0.009%。单 / 二甘油酯与多聚赖氨酸组合。多聚赖氨酸的浓度范围为以 10 步每步 0.0075% 从 0 到 0.0675%，产生 100 种不同培养基。用 1N HCl 或 1N NaOH 将培养基的 pH 调整到 6.1-6.2。培养基以 10ml 的量制备，并通过过滤进行灭菌。每份培养基取 300  $\mu$ l 转移到一组灭菌的 **Bioscreen®** C 蜂窝式 100 孔板中。使用 5  $\mu$ l 的灭菌重复分配器将多孔板用 5  $\mu$ l 脑心浸剂肉汤中生长过夜的培养物进行孵育。生长速率用 **Bioscreen®** 确定，其通过垂直光度测定法动力学地测量浊度的发展。板在 37°C 下孵育 16-24 小时，使用宽频带滤波器于 420-580nm 处每 30 分钟测量培养物的光密度。 **Bioscreen®** 在设定的时间间隔测量培养物的光密度。 **Bioscreen®** 从这些数据计算最大特定生长速率。进一步数据处理的目的为确定两种氨基酸是否独立于彼此作用或者是否其在抑制作用上相互刺激（协同）还是彼此抵消抑制作用（拮抗）。当特定的化合物对于生物体没有作用时，此生物体的特定生长速率 ( $\mu$ ) 能表示为生长限制性底物浓度 (s) 的函数 (f)，通过例如莫诺德 (Monod) 公式，其为： $\mu = \mu_{\max} \cdot s / (K_s + s)$ ，其中  $\mu_{\max}$  代表最大的特定生长速率，s 为培养基中生长限制性底物的稳定浓度， $K_s$  为底物浓度，其中  $\mu = 0.5 \cdot \mu_{\max}$ 。然而，当抑制剂 P 的存在影响细胞生长时，必须修改  $\mu$  的函数 f，即  $\mu = f(s, p)$ ，其中 p 代表抑制剂 P 的浓度。细菌生长抑制动力学的大量研究已经表明，许多抑制剂起非竞争性抑制剂的作用。这暗示了只有最大特定生长速率 ( $\mu_{\max}$ ) 数值，而非亲和力 ( $K_s$ ) 受到影响。因此，在抑制剂存在时的特定生长速率可写作： $\mu = \mu_i \cdot s / (K_s + s)$ ，其中  $\mu_i$  为在抑制剂 P 存在下的最大特定生长速率。 $\mu_i$  和  $\mu_{\max}$  及抑制剂 P 的浓度之间的关系用对数剂量反应 (Logistic Dose Response) 公式描述，其为： $\mu_i / \mu_{\max} = 1 / (1 + (p / p_{0.5})^b)$  (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)。该公式中，p 代表抑制剂 P 的浓度， $p_{0.5}$  为  $\mu_i = 0.5 \cdot \mu_{\max}$  时 P 的浓度， $\mu_{\max}$  为最大特定生长速率，其为抑制剂 P 不存在时的特定生长速率，b 是无量纲的量，其确定  $\mu_i$  和 p 之间的关系。将莫诺德和对数剂量反应公式结合，可写作： $\mu = \mu_{\max} \cdot s / (K_s + s) / (1 + (p / p_{0.5})^b)$ 。在批次培养物中，s 常常比  $K_s$  高很多倍，该公式简化为  $\mu = \mu_{\max} / (1 + (p / p_{0.5})^b)$ 。当比较相同条件下生长的不同生物体，或不同条件下生长的相同生物体时，使用相对生长速率比使用绝对生长速率作为比较标准更有意义。相对生长速率 (O) 为生长速率 ( $\mu$ ) 对最大生长速率 ( $\mu_{\max}$ ) 的比率，即  $O = \mu / \mu_{\max}$ 。可以看到，当  $\mu$  和  $\mu_{\max}$  的量纲为 (倍数)<sup>-1</sup> 时，其比率 O 为无量纲，即纯数。类似地，我们能定义相对抑制剂浓度  $\epsilon$  为  $p / p_{0.5}$ 。简化的莫诺德和对数剂量反应公式现在可写作： $O = 1 / (1 + \epsilon^b)$ 。对于两种抑制剂 X 和 Y，例如，可以定义以下两种 O 的表达式： $O_x = 1 / (1 + \epsilon^{b1})$  及  $O_y = 1 / (1 + \epsilon^{b2})$ 。 $O_x$  和  $O_y$  能通过检查 X 或 Y 对于靶标生物体生长速率的抑制作用在实验上进行估计。知道  $O_x$  和  $O_y$  的评估函数，理论

性的独立影响定义为： $O_x \cdot O_y$ 。实验中观察到的 X 和 Y 的组合对相对生长速率的作用定义为  $O_{xy}$ 。X、Y 彼此独立对特定生物体产生作用的假说在数学上转化成  $O_{xy}/O_x \cdot O_y = 1$ 。对此假说的否定暗示了 X 和 Y 的组合作用不是独立的作用，而是协同或拮抗作用。在抑制剂 X 和 Y 协同地作用于靶标生物体的情况下， $O_{xy}/O_x \cdot O_y < 1$ （但  $> 0$ ）。在抑制剂 X 和 Y 的组合作用的情况下， $O_{xy}/O_x \cdot O_y > 1$ 。

[0050] 协同性，独立作用以及拮抗性，能显示在  $O_{xy}$  对  $O_x \cdot O_y$  的作图中。这在图 1-4 中有示例，其中，对于鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 13311) 和肠炎沙门氏菌 (ATCC 13076) 给出了  $O_{C_{xG} \cdot p_{Lys}}$ （单甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，实验中观察到的相对生长速率）对  $O_{C_{xG}} \cdot O_{p_{Lys}}$ （单甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，预期的相对生长速率）的不同作图，显示出乳酸酯（盐）和多聚赖氨酸之间抑制作用的协同性。该图中的实线代表了其中实验中观察的相对生长速率 ( $O_{C_{xL} \cdot p_{Lys}}$ ) 等于预期的相对生长速率 ( $O_{C_{xL}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) 的线，其中乳酸酯（盐）和多聚赖氨酸作为独立的抑制剂起作用。

[0051] 图 1 为在 C8-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，鼠伤寒沙门氏菌的实验中观察的相对生长速率 ( $O_{C_{8G} \cdot p_{Lys}}$ ) 对在 C8-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，预期的相对生长速率 ( $O_{C_{8G}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) 的作图。

[0052] 图 2 为在 C8-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，肠炎沙门氏菌的实验中观察的相对生长速率 ( $O_{C_{8G} \cdot p_{Lys}}$ ) 对在 C8-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，预期的相对生长速率 ( $O_{C_{8G}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) 的作图。

[0053] 图 3 为在 C10-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，鼠伤寒沙门氏菌的实验中观察的相对生长速率 ( $O_{C_{10G} \cdot p_{Lys}}$ ) 对在 C10-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，预期的相对生长速率 ( $O_{C_{10G}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) 的作图。

[0054] 图 4 为在 C10-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，肠炎沙门氏菌的实验中观察的相对生长速率 ( $O_{C_{10G} \cdot p_{Lys}}$ ) 对在 C10-甘油酯和多聚赖氨酸混合物存在下，预期的相对生长速率 ( $O_{C_{10G}} \cdot O_{p_{Lys}}$ ) 的作图。

[0055] 图 1-4 指出，在所测试的不同组合中，多聚赖氨酸和甘油酯对靶标生物体协同作用， $O_{xy}/O_x \cdot O_y < 1$  且  $> 0$ （由实线下的点表示）。

[0056] 表 1 中给出了协同性的进一步的实例，例如 0.0225% (w/w) 多聚赖氨酸和 0.12% (w/w) C8-甘油酯或 0.0225% (w/w) 多聚赖氨酸和 0.09% (w/w) C10-甘油酯之间的协同性。在表中可以观察到，大肠埃希氏菌 (ATCC 8739)、大肠埃希氏菌血清型 0157:H7 (ATCC 700728)，鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 13311) 或肠炎沙门氏菌 (ATCC 13076) 在含有 0.0225% (w/w) 多聚赖氨酸和 0.12% (w/w) C8-甘油酯或者 0.0225% (w/w) 多聚赖氨酸和 0.09% (w/w) C10-甘油酯的培养基中的相对生长速率在所有情况下都低于根据这些生物体在含有多聚赖氨酸或这些甘油酯之一的培养基中相对生长速率的预期值。

[0057] 表 1：协同性的实例

[0058]

化合物浓度 (w/w)	观察的相对生长速率		
	C8-甘油酯	多聚赖氨酸	C8-甘油酯加多聚赖氨酸
	0.120%	0.0225%	0.12% / 0.0225%
大肠埃希氏菌 ATCC 8739	1.0845	0.7570	0.0000
大肠杆菌 0157:H7 ATCC 700728	0.9410	0.8315	0.0000
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311	0.4035	0.9653	0.0000
肠炎沙门氏菌 ATCC 13076	0.5220	0.9945	0.0730

[0059]

化合物浓度 (w/w)	观察的相对生长速率		
	C10-甘油酯	多聚赖氨酸	C10-甘油酯加多聚赖氨酸
	0.090%	0.0225%	0.09% / 0.0225%
大肠杆菌 0157:H7 ATCC 700728	0.8685	0.5850	0.0000
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311	0.4613	0.9910	0.0000
肠炎沙门氏菌 ATCC 13076	0.8960	0.9600	0.0000

[0060] 实施例 2:受污染的鸡排及牛奶中的抗微生物作用

[0061] 材料和方法

[0062] 培养物及培养条件

[0063] 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 及大肠埃希氏菌 0157:H7 ATCC700728 于含有脑心浸剂肉汤的灭菌螺旋盖管中,30℃下培养 18-24 小时。

[0064] 鸡排 (chicken filet) 的制备

[0065] 将鸡排 (150-200g) 切好,真空包装,储存于 4-7℃。接着鸡排通过  $\gamma$ -辐射 (平均辐射剂量:12 千戈瑞) 灭菌。

[0066] 用鼠伤寒沙门氏菌接种鸡排。

[0067] 将脑心浸剂肉汤中的鼠伤寒沙门氏菌的 1ml 过夜培养物用灭菌的 0.8% (w/v) NaCl 和 0.1% (w/v) 蛋白胨稀释 1000 倍。将 0.5ml 的该稀释培养物转移至鸡排的一侧。通过轻柔摩擦鸡排的整个表面分散接种物。对于鸡排另一侧重复该步骤。在 6℃下进行接种。接种的鸡排于 6℃下静置 60-120 分钟以使细胞附着。

[0068] 鸡排的去污染

[0069] 将鸡排简短地蘸入并完全浸没于 1L 含有适当制剂的溶液中,然后转移至含有 5ml 适当制剂的 400ml 的 **Bagfilter®** 侧滤袋 (Interscience, St Nom, France) 中。将袋子真空密封并于 12℃下孵育多至 7 天,直到进行进一步分析。蘸入后 30 分钟内对 0 时间点样品铺板。

[0070] 鸡排的微生物分析

[0071] 鸡排上的存活鼠伤寒沙门氏菌按如下方法计数:打开密封袋,向其中加入 2 倍净重的灭菌稀释液体 (8.5% (w/v) NaCl 和 0.1% (w/v) 细菌学蛋白胨)。将两份相同的鸡排于 **Bagmixer®** 400 板实验室混合器 (Interscience, St Nom, France) 中进行 1 分钟的均一化。使用 Eddyjet 1.23 型螺旋铺板仪 (IUL Instruments, 巴塞罗那, 西班牙) 将 50  $\mu$ l 的均一物或其稀释液铺于两份相同的含有头孢磺啉 (cefsulodin)、新生霉素 (novobiocin)

补充物 (SR0194) (Oxoid, 贝辛斯托克, 英国) 的沙门氏菌属显色琼脂平板 (CM1007) 上。平板在 30℃ 下孵育 24-48 小时, 然后计数。沙门氏菌属的数量表示为每 ml 均一物的  $\log_{10}$  菌落形成单位。

[0072] 接种用抗微生物制剂处理过的牛奶

[0073] 从地方超市购买灭菌的低脂牛奶, 将 100ml 的量转移至一系列灭菌螺旋盖瓶中。加入  $\epsilon$ -多聚赖氨酸、甘油单 / 二辛酸酯钠盐 (C8 单 / 二甘油酯) 和甘油单 / 二癸酸酯钠盐 (C10 单 / 二甘油酯) 至表 2 中显示的浓度。用大肠埃希氏菌 0157:H7 的过夜培养物接种不同的牛奶制品。起始细胞密度为  $\log_{10}$  2.5-3.0。

[0074] 牛奶培养物的微生物分析

[0075] 存活的大肠埃希氏菌 0157:H7 按如下方法计数: 使用 Eddyjet1.23 型螺旋铺板仪 (IUL Instruments 巴塞罗那, 西班牙) 将两份相同的 50  $\mu$ l 牛奶培养物样品或其稀释液铺于两份相同的 Violet Red Bile Glucose (VRBG) 琼脂板 (CM0485 Oxoid, 贝辛斯托克, 英国) 上。平板在 30℃ 下孵育 24-48 小时, 然后计数。大肠埃希氏菌的数量表示为每 ml 均一物的  $\log_{10}$  菌落形成单位。

[0076] 制备抗微生物制剂

[0077] 所研究的制剂的组合物表示在表 2 中。 $\epsilon$ -多聚赖氨酸和单 / 二甘油酯溶解于去矿物质水中, 于 120℃ 下灭菌 20 分钟。

[0078] 表 2. 抗微生物制剂的组合物

[0079]

制剂	空白	a	b
$\epsilon$ -多聚赖氨酸		0.1% (w/v)	0.1% (w/v)
C8-单 / 二甘油酯		0.2% (w/v)	
C10-单 / 二甘油酯			0.05% (w/v)
NaCl	0.8% (w/v)	0.8% (w/v)	0.8% (w/v)

[0080] 化学品

[0081]  $\epsilon$ -多聚赖氨酸购自 Chisso America Ins (纽约, 美国)。甘油单 / 二辛酸酯 (C8 单 / 二甘油酯) 和甘油单 / 二癸酸酯 (C10 单 / 二甘油酯) 的钠盐购自 Caravan Ingredients (莱尼克萨, 堪萨斯, 美国)。

[0082] 鸡排的去污染结果

[0083] 鸡排上存在的鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 暴露于  $\epsilon$ -多聚赖氨酸与单 / 二甘油酯的组合引起存活细胞的数量几乎立刻减少大约 90% (表 3)。一天后, 在 12℃ 下, 数量的减少超过  $4\log_{10}$ 。所测试的组合对生长的抑制不是永久的; 4 天后, 数量有所增加, 尽管孵育 7 天后制剂和空白之间的差异不会少于  $2\log_{10}$ , 而且微生物活性仍然存在。

[0084] 表 3: 12℃ 下,  $\epsilon$ -多聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -PL) 与单 / 二甘油酯的组合对鸡排上鼠伤寒沙门氏菌的作用; 以  $\log_{10}$  菌落形成单位 (CFU)/ml 表示。

[0085]

时间(天数)	空白	制剂	
		0.1% (w/v) $\epsilon$ -PL+0.2% (w/v) C8-单/二甘油酯	0.1% (w/v) $\epsilon$ -PL+0.05% (w/v) C10-单/二甘油酯
0	3.74	2.68	3.02
1	5.91	0	0
4	6.01	3.82	4.17
5	6.89	5.18	4.53
6	7.36	4.5	5.23
7	7.46	4.46	5.18

[0086] 各自地,没有  $\epsilon$ -多聚赖氨酸存在时,甘油酯不显示任何杀伤或生长抑制作用(表4)。 $\epsilon$ -多聚赖氨酸自身减少细胞数量,但是作用小于其与脂肪酸衍生物之一组合的情况。这一点在孵育一天后尤其明显。而对于组合在数量上减少的范围在  $4\log_{10}$  到  $5\log_{10}$  之间(表3),对于单独添加的  $\epsilon$ -多聚赖氨酸,减少量仅为  $2\log_{10}$ (表4)。这表明  $\epsilon$ -多聚赖氨酸和脂肪酸衍生物之间在抑制作用上具有一种形式的协同性。这由体外研究得以证实,其中这些组合的作用在肉汤中进行研究(实验1)。

[0087] 表4:12°C下,  $\epsilon$ -多聚赖氨酸和C8、C10单/二甘油酯对鸡排上鼠伤寒沙门氏菌各自的作用;以  $\log_{10}$  菌落形成单位(CFU)/ml表示。

[0088]

时间(天数)	空白	制剂		
		0.1% (w/v) $\epsilon$ -多聚赖氨酸	0.2% (w/v) C8-单/二甘油酯	0.05% (w/v) C10-单/二甘油酯
0	3.8	3.04	3.82	3.72
1	4.05	2.04	3.81	3.98
4	4.82	2.15	4.03	4.32
5	7.2	4.04	6.41	6.0
6	7.6	4.26	7.48	7.62
7	7.68	5.35	7.39	7.85

[0089] 牛奶中对大肠埃希氏菌 0157:H7 的抑制结果

[0090] 对于在脱脂牛奶中生长的大肠埃希氏菌 0157:H 7,也观察到  $\epsilon$ -多聚赖氨酸和单/二甘油酯的组合对生长的强烈抑制(表5)。

[0091] 表5:12°C下,  $\epsilon$ -多聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)和单/二甘油酯的组合对牛奶中大肠埃希氏菌 0157:H7 的作用;以  $\log_{10}$  菌落形成单位(CFU)/ml。(ND:无数据)

[0092]

时间(天数)	制剂		
	空白	0.1% (w/v) $\epsilon$ -PL+0.2% (w/v) C8-单/二甘油酯	0.1% (w/v) $\epsilon$ -PL+0.05% (w/v) C10-单/二甘油酯
0	2.85	2.6	2.7
1	3.48	1.3	1.85
2	6.12	1.0	2.71
3	7.42	1.0	3.8
6	ND	1.0	5.89

[0093] 与鸡排相反,没有观察到初始的杀伤。 $\epsilon$ -多聚赖氨酸和C8-单/二甘油酯(甘油单/二辛酸酯)的组合尤其有效。

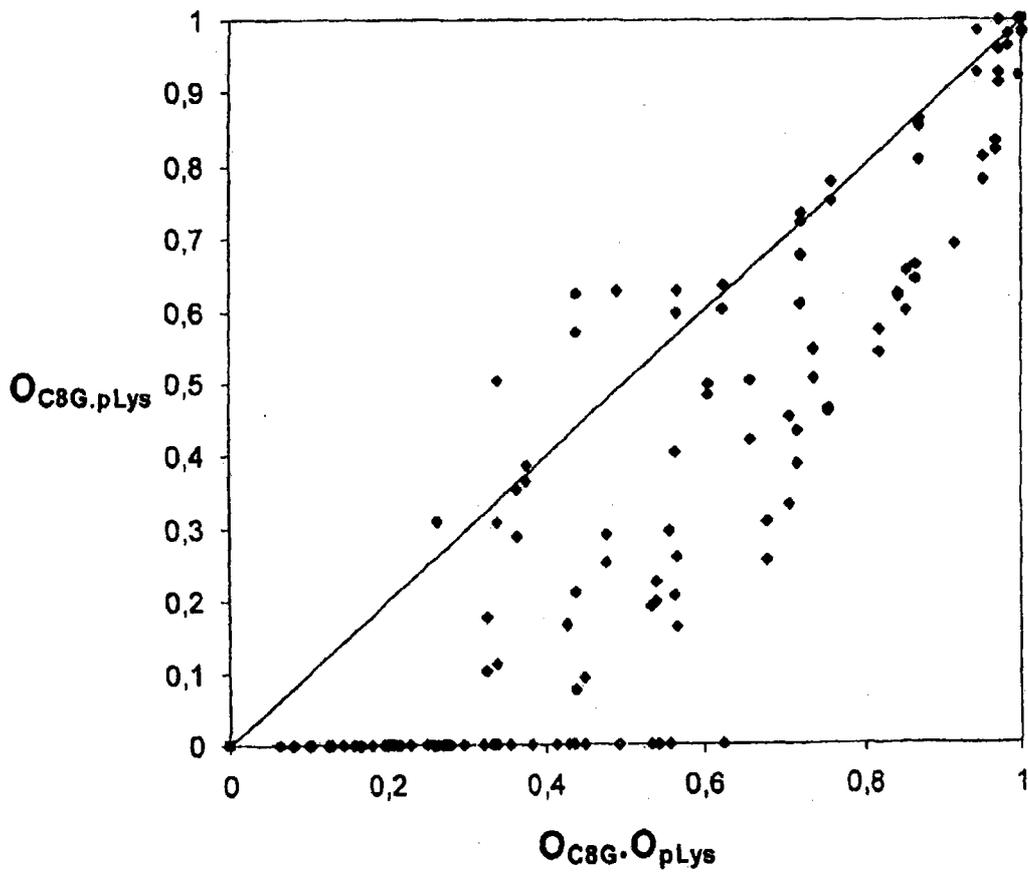


图 1

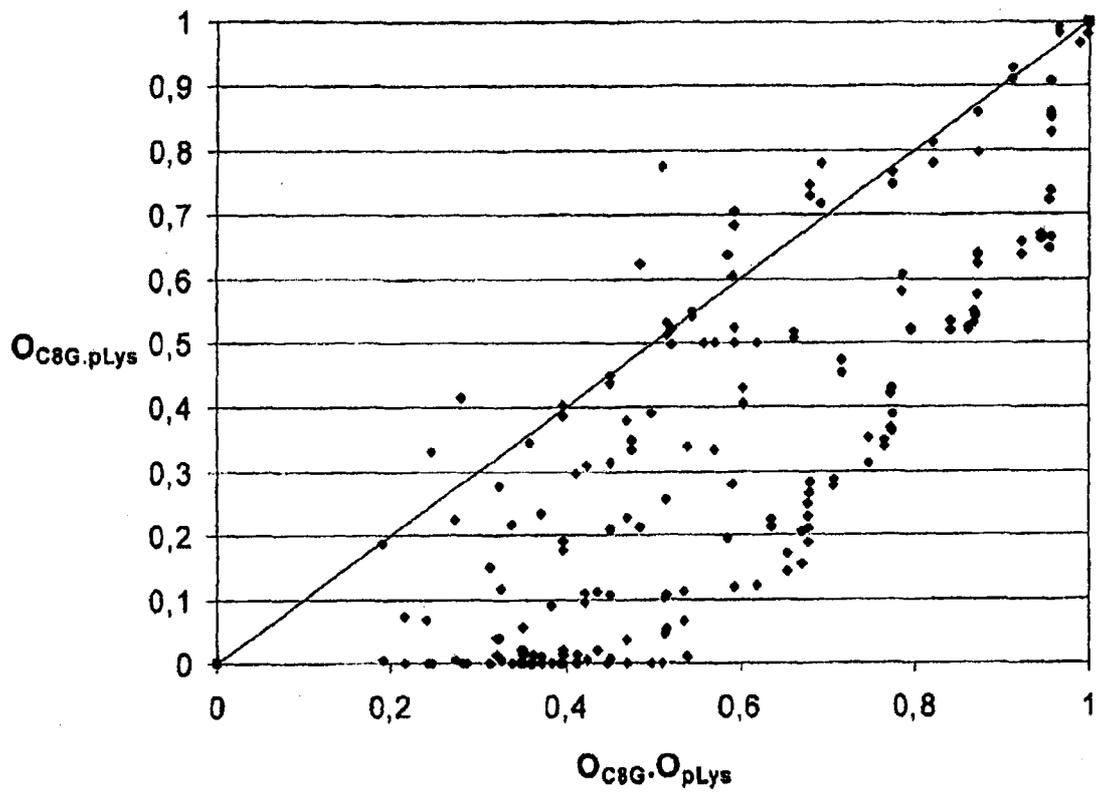


图 2

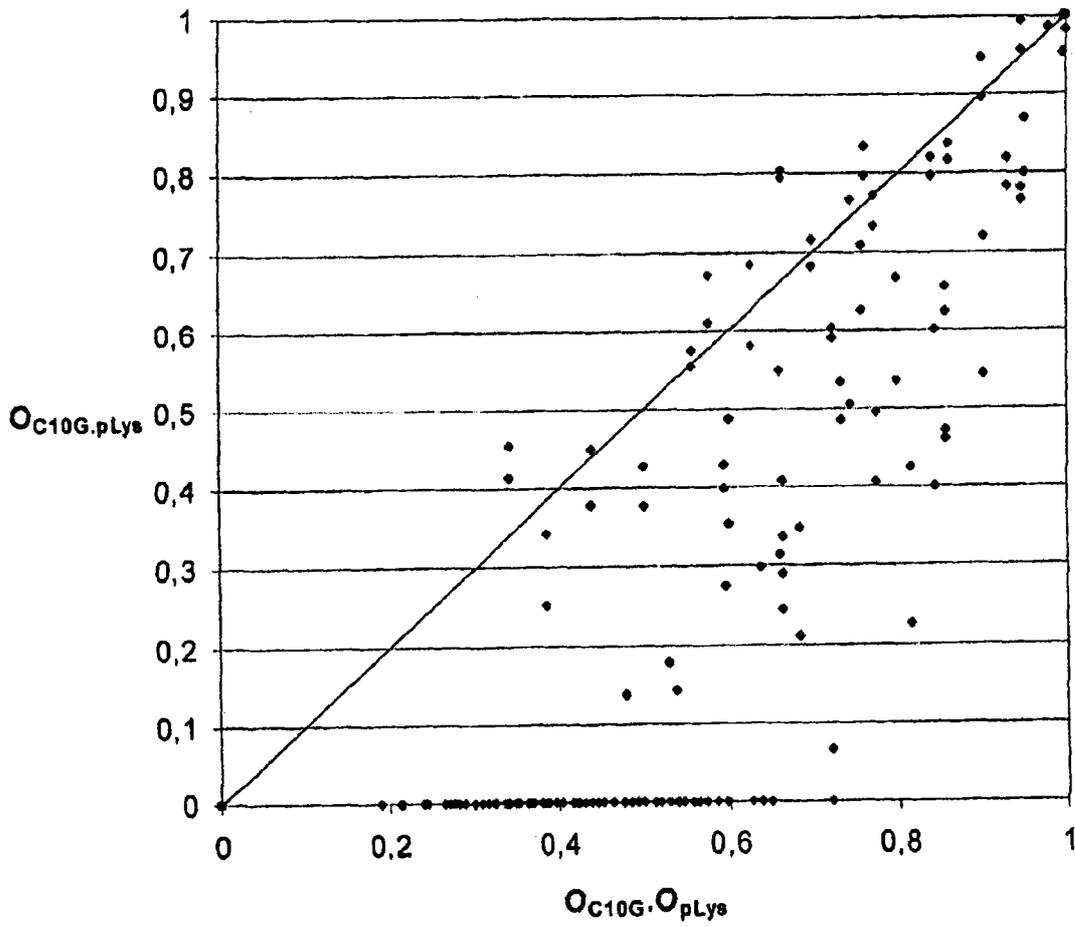


图 3

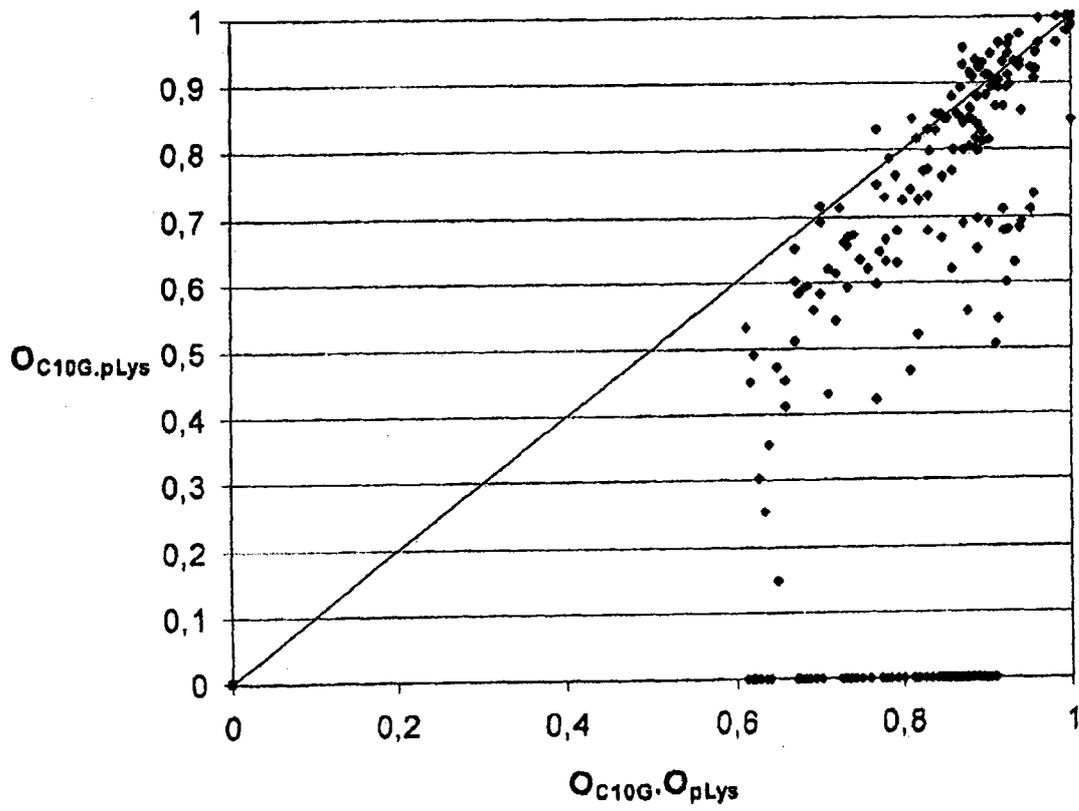


图 4