

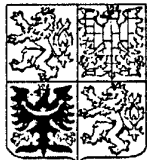
# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

# 277 995

ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **6897-89**

(22) Přihlášeno: 06. 12. 89

(40) Zveřejněno: 16. 07. 91

(47) Uděleno: 26. 05. 93

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14. 07. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>:

**A 61 K 37/02**

**C 07 D 223/00**

// **A 23 L 3/3463**

(73) Majitel patentu:

Applied Microbiology, Inc., Brooklyn, New  
York, US;

(72) Původce vynálezu:

Blackburn Peter, New York, New York, US;  
Polak June, Brooklyn, New York, US;  
Gusik Sara-Ann, New York, New York, US;  
Rubino Stephen D., Harrison, New York, US;

(54) Název vynálezu:

**Bakteriocinový přípravek**

(57) Anotace:

Bakteriocinové přípravky obsahující lanthionin obsahují bakteriociny a nebaktericidní činidla. Jejich podstata spočívá v tom, že obsahují bakteriocin s obsahem lanthioninu vybraný ze skupiny zahrnující nisin, subtilin, epidermin, cinnamycin, duramycin, ancovenin a Pep 5 a chelatační činidlo vybrané ze skupiny zahrnující alkylamidintetraacetáty, EGTA a citrát a/nebo povrchově aktivní látku. Baktericid s rozšířeným obsahem obsahuje navíc vhodný nosič.

CZ 277 995 B6

Vynález je pokračováním přihlášky vynálezu č. 209861, podané 22. června 1988. Nisin je polypeptid mající antibakteriální vlastnosti a je přímo produkován různými kmeny bakterií *Streptococcus lactis*. Je znám jako konzervační činidlo potravin inhibující vnější růst spor určitých grampozitivních Bacilli.

Ačkoliv se někdy chybně a naprosto nepřesně pokládá za antibiotikum, je nisin přesněji klasifikován jako bakteriocin, tj. látka bílkovinné povahy produkovaná bakteriemi, mající antibakteriální účinnost pouze na druhy blízce příbuzné bakteriím, které jej produkují. Nisin je přirozeně se vyskytující konzervační látka, která byla v nízkých koncentracích nalezena v mléku a sýrech a předpokládá se, že je zcela netoxická a nealergizující člověka.

Nově byl nisin uznán FDA jako neškodný pro použití ve formě přímé potravinové přísady u pasterovaných sýrových pomazánek, pasterovaných pomazánek z tavených sýrů a pasterovaných pozmazánek z tavených sýrů s ovocem, zeleninou nebo masem. Navíc vzhledem k tomu, že se jedná o polypeptid, jsou každá rezidua nisinu v potravinách rychle strávena.

Souhrn vlastností nisinu je uveden v práci Hursta A., *Advances in Applied Microbiology* 27:85-123 (1981). Tato publikace uvádí obecné znalosti o nisinu. Nisin produkováný bakteriemi *Streptococcus lactis* je obchodně dostupný jako ne čistý přípravek Nisapin<sup>TM</sup> vyráběný firmou Aplin & Barrett Ltd., Dorset, Anglie a lze jej získat izolací přirozeně se vyskytujícího nisinu z kultur *Streptococcus lactis* a koncentrováním nisinu známými postupy. Uváděny jsou i způsoby výroby nisinu za použití jiných druhů *Streptococcus*. Viz Gonzales a spol., US patent č. 4716115, vydaný 29. 12. 1987. Také by bylo možné vyrábět nisin technologií rekombinace DNA.

Nisin byl úspěšně použit jako konzervační prostředek u mlékárenských produktů jako jsou tavené sýry, smetana a mléko. Použití nisinu u tavených sýrů bylo předmětem patentů v poslední době. Viz US patent č. 4584199 a 4597972. Použití nisinu k inhibici růstu určitých grampozitivních bakterií je velmi dobře dokumentováno. Nicméně zcela úspěšnému a přijatelnému použití nisinu jako konzervačního prostředku potravin dosud bránil názor, že nisin je neúčinný vůči gramnegativním a mnoha grampozitivním bakteriím. Gramnegativní bakterie jsou téměř vždy přítomny ve spojení s grampozitivními bakteriemi a jsou hlavním zdrojem kontaminace a znehodnocení potravin. Viz Taylor, US patent č. 4584199, vydaný 22. dubna 1986, a Taylor US patent č. 4597972 vydaný 1. července 1986; Tsai a Sandine, "Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from *Streptococcus Lactis* 7962 to *Leuconostoc Dextranicum* 181, *Applied and Environmental Microbiology*, únor 1987, str. 352; "A Natural Preservative", *Food Engineering Int'l*, květen 1987, str. 37 až 38; "Focus on Nisin", *Food Manufacture*, březen 1987, str. 63.

Na rozdíl od předchozích poznatků bylo nyní zjištěno, že přípravky obsahující nisin v kombinaci s různými nebaktericidními prostředky mají zvýšenou baktericidní účinnost vůči

gramnegativním bakteriím také jako zvýšenou účinnost vůči širšímu spektru grampozitivních bakterií než je nisin samotný. Zvýšená baktericidní účinnost vůči grampozitivním bakteriím se projevuje v širším rozmezí pH než se dříve uvádělo. Vynález poskytuje bakteriocinové kompozice nisinu nebo jiných lanthionin obsahujících bakteriocinů v kombinaci s různými nebaktericidními látkami, například chelatotvornými činidly nebo povrchově aktivními látkami. Vynález dále poskytuje tyto kompozice (přípravky) rozpuštěné nebo suspendované ve vhodném nosiči se zvýšeným širokým spektrem baktericidní účinnosti.

Konkrétně bylo zjištěno, že roztok obsahující asi 0,1 µg/ml až 300 µg/ml za přítomnosti asi 0,1 mM až 20 mM chelatotvorného činidla, například EDTA, prakticky eliminuje růst gramnegativních bakterií jako jsou *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetescomitans* a *Klebsiella pneumoniae* a je účinnější vůči grampozitivním bakteriím jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* a *Coryneform bacteria* než nisin samotný. Ačkoliv zvýšení účinnosti nisinu přítomností chelatotvorného činidla bylo závislé na koncentraci činidla koncentrace EDTA převyšující 20 mM inhibovaly proti očekávané baktericidní účinnosti nisinu. Nicméně za přítomnosti bílkovinného nosiče a polyvalentních polymerů jako je sérový albumin, kolagen, kasein a keratin, byla inhibice nisinu vyššími koncentracemi významně snížena, a tím se rozšiřuje užitečný rozsah zvýšení účinnosti nisinu pomocí EDTA.

Bylo také zjištěno, že roztok obsahující asi 0,1 µg/ml až 300 µg/ml nisinu a asi 0,1 mM až 20 mM chelatotvorného činidla vykazuje další zvýšení účinnosti nisinu vůči gramnegativním a grampozitivním bakteriím za přítomnosti asi 0,01 % až 1,0 % povrchově aktivní látky. Navíc bylo zjištěno, že při přítomnosti samotné povrchově aktivní látky má nisin zvýšenou účinnost vůči grampozitivním bakteriím.

V předloženém vynálezu vhodná chelatotvorná činidla zahrnují, ale nejsou pouze na ně omezena, EDTA, CaEDTA, CaNa<sub>2</sub>EDTA a další alkyldiamintetraacetáty, EGTA a citrát.

Povrchově aktivní látky, používané jako čisticí prostředky, vhodné pro kombinaci s nisinem s nebo bez EDTA zahrnují, ale nejsou omezovány jen na ně, neionogenní tenzidy Tweeny, Tritony a glyceridy, ionogenní tenzidy jako jsou mastné kyseliny, kvartérní sloučeniny, aniontové tenzidy jako je dodecylsulfát sodný a amfoterní tenzidy jako kokamidopropylbetain a emulgátory.

Protože grampozitivní a gramnegativní bakterie se nalézají téměř vždy v potravinách společně, účinnost nisinových přípravků na gramnegativní bakterie jako jsou *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetescomitans* a další gramnegativní patogeny a grampozitivní bakterie bude mít velké uplatnění. Tyto baktericidy jsou zvláště vhodné pro omezení a prevenci kontaminace surovin připravovaných potravin a nápojů bakteriálními patogeny a dalšími znehodnocujícími mikrobiálními organismy. Možné použití se týká ošetření masa, zejména drůbeže,

vajec, sýrů a ryb a ošetření obalů potravin a manipulačního zařízení. Další užití mají jako konzervační prostředek potravin, u tavených sýrů, smetany, mléka, mlékárenských výrobků, při zpracování drůbeže, ryb, masa, zeleniny a u mlékárenského a potravinářského zařízení. Použití nisinových přípravků není omezováno jen na použití u potravin a může být vhodné v každé situaci, při které je nutné nebo žádoucí eliminovat gramnegativní a grampozitivní bakterie.

Přípravky mohou být rozpuštěny ve vhodném nosiči, například ve vodném rozpouštědle nebo puftru nebo mohou být suspendovány v jakémkoli vhodném kapalném, koloidním nebo polymerním základě za vzniku baktericidů. Přípravky nebo baktericidy mohou být zpracovány do mastí nebo obkladů pro lékařské použití jako je léčení infekcí, ošetření ran nebo chirurgických implantací, jako širokospektrý dezinfekční prostředek ve formě orálních nebo kožních výplachů, pro dezinfekční kartáče, utěrky nebo roztoky. Baktericidy mohou být užity pro čištění lékařských nástrojů, předoperačních chirurgických kartáčů a podobně. Baktericidy jsou zvláště vhodné v těch případech, kdy je požadována dezinfekce prostředí, ale kdy je nutné chemické germicidy vyloučit z důvodů rizika koroze nebo toxických reziduí.

Na rozdíl od účinnosti širokospektrých germicidních přípravků, která je u většiny z nich ovlivňována přítomností komplexních organických látek, jsou přípravky podle vynálezu účinné jako baktericidy i za přítomnosti organických látek, jako je mléko nebo sérum.

O nisinu bylo známo, že optimálně inhibuje růst několika blízce příbuzných grampozitivních druhů bakterií, zvláště grampozitivních bakterií tvořících spory při pH 5,0. Baktericidní účinnost nisinu v roztoku s chelatotvorným činidlem byla neobyčejně rychlá a značně zvýšená směrem k širokému spektru grampozitivních bakterií při hodnotách pH vyšších než 5,0 a navíc se objevila účinnost na gramnegativní bakterie jak v kyselém, tak v alkalickém prostředí výhodně při rozmezí pH 5,0 až 8,0. Tato nečekaně rychlá a širokospektrá baktericidní účinnost nisinu aktivovaného chelatotvorným činidlem jej činí použitelným mezi jinými aplikacemi jako dezinfekčního prostředku.

Nisin náleží do třídy peptidových bakteriocinů, obsahujících lanthionin. Do této třídy jsou také zahrnuty subtilin, epidermin, cinnamycin, duramycin, ancovenin a Pep 5. Každý z těchto peptidových bakteriocinů je produkován jiným mikroorganismem. Nicméně bylo zjištěno, že subtilin získaný z určitých kultur *Bacillus subtilis* a epidermin získaný z určitých kultur *Staphylococcus epidermis* mají molekulární struktury velmi podobné nisinu (viz Hurst, str. 85 až 86 a Schnell a spol., *Nature*, 333:276 až 278). Proto lze předpokládat, že díky podobnosti molekul budou i další peptidové bakteriociny obsahující lanthionin v kombinaci s chelatotvornými činidly a naionogenními tenzidy eliminovat kontaminace gramnegativními a grampozitivními mikroby.

Využití účinnosti nisinu a dalších lanthionin obsahujících peptidových bakteriocinů jako baktericidních prostředků vůči

gramnegativním bakteriím je překvapující, protože dosavadní poznatky tuto účinnosti nepřipouštěly. Také zvýšená účinnost nisinu za přítomnosti EDTA vůči grampozitivním bakteriím při hodnotách pH větších než 5,0 je neočekávaná, protože se předpokládalo, že optimální účinnost nisinu je při pH 5,0. Mimoto objev těchto účinků nisinu, lanthionin obsahujících peptidových bakteriocinů a jejich využití jako baktericidů vyplňuje dlouhotrvající potřebu přijatelného, přírodního, netoxického prostředku vůči širokému spektru bakterií v oboru konzervace potravin.

Ke znázornění výhodného a nečekaně rychlého účinku směsi obsahující nisin, EDTA a/nebo různé povrchově aktivní látky, byla s uvedenými baktericidy provedena řada pokusů. Tyto pokusy jsou jen ilustrativní a předložený vynález jimi není nijak omezován. Lze předpokládat, že další bakteriociny obsahující lanthionin (peptidové bakteriociny) mohou účinně nahradit nisin a také jiná chelatotvorná činidla mohou nahradit EDTA.

Všechny testy v následujících příkladech byly provedeny při 37 °C. Zvýšená širokospektrá baktericidní účinnost byla určována stanovením procentuálního počtu přežívajících bakterií po ošetření baktericidním prostředkem. Obecně, bylo inkubováno  $10^7$  buněk sledovaného druhu v ml suspenze s novým baktericidním prostředkem po určitou dobu a potom byly bakterie izolovány odstředěním po dobu 2 minut. Ze shluku bakterií byl potom baktericid vymyt pomocí pufru, označovaného zde jako Phagův pufr (50 mM Tris-HCl pufr pH 7,8, 1 mM  $MgSO_4$ , 4 mM  $CaCl_2$ , 0,1 M NaCl a 0,1 % želatiny), bakterie byly potom resuspendovány a postupně ředěny do Phagova pufru a 100 ml bakterií bylo potom vneseno na živnou agarovou plotnu. Počet přežívajících bakterií byl stanoven na základě počtu vzniklých mikrobiálních kolonií (CFU) po inkubaci po dobu 24 až 48 hodin při 37 °C. Účinný baktericid podle předloženého vynálezu je ten, kde přežívá méně než 0,1 % bakterií z původního počtu životaschopných bakterií.

#### Příklad 1

Účinnost nisinu a chelatotvorného činidla vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Jak je zřejmé z tabulky 1, k doložení účinku baktericidu obsahujícího samotný nisin a nisin s chelatotvorným činidlem EDTA, byly provedeny dva testy ve 20 mM Tris při pH 8,0 a při 37 °C. Kontrolní test (≠) byl proveden bez EDTA a znázorňuje účinek samotného nisinu na gramnegativní bakterie *S. typhimurium*. Zvýšené koncentrace nisinu vykazují určité zvýšení účinnosti, ale i účinnost vyšších koncentrací za nepřítomnosti EDTA při dávce 100 µg/ml nisinu přežití 1,6 %, je zcela nedostatečné při použití jako konzervačního prostředku potravin. Hodnoty baktericidní účinnosti získané pro nisin s EDTA jsou významné.

Tabulka 1

Test #	původní počet ži- vých bakterií	EDTA /mM/	nisin / $\mu$ g/ml/					
			0	10	30	50	100	300
			% přežití <i>S. typhimurium</i> po 3 hodinách					
1	$3,0 \times 10^6$	0	100	51,3	-	7,0	1,6	-
2	$5,7 \times 10^6$	20	2,5	-	$10^{-3}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

Test # (tabulka 1) provedený za použití nisinu s 20 mM EDTA, znázorňuje překvapující účinnost směsi nisinu při eliminaci sledovaných gramnegativních bakterií.

Z tabulky 1 je zřejmé, že v testu # při koncentraci 20 mM EDTA a 30  $\mu$ g/ml nisinu má tento baktericid významnou baktericidní účinnost na *S. typhimurium*, zatímco při koncentraci nisinu 100  $\mu$ g/ml a vyšší, baktericidní směs nisinu a EDTA bakterie prakticky eliminuje (procento přežití menší než  $10^{-4}$  znamená, že při stanovení nebyly zjištěny žádné přežívající bakterie). Kombinace EDTA a nisinu tedy vykazuje synergickou účinnost více než tisícinásobnou vzhledem k samotnému nisinu.

## Příklad 2

Účinnost nisinu, chelatotvorného činidla a povrchově aktivní látky vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Ke stanovení účinku baktericidu obsahujícího nisin a jak EDTA, tak povrchově aktivní látku Triton X-100 na *S. typhimurium* byly provedeny čtyři pokusy (tabulka 2) ve 20 mM Tris, pH 8,0 při 37 °C. Kontrolní pokus (#) byl stejný jako kontrolní pokus v příkladu 1 (tabulka 1).

Tabulka 2

Test #	počáteční obsah ži- vých bakterií	EDTA (mM)	Triton X-100 (%)	0	10	30	50	100	300
1	$3,0 \times 10^6$	0	0	100	51,3	-	7,0	1,6	-
2	$3,0 \times 10^6$	0	1,0	37,4	93,0	-	64,0	47,0	-
3	$5,7 \times 10^6$	20	0,1	0,03	-	$< 10^{-3}$	-	-	-
4	$5,7 \times 10^6$	20	1,0	$< 10^{-4}$	-	$< 10^{-4}$	-	$< 10^{-4}$	$< 10^{-4}$

% *S. typhimurium* přežívajících po 3 hodinách

Pokus #2 (tabulka 2) byl proveden za použití nisinu a 1% Tritonu X-100 ale bez EDTA. Přítomnost detergentu samotného inhibuje účinnost nisinu na gramnegativní bakterie a nisin je neúčinný. Podle pokusů #3 a #4, které představují provedení podle vynálezu, je přítomnost 20 mM EDTA v kombinaci s Tritonem X-100 baktericidem, významně zvyšující baktericidní účinnost nisinu na *S. typhimurium*. Ve skutečnosti kombinace Tritonu X-100 s EDTA, ale bez nisinu byla účinná, ačkoliv v menší míře než za přítomnosti nisinu. Kombinace nisinu, použité pro pokusy #3 a #4 (tabulka 2) byly velmi účinné, nejúčinnější byla koncentrace Tritonu X-100 1 % (test #4, tabulka 2).

Přítomnost neionogenní povrchově aktivní látky, Tritonu X-100 v kombinaci s EDTA zvyšuje účinnost nisinu na gramnegativní bakterie, a to ještě více, než vykazuje baktericid obsahující pouze nisin a samotnou EDTA (příklad 1).

### Příklad 3

Účinnost nisinu, chelatotvorného činidla a povrchově aktivní látky vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Tabulka 3 dokládá zvýšenou aktivitu baktericidu obsahujícího nisin, 20 mM chelatotvorného činidla EDTA a neionogenní povrchově aktivní látky Tweenu 20 vůči *S. typhimurium* ve 20 mM Tris, pH 8,0 při 37 °C. Kombinace nisinu a EDTA s (1 %) Tweenu 20 je účinnější než kombinace s Tritonem X-100 (příklad 2).

Tabulka 3

Test #	původní počet ži- vých bakte- rií	EDTA /mM/	Tween 20 /%/	0	nisin / $\mu$ g/ml/			
					10	50	100	300
					% <i>S. typhimurium</i> přežívá- jících po 3 hodinách			
1	$3,0 \times 10^6$	0	0	100	51,3	-	7,0	1,6 -
2	$5,7 \times 10^6$	20	0	2,5	-	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$ $<10^{-4}$
3	$4,3 \times 10^6$	20	1,0	$10^{-2}$	-	$<10^{-4}$	-	$<10^{-4}$ $<10^{-4}$

### Příklad 4

Účinnost nisinu, chelatotvorného činidla a povrchově aktivní látky vůči gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*)

Aktivita baktericidu obsahujícího nisin a EDTA vůči gramnegativní bakterii *E. coli*, která byla stanovena, je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4

Test #	původní počet ži- vých bakte- rií	Triton EDTA /mM/	X-100 / % /	nisin / $\mu$ g/ml/				
				0	30	100	300	
					% E.coli přežívajících po 2 hodinách			
1	$1,0 \times 10^7$	0	0	100	27	25	8,5	
2	$1,0 \times 10^7$	20	0	14,5	0,86	0,01	0,001	
3	$1,0 \times 10^7$	0	1,0	100	-	30	-	
4	$1,0 \times 10^7$	20	1,0	1,2	0,8	0,05	$<10^{-4}$	

Testy s a bez EDTA byly provedeny ve 20 mM Tris pufru o pH 8,0 při 37 °C, s počátečním počtem živých mikroorganismů  $1 \times 10^7$  buněk E. coli/ml. Funkce baktericidu byla měřena jako procentuální počet bakterií přežívajících po 2 hodinách.

V testu #1 (kontrolní, tabulka 4) bez EDTA, vykazuje nisin málo významnou účinnost při eliminaci E. coli. V testu (tabulka 4), kde je přítomno 20 mM EDTA, vykazuje podstatnou aktivitu vůči bakteriím E. coli. Aktivita se zvyšuje se stoupající koncentrací nisinu. Kombinace nisinu s EDTA jako baktericid prokazuje tisíckrát vyšší synergické zvýšení vůči E. coli. V testech #3 a #4 (tabulka 4), je možno pozorovat, že Triton X-100 nemá významnou baktericidní účinnost vůči E. coli. Triton X-100 působí tak, že inhibuje účinnost nisinu vůči gramnegativním bakteriím jak bylo zjištěno u S. typhimurium (tabulka 2). Nicméně obecně zvýšení aktivity nisinu pomocí EDTA podstatně mění inhibiční účinky Tritonu X-100, jak je zřejmé z tabulek 2 a 4.

Tak bylo zjištěno, že baktericid obsahující nisin a chelatační činidlo jako je EDTA je účinným konzervačním činidlem potravin vůči různým typům gramnegativních bakterií i za přítomnosti povrchově aktivních látek.

#### Příklad 5

Účinnost nisinu a chelatačního činidla vůči gramnegativním bakteriím (*Klebsiella pneumoniae*)

Účinek baktericidu obsahujícího nisin a EDTA a samotný nisin vůči gramnegativním bakteriím *K. pneumoniae* je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5

Test ##	původní		EDTA /mM/	Triton X-100 /%/	nisin $\mu\text{g/ml}$			
	počet ži- vých bakte-				0	30	100	300
					% přežívajících po 2 hodinách			
1	$10^7$	0	0		100	-	50	38
2	$10^7$	20	0		22	0,5	1,1	0,085

Dva testy, jeden s a jeden bez EDTA (kontrolní), byly provedeny ve 20 mM Tris pufru, pH 8,0 při 37 °C s počátečním počtem živých bakterií *K. pneumoniae*  $10^7$  buněk/ml. Účinek byl hodnocen jako procenta bakterií přežívajících po dvou hodinách.

V testu #1 (kontrola, tabulka 5) bez EDTA, vykazuje nisin málo významnou baktericidní účinnost vůči *K. pneumoniae*. V testu #2 (tabulka 5) za přítomnosti 20 mM EDTA, vykazuje baktericid podstatnou účinnost vůči *K. pneumoniae*. Účinnost se zvyšuje se stoupající koncentrací nisinu.

## Příklad 6

Účinnost nisinu vůči gramnegativním bakteriím (*Salmonella typhimurium*) je závislá na koncentraci chelatačního činidla.

Údaje z tabulky 6 ukazují, že zvýšení aktivity nisinu vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*) je závislé na koncentraci EDTA v 50 mM acetátu sodném, pH 5,0 nebo v 20 mM Tris, pH 8,0 při 37 °C.

Tabulka 6

Test	pH	počáteční obsah živých bakterií	nisin /ug/ml	EDTA (mM)			% přežívajících po 2 hodinách		
				0	2,0	10		50	100
1	5,0	$3 \times 10^6$	0	100	-	38,7	15,2	3,5	-
2	5,0	$3 \times 10^6$	100	0,6	$10^{-4}$	$10^{-4}$	0,004	0,02	-
3	8,0	$5 \times 10^6$	0	100	-	8,7	14	11,4	45
4	8,0	$5 \times 10^6$	100	4	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	0,6	30

V testech #1 a #3 (kontrola, tabulka 6) za použití koncentrací EDTA až do 100 mM bez nisinu vykazuje málo významnou aktivitu vůči *S. typhimurium* buď při pH 5,0 (#1), nebo pH (#3) 8,0. V testech #2 a #4 (tabulka 6), kde bylo přítomno 100 µg/ml nisinu v kombinaci s EDTA, vykazuje baktericid významnou aktivitu vůči *S. typhimurium*. Účinnost baktericidů byla podobná v kyselé oblasti pH (5,0) i v zásadité oblasti pH (8,0), i když je známo, že aktivita samotného nisinu vůči gram pozitivním bakteriím je optimální při pH 5,0.

Zvýšení účinnosti nisinu přítomností EDTA bylo závislé na koncentraci EDTA a bylo optimální v rozmezí 0,2 mM až 10 mM při pH hodnotách 5,0 a 8,0. S překvapením bylo zjištěno, že koncentrace vyšší než 10 mM EDTA, se zvyšování účinnosti nisinu pomocí EDTA snižuje, snížení účinnosti je výrazně vyšší při pH 8,0 než při pH 5,0.

#### Příklad 7

Nisin a chelatační činidlo vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Zvýšení účinnosti nisinu za přítomnosti EDTA vůči gramnegativním bakteriím za přítomnosti biologické tkáně je demonstrováno se *S. typhimurium* na kuřecím svalu, výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7

Test #	pH	nisin /ug/ml	0	0,1	0,3	1	3	EDTA (mM)				100
								10	20	30	100	
% přežívajících <sup>a</sup> po 2 hodinách												
1	5,0	0	11,8	-	-	-	-	6,4	-	-	-	-
2	5,0	300	0,1	0,2	0,05	0,01	0,003	0,016	0,03	0,02	0,07	
3	8,0	0	100	-	-	-	-	5,2	-	-	-	
4	8,0	300	7,5	0,1	0,02	0,02	0,09	0,47	0,5	-	2,2	
5	8,0	300 <sup>b</sup>	0,02	0,09	0,0002	$10^{-4}$	0,0004	0,003	-	0,03	0,09	

<sup>a</sup> nezadržené buňky

<sup>b</sup> obsah 1 % hovězího sérového albuminu (BSA)

Inkubace byla provedena buď v 50 mM octanu sodném, pH 5,0, nebo 20 mM Tris, pH 8,0 při 37 °C.

Kostky kuřecího svalu byly před použitím čištěny chlornanem sodným a povidonjodiem. Pro inokulaci tkáně byly kostky kuřecího svalu ponořeny do suspenze  $10^8$  buněk/ml *S. typhimurium* ve 20 mM Tris HCl, pH 8,0. Přebytek vlhkosti byl odstraněn z ponořených kostek setřepáním. Vzorky kuřecí tkáně byly ponořeny do pufru obsahujícího přípravek s nisinem, dostatečného k překrytí tkáně a inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin, potom byla tkáň přemístěna do Phagova pufru použitého v množství dostatečném k překrytí tkáně. Bakterie zbylé v testovaném roztoku byly odděleny odstředěním, promytím Phagovým pufrem a spojeny s bakteriemi vymytými z tkáně Phagovým pufrem. Spojené vzorky (označeno "nezadržené" buňky) byly sériově zředěny a 100  $\mu$ l podíly byly použity pro stanovení přežívajících bakterií.

V testech  $\neq 1$  a  $\neq 3$  (tabulka 7), za nepřítomnosti nisinu buď při pH 5, nebo pH 8, EDTA samotná nemá významný vliv na přežívající *S. typhimurium*. V testech  $\neq 2$  a  $\neq 4$  (tabulka 7), za přítomnosti 300  $\mu$ g/ml nisinu vykazovaly baktericidy významnou aktivitou vůči *S. typhimurium* na kuřecích svalech při obou hodnotách pH 5,0 a pH 8,0.

Zvýšení aktivity nisinu přítomností EDTA bylo závislé na její koncentraci, optimální koncentrace byla v rozmezí 0,3 mM až 10 mM EDTA při obou hodnotách pH 5,0 a 8,0. Při koncentraci vyšší než 10 mM EDTA při pH 8,0 byla aktivace nisinu EDTA snížena. Nicméně jak je zřejmé z testu  $\neq 5$  (tabulka 7), za přítomnosti 1,0 % hovězího sérového albuminu při hodnotě pH 8,0, účinek nisinu vůči *S. typhimurium* na kuřecím svalu je vyjádřena v závislosti na koncentracích EDTA až do 100 mM.

Baktericidy obsahující nisin a nízké koncentrace chelatačního činidla, jako je EDTA v rozmezí 0,1 mM až 20 mM, mohou být zvláště účinné pro eliminaci nebo prevenci kontaminace potravin gramnegativními bakteriemi.

#### Příklad 8

Titrace nisinové aktivity vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Při optimální koncentraci chelatačního činidla byla účinnost baktericidů v Tris pufru vůči gramnegativním bakteriím doložena jako podstatná, jak je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8

Test	počáteční obsah živých bakterií	nisin /ug/ml									
		EDTA	BSA	0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100
1	$6 \times 10^6$	0	0	100	-	-	-	-	51,3	-	1,6
2	$6 \times 10^6$	1,0	1,0	63	0,7	0,08	0,01	0,05	0,01	$< 10^{-4}$	-

% přežívajících po 2 hodinách

V testu #2 (tabulka 8) je zřejmé, že malé množství nisinu, jako je 0,3 µg/ml, s 1,0 mM EDTA ve 20 mM Tris při pH 8,0 za přítomnosti 1 % hovězího sérového albuminu (BSA), významně snižuje počet přežívajících *S. typhimurium*. Baktericid je aktivní vůči gramnegativním bakteriím, jako je nisin samotný vůči grampozitivním *Streptococci*.

#### Příklad 9

Titrace nisinové aktivity vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Při optimální koncentraci chelatačního činidla byla účinnost baktericidu vůči gramnegativním bakteriím za přítomnosti biologické tkáně demonstrována se *S. typhimurium* na kuřecím svalu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9

Test	pH	původní počet živých bakterií	EDTA /mM/	BSA /%/	nisin µg/ml				
					0	10	100	200	300
					% přežívajících po 2 hodinách				
1	8,0	$3 \times 10^7$	0	0	100	-	-	-	-
2	8,0	$3 \times 10^7$	1,0	1,0	27	0,26	0,008	0,007	0,006

Kostky kuřecího svalu byly očištěny chlornanem sodným a pevidonjodidem před použitím. Pro inokulaci tkáně, byly kostky kuřecího svalu ponořeny do suspenze obsahující  $10^8$  buněk/ml *S. typhimurium* ve 20 mM Tris HCl, pH 8,0. Přebytková vlhkost byla z ponořených kostek setřepána. Tkáň byla umístěna do pufro obsahujícího nisinový přípravek. Pufr byl použit v množství dostatečném pro překrytí tkáně a byla provedena inkubace po dobu 2 hodin při 37 °C, potom byla tkáň převedena do Phagova pufro použitého v množství postačujícím k překrytí tkáně. Bakterie zbylé v testovaném roztoku byly odděleny odstředěním, promyty Phagovým pufrem a spojeny s bakteriemi vymytými ze tkáně Phagovým pufrem. Spojené vzorky (označené jako "nezadržené" buňky) byly sériově zředěny a 100 µl podíly byly použity pro stanovení přežívajících bakterií.

#### Příklad 10

Účinnost nisinu, EDTA a methylparabenu vůči gramnegativním bakteriím (*S. typhimurium*)

Baktericid obsahující nisin a EDTA ve spojení se známým prostředkem pro ochranu potravin, methylparabenem, byl doložen jako výjimečně účinný vůči gramnegativním bakteriím, jak je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10

Test #	původní počet ži- vých bak- terií	nisin g/ml	EDTA <sup>b</sup> /mM/	% methylparabenu		
				0	0,1	1,0
				% přežívajících <sup>c</sup> po 2 hodinách		
1	3x10 <sup>6</sup>	0	10	11,8	1,0	10 <sup>-4</sup>
2	3x10 <sup>6</sup>	300	10	0,03	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-4</sup>

Kostky kuřecího svalu byly před použitím čištěny chlornanem sodným a povidonjodidem. Pro inokulaci tkáně byly kostky kuřecího svalu ponořeny do suspenze obsahující 10<sup>8</sup> buněk/ml *S. typhimurium* v 50 mM pufru octanu sodného, pH 5,0. Přebytek vlhkosti byl odstraněn z ponořených kostek setřepáním. Tkáň byla umístěna do pufru obsahujícího nisinové přípravky v množství dostatečném k překrytí tkáně a inkubována 2 hodiny při 37 °C. Potom byla tkáň převedena do Phagova pufru použitého v množství dostatečném k překrytí tkáně. Bakterie zbylé v roztoku byly odděleny odstředěním, promyty Phagovým pufrům a spojeny s bakteriemi vymytými ze tkáně Phagovým pufrům. Spojené vzorky (označené jako "nezadržené" buňky) byly sériově ředěny a 100 µl podíly byly použity pro stanovení přežívajících bakterií.

V testu #1 (tabulka 10) vykazoval methylparaben za přítomnosti 10 mM EDTA účinnost vůči *S. typhimurium* pouze při koncentraci 1,0 %. V testu #2 (tabulka 10), za přítomnosti 300 µg/ml nisinu, byla účinnost methylparabenu a nisinu vůči *S. typhimurium* podstatně zlepšena.

Přípravky obsahující nisin a EDTA významně zlepšují využití methylparabenu při ochraně potravin. Dále baktericidy mohou podstatně snížit koncentraci nebo odstranit potřebu běžně používaných, ale i méně žádoucích prostředků pro ochranu potravin jako je methylparaben.

#### Příklad 11

Účinnost nisinu a chelatačního činidla vůči gram pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*)

Aktivace nisinu chelatačním činidlem je závislá na pH. Data v tabulce 11 ukazují, že při pH 5,0 je nisin o něco baktericidně účinnější vůči *S. aureus* než nisin při pH 8,0. Při pH 5,0 EDTA nezvyšuje účinnost nisinu vůči *S. aureus* a při koncentraci EDTA vyšší než 10 mM, EDTA inhibuje baktericidní aktivitu nisinu. Nicméně je baktericidní účinnost nisinu aktivovaného EDTA při pH 8,0 výrazně větší než baktericidní účinnost samotného nisinu nebo při kombinaci s EDTA při pH 5,0.

Tabulka 11

Účinek pH na vliv EDTA na baktericidní účinnost nisinu vůči *Staphylococcus aureus*

Nisin pH	µg/ml	EDTA mM							
		0	0,1	0,3	1,0	10	30	100	
% přežívajících po 2 h <sup>a</sup>									
8,0	0	100	-	100	81	100	100	100	-
8,0	3,0	7,4	0,03	0,01	0,2	0,4	3	56	-
5,0	0	100	-	-	-	100	-	-	-
5,0	3,0	0,6	1,0	1,3	1,4	1,8	-	34	80

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $8,0 \times 10^6$  cfu/ml  
Inkubace byla prováděna v 50 mM pufru octanu sodného, pH 5,0 nebo ve 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 při 37 °C.

Baktericidní účinnost nisinu samotného je uváděna (viz Hurst) jako nejvyšší při pH 5,0 nebo nižším a údaje v tabulce 11 to potvrzují. Na základě těchto znalostí se předpokládalo, že baktericidní účinnost nisinu s EDTA vůči *S. aureus* také bude vyšší při nižším pH. Jak je však zřejmé z tabulky 11 a proti očekávání (viz tabulka 6), EDTA nezvyšovala účinnost nisinu vůči grampozitivním bakteriím při pH 5,0. Inhibice účinnosti nisinu za vyšších koncentrací EDTA byla ještě pozorována při pH 5,0. Aktivace nisinu chelatačním činidlem tak závisí nejen na rozmezí koncentrací chelatačního činidla, ale vzhledem ke grampozitivním bakteriím, je závislá na pH s tím, že výhodné je pH v rozmezí vyšším než 5,0.

## Příklad 12

Účinnost nisinu a chelatačního činidla vůči grampozitivním bakteriím

Účinky EDTA na baktericidní účinnost nisinu při pH 8,0 nejsou omezeny jen na *S. aureus*, důležitý lidský pathoge, ale jsou také pozorovány ve *Streptococcus mutans*, působící zubní kaz (tabulka 12A), *Listeria monocytogenes*, patogen potravin (tabulka 12B) a se směsnou populací podpažních Coryneformních bakterií, které působí tělesný pach (tabulka 12C).

Tabulka 12A

Účinek EDTA na baktericidní účinnost nisinu vůči *Streptococcus mutans*

nisin pH	μg/ml	EDTA mM								
		0	0,01	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100
% úřeživajících po 2 h <sup>a</sup>										
8,0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-
8,0	0,1	4,3	1,8	0,04	0,02	1	25	100	100	100

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $6,0 \times 10^6$  cfu/ml  
 Inkubace byly provedeny ve 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 při 37 °C.

Tabulka 12B

Účinek EDTA na baktericidní účinnost vůči *Listeria monocytogenes*

nisin pH	μg/ml	EDTA mM								
		0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100	
% přeživajících po 2 h <sup>a</sup>										
8,0	0	100	-	-	84	-	-	-	-	-
8,0	3,0	0,71	0,04	0,04	0,02	0,1	0,64	10	14	

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $6,0 \times 10^6$  cfu/ml  
 Inkubace byly provedeny ve 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 při 37 °C.

Tabulka 12C

Účinek EDTA na baktericidní účinnost nisinu vůči Coryneformním bakteriím

nisin g/ml								
		0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	
% přeživajících po 2 h <sup>a</sup>								
8,0	0	100	-	4,6	3,6	8		36
8,0	3	0,22	0,03	0,0009	0,1	-		0,16

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $1,0 \times 10^6$  cfu/ml  
 Inkubace byly provedeny ve 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 při 37 °C.

## Příklad 13

Rychlá baktericidní účinnost nisinu aktivovaného chelatačním činidlem

Baktericid obsahující nisin s EDTA je rychle baktericidně účinný jak je doloženo údaji uvedenými v tabulce 13A. Suspenze  $10^7$  buněk (ml gram pozitivních bakterií *S. mutans* byly inkubovány ve 20 mM Tris pufri, pH 7,3 při 37 °C při různých koncentracích nisinu aktivovaného 1 mM EDTA. Suspenze byly inkubovány po různou dobu v rozmezí od 0,5 do 60 minut s baktericidy. Baktericidní účinnost baktericidů byla hodnocena stanovením procent přežívajících bakterií. Při působení EDTA je malé množství nisinu, jako 10 µg/ml, v těchto přípravcích schopno snížit obsah bakterií řádově 6krát během 1 minuty.

Rychlá baktericidní účinnost je také předpokladem pro účinnou dezinfekci. Přípravky mají předpoklad být účinnými baktericidy zejména jak zde bylo doloženo jako složku ústní vody, výplachů, zubní pasty nebo jiných prostředků pro ošetřování zubů vůči skvrnám tvořených *S. mutans*.

Účinnost nisinu zvýšená přítomností EDTA vůči gramnegativním bakteriím po 2 až 3 hodinách byla doložena v příkladech 1 a 7. Rychlá baktericidní účinnost nisinu zvýšená přítomností EDTA byla také pozorována vůči gramnegativním bakteriím a je doložena údaji v tabulce 13B.

## Tabulka 13A

Kinetika baktericidní účinnosti nisinu zvýšená přítomností EDTA vůči *Streptococcus mutans*

inkubační doba /minuty/	nisin µg/ml s 1,0 mM EDTA					
	0	1	3	10	30	100
	% přežívajících <sup>a</sup>					
0,5	-	-	-	-	-	<10 <sup>-4</sup>
1	-	-	-	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup>
3	100	0,5	0,002	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup>	-
15	-	0,03	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup>	-	-
30	-	-	<10 <sup>-4</sup>	-	-	-
60	100	0,003	-	-	-	-

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $1,0 \times 10^7$  cfu/ml  
Inkubace byly provedeny ve 20 mM Tris, pH 7,0 při 37 °C.

Tabulka 13B

Rychlá baktericidní účinnost nisinu zvýšené EDTA vůči *Escherichia coli*

mM EDTA	nisin $\mu\text{g/ml}$						
	0	0,3	1,0	3	10	30	100
% přežívajících po 1 min <sup>a</sup>							
1,0	100	100	56	0,37	0,013	0,015	0,008

<sup>a</sup>počáteční počet živých bakterií:  $1,0 \times 10^7$  cfu/ml  
 Inkubace byly provedeny ve 20 mM Tris, pH 7,0 při 37 °C.

## Příklad 14

Vliv divalentních kationtů na zvyšování aktivity nisinu vlivem EDTA

Divalentní kationty se vážou s EDTA a jinými chelatačními činidly a bylo by možno předpokládat, že budou neutralizovat aktivaci nisinu EDTA. Nicméně jak je zřejmé z tabulky 14, baktericidní účinnost nisinu vůči *S. mutans* je zvýšena při 1 mM EDTA i za přítomnosti 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iontu; pouze koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontu vyšší než 3 mM inhibuje aktivaci nisinu EDTA. Toto je zvláště důležité v ústních vodách, kde jsou koncentrace vápníkových iontů důležité.

Tabulka 14

Rychlá baktericidní účinnost nisinu aktivovaná EDTA za přítomnosti divalentního kationdu vůči *Streptococcus mutans*

nisin	$\text{CaCl}_2$ mM					
	0	0,1	0,3	1,0	3	10
% přežívajících po 1 min <sup>a</sup>						
0	100					
3	2,9					
30 <sup>E</sup>	0,0042	0,0042	0,052			18
30 <sup>E</sup>	0,0019		0,003	0,0004	0,06	6,8
100 <sup>E</sup>	$<10^{-4}$		$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	0,0001	1,5

<sup>E</sup> 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

<sup>a</sup> počáteční obsah živých bakterií  $1,0 \times 10^2$  cfu/ml  
 Inkubace byly provedeny v 10% fetálním telecím séru při 37 °C.

## Příklad 15

Účinnost nisinu a povrchově aktivní látky vůči grampozitivním bakteriím

Baktericidní účinnost nisinu může být také významně zvýšena jestliže se spojí se samotnou povrchově aktivní látkou. To je nejlépe ilustrováno při limitní koncentraci nisinu (0,2 µg/ml) jak je uvedeno v tabulce 15A. Při koncentraci až do 0,1 %, má potravinářská povrchově aktivní látka monolaurin málo významnou baktericidní aktivitu vůči *Streptococcus agalactiae* v komplexním prostředí mléka. Nisin při koncentracích až do 0,2 µg/ml, podobně nevykazuje v mléce významnou baktericidní aktivitu. Nicméně kombinace těchto dvou činidel, 0,1 % monolaurinu a nisinu 0,2 g/ml je extrémně účinná vůči *S. agalactiae*. Tento baktericid je více než 100násobně účinnější, kdyby byl očekáván aditivní účinek a 10 000krát účinnější než u jednotlivých sloučenin. Jestliže je aplikace nisinu omezena jeho dostupnou účinností, je baktericid obsahující nisin a povrchově aktivní látku možno výhodně použít.

Příklad, kde je aplikace nisinu omezena jeho využitelnou účinností je ilustrován údaji v tabulce 15B. Ačkoliv nisin a zejména baktericid obsahující nisin a EDTA, je baktericidně účinný vůči *L. monocytogenes*, údaje v tabulce 15B dokládají, že v komplexním médiu podobném mléku je využitelná účinnost nisinu vůči tomuto organismu omezena. Nicméně baktericid obsahující nisin s glyceridem, monooleátem je v mléku účinný vůči potravinářským patogenům i když monooleát samotný není vůči tomuto organismu baktericidně účinný.

## Tabulka 15A

Baktericidní účinnost nisinu vůči *Streptococcus agalactiae* v mléku při 37 °C  
(akvitace nisinu monolaurinem)

nisin /µg/ml	0	monolaurin 0,01	0,1
% přežívajících po 2 h <sup>a</sup>			
0	100	100	4,5
0,02	100	100	0,2
0,2	2,2	0,05	0,0008

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $6,0 \times 10^7$  cfu/ml  
Inkubace byly provedeny v mléku při 37 °C.

Tabulka 15B

Baktericidní účinnost nisinu vůči *Listeria monocytogenes* v mléce při 37 °C  
(aktivace nisinu monooleátem)

nisin μg/ml	0	% monooleátu 0,1	1,0
% přežívajících po 2 h <sup>a</sup>			
0	100	67	63
100	0,56	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>počáteční obsah živých bakterií:  $5,0 \times 10^7$  cfu/ml  
Inkubace byly provedeny v mléce při 37 °C.

#### P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bakteriocinový přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje bakteriocin, obsahující lanthionin, vybraný ze skupiny zahrnující nisin, subtilin, epidermin, cinnamycin, duramycin, ancovenin a Pep 5 a chelatační činidlo vybrané ze skupiny zahrnující alkylamidintetraacetáty, EGTA a citrát a/nebo povrchově aktivní látku.
2. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že chelatační činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující alkylamidintetraacetáty, CaEDTA, Na<sub>2</sub>CaEDTA, EGTA a citrát.
3. Přípravek podle bodu 2, vyznačující se tím, že alkylamidintetraacetátem je EDTA a bakteriocinem je nisin.
4. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že povrchově aktivní látka je vybrána ze skupiny zahrnující Tritony, Tweeny, glyceridy, mastné kyseliny, emulgátory, kvarterní sloučeniny, amfoterní a anionogenní povrchově aktivní látky.
5. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že dále obsahuje prostředek pro ochranu potravin.
6. Baktericid s rozšířeným rozsahem, vyznačující se tím, že obsahuje nosič, bakteriocin obsahující lanthionin a chelatační činidlo a/nebo povrchově aktivní látku.

7. Baktericid s rozšířeným rozsahem podle bodu 6, vyznačující se tím, že bakteriocin obsahující lantionin je vybrán ze skupiny zahrnující nisin, subtilin, epidermin, cinnamycin, duramycin, ancovenin a Pep 5 a chelatační činidlo vybrané ze skupiny zahrnující alkylamidintetracetáty, EGTA a citrát a tyto látky jsou přítomny v takovém množství, že baktericid má zvýšenou účinnost vůči nejméně jedné z bakterií vybraných ze skupiny zahrnující *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, Coryneform bakterie, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bactericides gingivalis* a *Actinobacillus actinomycescomitans*.
8. Baktericid podle bodu 6, vyznačující se tím, že alkylamidintetraacetátem je EDTA.
9. Baktericid podle bodu 6, vyznačující se tím, že povrchově aktivní látka je vybrána ze skupiny zahrnující Tritony, Tweeny, glyceridy, mastné kyseliny, kvartérní sloučeniny, emulgátory, amfoterní a anionogenní povrchově aktivní látky a je přítomna v množství dostatečném k tomu, že baktericid má zvýšenou účinnost vůči nejméně jedné bakterii ze skupiny zahrnující gramnegativní a grampozitivní bakterie.
10. Baktericid podle bodu 7, vyznačující se tím, že koncentrace nisinu je mezi asi 0,1  $\mu\text{g/ml}$  a 300,0  $\mu\text{g/ml}$  a koncentrace chelatačního činidla je mezi asi 0,1 mM a 20 mM.
11. Baktericid podle bodu 9, vyznačující se tím, že koncentrace povrchově aktivní látky je mezi asi 0,01 % a 1,0 %.

---

Konec dokumentu

---