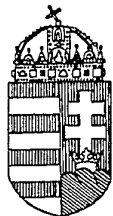


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 980 B

(21) A bejelentés száma: 3794/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 06. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
209 861 1988. 06. 22. US
317 626 1989. 03. 01. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 89/02625
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/12399

(51) Int. Cl.⁵

A 23 C 19/11

A 61 K 37/02

(40) A közzététel napja: 1990. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 03. 30. SZKV 92/03

(72) Feltalálók:

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)

(73) Szabadalmas:

Public Health Research Institute of the City of
New York, New York, New York (US)

(54) **Hatóanyagként lantionin-tartalmú baktericidet tartalmazó szerek
és eljárás az előállításukra**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya fertőtlenítőszer és élelmiszer-ipari tartósítószer, amely 0,1–300 µg/ml lantionintartalmú baktericid hatóanyagot és emellett 0,1–20 mmól/l kelátképző szert és/vagy 0,1–1,0 tömeg% felületaktív anyagot, és adott esetben adalékanyagot tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá eljárás fokozott és szé-

les hatású baktericid készítmény előállítására, amely során 0,1–300 µg/ml lantionin tartalmú baktericidet 0,1–20 mmól/l kelátképzővel és/vagy 0,1–1,0 tömeg% felületaktív anyaggal és adott esetben további adalékanyaggal kevernek és a keveréket gyógyszerkészítménnyé alakítják.

HU 204 980 B

A találmány tárgya hatóanyagként lantionin tartalmú baktericid tartalmú szer. A találmány tárgya közelebbről a fenti hatóanyagot tartalmazó fertőtlenítőszer és élelmiszer-ipari tartósítószer, valamint eljárás a fenti hatóanyagot tartalmazó fokozott és széles hatású baktericid készítmény előállítására.

A niszin – másképpen nizin – mikroba elleni hatással rendelkező polipeptid, amelyet a természetben különböző baktériumtörzsek, így a *Streptococcus lactis* termel. Ismert élelmiszer-tartósítóként történő felhasználása, mivel gátolja különböző gram-pozitív baktériumok spóráinak fejlődését.

Bár gyakran hibásan és pontatlanul antibiotikumnak tartják, a niszin inkább a baktericidok közé sorolható be, vagyis olyan fehérjeszerű és baktériumok által termelt anyag, amely antibakteriális hatással rendelkezik az öt termelő baktériummal közeli rokonságba tartozó fajokkal szemben. A niszin a természetben is előforduló tartósítószer, amely alacsony koncentrációban megtalálható a tejben és a sajtban, és a feltevések szerint az emberrel szemben sem toxikus, sem allergén hatást nem vált ki.

Felismerték, hogy a niszin blokkolja az FDA-t és közvetlen élelmiszer-adalékként alkalmazható pasztórizált eljárással előállított sajtokban, valamint gyümölcsöt, zöldségeket vagy húsféléket tartalmazó hasonló készítményekben. Mivel a niszin egy polipeptid, bármilyen maradáka gyorsan emészthető.

A niszin tulajdonságainak összefoglalását A. Hurst adja meg (*Advances in Applied Microbiology*, 27, 85–123, 1981). Ez a közlemény leírja azt, ami a niszinről általánosan ismert. A *Streptococcus lactis* által termelt niszin Nisaplin néven (Aplin és Barrett Ltd., Dorset, Anglia) a kereskedelmi forgalomban kapható. Ezt a nem teljesen tiszta készítményt a természetes formában *Streptococcus lactis* tenyésztésben előforduló niszin izolálásával és szokásos módon történő töményítésével állítják elő. Ismert a niszin más *Streptococcus* törzsekkel történő előállítása is (4 716 115 számú USA-beli szabadalmi leírás). Feltételezhető, hogy a niszin rekombináns DNS technológiával is előállítható.

A niszin előnyösen alkalmazható konzerválószerként különböző tejipari termékekben, így tejben, krémekben és sajtban. A sajtban történő alkalmazását több szabadalmi leírás ismerteti (4 584 199 és 4 597 972 számú USA-beli szabadalmi leírás). Tejipari tartósítószerként alkalmazható száraz niszin-készítmény előállítását ismerteti a 738 655 számú nagy-britanniai szabadalmi leírás. A niszin alkalmazása gátolja néhány gram-pozitív baktérium fejlődését. Élelmiszer-tartósítóként történő széleskörű elterjedését gátolja azonban az a feltevés, hogy a niszin hatástalan gram-negatív és több gram-pozitív baktérium ellen. A gram-negatív baktériumok szinte minden esetben gram-pozitív baktériumokkal együtt fordulnak elő és élelmiszerek romlásának és elszennyeződésének fő okát képezik (4 584 199, 4 597 972 számú USA-beli szabadalmi leírás, Tsai és Sandine: *Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from Streptococcus Lactis 7962 to Leuconostoc Dextranicum 181*, *Applied and Environmen-*

tal Microbiology, 352, 1987, „A Natural Preservative” *Food Engineering Int'l*, 37–38, 1987, „Focus on Nisin”, *Food Manufacture*, 63, 1987).

Azt találtuk, hogy a technika állásával ellentétben a niszin és más nem baktericid szer kombinációját tartalmazó készítmények lényegesen jobb hatással rendelkeznek számos gram-negatív baktérium, valamint számos gram-pozitív baktérium ellen, mint a niszin önmagában. A gram-pozitív baktériumokkal szemben jelentkező fokozott baktericid hatás lényegesen szélesebb pH-tartományban érvényes, mint korábban hitték.

A találmány tárgya tehát hatóanyagként niszin vagy más lantionint tartalmazó baktericid és egyéb, nem baktericid szer, például kelátképző szer vagy felületaktív anyag kombinációját tartalmazó fertőtlenítőszer és élelmiszer-ipari tartósítószer. A találmány szerinti készítmények a fenti kombinációt előnyösen megfelelő hordozóban oldva vagy szuszpendálva tartalmazzák.

A fenti kombinációt tartalmazó készítmények baktericidként is alkalmazhatók, ezért a találmány kiterjed az ilyen gyógyszerkészítmények előállítására is.

Előnyös összetétel például mintegy 0,1–300 µg/ml niszin és 0,1–20 mmól/l kelátképző szer, például EDTA kombinációja, amely előnyösen gátolja gram-negatív baktériumok, így *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetecomitans*, és *Klebsiella pneumoniae*, valamint több gram-pozitív baktérium, így *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* és *Corynebacterium* növekedését. A kombináció hatása nagyobb, mint a niszin hatása önmagában. A niszin aktivitásának növelése a kelátképző koncentrációjától függ, a feltevésekkel ellentétben 20 mmól/l értéknél nagyobb EDTA-koncentráció már csökkenti a niszin baktericid hatását. A fehérjeszerű hordozóanyag, így kolivalens polimer, például szérum albumin, kollagén, zselatin, kazein vagy keratin jelenléte jelentős mértékben csökkenti a 20 mmól/l feletti koncentrációjú EDTA hatáscsökkentő hatását, ami kiterjeszti az EDTA-val feljavított niszin felhasználási tartományát.

A mintegy 0,1–300 µg/ml niszin és mintegy 0,1–20 mmól/l kelátképző szer kombinációját tartalmazó készítmény gram-negatív és gram-pozitív baktériumok elleni hatását tovább növeli mintegy 0,01–1,0 tömeg% felületaktív anyag jelenléte. Ha adalékanyagként önmagában felületaktív anyagot alkalmazunk, akkor a niszin gram-pozitív baktériumok elleni hatását növelhetjük.

A találmány értelmében kelátképző szerként előnyösen alkalmazható például etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), valamint sói, így kalcium-etilén-diamin-tetraecetsav (Ca EDTA), és kalcium-dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav (CaNa₂ EDTA) és más alkil-diamin-tetraecetátok, továbbá dietilén-triamin-pentaecetsav (DTPA), ciklohexán-diamin-tetraecetsav (CDTA), etilén-glikol-bisz (2-amino-etil-éter)-tetraecetsav (EGTA) és különböző citrátok. A niszinnel az EDTA-val együtt vagy anélkül kombinálható felületaktív anyagként előnyösen alkalmazhatók a nemionos felületaktív

anyagok, így a Tween, a Triton, valamint gliceridek, továbbá ionos felületaktív anyagok, például zsírsavak, kvaterner vegyületek, valamint anionos felületaktív anyagok, például nátrium-dodecil-szulfát és amfoter felületaktív anyagok, így kokamido-propil-betain (CAB) és különböző emulgeálószer.

Mivel a gram-pozitív és a gram-negatív baktériumok szinte minden alkalommal együtt fordulnak elő az élelmiszerekben, a niszin készítmények gram-negatív baktériumok, így *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetescomitans* és más gram-negatív baktériumok és gram-pozitív baktériumok elleni hatása nagy jelentőségű. A baktericidek előnyösen alkalmazhatók különböző nyersanyagok, készételek és italok baktériumos és mikrobiológiai szennyező organizmusok által kiváltott romlásának szabályozására és megelőzésére. Az élelmiszer-ipari alkalmazás magában foglalja különböző húsfélék, elsősorban szárnyasok, tojás, sajt és hal kezelését, valamint az élelmiszer-csomagoló és -gyártó berendezések kezelését. Alkalmazhatók továbbá élelmiszer-tartósítóként is, így sajtjűlékben, krémekben, tejben, tejipari termékekben, tisztított baromfiban, halkészítményekben, húskészítményekben, zöltségekben és ezek előállításához alkalmazott berendezésekben. A niszint tartalmazó készítmények alkalmazása azonban nem korlátozódik az élelmiszeriparra, és a találmány szerinti készítmények felhasználhatók minden olyan esetben, ahol gram-negatív és gram-pozitív baktériumokat kell leküzdeni.

A találmány szerinti készítményt előnyösen oldat, például vizes vagy pufferolt oldat, megfelelő folyékony hordozóanyagban felvett szuszpenzió, valamint kolloid vagy polimer mátrix formájában alkalmazzuk. A készítmények alkalmazhatók továbbá a gyógyszerészetben szokásos kenőcs, fertőzött területek bevonására alkalmas készítmény, sebkötő anyag, sebészeti implantátum, valamint a bőr kezelésére és fertőtlenítésére alkalmas készítmény formájában. A készítmény felhasználható gyógyászati eszközök, valamint operáció előtt sebészeti eszközök tisztítására is. A találmány szerinti készítmények előnyösen alkalmazhatók minden olyan fertőtlenítési célból, ahol a kémiai hatóanyagok alkalmazása a korrózió vagy más toxikus hatás miatt kizárt.

Az ismert széles spektrumú hatóanyagokkal ellentétben, amelyek általában összetett szerves anyagok, a találmány szerinti készítmények különböző szerves anyagok, így tej vagy szérum jelenlétében is hatékonyak.

A niszinről ismert, hogy előnyösen gátolja a közeli rokonságban lévő gram-pozitív baktériumok, elsősorban a pH 5,0 értéken életképes spórákkal rendelkező gram-pozitív baktériumok növekedését. A niszin és egy kelátképző szer kombinációját tartalmazó oldat baktericid hatása meglepően gyors és igen erős számos gram-pozitív és pH 5,0 érték feletti életképes baktérium, valamint mind savas, mind bázikus pH-n, előnyösen pH 5,0–8,0 között életképes gram-negatív bak-

térium ellen. A kelátképzővel aktivált niszinnek ez a váratlanul gyors és erős baktericid hatása lehetővé teszi, hogy a találmány szerinti készítményeket egyebek mellett fertőtlenítésre is alkalmazzuk.

A niszin a lantionint tartalmazó peptidszerű baktericidek osztályába tartozik. Ugyanebbe az osztályba tartozik továbbá a szubtilin, epidermin, cinnamicin, duramicin, ankovenin és pep 5. Ezeket a baktericid peptideket is különböző mikroorganizmusok termelik. Ezek közül a *Bacillus subtilis* kultúrából előállított szubtilin és a *Staphylococcus epidermidis* kultúrából előállított epidermin molekulá szerkezete nagyon hasonló a niszin molekulá szerkezetéhez (Hurst idézett műve, 85–86. oldal, Schnell és munkatársai: *Nature*, 333, 276–278). A molekulá szerkezetben mutatott hasonlóság alapján feltehető, hogy a niszinhez hasonlóan más lantionin tartalmú peptidek is fokozott baktericid hatással rendelkeznek gram-negatív és gram-pozitív baktériumok ellen, ha azokat kelátképző szerekkel és nemionos felületaktív anyagokkal kombinálva alkalmazzuk.

A niszin és más lantionint tartalmazó peptidek gram-negatív baktériumok elleni hatása meglepő, mivel a technika állása általában ellenkező értelmű kitanítást ad. A niszin és EDTA kombinációjának pH 5,0 érték feletti előnyös hatása gram-pozitív baktériumok ellen meglepő, mivel korábban feltételezték, hogy a niszin optimális hatását pH 5,0 értéken fejt ki. Emellett a niszin és más lantionint tartalmazó peptidek baktericid hatásának felfedezése régi igényt elégít ki az élelmiszeripar területén, mivel korábban nem volt ismert olyan természetes, nemtoxikus szer, amely előnyösen alkalmazható a baktériumok széles köre ellen.

A niszint, EDTA-t és/vagy valamely felületaktív anyagot tartalmazó készítmények gram-negatív és gram-pozitív baktériumok elleni előnyös hatását egy sor példával mutatjuk be. Ezek a példák közelebbről szemléltetik a találmány tárgyát anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna. Megjegyezzük, hogy a niszin helyett más, lantionint tartalmazó és baktericid hatással rendelkező peptidek, illetve az EDTA helyett más kelátképző szerek is alkalmazhatók.

A példákban ismertetett vizsgálatokat 37 °C hőmérsékleten végeztük. A fokozott baktericid hatást úgy állapítottuk meg, hogy kezelés után mértük a baktériumok százalékos pusztulását. A vizsgálatok során általában úgy jártunk el, hogy a vizsgált baktériumsuszpenzióját, amelynek koncentrációja 10⁷ sejt/ml, a megfelelő ideig a vizsgált hatóanyag-készítménnyel inkubáltuk, majd a baktériumsejteket 2 percen keresztül végzett centrifugálással összegyűjtöttük. A kapott baktériumsejteket Phage-pufferrel (50 mmól/l Trisz-HCl puffer, pH 7,8, 1 mmól/l magnézium-szulfát, 4 mmól/l kalcium-klorid, 0,1 mól/l nátrium-klorid és 0,1 tömeg% zselatin) baktericid-mentesre mossuk, majd a Phage-pufferben ismét szuszpendáljuk és hígítjuk. 100 ml baktériumsuszpenziót agarlemezekre viszünk. 37 °C hőmérsékleten 24–48 órán keresztül végzett inkubálás után a telepkező egység (colony forming unit, CFU) meghatározásával vizsgáljuk a baktériumok életképességét. A találmány szerinti készí-

mény az eredeti életképesbaktérium-számra vonatkoztatva legfeljebb 0,1%-os túlélést enged meg.

1. példa

Niszint és kelátképző szert tartalmazó kombináció hatása gram-negatív baktérium (*S. typhimurium*) ellen

Mint az 1. táblázatból látható, két vizsgálatot végeztünk 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten. Hatóanyagként niszin és EDTA kombináció-

ját alkalmazzuk. Az 1. számú kísérletben EDTA nélküli kontrollt vizsgálunk, amely a niszin önmagában kifejtett gram-negatív baktérium elleni hatását mutatja. A niszin koncentrációjának növekedése kis mértékben növeli a hatékonyságot, de EDTA távollétében a különösen magas koncentrációértékeknél, például 100 µg/ml niszinnél is 1,6%-os túlélés észlelhető, amely élelmiszeri célokra alkalmatlan. Jelentős baktericid hatás mérhető azonban niszin és EDTA kombinációjának alkalmazásával.

1. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 3 órás kezelés után

Kísérlet száma	Kezdeti életképesbaktériumszám	EDTA mmól/l	Niszin (µl/ml)					
			0	10	30	50	100	300
1.	$3,0 \times 10^6$	0	100,0	51,3	–	7,0	1,6	–
2.	$5,7 \times 10^6$	20	2,5	–	10^3	–	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

A 2. számú kísérlet, ahol niszin és 20 mmól/l EDTA kombinációját alkalmaztuk, igazolja a találmány szerinti készítmény gram-negatív baktérium elleni megfelelő hatását.

Az 1. táblázatból látható, hogy a 2. számú kísérletben 20 mmól/l EDTA és 30 µg/ml alkalmazásával a találmány szerinti kombináció jelentős baktericid hatással rendelkezik *S. typhimurium* ellen, míg a 100 µg/ml és ennél nagyobb koncentrációjú niszint tartalmazó készítmények esetében a találmány szerinti kombináció gyakorlatilag teljes egészében elpusztítja a baktériumot (a vizsgálatban kapott 10^{-4} alatti százalékos túlélés gyakorlatilag azt jelenti, hogy élő baktériumot nem találtunk.) A vizsgálatok szerint tehát a ni-

szin és EDTA kombináció hatása több, mint 1000-szeres, a niszin önmagában mérhető hatásához képest.

2. példa

Niszint, kelátképző szert és felületaktív anyagot tartalmazó kombináció hatása gram-negatív baktérium (*S. typhimurium*) ellen

Négy kísérletet (2. táblázat) végeztünk az *S. typhimurium* elleni hatás megállapításához, amikor is niszin, EDTA és Triton X-100 felületaktív anyag kombinációjának 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 8,0) felvett készítményét alkalmaztuk 37 °C hőmérsékleten. A kontroll (1. számú kísérlet) azonos az 1. példában alkalmazott kontrollal.

2. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 3 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2	3	4
Kezdeti életképesbaktérium-sz.	$3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$
EDTA (mmól/l)	0	0	20	20
Triton X-100 (tömeg%)	0	1,0	0,1	1,0
Niszin				
0 µg/ml	100,0	37,4	0,03	$<10^{-4}$
10 µg/ml	51,3	93,0	–	–
30 µg/ml	–	–	$<10^{-3}$	$<10^{-4}$
50 µg/ml	7,0	64,0	–	–
100 µg/ml	1,6	47,0	–	$<10^{-4}$
300 µg/ml	–	–	–	$<10^{-4}$

A 2. számú kísérletben niszint és 1,0 tömeg% Triton X-100 felületaktív anyagot alkalmaztunk EDTA nélkül. A felületaktív anyag önmagában gátolja a niszin gram-negatív baktériumok elleni hatását, és ezért a niszin hatástalan. A 3. és 4. számú kísérletben azonban, amelyek a találmány szerinti készítményt mutatják be,

a 20 mmól/l EDTA Triton X-100 felületaktív anyaggal kombinálva jelentős mértékben növeli a niszin *S. typhimurium* elleni baktericid hatását. Valójában a Triton X-100 és az EDTA kombinációja is hatásos niszin nélkül, de jóval kisebb arányban, mint niszin jelenlétében.

Bár a 3. és 4. számú kísérletben alkalmazott mindkét kombináció igen hatásos, a legerősebb hatást az 1,0 tömeg% Triton X-100 felületaktív anyagot tartalmazó 4. számú kísérletben kapjuk.

A nemionos felületaktív anyag, a Triton X-100 jelenléte EDTA-val kombinálva növeli a niszin gram-negatív baktériumok elleni hatását, és ez a növekedés nagyobb, mint niszin és EDTA kombinációja esetén.

3. példa

Niszin, kelátképző szer és felületaktív anyag kombinációjának hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen

Niszin, 20 mmól/l EDTA és nemionos felületaktív anyagként Tween 20 kombinációját 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten vizsgáltuk S. typhimurium ellen. Mint a 3. táblázatból látható, a Triton X-100 felületaktív anyaghoz (2. példa) hasonlóan niszin és EDTA kombinációja 1 tömeg% Tween 20 jelenlétében a leghatékonyabb.

3. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 3 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2	3
Kezdeti életképesbaktérium-sz.	$3,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
EDTA (mmól/l)	0	20	20
Tween 20 (tömeg%)	0	0	1,0
Niszin:			
0 µg/ml	100,0	2,5	$<10^{-2}$
10 µg/ml	51,3	–	–
30 µg/ml	–	$<10^{-3}$	$<10^{-4}$
50 µg/ml	7,0	–	–
100 µg/ml	1,6	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
300 µg/ml	–	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

4. példa

Niszin, kelátképző szer és felületaktív anyag kombinációjának hatása gram-negatív baktérium (Escherichia coli) ellen

Niszin és EDTA kombinációjának E. coli gram-negatív baktérium elleni baktericid hatását a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat

E. coli túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2	3	4
Kezdeti életképesbaktérium-sz.	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
EDTA (mmól/l)	0	20	0	20
Triton X-100 (tömeg%)	0	0	1,0	1,0

Kísérlet száma	1	2	3	4
Niszin:				
0 µg/ml	100,0	14,5	100	1,2
30 µg/ml	27,0	0,86	–	0,8
100 µg/ml	25,0	0,01	30	0,05
300 µg/ml	8,5	0,001	–	$<10^{-4}$

A vizsgálatokat EDTA jelenlétében és távollétében 20 mmól/l trisz-puffer oldatban (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten végeztük ml-enként 1×10^7 életképes E. coli sejt kezelésével. A baktericid hatást 2 órás kezelés után mérhető százalékos túlélés alapján határoztuk meg.

Az 1. számú kísérletben (kontroll, lásd a 4. táblázat) EDTA távollétében a niszin csak igen alacsony hatást mutat E. coli ellen. A 2. számú kísérletben, ahol 20 mmól/l EDTA-t alkalmaztunk, a baktericid készítmény lényeges hatást mutat E. coli baktériumok ellen. A hatékonyság a niszin koncentrációjának növelésével együtt növekszik. A niszin és EDTA kombinációja 1000-szeres hatásnövekedést mutat E. coli esetében. A 3. és 4. számú kísérletben bemutattuk, hogy a Triton X-100 nem rendelkezik jelentős baktericid hatással E. colival szemben. A gyakorlatban, a Triton X-100 csekély mértékben gátolja a niszin gram-negatív baktériumok elleni hatását, mint ez S. typhimurium ellen látható (2. táblázat). A niszin és EDTA kombináció hatásának növekedése azonban túllépi a Triton X-100 gátló hatását, mint ez a 2. és 4. táblázatból látható.

A mérések alapján a niszin és egy kelátképző szer, így EDTA kombinációja hatékony élelmiszer-tartósító szer különböző gram-negatív baktériumok ellen, még felületaktív anyag jelenlétében is.

5. példa

Niszin és kelátképző szer kombinációjának hatása gram-negatív baktérium (Klebsiella pneumoniae) ellen

A niszin és EDTA kombináció hatását K. pneumoniae gram-negatív baktérium ellen az 5. táblázatban mutatjuk be.

5. táblázat

K. pneumoniae túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2
Kezdeti életképesbaktérium-sz.	10^7	10^7
EDTA (mmól/l)	0	20
Triton X-100 (tömeg%)	0	0
Niszin:		
0 µg/ml	100	22
30 µg/ml	–	0,5
100 µg/ml	50	1,1
300 µg/ml	38	0,085

Két kísérletet végeztünk, az egyiket EDTA jelenlétében, a másikat EDTA távollétében (kontroll) 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten ml-enként 10⁷ életképes *K. pneumoniae* sejt kezelésével. A hatást a 2 órás kezelés után életképes sejtek száma alapján határoztuk meg.

Az 1. számú kísérletben (kontroll, lásd az 5. táblázatot) EDTA távollétében a niszin csekély baktericid hatást mutat *K. pneumoniae* ellen. A 2. számú kísérletben, ahol 20 mmól/l EDTA-t alkalmazunk, a baktericid hatás jelentős mértékben megnő. A hatékonyság a niszin koncentrációjának növelésével együtt nő.

6. példa

Niszin hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen a kelátképző koncentrációjának függvényében

A niszin gram-negatív baktérium (*S. typhimurium*) elleni hatását az EDTA koncentrációjának függvényében 50 mmól/l nátrium-acetát (pH 5,0), valamint 20 mmól/l trisz (pH 8,0) oldatban 37 °C hőmérsékleten a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2	3	4
pH	5,0	5,0	8,0	8,0
Kezdeti életképes-baktérium-szám	3×10 ⁶	3×10 ⁶	5×10 ⁶	5×10 ⁶
Niszin (μg/ml)	0	100	0	100
EDTA:				
0 mmól/l	100	0,6	100	4
0,2 mmól/l	–	10 ⁻⁴	–	10 ⁻⁴
2,0 mmól/l	38,7	10 ⁻⁴	8,7	10 ⁻⁴
10 mmól/l	15,2	0,004	14,0	10 ⁻⁴
50 mmól/l	3,5	0,02	11,4	0,6
100 mmól/l	–	–	45,0	30

Az 1. és 3. számú kísérletben (kontroll, lásd a 6. táblázatot) a különböző koncentrációjú EDTA niszin távollétében csak csekély hatást mutat *S. typhimurium* ellen mind pH 5,0, mind pH 8,0 értéken. A 2. és 4. számú kísérletben azonban, ahol EDTA-val kombinálva 100 μg/ml niszint alkalmaztunk, előnyös baktericid hatást észleltünk *S. typhimurium* ellen. A készítmény baktericid hatása azonos mind savas (pH 5,0), mind lúgos (pH 8,0) körülmények között, ellentétben azzal a ténnyel, hogy az önmagában alkalmazott niszin baktericid hatását előnyösen pH 5,0 értéken feje ki.

A niszin baktericid hatásának EDTA-val történő fokozása az EDTA koncentrációjától függ és a legelőnyösebb a 0,2–10 mmól/l tartományban pH 5,0–8,0 között. Meglepő módon, 10 mmól/l koncentrációnál nagyobb értékek esetén az EDTA hatásfokozó hatása csökken, ez a csökkenés pH 8,0 értéken nagyobb, mint pH 5,0 értéken.

7. példa

Niszin és kelátképző szer kombinációjának hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen

A niszin hatásának EDTA-val történő fokozását gram-negatív baktériumok ellen biológiai szövetek jelenlétében csirkeizomban *S. typhimurium* ellen vizsgáltuk, az eredményeket a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat

S. typhimurium túlélése^a (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma	1	2	3	4	5
pH	5,0	5,0	8,0	8,0	8,0
Niszin μg/ml	0	300,0	0	300	300 ^b
EDTA					
0 mmól/l	11,8	0,1	100,0	7,5	0,02
0,1 mmól/l	–	0,2	–	0,1	0,09
0,3 mmól/l	–	0,05	–	0,02	0,0002
1 mmól/l	–	0,01	–	0,02	<10 ⁻⁴
3 mmól/l	–	0,003	–	0,09	0,0004
10 mmól/l	6,4	0,016	5,2	0,47	0,003
20 mmól/l	–	0,03	–	0,5	–
30 mmól/l	–	0,02	–	–	0,03
100 mmól/l	–	0,07	–	2,2	0,09

Megjegyzések:

^a – önálló sejtek

^b – 1 tömeg% borjuszérum albumin

A vizsgálatok során a készítményt 50 mmól/l nátrium-acetátban (pH 5,0), valamint 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten alkalmaztuk.

A csirkeizmot nátrium-hipoklorittal és povidon jóddal tisztítottuk. A szövetek inokulálásához a csirkeizomdarabokat 10⁸ sejt/ml koncentrációjú és 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 8,0) felvett *S. typhimurium* szuszpenzióba merítjük. A szuszpenzió feleslegét lecspegetjük, majd a szöveteket niszin készítményt tartalmazó pufferbe helyezük és 2 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a szöveteket eltávolítjuk a pufferből, majd a vizsgált oldatban visszamaradó baktériumokat centrifugálással összegyűjtjük, Phage-pufferrel lemosunk és egyesítjük a szövetről Phage-pufferrel lemosott baktériumokkal. Az egyesített mintákat (önálló sejtek) hígítjuk és 100 μl alikvot részt lemezre viszünk a túlélés meghatározásához.

Az 1. és 3. számú kísérletben (7. táblázat) az EDTA önmagában, niszin távollétében, sem pH 5,0 sem pH 8,0 értéken nem mutat jelentős hatást *S. typhimurium* ellen. A 2. és 4. számú kísérletben azonban, ahol 300 μg/ml niszint alkalmaztunk, jelentős baktericid hatás észlelhető csirkeizomban lévő *S. typhimurium* ellen mind pH 5,0, mind pH 8,0 értéken.

A niszin EDTA-val történő hatásfokozása az EDTA koncentrációjától függ, az optimális érték mind pH 5,0, mind pH 8,0 esetben 0,3–10 mmól/l határok között mozog. pH 8,0 esetben 10 mmól/l-nél nagyobb EDTA-koncentrációnál a niszin hatása csökken. 1,2 tömeg%

borjúsérum albumin jelenléte azonban, mint ez az 5. számú kísérletben látható, pH 8,0 értéken tovább növe-li a niszin *S. typhimurium* elleni hatását.

A kísérletekből megállapítható tehát, hogy niszin és 0,1–20 mmól/l kelátképző szer, így EDTA kombináció-ja különösen előnyösen alkalmazható gram-negatív baktériumok ellen különböző élelmiszerekben.

8. példa

Niszin hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen

A kelátképző szer optimális koncentrációját trisz-pufferben gram-negatív baktérium ellen a 8. táblázatban foglaljuk össze.

8. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma:	1	2
Kezdeti életképesbaktérium-szám	6×10^6	6×10^6
EDTA (mmól/l)	0	1,0
BSA (tömeg%)	0	1,0
Niszin:		
0 µg/ml	100,0	63
0,1 µg/ml	–	0,7
0,3 µg/ml	–	0,08
1,0 µg/ml	–	0,01
3,0 µg/ml	–	0,05
10 µg/ml	51,3	0,01
30 µg/ml	–	$<10^{-4}$
100,0 µg/ml	1,6	–

A 2. számú kísérletben (8. táblázat) 0,3 µg/ml niszint alkalmaztunk, amely 1,0 mmól/l EDTA és 1 tömeg% borjúsérum albumin jelenlétében 20 mmól/l trisz-pufferben pH 8,0 értéken jelentős mértékben csökkentette az *S. typhimurium* életképességét. A találmány szerinti kombináció tehát ugyanolyan hatásos gram-negatív baktériumok ellen, mint a niszin önmagában a gram-pozitív *Streptococcus*ok ellen.

9. példa

Niszin hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen

A kelátképző szer optimális koncentrációjánál a niszin gram-negatív baktériumok elleni hatását biológiai szövetek jelenlétében csirkeizomban lévő *S. typhimurium* ellen vizsgáltuk, és a mérési eredményeket a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma:	1	2
pH	8,0	8,0
Kezdeti életképesbaktérium-szám	3×10^7	3×10^7

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Kísérlet száma:	1	2
EDTA (mmól/l)	0	1,0
BSA (tömeg%)	0	1,0
Niszin:		
0 µg/ml	100	27
10 µg/ml	–	0,26
100 µg/ml	–	0,008
200 µg/ml	–	0,007
300 µg/ml	–	0,006

A csirkeizomszövetet nátrium-hipokloriddal és povidon jóddal tisztítjuk, majd 10^8 sejt/ml koncentrációjú és 20 mmól/l trisz-HCl pufferban (pH 8,0) felvett *S. typhimurium* szuszpenzióba merítve inokuláljuk. A sejtsuszpenzió feleslegét lecsepegtetjük, majd a szöveteket vizsgált készítményt tartalmazó pufferbe merítjük és 2 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a szöveteket eltávolítjuk, majd Phage-pufferrel mossuk. A baktériumok a vizsgált hatóanyag-oldatban maradnak vissza, ezeket centrifugálással összegyűjtjük, Phage-pufferrel lemosott baktériumokkal egyesítjük. Az egyesített sejteket (önálló sejtek) hígítjuk és 100 µl alikvot részt lemeze re vive meghatározzuk a baktérium túlélését.

10. példa

Niszin, EDTA és metil-parabén kombinációjának hatása gram-negatív baktérium (S. typhimurium) ellen

Niszin, EDTA és az ismert élelmiszer-tartósítós metil-parabén kombinációjának baktericid hatását gram-negatív baktérium ellen a 10. táblázatban foglaljuk össze.

10. táblázat

S. typhimurium túlélése (%) 2 órás kezelés után

Kísérlet száma:	1	2
Kezdeti életképesbaktérium-szám	3×10^6	3×10^6
Niszin (µg/ml)	0	300
EDTA (mmól/l) ^b	10	10
Metil-parabén:		
0 tömeg%	11,8	0,03
0,1 tömeg%	1,0	$<10^{-3}$
1,0 tömeg%	10^{-4}	$<10^{-4}$

Megjegyzés:

^b = 50 mmól/l Na-acetát puffer, pH 5,0

Csirkeizmot alkalmazás előtt nátrium-hipoklorittal és povidon jóddal tisztítunk, majd 10^8 sejt/ml koncentrációjú és 50 mmól/l nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) felvett *S. typhimurium* szuszpenzióba merítjük. A sejtsuszpenzió feleslegét lecsepegtetjük, majd a szöveteket vizsgált hatóanyagkészít-

ményt tartalmazó oldatba merítjük és 2 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a szöveteket eltávolítjuk és Phage-pufferrel mossuk. A baktérium a vizsgált hatóanyag-oldatban marad vissza, ezeket centrifugálással összegyűjtjük, Phage-pufferrel mossuk és a szövetekről Phage-pufferrel lemosott baktériumokat egyesítjük. Az egyesített sejteket (önálló sejtek) hígítjuk és 100 µl alikvot részt lemezzre felvive meghatározzuk a túlélést.

Az 1. számú kísérletben (10. táblázat) a metil-parabén 10 mmól/l EDTA jelenlétében csak 1,0 tömeg% koncentrációban mutat jelentős hatást *S. typhimurium* ellen. A 2. számú kísérletben azonban, ahol 300 µg/ml niszint is alkalmazunk, a metil-parabén és niszin kombinációja már lényegesen jobb hatást mutat.

A vizsgálatokból megállapítható, hogy a niszin és EDTA kombinációja jelentős mértékben növeli az élelmiszer-tartósító metil-parabén alkalmazhatóságát. A

baktericid hatás tehát jelentős mértékben csökkenti vagy akár ki is küszöbölheti a kevésbé kívánatos tartósítószer metil-parabén alkalmazását.

5

11. példa

Niszin és kelátképző szer kombinációjának hatása gram-pozitív baktérium (Staphylococcus aureus) ellen

A niszin hatásának kelátképző szerrel történő fokozása a pH-értéktől függ. A 11. táblázatban megadott adatok alátámasztják, hogy pH 5,0 értéken a niszin valamivel nagyobb baktericid hatást fejt ki *S. aureus* ellen, mint pH 8,0 értéken. pH 5,0 értéken az EDTA nem növeli a niszin *S. aureus* elleni hatását és 10 mmól/l feletti koncentrációnál kifejezetten hatáscsökkentést vált ki. Az EDTA-val aktivált niszin baktericid hatása azonban pH 8,0 értéken lényegesen nagyobb, mint a niszin önmagában mért vagy EDTA-val kombinálva pH 5,0 értéken mérhető hatása.

20

11. táblázat

S. aureus túlélése (%) 2 órás kezelés után

pH	Niszin (µg/ml)	EDTA (mmól/l)							
		0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100
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

A kezdeti sejtszám $8,0 \times 10^6$ /ml, az inkubálást 50 mmól/l nátrium-acetát pufferben (pH 5,0), valamint 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 8,0) 37 °C hőmérsékleten végeztük.

A niszin önmagában mért hatása Hurst szerint (lásd idézett irodalom) pH 5,0 értéken vagy ez alatt a legoptimálisabb, és azt a 11. táblázat adatai alátámasztják. A fenti információból kiindulva arra lehet következtetni, hogy a niszin EDTA-val történő aktiválása *S. aureus*-szal szemben alacsonyabb pH-értéken intenzívebb. Ezzel ellentétben azonban még a 11. táblázatból (és 6. táblázatból is) látható, az EDTA nem növeli a niszin hatását gram-pozitív baktériumok ellen pH 5,0 értéken. Emellett nagy mennyiségű EDTA pH 5,0 értéken kife-

35

jezetten csökkenti a niszin hatását. Ez azt jelenti, hogy a niszin kelátképző szerrel történő aktiválása csak egy adott kelátképző koncentrációhatáron belül lehetséges, és gram-pozitív baktériumok esetében a pH-tól függ, ahol az előnyös tartomány 5,0 érték felett van.

40

12. példa

Niszin és kelátképző szer kombinációjának hatása gram-pozitív baktérium ellen

Az EDTA niszin aktiváló hatása pH 8,0 értéken nem korlátozódik az *S. aureus* törzsre, hanem kiterjed más törzsekre is, így a *Streptococcus mutans*ra (12A táblázat), a *Listeria monocytogenes*re (12B táblázat) és a *Corynebacterium* vegyes populációjára (12C táblázat).

45

12A táblázat

S. mutans túlélése (%) 2 órás kezelés után

pH	Niszin (µg/ml)	EDTA (mmól/l)								
		0	0,01	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100
8,0	0	100	–	–	–	–	–	–	–	–
8,0	0,1	4,3	1,8	0,04	0,02	0,06	1	25	100	100

Inkubálás 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 8,0)

60

37 °C hőmérsékleten.

Kezdeti életképesbaktérium-szám: $6,0 \times 10^6$ /ml

12B. táblázat
L. monocytogenes túlélése (%) 2 órás kezelés után

pH	Niszin (µg/ml)	EDTA (mmól/l)							
		0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30	100
8,0	0	100	–	–	84	–	–	–	–
8,0	3,0	0,71	0,04	0,04	0,02	0,1	0,64	10	14

Kezdeti életképesbaktérium-szám: $6,0 \times 10^6$ /ml
Inkubálás 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 8,0) 10
37 °C hőmérsékleten.

12C. táblázat
Coryneform túlélése (%) 2 órás kezelés után

pH	Niszin (µg/ml)	EDTA (mmól/l)						
		0	0,1	0,3	1,0	3,0	10	
8,0	0	100	–	4,6	3,6	8	36	
8,0	3	0,22	0,03	0,0009	0,1	–	0,16	

Kezdeti életképesbaktérium-szám: $1,0 \times 10^6$ /ml
Inkubálás 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 8,0)
37 °C hőmérsékleten.

13. példa

Niszin és kelátképző kombinációjának baktericid hatása

Mint a 13A táblázat adataiból látható, niszin és EDTA kombinációját tartalmazó készítmény igen gyors 30

baktericid hatással rendelkezik. 10^7 sejt/ml koncentrációjú és 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 7,3) felvett gram-pozitív baktérium *S. mutans* szuszpenzióját 37 °C hőmérsékleten 1 mmól/l EDTA-val aktivált különböző koncentrációjú niszint tartalmazó készítménnyel kezeljük. A szuszpenziót 0,5–60 perc között különböző ideig inkubáljuk a baktericid készítménnyel. A baktericid hatást a túlélő baktériumok %-os aránya alapján számoljuk. Az EDTA-val aktivált niszin 10 µg/ml koncentrációban 1 percen belül 6 nagyságrenddel csökkenti az életképes baktériumok számát.

20 A gyors baktericid hatás a hatékony fertőtlenítés elsődleges feltétele. A vizsgált készítmény tehát előnyösen alkalmazható baktericid szerként szájvíz, fogpaszta és más, száj- és fogápoló készítményekben *S. mutans* ellen.

25 Az EDTA-val aktivált niszin gram-negatív baktériumok ellen 2-3 órán belül kifejtett hatását az 1–7. példákban mutattuk be. Az EDTA-val aktivált niszin gram-negatív baktériumok elleni gyors baktericid hatását a 13B táblázatban mutatjuk be.

13A táblázat
S. mutans túlélése (%)

Inkubációs idő (perc)	Niszin (µg/ml) + 1,0 mmól/l EDTA					
	0	1	3	10	30	
0,5	–	–	–	–	–	$<10^{-4}$
1	–	–	–	$<10^{-4}$	10^{-4}	10^{-4}
3	100	0,5	0,002	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	–
15	–	0,03	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	–	–
30	–	–	$<10^{-4}$	–	–	–
60	100	0,003	–	–	–	–

Kezdeti életképesbaktérium-szám: $1,0 \times 10^7$ /ml

Inkubálás 20 mmól/l trisz-HCl pufferben (pH 7,3)
37 °C hőmérsékleten.

13B táblázat
E. coli túlélése (%) 1 perc kezelés után

EDTA (mmól/l)	Niszin (µg/ml)						
		0	0,3	1,0	3	10	30
1,0	100	100	56	0,37	0,013	0,015	0,008

Kezdeti életképesbaktérium-szám: $1,0 \times 10^7$ /ml

Inkubálás 20 mmól/l trisz-pufferben (pH 7,0) 37 °C
60 hőmérsékleten.

14. példa

EDTA-hoz kapcsolódó kétértékű kationok hatása a niszin aktiválására

A feltételezések szerint az EDTA-hoz és más kelátképző szerben kapcsolódó kétértékű kationok semlegesítik az EDTA aktiváló hatását. Ezzel szemben, mint a 14. táblázat adataiból látható, az 1 mmól/l EDTA 1

5 mmól/l Ca^{2+} ion jelenlétében is fokozza a niszin S mutans elleni hatását, a kalciumion csak 3 mmól/l koncentráció felett gátolja az EDTA-val aktivált niszin hatását. Ez különösen fontos szájmószó vízként történő alkalmazás esetén, ahol a kalciumionok jelentős koncentrációban vannak jelen.

14. táblázat
S. mutans túlélése (%) 1 perc kezelés után

Niszin ($\mu\text{g/ml}$)	CaCl ₂ (mmól/l)					
	0	0,1	0,3	1,0	3	
0	100					
3	2,9					
3 ^E	0,0042	0,0042	0,052			18
30 ^E	0,0019		0,0003	0,0004	0,06	6,8
100 ^E	<10 ⁻⁴		<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0,0001	1,5

E = 1 mmól/l Na₂ EDTA

Kezdeti életképesbaktérium-szám: 1,0×10²/ml

Inkubálás 10 tömeg% borjűmagzati szérumban 37 °C hőmérsékleten.

15. példa

Niszin és felületaktív anyag kombinációjának hatása gram-pozitív baktérium ellen

A niszin baktericid hatása felületaktív anyag segítségével is fokozható. Ez a legjobban alacsony niszin-koncentrációnál (0,2 $\mu\text{g/ml}$) illusztrálható, mint ez a 15A táblázatban látható. 0,1 tömeg% koncentrációig az élelmiszer-ipari felületaktív anyagként alkalmazott monolaurin csak jelentéktelen baktericid hatással rendelkezik Streptococcus agalactiae ellen tejközegben. A niszin 0,2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációig a tejben szintén nem mutat jelentős baktericid hatást. A két szer kombinációja azonban, vagyis 0,1 tömeg% monolaurin és 0,2 $\mu\text{g/ml}$ niszin jelentős mértékben pusztítja az S. agalactiae baktériumot. Ez a baktericid több mint százszor hatékonyabb, mint ez a hatóanyagok hatásának összeadásával várható, és tízezerszer hatékonyabb, mint az egyes komponensek önmagukban. Ez azt jelenti, hogy a felületaktív anyaggal kombinált niszin még akkor is alkalmazható, amikor a niszin önmagában alacsony hatékonysága miatt már alkalmazhatatlan.

Az alacsony aktivitású niszin alkalmazhatatlanságát mutatja be a 15B táblázat. Bár a niszin, és még inkább a niszin és EDTA kombinációja baktericid hatással rendelkezik L. monocytogenes ellen, a 15B táblázat adatai igazolják, hogy a tejhez hasonló komplex közegben a niszin aktivitása jelentős mértékben beszűkül. A niszin

25 és monooleát kombinációja azonban még a tejben is hatékony, bár a monooleát önmagában baktericid hatást nem fejt ki.

30

15A táblázat
S. agalactiae túlélése (%) 2 órás kezelés után

Niszin ($\mu\text{g/ml}$)	Monolaurin (tömeg%)		
	0	0,01	0,1
0	100	100	4,5
0,02	100	100	0,2
0,2	2,2	0,05	0,0008

35

40

Kezdeti életképesbaktérium-szám: 6,0×10⁷/ml
Inkubálás tejben 37 °C hőmérsékleten.

45

15B táblázat
L. monocytogenes túlélése (%) 2 órás kezelés után

Niszin ($\mu\text{g/ml}$)	Monooleát (tömeg%)		
	0	0,1	1,0
0	100	67	63
100	0,56	10 ⁻³	10 ⁻⁴

50

55

Kezdeti életképesbaktérium-szám: 5,0×10⁷/ml
Inkubálás tejben 37 °C hőmérsékleten.

16. példa

50 További komponensek hatékonyságát igazolják a következő táblázatok:

16A. táblázat
Szubtilin és EDTA hatékonysága a Gram-negatív *Salmonella typhimurium* ellen

Hordozó	Szubtilin (µg/ml)	EDTA (mmól/l)					
		0	0,1	1	3	10	100
		túlélés 2 óra után (%)					
puffer							
pH 8,0 ^b	0	100 ^a					
	5	5	0,008	0,0004	0,004	0,04	11,3
puffer							
pH 5,0 ^c	5	0,06	0,04	0,0003	0,0003	0,08	6

^a = kezdeti életképesbaktérium-szám 3×10^6 /ml

^b = 20 mmól/l trisz-HCl, pH 8,0

^c = 50 mmól/l Na-acetát, pH 5,0

16B táblázat
Niszin és különböző kelátképző szerek hatása
Escherichia coli ellen

Niszin	Kelátképző szer 1 mmól/l koncentrációban ^b				
	0	EDTA	DTPA	CDTA	EGTA
100	100 ^a	0,61	4,2	4,3	10,9

^a = kezdeti életképesbaktérium-szám 1×10^7 /ml

^b = 10 mmól/l trisz-HCl, pH 7,3

20

16C táblázat
Niszin és CaNa₂ EDTA hatása *Streptococcus mutans* ellen

Hordozó	Niszin	CaNa ₂ EDTA (mmól/l)	
	(µg/ml)	0	1
10% FCS ^b	3,0	3,0	0,052

25

Kezdeti életképesbaktérium-szám 3×10^6 /ml

^b = 10% borjú magzati szérum.

30

16D táblázat
Niszin és citrát hatása *Streptococcus mutans* ellen

Hordozó	Niszin (µg/ml)	Citrát (mmól/l)					
	0	0,1	1	3	10	100	
		túlélés 2 óra után (%)					
puffer							
pH 7,3 ^b	0,3	3,65	1,25	0,1	0,42	0,2	0,35

Kezdeti életképesbaktérium-szám 3×10^6 /ml

^b = 10 mmól/l trisz-HCl, pH 7,3

16E táblázat
Niszin és citrát aktivitása *Escherichia coli* ellen

Hordozó	Niszin (µg/ml)	Citrát (tömeg%)				
		0	0,1	0,3	1	3
		túlélés 1 perc után (%)				
puffer						
pH 3,5	0	100	100	56,	73	100
	100	100	0,0025	0,0006	0,56	14,6

Kezdeti életképesbaktérium-szám 5×10^7 /ml

16F táblázat
Niszin és nemionos felületaktív anyag hatása
Escherichia coli ellen

Hordozó	Niszin (µg/ml)	Tween			
		0	Tw20	Tw40	Tw80
		túlélés 1 perc után (%)			
puffer					
pH 7,0 ^b	0	100 ^a	100	100	100
	3	0,25	0,001	0,007	0,007

^a = kezdeti életképesbaktérium-szám 1×10^7 /ml

^b = 20 mmól/l trisz-HCl, pH 7,0

16G táblázat
Niszin és amfoter felületaktív anyag hatása
Streptococcus mutans ellen

Hordozó	Niszin (µg/ml)	Kokamido-propil-betain (tömeg%)	
		0	0,1
10% FCS ^b	0	100	11
	3	30	0,07

^a = kezdeti életképesbaktérium-szám 1×10^7 /ml

^b = 10% borjúmagzati szérum

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fertőtlenítőszer és élelmiszer-ipari tartósítószer, *azzal jellemezve*, hogy 0,1–300 µg/ml lantionintartalmú baktericid hatóanyagot és emellett 0,1–20 mmól/l kelátképző szert és/vagy 0,01–1,0 tömeg% felületaktív anyagot, valamint adott esetben adalékanyagot tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

2. Az 1. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy 0,3–300 µg/ml niszint, és emellett 0,1–20 mmól/l kelátképző szert és/vagy 0,1–1,0 tömeg% nemionos felületaktív anyagot, valamint adott esetben adalékanyagot tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

3. A 2. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy kelátképző szerként EDTA-t tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

4. A 2. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy nemionos felületaktív anyagként Tritont, Tweent vagy monogliceridet tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

5. A 2. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy

adalékanyagként további élelmiszer-ipari tartósítószer tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

6. Az 1. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként niszint vagy szubtilint tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

7. Az 1. vagy 6. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy kelátképző szerként alkildiamin-tetraacetátot, CaEDTA-t, NaCa₂EDTA-t, EGTA-t vagy citrátot tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

8. Az 1. vagy 6. igénypont szerinti szer, *azzal jellemezve*, hogy felületaktív anyagként Tritont, Tweent, gliceridet, zsírsavat, emulgeálószer, kvaterner vegyületet, amfoter vagy anionos felületaktív anyagot tartalmaz.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

9. Eljárás fokozott és széles hatású baktericid készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,1–300 µg/ml lantionintartalmú baktericid hatóanyagot 0,1–20 mmól/l kelátképzővel és/vagy 0,01–1,0 tömeg% felületaktív anyaggal és adott esetben további adalékanyaggal keverünk, és a keveréket gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

10. A 9. igénypont szerinti eljárás gram-negatív baktériumok elleni szer előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,3–300 µg/ml niszint, 0,1–20 mmól/l kelátképző szert és/vagy 0,1–1,0 tömeg% nemionos felületaktív anyagot és adott esetben további adalékanyagot alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kelátképző szerként EDTA-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nemionos felületaktív anyagként Tritont, Tweent vagy monogliceridet alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1988. 06. 22.)

13. A 9. igénypont szerinti eljárás Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, Coryneform bacteria, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacterioides gingivalis és Actinobacillus actinomycetescumitans elleni szer előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként niszint vagy szubtilint és kelátképző szerként alkildiamin-tetraacetátot, EGTA-t vagy citrátot alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)

14. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy felületaktív anyagként Tritont, Tweent, gliceridet, zsírsavat, emulgeálószer, kvaterner vegyületet, amfoter vagy anionos felületaktív anyagot alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1989. 03. 01.)