



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 315 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 99 00092

(22) A bejelentés napja: 1996. 10. 30.

(30) Elsőbbségi adatok:

95202979.1 1995. 11. 03. EP

95202977.5 1995. 11. 03. EP

95202978.3 1995. 11. 03. EP

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 96/04727

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 97/16973

(51) Int. Cl.⁷

A 01 N 63/00

A 23 L 3/3571

A 23 L 3/3526

A 61 K 7/00

(40) A közzététel napja: 1999. 04. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 03. 28.

(72) Feltalálók:

Brul, Stanley, Vlaardingen (NL)

Coote, Peter, Sharnbrook, Bedford (GB)

Dielbanhoesing, Shanti, Vlaardingen (NL)

Naaktgeboren-Stoffels, Geke, Vlaardingen (NL)

Oomes, Suzanna, Vlaardingen (NL)

Stam, Wilma M., Vlaardingen (NL)

Stratford, Malcolm, Sharnbrook, Bedford (GB)

(73) Szabadalmaz:

UNILEVER NV., Rotterdam (NL)

(74) Képvisező:

dr. Gárdonyi Zoltánné, DANUBIA Szabadalmi
és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Természetes kompozíció gombák leküzdésére

KIVONAT

A találmány a gombák leküzdésére alkalmas készítményre vonatkozik, amely legalább egy sejtfalbontó enzimet és legalább egy természetes eredetű, mikroba sejtmembránt befolyásoló anyagot (MMAS), éspedig ni-

zint, metélőhagymát, fokhagymát és/vagy kurkumát tartalmaz hatásos koncentrációban. A készítmény előnyösen élelmiszer-ipari termék.

HU 219 315 B

A találmány a gombák elleni küzdelemre vonatkozik, különös tekintettel az élelmiszerek gombanövekedés okozta romlás elleni tartósítására. Évente több millió tonna élelmiszer vész kárba mikrobiális romlás következtében. Az emberiség történetében igen hamar felfedezték, hogy a jótékony mikroorganizmusokkal történő fermentációval az élelmiszerek tartósíthatók.

Modern fagyasztóberendezések hiányában a trópusi és szubtrópusi régiók lakói még mindig nagyrészt a fermentációra mint élelmiszereik tartósításának és védelmének eszközére támaszkodnak.

Az élelmiszerek romlását okozó mikroorganizmusok baktériumok, illetve gombák. A gombák romlási kockázatot jelentenek az élelmiszergyártásban. Az alacsony zsírtartalmú kenhető készítmények, sajtok, teaalapú italok, gyümölcs- és paradicsomalapú termékek érzékeny élelmiszerek. Az inaktíváló hőkezelés nem mindig kívánatos vagy lehetséges. A gyárak csarnokaiban jelen lévő gombaspórák további problémákat okozhatnak a csomagolási szakaszban. A baktériumok elleni küzdelem viszonylag könnyű. A gombák ezzel szemben olyan organizmusok, melyek igen kedvezőtlen körülmények közt is képesek a túlélésre. A gombák elleni hatékony küzdelem nehéz a csírázás vagy növekedés gátlásával, különösen ha csak természetes tartósítóanyagokat kívánunk használni. A gombák gátlása magában foglalja mind a gombák elpusztítását, mind pedig növekedésük megakadályozását tulajdonképpen elpusztításuk nélkül.

Jóllehet az élelmiszer-technológia kifejlesztett mesterséges, vegyi tartósítóanyagokat a gombák elleni küzdelemre, egyre több fogyasztó részesíti előnyben az olyan készítményeket, melyeknek összetevői nem vegyi, hanem természetes eredetűek. Ezért növekvő figyelmet fordítottak arra, hogy olyan tartósítóanyagokat találjanak, melyek fermentációs folyamatokkal állíthatók elő, és így természetes eredetűnek tekinthetők. Ilyen hatóanyagok a mikrobiális sejtfalat oldó enzimek, melyeket például a „Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and foodgrade enzymes” [Int. Journal of Food Microbiology, 24, 343–362. (1995)] című összefoglaló tanulmány ismerteti. A WO 90/03732 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés szerint növények megvédhetők gombák ellen gombasejtfaloldó enzimekkel, közelebbről kitinázsal és glukánázsal, még pontosabban β -1,3-glukanázsal, β -1,6-glukanázsal és kitinázsal történő kezeléssel. Az enzimek előnyösen együtt kerülnek felhasználásra egy keverékben, mivel a gombasejtek falai rendes körülmények között kitint és glukánt egyaránt tartalmaznak, változó arányban.

Jóllehet ezen sejtfaloldó enzimek keverékei hatékonyan bizonyultak a gombák ellen, fogyasztási cikkek tartósítására történő tömeges felhasználásuk még korlátozott magas árak és viszonylag alacsony aktivitásuk következtében. Szélesebb körű felhasználással lehetne számolni, amennyiben csökkenteni lehetne a hatékony dózist és ennek következtében a költségeket.

Agrokémiai készítményekhez ismeretesek az enzimek szinergisztikus keverékei nem élelmiszer-minősé-

gű gombaölő szerekkel [WO 90/03732 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés; Microbiology, 140, 623–629. (1994)]. Nagy szükség lenne egy teljesen természetes eredetű sejtfalbontó, enzimalapú gombanövekedést gátló készítményre.

Ismeretesek természetes eredetű mikroba sejtmembránt befolyásoló anyagok (MMAS) gombanövekedés gátlására szinergisztikus keverékben, melyben legalább egy, a gombasejtfalat bontó enzim van. A találmány olyan, gombák elleni küzdelemre alkalmas készítményekre vonatkozik, amelyek jellemző tulajdonsága, hogy hatékony koncentrációban tartalmazznak legalább egy gombasejtfalbontó enzimet és legalább egy természetes mikroba sejtmembránt befolyásoló anyagot (MMAS). Ilyen anyagok előnyösen a nizin, valamint az élelmiszer-készítményekben előforduló gombainhibitorok.

Ábrajegyzék

1. ábra: Az *Aspergillus niger* gomba elszaporodásának gátlása a nizin-koncentráció függvényében sejtfalbontó enzimmel és anélkül.

2. ábra: A *Penicillium roqueforti* elszaporodásának gátlása friss sajton egy sejtfalbontó enzim függvényében, hozzákevert fűszerekkel, illetve azok nélkül.

3. ábra: A feldolgozott sajtbba oltott *Penicillium roqueforti* elszaporodása 16 napon át, csak nizin, csak sejtfalbontó enzimek, sejtfalbontó enzimek és nizin együttes jelenlétében, illetve mindkettjük hiányában.

A sejtfalbontó enzim előnyösen kitináz vagy glukánáz, vagy – még előnyösebben – ezek keveréke. A legelőnyösebb glukánáz a β -1,3-glukanáz, adott esetben β -1,6-glukanázzal keverve. Az enzimek a találmány értelmében felhasználhatók elkülönítet, többé-kevésbé tiszta enzimizolátumként is, de előnyösen az enzimek kombinációit alkalmazzuk. Az enzimeket tartalmazó, természetes eredetű, finomítatlan készítmények a kereskedelemben hozzáférhetők, és felhasználhatók a tisztított enzimek helyett. Az egyik ilyen kereskedelmi enzimkészítmény a NovoZyme™ 234 (NOVO NORDISK, Dánia), mely bontóenzimek keveréke, és egyebek között tartalmaz kitinázt és β -1,3-glukanázt, valamint kis mennyiségű β -1,6-glukanázt. Ilyen készítményt a *Trichoderma harzianum* gomba fermentációjával állítanak elő az US 4 353 891 számú szabadalmi leírás szerint, melynek használatát a WO 90/03732 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés ismerteti. A kitináz és az említett glukánázok más természetes keverékei kivonhatók zöldségekből, közelebbről olyan növényekből, melyek képesek glukánázt és kitinázt termelni, amint az a szakirodalomban megtalálható [például *Plant Physiology*, 101, 857–863].

A kitináz és a glukánáz felhasználása egyaránt 0,001–2%-os koncentrációban történik a készítmény teljes tömegére számítva. A MMAS mennyisége célszerűen 0,00001–0,1%, kívánatosan 0,0001–0,02% a készítmény teljes tömegére számítva. A kitináz és β -1,3-glukanáz tömegaránya előnyösen (1:9)–(9:1).

A koncentrációk és az arányok könnyen optimalizálhatók a készítmény aktuális összetevőitől függően. A ter-

mékekhez keverendő gombaellenes készítmények emelt koncentrációban tartalmazzák az aktív összetevőket, számításba véve a keverésből eredő hígulást.

A „természetes” kifejezés az anyag eredetére vonatkozik. Azt jelenti, hogy az anyag természetes forrásból nyerhető, még ha a MMAS szintetikus is előállítható lenne. Ezért a találmány gombaellenes készítménye MMAS-t tartalmaz, tekintet nélkül annak készítési módjára.

Jó néhány MMAS már ismert lehet mint ilyen a mikroorganizmusok sejtmembránjával való kölcsönhatása miatt. Ezek hatása a sejtmembrán felbomlásához vagy perforációjához vezet, ami végzetes következményekkel jár a mikroorganizmusra nézve. Magukban ép gombán alkalmazva a sejtfal olyan gátat képezhet, hogy gombagátló tulajdonságaik nem vagy csak alig lennének észlelhetők.

Egy jól ismert, a találmány szerinti megoldásban felhasználható MMAS az élelmiszer-minőségű, 3,5 kD molekulatömegű peptid, a nizin. A nizin bakteriocin lévén baktériumölő tulajdonsággal rendelkezik, gombanövekedést gátló hatása azonban nem ismeretes (lásd az 1. ábrát).

Más, természetes gombanövekedés-gátlóként ható MMAS anyagok vannak jelen fűszerekben, melyek felhasználhatók élelmiszerek készítésére – pontosabban sajtkészítésre, mint például a metélőhagyma, fokhagyma, valamint a kurkuma. Gyakorlati okokból a gátló vegyületek előnyösen nincsenek izolálva a fűszerekből, hanem az őket tartalmazó fűszer formájában kerülnek felhasználásra. A fűszerek előnyösen egy kondicionáló kezelés – mint például a szárítás – után kerülnek felhasználásra. A fűszereket előnyösen lényegében száraz formában, 0,01–10 tömeg%-os koncentrációban alkalmazzák.

A találmány olyan készítményekre is vonatkozik, melyeknél a MMAS-t más anyagokból állítjuk elő, beleértve a szintetikus eljárással történő készítést.

A bontóenzimből és MMAS-ból álló készítmény szinergisztikus aktivitása változhat, de általában legalább kétszerese az alkotó összetevők szinergizmusát nélkülöző azonos keverék aktivitásának. Ez azt jelenti, hogy a kívánt aktivitás eléréséhez a keverék csupán 50 tömeg%-a vagy még kevesebb kell, amennyiben az nem mutatott szinergisztikus aktivitást. A szinergizmus világosan látható az 1–3. ábrákon.

A gombasejtfalbontó enzimet és MMAS anyagot tartalmazó készítményeknek a szinergizmusból származó első előnye az, hogy a tartósítás költségei mérséklődnek, mivel kevesebb tartósítósanyagra van szükség. Táplálkozási szempontból még fontosabb azonban, hogy ilyen esetben a nem természetes élelmiszeradalék-tartalom csökkenthető. A találmány szerinti tartósító alapanyagok természetes eredetűnek tekinthetők.

A találmány egyaránt vonatkozik olyan tartósító adalékanyagokat tartalmazó készítményekre, melyek mind a bontóenzim(ek)et, mind a MMAS-t tartalmazzák, valamint az olyan kész fogyasztási cikkek vonatkozik, melyekbe megfelelő mennyiségben belekevertük ezeket az összetevőket.

A levegő által szállított gombák elleni védekezés érdekében a találmány értelmében eljárva alkalmazhatjuk az enzim(ek)et és a MMAS-t vizes oldatban elosztatva, és a termék – amely lehet élelmiszer, kozmetikum vagy bármely más termék, melyet a gombanövekedés megtámadhat – felületére permetezve.

Az aktív összetevők mellett a találmány szerinti készítmény tartalmazhat kiegészítő összetevőket, melyek a gombaellenes készítményekben használatosak, és amelyek lehetnek szilárd hígítóanyagok, oldószerek, stabilizálóanyagok és pH-szabályozók. A készítmény lehet por, kenőcs vagy folyadék az előírányzott felhasználási módtól függően.

Jóllehet a találmányban szereplő készítmény különösen alkalmas gombaellenes élelmiszer-tartósításra, felhasználható nem kívánt gombanövekedés megelőzésére vagy leküzdésére más termékeken is – ilyenek a piperickek, például a szappanok. A kozmetikai termék nemcsak azért tartalmazhat gombagátló szert, hogy maga gombamentes maradjon, hanem az ilyen termékkel kezelt bőrön jelentkező előnyös hatások kedvéért is, például egy sampon használata gombával fertőzött fejbőrön.

A következő példák a találmány jobb megértését segítik elő.

1. példa

Gombanövekedés gátlása sejtfalbontó enzim és nizin segítségével

0,2 tömeg% NovoZyme™ 234 gombaellenes anyagot és 0,002 tömeg% nizin tartalmazó oldatot készítünk ioncserélt vízzel. Az oldatból 75 µl-t 20 °C-ra melegítettünk, és egy mikrotitráló lemez mélyedésébe öntöttük. Ezt követően 75 µl térfogatú, 4 tömeg% malátakivonat-táptalajt (Oxoid), 0,75 tömeg% agart (Difco), valamint 10³ *Aspergillus niger* spórát tartalmazó oldatot 25 °C-ra melegítettünk, és a mélyedésében lévő tesztoldathoz (pH 5,1) adtuk.

Az eljárást megismételtük 0,004, 0,008, 0,016, 0,032, valamint 0,064 tömeg% nizin tartalmazó oldatokkal. A mélyedések tartalmát alaposan megkevertük, és 75 tömeg% paraffinolajat töltöttünk a keverék tetejére. Végül a lemezeket oxigénáteresztő fóliával (Merlin) zártuk le.

360 órán keresztül szabályos időközönként megmértük a minta optikai denzitását 620 nm hullámhosszon, MCC 340 Multiscan-készülék segítségével. A gomba elszaporodásának tekintettük, ha az OD (optikai sűrűség) legalább 0,1-es emelkedést mutatott.

Az 1. ábra a gomba spóráinak elszaporodásához szükséges időt (órákban) ábrázolja egy 0 tömeg%-tól 0,032 tömeg%-ig növekedő koncentrációban nizin tartalmazó környezetben. Bármely enzim (első sor) hiányában a nizin önmagában nincsen lényeges hatással a gomba elszaporodásának – egy nizinmentes keveréknél megállapított – 100 órán túli késleltetésére. A kitináz és glukanáz tartalmazó NovoZyme™ 234 (0,1 tömeg%) enzimmészítmény nizin nélkül alkalmazva alig mutat bármilyen gombanövekedés-gátlást. Ezzel szemben a nizin és az enzimmészítményt egyaránt tartalma-

zó (második sor) keverékek figyelemreméltó aktivitást mutatnak, ami az elszaporodáshoz szükséges, erősen megnövekedett időtartamokból tűnik ki.

2. példa

Gombanövekedés gátlása sejtfalbontó enzim és fűszerek segítségével

Laminárboxban, aszeptikus körülményeket biztosítva, homogén friss-sajt-mintákat készítettünk, melyek 0, 0,5, valamint 2 tömeg% NovoZyme™ 234 port, továbbá egy 2 tömeg% inaktivált NovoZyme™ 234 port tartalmazott. Hasonló sorozatot készítettünk, mely ezenkívül 1,6 tömeg% fűszerkeveréket tartalmazott metélőhagymából, fokhagymából és kurkumából. A termékeket egy kis steril fedélbe – melyet beleragasztottunk egy nagyobb – töltöttük steril késsel oly módon, hogy sima sajtfelületet kapjunk.

Elkészítettük a *Penicillium roqueforti* spóráinak száraz szuszpenzióját, és a keverékben található spórák számát úgy határoztuk meg, hogy 10 edény fedőjében lévő 10 azonos maláta kivonat-agar mintára permeteztük. A kiszáradást megelőzendő a fedőket NaCl-agart (vízaktivitás=0,99) tartalmazó üvegedényre csavartuk. Az edényeket 3–5 napig 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációt követően megszámoltuk a gombatelepeket, és a számtani középértéket vettük a gombaspórák számának meghatározásához.

Hasonlóképpen a sajtok felületét is beoltottuk az azonos spóraszuszpenzióval. 10²–10⁴ spórát tartalmazó oltóanyagot kaptunk. A mintákat egy NaCl-agart (vízaktivitás=0,99) tartalmazó üvegedényre csavartuk, hogy elkerüljük a kiszáradást, és 20 °C hőmérsékleten inkubáltuk.

A beoltást követően több héten keresztül hetente háromszor megvizsgáltuk a beoltott sajt mintákat gomba okozta látható romlásra nézve. A β -glukanáz aktivitását is mértük, hogy megállapítsuk a tárolás időtartamának az enzim aktivitására gyakorolt hatását sajt környezetben. A kísérlet folyamán nem tapasztaltuk a β -glukanáz aktivitásának csökkenését.

Az I. táblázat a gomba elszaporodásának késleltetését mutatja a különböző készítmények esetében.

I. táblázat

Gombanövekedés a sajt felületén, 20 °C-on	Gomba okozta látható romlás n nap után
Tartósítóanyag nélkül	5
Csak fűszerek jelenlétében (1,6 tömeg%)	7–10
NovoZyme™ 234 jelenlétében (2 tömeg%)	7
Fűszerek (1,6 tömeg%) és NovoZyme™ 234 (2 tömeg%) jelenlétében	> 70

A 6. ábra – az I. táblázatot illusztrálva – azt mutatja, hogy a fűszerek és a NovoZyme™ 234 keverék együttes jelenléte (második sor) meglepően erős szinergisztikus gátló hatással bír a *Penicillium roqueforti* gomba spóráinak elszaporodására.

3. példa

Élelmiszerek védelme gombanövekedés ellen

A kezelt sajt felületét középen *Penicillium roqueforti* gombával oltottuk be. A nizin és a bontóenzimek hozzáadását laminárboxban, aszeptikus körülményeket biztosítva végeztük. A mintákat 16 napon keresztül vizsgáltuk (lásd a 7. ábrát).

Az a minta, amely tartósítószerrel egyáltalán nem vagy csak 0,005 tömeg% (500 ppm) nizin tartalmazott, már 4 nap múlva mutatta a gomba elszaporodását. A gomba növekedését a telepek átmérőjével fejezzük ki. NovoZyme™ 234 (2 tömeg%) jelenlétében a gomba elszaporodása jelentősen később, és csak 12 nap múlva vált láthatóvá. A NovoZyme™ 234-et (2 tömeg%) és nizin (0,05 tömeg%) egyaránt tartalmazó minta azonban figyelemreméltóan csökkent elszaporodást mutatott még 16 nap után is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Készítmény gombák leküzdésére, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy sejtfalbontó enzimet és legalább egy természetes eredetű mikroba sejtmembránt befolyásoló anyagot (MMAS), éspedig nizin, metélőhagymát, fokhagymát és/vagy kurkumát tartalmaz hatékony koncentrációban.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy sejtfalbontó enzimeként kitinázt és β -1,3-glukanázt, valamint adott esetben β -1,6-glukanázt tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a kitináz és glukanáz aránya 9:1 és 1:9 közötti.

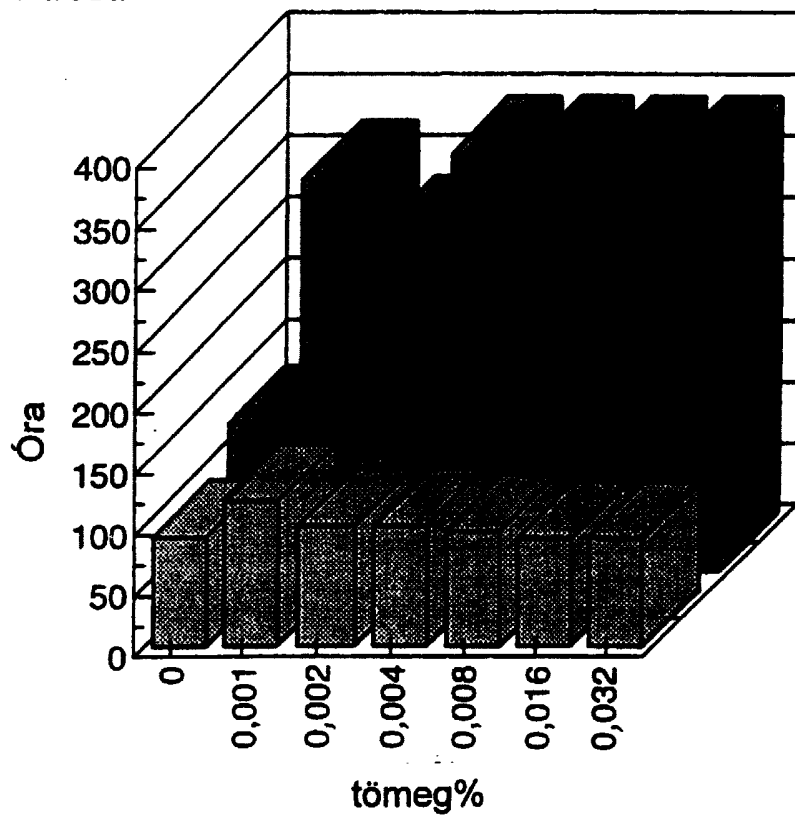
4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a kitináz és glukanáz enzimek egyaránt 0,001–0,02-os koncentrációban vannak jelen a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a MMAS a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva 0,00001–0,1%-os, előnyösen 0,0001–0,02%-os koncentrációban van jelen.

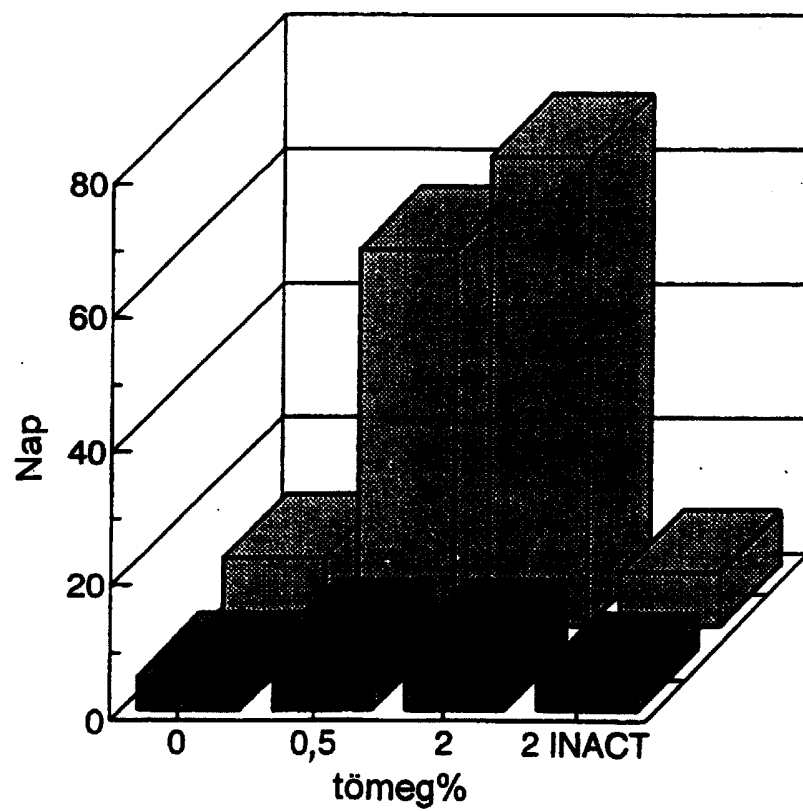
6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény gombanövekedést gátló aktivitással rendelkezik, ami legalább kétszerese az azonos keverék olyan aktivitásának, ami az alkotó komponensek szinergizmusának hiányában mérhető.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény élelmiszeripari termék vagy kozmetikai készítmény.

1. ábra

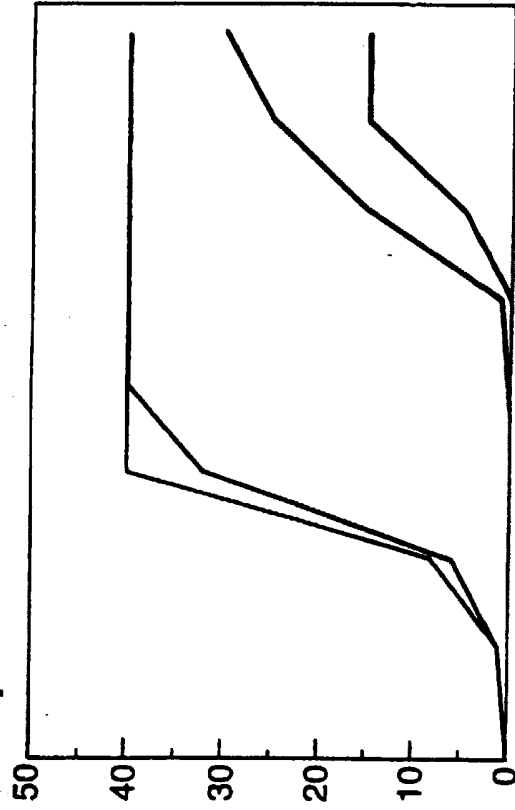


2. ábra



3. ábra

Kolónia átmérője



	Nap																
	0	2	4	6	8	10	12	14	16								
Sajt	—	0	1	8	40	40	40	40	40								
Sajt + 500 ppm NISIN	—	0	1	6	32	40	40	40	40								
Sajt + 2% NOVOZYM	—	0	0	0	0	1	15	25	30								
Sajt + NOVOZYM/NISIN	—	0	0	0	0	0	5	15	15								