



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 104390 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

14.01.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

G01N 33/14, 33/68

(21) Patentihakemus - Patentansökning

980863

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

17.04.1998

(24) Alkupäivä - Löpdag

17.04.1998

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

18.10.1999

(73) Haltija - Innehavare

1 •Oy Panimolaboratorio - Bryggerilaboratoriet AB, PL 16, 02151 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Haikara, Auli, Itälahdenkatu 8 C 49, 00210 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 •Sarlin, Tuula, Jaalanatie 5 B, 00600 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 •Nakari-Setälä, Tiina, Magnus Enckellin kuja 2-4 D 7, 02160 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

4 •Penttilä, Marja, Vattuniemenkatu 2 A 22, 00210 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Papula Rein Lahtela Oy
Fredrikinkatu 61 A, 6.krs, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä juoman ylikuohuntatekijän määrittämiseksi
Förfarande för bestämning av en drycks överskumningsfaktor

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Vaag ja Pedersen, European Brewery Convention Proceedings of the 24th Congress Oslo 1993 p. 111-120,
Caplus An 120:296873, Nielssen et al. Mycotoxin Res. 1993,9 (2) p. 99-109

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä juoman ylikuohuntatekijän määrittämiseksi, jossa menetelmässä hydrofobiinin määrä määritetään juoman raaka-aineesta ja/tai juomasta. Hydrofobiini määritetään immunologisesti hydrofobiiniantigeenin ja vasta-aineen välisellä immunologisella reaktiolla.

Uppfinningen avser ett förfarande för bestämning av en drycks överskumningsfaktor, vid vilket förfarande hydrofobin halten i dryckens råmaterial och/eller i drycken bestäms. Hydrofobin bestäms immunologiskt genom den immunologiska reaktionen mellan hydrofobin antigenen och antikroppen.

MENETELMÄ JUOMAN YLIKUOHUNTATEKIJÄN MÄÄRITTÄMISEKSI

Keksinnön kohteena on patenttivaatimuksen 1 johdanto-osassa määritelty menetelmä juoman ylikuohuntatekijän määrittämiseksi.

5 Käytettäessä oluen valmistuksessa homeilla saastunutta ohraa saattaa tuotettava olut olla altis ylikuohunnalle. Ylikuohunta on ilmiö, jossa olut kuu-
huu liiallisesti, esim. olut saattaa syöksyä ulos pul-
lostasta pulloa avattaessa. Pahimpia ylikuohunnan aiheut-
10 tajia ovat Fusarium-homeet, mutta esimerkiksi myös Al-
tenaria-, Aspergillus-, Nigrospora-, Penicillium- ja
Stemphylium-sukuihin kuuluvilla homeilla esiintyy yli-
kuohunta-aktiivisuutta. Homeiden tuottamia ylikuohun-
tatekijöitä on tutkittu vuosikymmenien ajan, mutta
15 niitä ei ole pystytty tarkasti osoittamaan ja karakte-
risoimaan. Ylikuohuntatekijöiden on todettu olevan
peptidejä tai ainakin peptidejä sisältäviä yhdisteitä.
Niiden on lisäksi todettu olevan hydrofobisia ja luon-
teeltaan happamia. Useimpien homeiden ylikuohuntateki-
20 jät sisältävät varsin runsaasti kysteiiniä. Viimeai-
kaiset tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että
ylikuohuntatekijät olisivat konsentroituneet ohran
kuorikerrokseen.

Tällä hetkellä oluen ylikuohuntataipumus tes-
25 tataan määrittämällä ohraerän Fusarium-homeilla saas-
tuneiden jyvien osuus. Ohraerä hylätään, jos saastu-
neiden jyvien osuus ylittää sallitun raja-arvon. Mene-
telmä on työläs ja hidas eikä se ole kvantitatiivinen.
Menetelmän suurin heikkous on siinä, ettei sillä pys-
30 tytä määrittämään ylikuohunnan todellista aiheuttajaa,
ylikuohuntatekijää. Näin ollen tulokset voivat johtaa
vääriin johtopäätöksiin.

Keksinnön tarkoituksena on poistaa edellä
mainitut epäkohdat.

35 Erityisesti keksinnön tarkoituksena on tuoda
esiin luotettava ja laadunvalvontaan soveltuva mene-
telmä juomien, erityisesti oluen ylikuohuntataipumuk-

sen määrittämiseksi juomien raaka-aineista. Erityisesti menetelmän tarkoituksena on määrittää oluen todellisen ylikuohuntatekijän määrä viljasta.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä on esitetty patenttivaatimuksessa 1.

Keksintö perustuu suoritettuun tutkimustyöhön, jossa tutkittiin oluen ylikuohunnan aiheuttajia ja jossa havaittiin, että homeiden tuottamat hydrofobiset proteiinit, hydrofobiinit, ovat oluen ylikuohuntatekijöitä.

Hydrofobiinit ovat pieniä homeiden tuottamia hydrofobisia proteiineja, jotka sisältävät yleensä esim. 100 ± 25 aminohappoa. Hydrofobiineja on tähän mennessä eristetty useista homeista ja syötävistä sienistä. Tunnusomaista hydrofobiineille ovat niiden 8 kysteiniinitähdettä, jotka ovat sijoittuneet proteiiniin tietyn kaavan mukaisesti. Hydrofobiineja esiintyy homeiden myseelin ja itiöiden pinnalla sekä erittyneenä kasvualustassa. Hydrofobiinit välittävät homerihmasto-

jen kiinnittymistä kasvualustaan ja toisiinsa sekä muodostavat ilmarihmaston ja itiöiden pinnalle vettymiseltä suojaavan kerroksen. Hydrofobiinien on todettu kerääntyvän faasien rajapintaan, esimerkiksi kasvuliukoksessa ilmakuplien pinnalle, jolloin ne muodostavat rajapinnalle amfipaattisia kalvoja. Kalvonmuodostuskynsä ansiosta hydrofobiinit muuttavat aineiden pintam ominaisuuksia hydrofobisesta hydrofiiliseksi ja päinvastoin. Niiden kyky alentaa vesiliuoksen pintajännitystä on samaa luokkaa kuin eräillä synteettisillä detergenteillä. Hydrofobiineja on kuvattu mm. seuraavissa artikkeleissa Wessels, J.G.H., Hydrofobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface, Advances in Microbial Physiology, vol. 38, 1997 Academic Press Limited, s. 1-45 ja Wessels, J.G.H., Fungal hydrofobins: proteins that function at an interface, Trends in Plant Science, vol. 1, s. 9-15. Hydrofobiinit stabiloivat kuplia aiheuttaen kasvuliuoksen kuohu-

mista. Nyt homeista eristetyn hydrofobiinin on todettu aiheuttavan oluen ylikuohuntaa.

Keksinnön mukaisesti hydrofobiinin määrä juoman raaka-aineesta ja/tai juomasta, erityisesti viljasta, kuten ohrasta, maltaasta ja/tai oluesta voidaan
5 määrittää millä tahansa hydrofobiinin määrittämiseen soveltuvalla menetelmällä.

Eräässä edullisessa sovellutuksessa hydrofobiini määritetään immunologisesti hydrofobiiniantigeenin ja vasta-aineen välisellä immunologisella reaktiolla. Immunologinen menetelmä voi olla immunoradiometrinen, -entsymetrinen, -fluorimetrinen tai -lumino-
10 metrinen menetelmä. Määrittämisessä tarvittavat hydrofobiiniproteiineille spesifiset vasta-aineet valmistetaan tavanomaisilla vasta-aineiden valmistusmenetel-
15 millä.

Hydrofobiiniproteiineja voidaan eristää ylikuohunta-aktiivisuutta omaavista homekannoista ja etenkin Fusarium-kannoista. Käyttökelpoisia kantoja
20 ovat esim. Gibberella avenacea (F.avenaceum), F.culmorum, F.poeae, Gibberella zeae (F.graminearum), Nigrospora sp. ja T.reesei. Hydrofobiineja voidaan eristää homeyseenistä ja/tai kasvuliuksista tavanomaisin menetelmin esim. uuttamalla, kuplittamalla
25 ja/tai kylmäkuivaamalla.

Hydrofobiini voidaan eristää myseelistä kolmivaiheisella uuttomenetelmällä ja/tai kasvuliuksesta kuplittamalla liuosta, jolloin hydrofobiini rikastuu
30 syntyvään vaahtoon, ja/tai pakastamalla kasvuliuos, jolloin hydrofobiini sakkautuu ja se voidaan erottaa fuugaamalla liuoksen sulatuksen jälkeen.

Menetelmän eräässä edullisessa sovellutuksessa hydrofobiinin määrittämiseksi käytetään ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) -menetelmää. Menetelmän entsyymireaktiossa syntyvä väri tai fluoresenssi
35 osoittaa hydrofobiinin olemassaolon ja määrän. ELISA-menetelmää, vasta-aineiden valmistusta ja puhdis-

tusta, siinä käytettäviä entsyymejä, konjugaatteja ja substraatteja on kuvattu mm. seuraavassa artikkelissa Vaag, P., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Beverage Industries: Principles and Practice, Analysis of Non-Alcoholic Beverages (Modern Methods of Plant Analysis, new series vol 8), Eds. Liskens, H.H. ja Jackson, J.F., Springer-Verlag, Berlin 1988, s. 1-29.

Menetelmässä voidaan käyttää myös muita vastaavia immunologisia menetelmiä, kuten EBStrALISA (Enzyme Biotin Streptavidin Linked ImmunoSorbent Assay) -menetelmää. EBStrALISA-menetelmää on kuvattu mm. artikkelissa Vaag, P., Immunological detection of Fusarium in barley and malt, Proc. Eur. Brew. Conv. Lisbon 1991, s. 553-560.

Menetelmän eräässä toisessa edullisessa sovellutuksessa hydrofobiini määritetään immunokromatografisesti käyttäen immunokromatografiaan perustuvaa testiliuskaa. Menetelmän immunologisessa reaktiossa syntyvä väri osoittaa hydrofobiinin olemassaolon ja määrän.

Käytettävä testiliuska voi käsittää esim. kromatografisen membraanin, jossa on liikkuvia leimapartikkeleita ja kaksi paikallaan pysyvää hydrofobiinin vasta-ainealuetta. Näyte absorboidaan testiliuskan membraaniin, jossa reagoi leiman kanssa ja kulkeutuu membraanin vasta-ainealueille. Jos näyte sisältää hydrofobiinia vasta-ainealueille muodostuu immunologisessa reaktiossa syntyvät värilliset testi- ja kontrolliviivat. Mikäli näyte ei sisällä hydrofobiinia muodostuu ainoastaan kontrolliviiva.

Keksinnön ansiosta teollisuuden laadunvalvonassa käytössä oleva puolikvantitatiivinen, Fusarium-sienen osoittamiseen perustuva detektiomenetelmä voidaan korvata uudella luotettavalla täsmämenetelmällä määritettäessä viljasta primäärinen ylikuohuntatekijä. Valitsemalla käytettävä vilja, erityisesti ohra uuden

menetelmän avulla voidaan turhien ja kalliiksi osoit-
tautuneiden varotoimenpiteiden tarvetta vähentää eri-
tyisesti riskivuosina, jolloin viljan laatu on huonoa
ja ylikuuhuntaa esiintyy runsaasti viljasta tuotetussa
5 oluessa.

Edelleen uusi immunologinen detektiomenetelmä
tarjoaa aiempaa nopeamman ja yksinkertaisemman ja si-
ten halvemman menetelmän ohran ylikuuhuntataipumuksen
määrittämiseksi.

10 Seuraavassa keksintöä kuvataan yksityiskoh-
taisemmin oheisissa esimerkeissä.

Esimerkki 1. Hydrofobiinien eristys ja osoit-
taminen

Hydrofobiinia eristettiin ylikuuhunta-
15 aktiviteettia omaavista homekannoista: Gibberella ave-
nacea (F.avenaceum) (VTT-D-80141), F.culmorum (VTT-D-
80148), F.poa (VTT-D-82182), Gibberella zeae
(F.graminearum) (VTT-D-95470), Nigrospora sp. (VTT-D-
79122) ja T.reesei (VTT-D-74075).

20 Homeita kasvatettiin kolmella erilaisella
alustalla, agarilla, kasvuliuksessa ja ohrassa. Hyd-
rofobiini eristettiin kolmivaiheisella uuttomenetel-
mällä sekä kasvuliusta kuplittamalla. Näytteen sisäl-
tämien proteiinien molekyylijakauma selvitettiin gee-
25 lielektroforeesilla. T.reesei-kannan tuottama hydrofo-
biini on kooltaan noin 7,5 kDa. Nigrospora sp.-kannan
(myseeliuutto) ja F.poa-kannan (kasvuliuksen kupli-
tus) tuottamat hydrofobiinit olivat kooltaan samaa
suuruusluokkaa. Gibberella zeae-kannan myseelistä uu-
30 tettu hydrofobiini oli kooltaan noin 20 kDa.

Hydrofobiinien osoittamiseen näytteestä käy-
tettiin immunologista ELISA-testiä. Testissä käytettä-
vä vasta-aine valmistettiin käyttämällä seuraavaa im-
munisointiprotokollaa. Kani immunisoitiin puhdistetul-
35 la T.reesei-homeen tuottamalla hydrofobiinilla, jota
sekoitettiin Freund'n adjuvanttiin. Pistoksia annet-
tiin 4 kertaa kolmen kuukauden aikana. Tiitterin ke-

hittymistä seurattiin määrittämällä kaksi kertaa veren vasta-ainepitoisuus ELISA-menetelmällä. Immunisointijakson loputtua kanin veri kerättiin talteen ja verestä erotettiin seerumi. Seerumin reaktiivisuus testattiin määrittämällä se seerumilaimennos, joka vielä antaa vasteen ELISA-menetelmässä. Laimennos oli yli 1/100 000.

Testissä hydrofobiininäytettä pipetoitiin mikrotiitterilevyn kuoppiin, jolloin näytteen proteiinit kiinnittyivät kuoppien seinämiin. Seuraavaksi lisätty hydrofobiinivasta-aine tunnisti seinämistä hydrofobiiniproteiinin ja kiinnittyi siihen. Tämän jälkeen lisätty konjugaatti kiinnittyi vuorostaan vasta-aineeseen. Konjugaatti sisälsi entsyymien, joka muutti kuoppiin pipetoidun substraatin värilliseksi. Substraatin värin voimakkuus oli suoraan verrannollinen näytteen hydrofobiinipitoisuuteen.

Korkeimmat vasteet saatiin F.poaen, Nigrospora sp.:n ja T.reesein hydrofobiininäytteistä.

Esimerkki 2. Hydrofobiinin määrittäminen ohra- teestä

Ohraa kontaminoitiin esimerkin 1 Fusarium-kannoilla ja T.reesei-kannalla kaksi viikkoa. Ohraute valmistettiin sekoittamalla 50 g ohraa/100 ml vettä 1 min ajan. Ohra-vesiseosta fuugattiin 15 min nopeudella 4000 g. Supernatantti otettiin talteen ja uutteen sisältämä hydrofobiini määritettiin suoralla ELISA-menetelmällä käyttäen T.reesein hydrofobiinia vastaan valmistettua vasta-ainetta.

Mikrotiitterilevyille pipetoitiin 150 µl/kuoppa ohrautelaimeesta 1/10 ja 1/100. Laimennokset tehtiin natriumfosfaattipuskuriin (10 mM natriumfosfaattia pH 7,3, 150 mM natriumkloridia = PBS-liuos). Levyn annettiin olla yön yli jääkaapissa. Seuraavana päivänä levyille pipetoitiin 100 µl/kuoppa PBS-liuosta, jossa oli 0,1 % naudan seerumin albumiinia ja 0,05 % Tween 20 -liuosta (=BSA/PBS-liuos). Levyn an-

- nettiin olla yli yön kylmässä, minkä jälkeen se pestiin PBS-liuoksella, johon oli lisätty 0,01 % Tween 20-liuosta (PBST-liuos). Hydrofobiinivasta-aineesta tehtiin laimennos 1/100 BSA/PBS-liuokseen. Vastainelaimennosta pipetoitiin levyille 100 µl/kuoppa ja levyä inkuboitiin 2 h +37 °C:ssa. Levy pestiin PBST-liuoksella. Seuraavaksi levyille pipetoitiin 100 µl/kuoppa konjugaattia: vuohen anti-kani IgG alkaalinen fosfataasi, laimennos 1/1000 BSA/PBS-liuokseen.
- 10 Levyä inkubointiin 2 h +37 °C:ssa ja pestiin PBST-liuoksella. Viimeiseksi levyille pipetoitiin 100 µl/kuoppa substraattia: 1 tabletti p-nitrofenyyli-fosfaattia/5 ml dietyleeniamiini+MgCl₂ -puskuria. Levyä inkuboitiin ravistelijassa 30 min huoneenlämpötilassa.
- 15 Absorbanssi mitattiin 405 nm aallonpituudella Multiscan-fotometrillä. Värin intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteen sisältämän hydrofobiinin määrään. Ohrautenäytteiden absorbanssit on esitetty taulukossa 1.
- 20 Taulukko 1.

Näyte	Näytelaimennos	
	1/10	1/100
Kontrolli	0,551	0,388
VTT-D-80141	1,823	1,360
VTT-D-80148	0,452	0,374
VTT-D-82182	1,088	0,898
VTT-D-95470	0,664	0,634
VTT-D-74075	0,863	1,914

Korkeimmat hydrofobiinipitoisuudet määritettiin homekannoilla Gibberella avenacea, F.poea ja T.reesei kontaminoiduista ohranäytteistä.

- 25 Menetelmä soveltuu hyvin myös mallasnäytteille.

Esimerkki 3. Oluen ylikuohuntakokeet

Oluen ylikuohuntakoe suoritettiin lisäämällä olutpulloon 0,5 - 1 ml hydrofobiininäytettä. Pulloa

ravisteltiin 3 vuorokautta huoneenlämmössä, jonka jälkeen se avattiin ja ylikuohuvan oluen määrä määritettiin pullon painonmuutoksesta.

- 5 T.reesein (myseeliuutto) ja F.poaen (kasvu-
liuoksen kuplitus) hydrofobiininäytteet aiheuttivat
erityisen voimakasta ylikuohuntaa. Edellinen näyte aiheutti jopa yli 50 % ja jälkimmäinen 30 - 45 % ylikuohuntaa. Nigrospora sp.:n (myseeliuutto) hydrofobiininäyte aiheutti toistuvaa 1 - 10 % ylikuohuntaa. Myös
10 muiden tutkittujen homeiden hydrofobiininäytteet aiheuttivat oluen ylikuohuntaa vaihtelevasti.

Tehtyjen kokeiden perusteella hydrofobiini-proteiinit aiheuttavat oluen ylikuohuntaa.

- 15 Keksintöä ei rajata pelkästään edellä esitettyjä sovellutusesimerkkejä koskevaksi, vaan monet muunnokset ovat mahdollisia pysyttäessä patenttivaatimusten määrittelemän keksinnöllisen ajatuksen puitteissa.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä juoman ylikuohuntatekijän määrittämiseksi, tunnettu siitä, että hydrofobiinin määrä määritetään juoman raaka-aineesta ja/tai juomasta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määritetään ylikuohuntatekijä oluessa siten, että hydrofobiinin määrä määritetään viljasta, maltaasta ja/tai oluesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hydrofobiini määritetään immunologisesti hydrofobiiniantigeenin ja vasta-aineen välisellä immunologisella reaktiolla.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hydrofobiini määritetään ELISA-menetelmällä, EBStrALISA-menetelmällä ja/tai immunokromatografisesti.

PATENTKRAV

1. Förfarande för bestämning av en drycks överskumningsfaktor, k ä n n e t e c k n a t därav, att hydrofobin halten i dryckens råmaterial och/eller i drycken bestäms.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att överskumningsfaktorn för öl bestäms så, att hydrofobin halten i säden, malten och/eller i ölet bestäms.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att hydrofobin bestäms immunologiskt genom den immunologiska reaktionen mellan hydrofobinantigenen och antikroppen.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att halten hydrofobin bestäms med ELISA-förfarandet, EBStrALISA-förfarandet och/eller immunokromatografiskt.