

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680037057.2

[51] Int. Cl.

A01N 43/90 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A23B 7/155 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月8日

[11] 公开号 CN 101282645A

[22] 申请日 2006.9.29

[21] 申请号 200680037057.2

[30] 优先权

[32] 2005.10.4 [33] EP [31] 05109190.8

[86] 国际申请 PCT/EP2006/066909 2006.9.29

[87] 国际公布 WO2007/039572 英 2007.4.12

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.3

[71] 申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 弗迪南得·桑朵斯·乔则夫·里简·

范 威廉·约翰内斯·威尔德波尔

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有
限责任公司

代理人 肖善强

权利要求书 3 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

改良的抗真菌组合物

[57] 摘要

本发明涉及改进的抗真菌组合物、制备该组合物的方法及其作为防腐剂的用途。

1. 用于从含有生物质和纳他霉素的发酵液中生产纳他霉素的一种方法，所述方法包括：

(a) 分裂所述生物质；

(b) 将所述纳他霉素从如此处理的发酵液中分离，获得纳他霉素悬浮液；

(c) 将所述纳他霉素悬浮液的 pH 调节至大于 10 的值并添加一定量的实质上能与水混溶的溶剂，所述量足够溶解所述纳他霉素悬浮液中的纳他霉素；

(d) 从所述经 pH 调节的纳他霉素溶液中去除不溶固体；

(e) 将步骤(d)中获得的所述溶液的 pH 降低至足够沉淀所述纳他霉素的水平；和

(f) 从所述纳他霉素悬浮液中取出所述纳他霉素；

(g) 任选地干燥所述取出的纳他霉素；和

(h) 任选地减小所述经干燥的纳他霉素的尺寸。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中存在于所述发酵液中的所述纳他霉素是固体形式。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述固体纳他霉素包含纳他霉素颗粒。

4. 根据权利要求 1 到 3 的方法，其中步骤(a)中所述生物质的分裂包括以下技术和/或处理之一或组合：匀化、高切应力混合、超声、加热、碱处理、酶处理或用表面活性剂处理。

5. 根据权利要求 1 到 4 中任一项的方法，其中步骤(b)中所述纳他霉素的分离包括一种重力梯度分离技术。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述重力梯度分离技术是重力梯度离心技术或使用上流柱或旋流分离器。

7. 根据权利要求 1 到 6 的方法，其中步骤(c)中使用的所述能与水混溶的溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、丙二醇、异丙醇、四氢呋喃及其组

合。

8. 根据权利要求 1 到 7 的方法, 其中步骤(c)的 pH 被调节至 10.0 和 11.0 范围内的值。

9. 根据权利要求 1 到 8 的方法, 其中步骤(b)通过膜过滤、深度过滤或离心进行。

10. 根据权利要求 1 到 9 的方法, 其中步骤(e)中 pH 被降低至 5.0 和 8.0 之间范围内的值。

11. 根据权利要求 1 到 10 的方法, 其中步骤(f)通过膜过滤进行。

12. 根据权利要求 1 到 11 的方法, 其中所述发酵液含有至少 2 g/l 纳他霉素。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中所述发酵液含有至少 7 g/l 纳他霉素。

14. 根据权利要求 1 到 13 中任一项的方法, 其中所述发酵液包含具有至少 2 微米的平均颗粒直径的纳他霉素颗粒。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所述纳他霉素颗粒具有至少 5 微米的平均颗粒直径。

16. 根据权利要求 14 或 15 的方法, 其中所述纳他霉素颗粒具有至少 10 微米的平均颗粒直径。

17. 能够通过根据权利要求 1 到 16 中任一项的方法获得的纳他霉素, 特征在于

(i) 当在载体上接触时, 在至少 9 天后显示降低 1% 到 45% 的释放率, 所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷;

(ii) 当在载体上测试时, 在至少 9 天后显示介于初始载体负荷 6% 到 10% 之间的释放率, 所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷;

(iii) 当在载体上接触时, 在最初的 24 小时显示介于每 24 小时 0.1 μg 和 2.0 μg 之间的释放率, 所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 40 μg 纳他霉素的载体负荷;

(iv) 当在载体上接触时, 在最初的 24 小时显示介于每 24 小时 0.1 μg

和 1.0 μg 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 10 μg 纳他霉素的载体负荷。

18. 根据权利要求 17 的纳他霉素，其中存在能与水混溶的溶剂。

19. 根据权利要求 18 的纳他霉素，其中所述能与水混溶的溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、丙二醇、异丙醇、四氢呋喃及其组合。

20. 一种抗真菌组合物，其包含根据权利要求 17 到 19 的纳他霉素。

21. 根据权利要求 20 的一种抗真菌组合物，其中所述组合物额外地包含至少一种其它抗微生物剂，所述抗微生物剂选自由弱酸防腐剂、二氧化硫、亚硫酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、二甲基碳酸氢盐、联苯、联二苯、邻苯基苯酚、硫苯哒唑、无机酸、咪唑和细菌素组成的组。

22. 用根据权利要求 20 或 21 的所述抗真菌组合物处理过的制品。

23. 根据权利要求 10 或 21 的所述抗真菌组合物用于处理容易真菌腐败的制品的用途。

24. 对容易真菌腐败的制品防腐的方法，所述方法用权利要求 20 或 21 的所述抗真菌组合物处理所述制品。

改良的抗真菌组合物

技术领域

本发明涉及改良的抗真菌组合物、制备这类抗真菌组合物的方法及其用途。

背景技术

对改良的食物防腐方法的需求是巨大的。据估计约四分之一的世界食物供应由于微生物引起的腐败（spoilage）和食物携带的微生物感染而损失，其代表了对人类健康的持久和严重的威胁。

真菌引起腐败可以导致严重的经济损失。若干种食品（例如农业制品、乳和肉制品、水果和蔬菜衍生制品、烘培制品）和化妆品对真菌生长非常敏感。乳制品的例子为奶酪、农家鲜干酪(cottage cheese)、乳清干酪(ricotta)和酸乳。干燥固化的香肠是肉制品的一个例子。农产品的例子是农作物，如谷物、坚果、水果、蔬菜和球茎(bulb)。真菌引起的腐败不仅影响制品的品质，而且代表了一种健康风险。众所周知例如在乳制品和香肠中生长的一些真菌物种可以产生真菌毒素。一些真菌毒素是极度危险的，因为它们能够引起致命的疾病。因此，不期望的真菌在食品中和食品上的过度生长(outgrowth)应当总是被预防的。

食物防腐技术（例如热加工、冷冻、超声、辐照和经改进的大气包装）显著地减少了微生物负荷，但是特别值得关注的是经加工的食物在加工之后和包装之前被微生物污染。在食品工业中更加值得注意的是微生物导致的多种食物（例如乳制品和肉制品、馅料(dressings)、涂抹料(spreads)、人造黄油和海鲜）的腐败。特别地，已知在 2.0 到 7.0 的 pH 范围内的食品对于酵母、真菌、耐酸细菌和/或形成嗜温或嗜热孢子的细菌和不形成孢子的细菌是易感的。

通常，经加工的食物不在加工后直接被食用，从而可能允许后期污染

(post-contamination)引入的细菌、酵母或霉菌生长。因为食物消耗可能不在将经加工的食物加热到足够温度维持足够时间后发生，所以存在食物中毒或食物腐败的风险。另外，近期对于最低限度加工食物以保持生鲜食物内在营养和口感品质的趋势已经带来了新的安全风险。更温和的防腐处理（例如高液体静力压和脉冲电场）已经被证明是成功的，但是依赖于有效的屏障，即低温运输系统和天然抗微生物剂的添加。

在食品安全领域已经进行了广泛的研究以开发有效的抗真菌组合物。纳他霉素 (Natamycin)，也被称为匹马霉素 (pimaricin) 或游霉素 (tennecetin)，是一种多烯抗生素，其自五十年代晚期为人们所知(Struyk et al, *Antibiot. Ann.* 1957-1958, 878)并且目前在许多食品和农产品中被用作防腐剂。US 5,821,233 公开了一种纳他霉素，当在载体上接触时，在最初 24 小时内显示至少 3 $\mu\text{g}/24$ 小时的高释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 40 μg 的纳他霉素载体负荷。US 5,997,926 公开了具有类似释放率的纳他霉素复合物。对于一些食物应用而言，具有高释放率的这种纳他霉素不提供足够的保护，因为例如保护的持续时间不够和/或纳他霉素的稳定性不是最佳的。因此，提供足够的保护将需要更大量的纳他霉素。具有高释放率的纳他霉素也可能在处理的产品中过于穿透，这在一些产品中是不期望的。

为了调控纳他霉素的释放，已经提出了封装(encapsulation)，参阅例如 WO2005/018322 和 US2005/042341。封装不改变纳他霉素本身的特征，但是它尝试通过提供额外的屏障确保纳他霉素的更缓慢释放。这自动地需要在从纳他霉素来源回收之后的额外配制步骤，相对于纳他霉素自身会被改变以给出更缓慢的释放的生产过程来说，这会使得纳他霉素生产过程更加复杂。

因此，仍然存在对改良的抗真菌组合物的需要，所述组合物能够解决至少一些下述问题：更慢的释放、更长的保护时间和/或提高的稳定性。

发明详述

本发明涉及一种改良的抗真菌组合物，特别提供了纳他霉素，所述组

合物显示低的纳他霉素释放率。该纳他霉素优选使用下文定义的方法制备。

用于制备显示低释放率的纳他霉素的方法

本发明涉及用于生产本发明的纳他霉素的方法，所述纳他霉素具有下文定义的低纳他霉素释放率。在本发明的方法中，纳他霉素从含有生物质（biomass）和纳他霉素的发酵液中回收，所述方法包括：

- (a) 分裂生物质；
- (b) 将纳他霉素从被如此处理的发酵液中分离，获得纳他霉素悬浮液；
- (c) 将所述纳他霉素悬浮液的 pH 调节至大于 10 的值并添加一定量的实质上能与水混溶的溶剂，所述量足够溶解所述纳他霉素悬浮液中的纳他霉素；
- (d) 从所述经 pH 调节的纳他霉素溶液中去除不溶性固体；
- (e) 将步骤(d)中获得的所述溶液的 pH 降低至足够沉淀纳他霉素的水平，并形成纳他霉素悬浮液；和
- (f) 从所述纳他霉素悬浮液中取出纳他霉素。
- (g) 任选地干燥所述取出的纳他霉素；
- (h) 和任选地减小所述经干燥的纳他霉素的尺寸。

本发明方法的第一个优点在于不需经过封装或其它复杂加工的途径就得到一种纳他霉素制品，所述纳他霉素制品具有比高释放纳他霉素制剂（例如 US 5,997,926 和 US 5,821,233）和其它可商业获得的制剂（例如 Delvocid®和 Delvocid® Instant）更慢的释放率，如实施例中所述。同时，该释放率足够高以提供更久的保护。令人惊奇的是，根据本发明的生产方法导致一种制品，所述制品具有不能从现有技术预期的新特性。

第二个优点在于该方法维持了早期方法的优点（参阅例如 WO 97/29207），所述优点在于将纳他霉素从生物质和其它杂质中分离而不使用有机溶剂，这从环保角度来看是优选的。

发酵生产纳他霉素通常产生包含纳他霉素、生物质固体、溶解或悬浮

的营养物、其它发酵产物和水的发酵液。

发酵液通常含有至少 2 g/l 纳他霉素，优选至少 7 g/l 纳他霉素。例如，发酵液中的纳他霉素浓度可以是如 WO 93/03170 中公开的约 7 g/l。因为纳他霉素在典型的发酵条件下在水中具有非常低的溶解度，所以发酵液中的纳他霉素以固体形式存在。优选纳他霉素主要以固体形式存在。“主要”是指至少 50%，优选至少 70%和更优选至少 80%。固体纳他霉素是指“未溶于水的纳他霉素”。存在于发酵液中的固体形式的纳他霉素可优选包含纳他霉素颗粒。纳他霉素颗粒是纳他霉素晶体，其可例如具有以下形式：针形晶体、盘形晶体或类似的。纳他霉素颗粒在发酵中形成。纳他霉素颗粒通常具有介于 0.5-20 微米之间的直径。纳他霉素颗粒的直径是从颗粒的一部分到颗粒另一端的最大距离。已观察到直径大于 40 微米的针形纳他霉素颗粒。可使用显微镜测定直径。优选在本发明的方法中，发酵液包含下述纳他霉素颗粒，所述纳他霉素颗粒具有至少 2 微米的平均颗粒直径，更优选所述纳他霉素颗粒具有至少 5 微米的平均颗粒直径，最优选所述纳他霉素颗粒具有至少 10 微米的平均颗粒直径。

纳他霉素生产中使用的链霉菌 (*Streptomyces*) 生物的生物物质通常由菌丝团簇 (菌丝体) 组成，尽管其它形式的生物物质 (例如所谓的“团块”) 也可同样存在。在这些菌丝中存在区室，细胞活性位于其中。存在于簇中的这些菌丝的尺寸通常介于 10-30 微米 (直径在 0.5-1.0 微米范围内)。

根据优选的方法，纳他霉素主要以固体形式存在于发酵液中。优选至少 50%的纳他霉素以固体形式存在，更优选至少 70%，进一步更优选至少 80%。

步骤(a)

在本发明中，处理在发酵过程结束时获得的发酵液以便分裂生物物质。生物物质的分裂可导致细胞物质的溶胞、溶解以及团簇和菌丝的断裂 (尺寸减小)。生物物质的分裂可以通过用显微镜 (放大率 400 x) 观察生物物质来核查。如果通过显微镜几乎观察不到生物物质的任何团簇或菌丝，则分裂是完全的。生物物质的分裂也可以通过测量发酵液的粘度来确定。例如在团簇

类型的生物质分裂时，粘度降低。如果粘度不随着进一步的处理而显著降低，则生物质应已充分分裂。尽管在纳他霉素生产中使用的不同发酵条件或不同链霉菌生物可以导致发酵结束时存在有点差异的生物质形式，但是本领域技术人员能够找到用于任何发酵液的生物质分裂的合适持续时间。

匀化、高切应力混合和超声技术或热、pH（碱）或酶处理或用表面活性剂处理可以例如单独或组合使用，以便分裂生物质。选择分裂技术使得获得分裂而不显著影响纳他霉素。大部分纳他霉素（至少 80%，优选至多 100%）保持其固体形式，且纳他霉素活性不会显著降低。另外，本领域技术人员应当明白分裂技术可不显著影响纳他霉素颗粒尺寸。如果纳他霉素的颗粒尺寸像生物质的颗粒尺寸一样被减小，则从生物质中分离纳他霉素将会是困难的。分裂的一个有效例子是使用热处理，所述热处理任选地与 pH 处理组合使用。

可以在发酵结束时对发酵液应用热处理（例如在发酵罐中，在所有的材料（例如氧、碳或氮源）停止供给后）。热处理可在例如 30°C 到 50°C 进行例如 1 到 8 小时。优选地，热处理可以在 30°C 到 40°C 进行。更高的温度可能导致絮凝、沉淀和聚沉(coagulation)，这会不利地影响从纳他霉素颗粒分离生物质。

例如在 pH 8—10 下进行例如 1 到 8 小时的 pH 处理也可以在发酵结束时在发酵罐中容易地进行。在高于 10 的 pH 下，纳他霉素会变得更加易溶和更加容易失活，这可能不利地影响回收产率和最终纳他霉素的纯度。氢氧化钠或任何其它合适的苛性材料（例如氢氧化铵或氢氧化钾）可以用于提高 pH。碱孵育后，用盐酸或其它合适的酸（例如磷酸、硫酸或醋酸）中和发酵液。优选地，中和发生在从发酵液中分离纳他霉素之后。

酶处理可包括与细胞壁分解酶和/或有机聚合物分解酶一起孵育，所述酶例如溶菌酶、木聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶、葡聚糖酶、酯酶和淀粉酶。单独的或作为酶混合物的酶通常在该酶作用的最适条件下孵育。酶有助于细胞的裂解和有机聚合物的增溶。

匀化可涉及 Manton-Gaulin 型匀化器的使用。发酵液受压通过注入孔。生物质会因为压力而分裂。

可以通过对发酵液应用超声波获得通过超声技术的生物质分裂，这会提供细胞壁不能承受的细胞液振荡。通过高切应力混合分裂生物质涉及对生物质使用高剪切应力。这些高剪切应力可以通过搅拌或其它机械搅动获得。某些发酵罐可例如装配有搅拌设备，所述搅拌设备能够提供所需的高剪切应力，从而分裂生物质。发酵时，搅拌可适应生物质的最佳生长或纳他霉素生产条件。发酵后，可改变搅拌从而例如通过应用高搅拌速度来分裂生物质。高切应力混合也可例如通过使用高切应力 Waring（或其它）搅拌器来完成。

通过表面活性剂处理来分裂生物质可涉及例如辛基苯氧聚乙氧基乙醇化合物（例如 Triton 型化合物）的使用。发酵液可在例如 1 到 24 小时内与例如 0.01% 到 1% 的例如 Triton X-100 一起孵育。

步骤(b)

生物质分裂步骤后，从生物质分离纳他霉素获得纳他霉素悬浮液。由于分裂处理，现在生物质主要由小固体颗粒和/或溶解了的物质组成。发酵产物回收工艺中使用的常规分离技术主要用于从液相中分离固体，本发明中优选使用的分离技术从分裂的生物质中分离固体颗粒，所述分离例如以尺寸差异和/或密度差异为基础。本发明中优选使用的分离技术不会得到澄清的液相，但是会产生含有大部分较小和/或较低密度固体颗粒的杂乱液相（主要包含分裂的生物质）。

为了将生物质与纳他霉素颗粒分离，可以例如使用重力梯度分离技术处理发酵液。重力梯度分离技术将纳他霉素颗粒从可溶性和不溶性杂质中分离。重力梯度分离技术包括例如重力梯度离心，并可以例如使用上流柱和旋流分离器（hydrocyclone）。重力梯度分离技术利用下述原理：当对不同密度和/或尺寸的颗粒施加重力或等效力时，不同密度和/或尺寸的颗粒能够被分离。

在生物质分裂时，生物质颗粒变得更小。这使得可能将生物质与纳他霉素颗粒分离。通常使用重力梯度分离技术能够去除多于 90% 的分裂的生物质和其它杂质。可以通过向分裂的发酵液中添加水和/或盐（例如氯化

钠)来提高分离效率。

重力梯度分离技术的使用具有下述优点:可能根据所期望的最终产物纯度和产率来容易地改进或指导该方法。通过改变操作条件,可以提高纯度或产率。通常当纯度提高时产率会降低,反之亦然。根据本发明的方法可以例如提供以干物质计约 70 w/w%纯度(无水基础)的纳他霉素,产率约 90%。使用不同的方法参数,也可以用本发明的方法获得以干物质计约 90 w/w%纯度(无水基础)的纳他霉素,产率约 80%。甚至可能从一种发酵液中生产不同品质的若干种产物。

如果产物颗粒和杂质之间的颗粒密度和/或尺寸差异增大,重力梯度分离技术会给出更好的结果,例如更高的纯度和/或产率。因此,优选发酵液含有具有至少 2 微米平均颗粒直径的纳他霉素颗粒。优选使用显微镜测定直径。优选平均纳他霉素颗粒直径为至少 5 微米,更优选至少 10 微米。已经观察到含有约 25 微米平均直径的纳他霉素颗粒的发酵液。因为纳他霉素可以以低于 0.05 微米到约 40 微米范围内的直径存在于发酵液中,所以本领域技术人员明白分离时可能丢失最小的颗粒。另外,本领域技术人员应当明白,使用重力梯度分离技术可以获得高纯度的具有大直径的纳他霉素颗粒级分。进行重力梯度分离技术的条件确定了会回收何种纳他霉素级分。通常,通过例如在发酵中使用低切应力条件或通过用小纳他霉素颗粒接种发酵或通过延长发酵可以获得更大的纳他霉素颗粒。

可以通过进行(与标准离心操作相比)更短时间或更低每分钟转数的分批离心在实验室规模上模拟重力梯度离心,这可导致固体与液体清楚分离。

在生产规模上,离心通常连续进行。与该类型离心的标准操作相比,降低离心的持续时间,从而将纳他霉素与分裂的生物物质分离。持续时间越低,获得的纳他霉素纯度越高、产率越低。本领域技术人员能够找到对应于最优的或预期的纯度:产率比值的合适持续时间。

在步骤(b)结束时,获得的纳他霉素悬浮液优选具有下述总体积,所述总体积与原始发酵液相比大约为 5%到 10%并优选含有少于 20% v/v 的剩余生物物质。更优选获得的纳他霉素悬浮液具有下述总体积,所述总体积与

原始发酵液相比大约为 6%到 8%并含有少于 15% v/v 的剩余生物质。最优选获得的纳他霉素悬浮液具有下述总体积，所述总体积与原始发酵液相比大约为 6%到 8%并含有少于 10% v/v 的剩余生物质。

步骤(c)

在本发明方法的以下步骤中，将所述纳他霉素悬浮液的 pH 调节至至少 10 的值，并添加一定量的实质上能与水混溶的溶剂，所述量足够溶解所述纳他霉素悬浮液中的纳他霉素。

优选步骤(c)中使用的能与水混溶的溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙二醇、四氢呋喃。

根据一个优选的实施方案，将步骤(c)的 pH 调节至范围在 10.0 和 11.0 之间值，优选 10.2 和 10.8 之间，更优选 10.3 和 10.6 之间，最优选调节至约 10.4 的值。

优选通过添加合适量的碱性试剂，例如 NaOH、KOH、Na₂CO₃、K₂CO₃ 来调节纳他霉素悬浮液的 pH。

能与水混溶的溶剂的添加和纳他霉素悬浮液 pH 的提高得到包含被溶解的纳他霉素的溶液。

步骤(d)

随后，从所述经 pH 调节的纳他霉素溶液中去掉任何不溶性固体。可使用任何合适的方法（例如膜过滤、深度过滤或离心）进行不溶固体的去除。本领域技术人员应当能够使用任何上述技术进行不溶固体的去除。优选通过膜过滤随后深度过滤进行残余碎屑的去除。膜过滤之后，用丙醇溶液洗涤滤饼以去除滤饼上任何溶解的纳他霉素。优选丙醇溶液为 35% v/v。优选在具有至少 0.4 μm 孔径的过滤器上进行深度过滤。更优选该过滤器具有至少 0.25 μm 的孔径。

步骤(e)

随后，将纳他霉素溶液的 pH 降低至足够沉淀纳他霉素并形成纳他霉

素悬浮液的水平。任何酸性化学品可用于降低 pH。合适酸性化学品的一个例子是盐酸。pH 被降低为范围在 5.0 和 8.0 之间的值。优选 pH 被降低为范围在 5.0 和 7.0 之间的值，更优选在 5.5 和 6.5 之间。更优选 pH 被降低达到约 6.0 的值。优选使用小 pH 步骤降低 pH，从而确保具有高纯度的晶状结晶形成（优选在持续搅拌下）。

小 pH 步骤优选表示合适量的酸性剂被添加，以达到每 5 分钟降低 0.1 单位的 pH，优选 0.2 单位和更优选 0.3 单位的 pH。优选 pH 每 5 分钟被降低 0.3 个 pH 单位，直到溶液开始浑浊。在该 pH 下持续搅拌后，以每 3 分钟 0.3 个 pH 单位降低 pH，直到 pH 为 6.0。

任选地，在降低纳他霉素溶液的 pH 之前，可以将该溶液的温度从 20 °C 提高到 35 °C。

结晶后将纳他霉素浆体的温度降低至 5 °C 以提高产率。

步骤(f)

在本发明方法的另一步骤中，从所述纳他霉素悬浮液中取出纳他霉素。优选使用膜压滤机取出纳他霉素。过滤后使用丙醇溶液洗涤纳他霉素并随后通过将纳他霉素滤饼通风干燥。优选丙醇溶液为 35% v/v。优选产生的滤饼使用 70% 丙醇溶液再悬浮一次并随后过滤以进一步降低水含量。

步骤(g)

任选地，在分离步骤后，纳他霉素可以例如被干燥，从而获得干燥产物。可以使用任何便利的干燥技术，例如真空干燥、传导干燥或对流干燥。因为纳他霉素在其晶体形式（纳他霉素·3 H₂O）下是稳定的，所以不要将产物干燥至低于约 7% 的含水量是关键。真空干燥优选在约 40 °C 进行。

优选使用在真空下操作的 Nauta 混合机进行干燥。当达到 40 °C 的温度时完成干燥。优选干燥后，将纳他霉素的温度降低至低于 20 °C，以预防任何可能污染物的微生物生长。

步骤(h)

任选地，优选使用锤磨机将步骤(g)中获得的干燥纳他霉素粉碎，从而获得具有范围在 1 到 50 μm 、优选 1 到 10 μm 之间直径的结晶。根据一个优选的实施方案，如 US 6,576,617 中所述粉碎纳他霉素。

纳他霉素

令人惊奇的是，可以通过所述方法获得的纳他霉素相对于本领域已知的纳他霉素显示低的释放率和/或释放率的降低。因此，本发明也涉及可通过上述方法获得的纳他霉素。根据本发明的纳他霉素显示如下文定义的低释放率和/或释放率的降低。根据一个优选的实施方案，本发明的纳他霉素不掺入任何特异配方中来获得这些特征。是纳他霉素本身显示这些特征。技术人员应当理解本发明的范围不限于根据本发明的方法制备的纳他霉素。

通过释放率具有特定的降低来定义的纳他霉素

根据一个优选的实施方案，当在载体上接触时，本发明纳他霉素的释放率在至少 9 天后显示降低 1% 到 45%，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选这些条件下的释放率降低 10% 到 45%，进一步更优选降低 20% 到 45%，最优选降低 40% 到 45%。

优选地，当在载体上接触时，本发明纳他霉素的释放率在 9 天后显示降低 1% 到 45%，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 40 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选 9 天后这些条件下的释放率降低 10% 到 45%，进一步更优选降低 20% 到 45%，最优选降低 40% 到 45%。

进一步更优选地，当在载体上接触时，本发明纳他霉素的释放率在 9 天后显示降低 1% 到 35%，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 10 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率降低 10% 到 35%，进一步更优选降低 20% 到 35%，最优选降低 30% 到 35%。

通过具有特定的释放率定义的纳他霉素

根据另一优选的实施方案，当在载体上测试时，本发明的纳他霉素在至少 9 天后显示范围在初始载体负荷 6% 到 10% 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率范围在 6% 和 8% 之间，进一步更优选在 6% 和 7% 之间，最优选在 6% 和 6.5% 之间。

优选地，当在载体上测试时，本发明的纳他霉素在 11 天后显示范围在 0.60 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.90 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 10 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率范围在 0.60 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.80 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间，更优选在 0.60 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.70 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间，最优选在 0.60 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.65 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间。

进一步更优选地，当在载体上测试时，本发明的纳他霉素在 11 天后显示范围在 0.35 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.50 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率范围在 0.35 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.45 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间，最优选在 0.35 $\mu\text{g}/\text{天}$ 和 0.40 $\mu\text{g}/\text{天}$ 之间。

根据一个优选的实施方案，纳他霉素：

- 当在载体上接触时，在至少 9 天后显示降低 1% 到 45% 的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷，和/或

- 当在载体上测试时，在至少 9 天后显示范围在初始载体负荷 6% 到 10% 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷，和

- 当在载体上接触时，在最初的 24 小时显示范围在每 24 小时 0.1 μg 和 2.0 μg 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 40 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率在 0.5 和 2.0 之间，更优选在 1.0 和 2.0 之间，最优选在 1.5 和 2.0 之间

- 任选地，纳他霉素晶体具有范围在 1 μm 到 50 μm 之间、优选 1 μm 到 10 μm 之间的直径。

根据一个优选的实施方案，纳他霉素：

- 当在载体上接触时，在至少 9 天后显示降低 1% 到 45% 的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷和/或，

- 当在载体上测试时，在至少 9 天后显示范围在初始载体负荷 6% 到 10% 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 5 到 40 μg 纳他霉素的载体负荷，和

- 当在载体上接触时，在最初的 24 小时显示范围在每 24 小时 0.1 μg 和 1.0 μg 之间的释放率，所述载体具有 0.6 cm 直径的琼脂表面和 10 μg 纳他霉素的载体负荷。更优选释放率在 0.2 和 1.0 之间，更优选在 0.4 和 1.0 之间，最优选在 0.8 和 1.0 之间。

- 任选地，纳他霉素晶体具有范围在 1 μm 到 50 μm 之间、优选 1 μm 到 10 μm 之间的直径。

用于测量纳他霉素释放率的测试方法已描述于本申请的实施例 1 中。简言之，将包含纳他霉素的样品应用于载体上。载体可以是提供不受限制的水转运的任何材料。优选地，载体为滤纸盘，更优选为实施例 1 中使用的滤纸盘。随后将负载着纳他霉素组合物的载体应用于琼脂平板表面，所述琼脂平板用酵母或真菌细胞接种（在实施例中使用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞）。随后在一定温度下孵育琼脂平板和载体，使得纳他霉素在 24 小时内被释放进琼脂中（在实施例 1 中，该温度为 6°C）。从琼脂平板上去除载体后，将琼脂平板在允许所述细胞生长的条件下孵育（在实施例 1 中，该温度为 30°C）一段选定的时间。在该情况下，这段时间为 24 小时或 48 小时，取决于预期要测定的释放率类型。最后，测定纳他霉素的存在对琼脂中细胞生长的抑制，所述纳他霉素已从载体被释放进琼脂中。抑制区域的尺寸是从样品释放的纳他霉素的一个度量。

具有这类低纳他霉素释放率的纳他霉素对于例如期望长期保护的所有应用而言非常吸引人。例如在乳酪或香肠或其它肉制品（如家禽）或海鲜和烘焙制品中，其中期望至少若干周的对抗霉菌的保护。

根据优选的实施方案，能与水混溶的溶剂与本发明的纳他霉素一起存

在。优选能与水混溶的溶剂选自丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、丙二醇、四氢呋喃及其组合。

本发明纳他霉素的用途

本发明还涉及一种包含本发明纳他霉素的抗真菌组合物，所述本发明的纳他霉素显示低的纳他霉素释放率。根据优选的实施方案，本发明的抗真菌组合物额外包含至少另一种抗微生物剂，所述抗微生物剂选自由弱酸防腐剂、二氧化硫、亚硫酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、二甲基碳酸氢盐、联苯、联二苯、邻苯基苯酚、硫苯哒唑（thiobendazole）、无机酸、咪唑和细菌素（bacteriocin）组成的组。所有这些成分已经为本领域技术人员已知，并在下文大致描述：

1. 弱酸防腐剂，例如山梨酸、丙酸、苯甲酸、对-羟基苯甲酸、乳酸、柠檬酸、醋酸或其碱金属盐或碱土金属盐；
2. 多烯抗真菌化合物，优选纳他霉素；
3. 二氧化硫或亚硫酸盐；
4. 硝酸盐和亚硝酸盐；
5. 二甲基碳酸氢盐；
6. 联苯、联二苯、邻苯基苯酚或硫苯哒唑；
7. 无机酸，例如盐酸；
8. 咪唑，例如抑霉唑(imazalil)；和/或
9. 在本领域已知用作防腐剂的任何抗真菌化合物，所述防腐剂用于食品，农作物保护或水果、蔬菜或谷物的收获后处理，药物制品或化妆品制品。
10. 尼生素（nisin）或片球菌素（pediocin）或溶菌酶（lysozyme）。

优选抗微生物剂是弱有机酸防腐剂和/或纳他霉素。弱有机酸防腐剂可以是山梨酸、丙酸、苯甲酸、乳酸、柠檬酸、醋酸或其碱金属盐或碱土金属盐，或其混合物。根据更优选的实施方案，抗微生物剂是山梨酸、山梨酸钾或山梨酸钙；苯甲酸、苯甲酸钠、苯甲酸钾或苯甲酸钙；纳他霉素或其混合物。

包含细菌素的抗微生物组合物对细菌是活性的。尼生素是由微生物如 *Lactococcus lactis subsp. Lactis* 产生的一种肽样抗菌物质。其主要针对革兰氏阳性菌是活性的。尼生素是无毒的并不具有副作用。尼生素是一种公认为安全的(GRAS)物质并广泛应用于多种食物中。这类制品的例子是经加工的乳酪、乳、凝块的乳酪(clotted cream)、牛乳甜点、冰激凌混合物、蛋液、热烘焙的面粉制品、馅料和啤酒。尼生素是热稳定的,并能够经受灭菌温度而最低程度丧失活性。世界卫生组织生物标准化委员会已经确立了尼生素的国际标准制品,即国际单位(下文作 IU)。尼生素浓缩物的商品名 Delvoplus®和 Nisaplin®分别由 DSM 和 Danisco 发布。Delvoplus®和 Nisaplin®含有 2.5%的纯尼生素或每克 1 百万 IU。尼生素对食品防腐的有效水平范围为 10 IU/g 到 80 IU/g 或 0.25 ppm 到 20 ppm 的尼生素。

本发明还涉及用本发明的抗真菌组合物处理的制品。本发明的抗真菌组合物可以被用于处理大量食物和饲料制品,例如乳酪、切碎的乳酪、酸乳、黄油、经加工的肉制品、香肠、谷类、蔬菜、水果、水果制品和方便食品(ready to use meals)。抗真菌组合物也可以用于处理饮料,例如果汁、柠檬水、冰茶、酒和啤酒。农业应用(例如大田或温室中喷雾或收获后处理)也包括在本发明中。农作物的例子是谷类、水果、蔬菜、豆类、坚果、草药、花和植物。种子、花的球茎和马铃薯种子(seed potatoes)也可以用本发明的抗真菌组合物处理。药物或化妆品引用的例子是用于局部应用的组合物、乳液、乳霜、软膏、香波和香皂。

优选本发明的纳他霉素被掺入食物包衣中。优选包衣被用作肉制品或乳制品的包衣。如 EP 1 239 732B 中所述的所有包衣通过引用并入本文上下文中。简言之,这类包衣优选地被用于乳酪、香肠或衍生制品的包衣中。该专利中描述的所有类型的聚合物也可以用于包含本发明的纳他霉素的包衣中。另外,如 EP 1 239 732 B 中所述的抗氧化剂和/或螯合剂也可以被添加进本发明的纳他霉素中和/或包含本发明的纳他霉素的包衣中。

本发明也涉及本发明的抗真菌组合物用于处理容易真菌腐败的制品的用途。本发明另外涉及对容易真菌腐败的制品防腐的方法,所述方法用本发明的抗真菌组合物处理所述制品。

本发明通过以下的实施例进一步阐述，所述实施例不应被解释为限制本发明的范围。

实施例

实施例 1

用于测定抗真菌成分可用度的微生物学方法

该实施例描述了一种微生物学方法，所述方法用于测定抗真菌组合物中抗真菌成分的可用度（availability）。在该实施例中，纳他霉素为所述抗真菌成分。

将待测试的制剂上样到直径 0.6 cm 的滤纸盘（S&S Antibiotics Test Discs no. 321260）上使得每个盘负荷有 40 μg 的纳他霉素，例如向一个盘应用含有 800 ppm 纳他霉素的 50 ml 待测试样品。然后将盘置于琼脂上，所述琼脂用 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 接种。将含有琼脂的培养皿在 6°C 储存 24 小时以允许纳他霉素释放进琼脂中。在这些条件下，*Saccharomyces* 不生长。用溶解在水性甲醇中一定范围内已知量的纳他霉素新鲜上样的盘作为参比。

第二天，将样品盘转移至新的培养皿中，所述培养皿含有用 *Saccharomyces cerevisiae* 接种的琼脂。制备用一定范围内已知量的溶解的纳他霉素新鲜上样的新盘作为参比。带有样品的新盘和新的参比在 6°C 储存 24 小时，将含有已释放的纳他霉素的旧盘在 30°C 孵育 24 小时。

抑制区域的尺寸是从样品盘中释放的纳他霉素的一个度量。释放的纳他霉素的量能够通过本身已知的方法计算。通过重复操作，可以每天测量释放的纳他霉素。或者可以选择其它的释放时间段。

实施例 2

具有改良特性的纳他霉素的生产方法

将含有纳他霉素（其具有约 10 微米的平均颗粒直径）的 *Streptomyces natalensis* 发酵液在 35°C 的温度下孵育 3 小时。对经热处理的该发酵液进

行进一步的重力梯度离心处理。离心在下述条件下进行，所述条件使得大部分生物质固体与上清液一起被取出。该处理得到以干物质计约 70 w/w%（无水基础）的纳他霉素悬浮液。纳他霉素产率约 97%。然后添加丙醇溶液获得含有 35v/v%丙醇的纳他霉素悬浮液。添加 NaOH 溶液，将该悬浮液的 pH 提高至 10.4，从而溶解纳他霉素。随后使用膜压滤机过滤纳他霉素溶液，所述膜压滤机装备有具有至少 10 μm 孔径的滤布。随后使用 35v/v%丙醇溶液洗涤滤饼。膜过滤后，使用 0.25 微米的孔径进行深度过滤。随后使用 35v/v%丙醇溶液洗涤深度过滤滤器。深度过滤后，通过添加盐酸以每 5 分钟将 pH 降低 0.3 个 pH 单位的速度将滤液的 pH 降低至 6.0，从而将纳他霉素从所述滤液中沉淀。随后通过膜过滤去除母液。为了进一步降低水含量，使用丙醇溶液洗涤晶体。使用真空干燥器干燥产生的纳他霉素饼。然后将干燥的晶体微粒化为 1 到 10 微米之间。

实施例 3

比较本发明的纳他霉素与现有技术的纳他霉素的释放率

使用实施例 1 中所述方法，将新的低释放纳他霉素的释放率特征与已知商业纳他霉素 Delvacid® (DSM, The Netherlands)的释放率特征进行比较。如下制备纳他霉素制剂的悬浮液：每种悬浮液含有 800 ppm 纳他霉素。将 50 ml 各自混合物的每一种应用于滤纸盘上，并使用实施例 1 的方法分析释放率。结果总结于下表中。

表 1：初始释放率（40 mg 载体负荷）

	24 小时后的释放率 ($\mu\text{g}/24$ 小时)	48 小时后的释放率 ($\mu\text{g}/24$ 小时)
低释放纳他霉素	<2	<1.8
Delvacid®	<3	<2

表 2: 9天后释放率的降低

	释放率降低%
低释放纳他霉素 (10 µg 载体负荷)	35
低释放纳他霉素 (40 µg 载体负荷)	45
Delvolid® (40 µg 载体负荷)	58

表 3: 11天后的释放率

	释放率 (µg/24 小时)
低释放纳他霉素 (5 µg 载体负荷)	0.35
低释放纳他霉素 (10 µg 载体负荷)	0.6
低释放纳他霉素 (40 µg 载体负荷)	1.2
Delvolid® (10 µg 载体负荷)	1.1

根据本发明的缓释纳他霉素清楚地具有比可商业获得的纳他霉素制剂 (Delvolid®) 更慢的释放率。

实施例 4

比较本发明纳他霉素与现有技术饮料中纳他霉素的释放率

通过测量它们在多种饮料中的化学稳定性将新的低释放纳他霉素的释放率与已知的商业纳他霉素 Delvolid® Instant (DSM, The Netherlands) 的释放率进行比较。将纳他霉素制剂悬浮在饮料中, 达到 150 ppm 到 170 ppm 纳他霉素的终浓度。含有纳他霉素的饮料储存于 4°C 并及时测量饮料中纳他霉素的浓度。结果概括于下表中。

表 1: 饮料细节

饮料	制造商	pH
番茄汁	Appelsientje (J44E3 34:38), Friesland Foods, The Netherlands	4.2
冰茶	Plus Supermarket (05125SE25056), The Netherlands	3.2

表 2: 饮料中的纳他霉素降解

饮料	时间 (周)	总降解 (ppm)		
		缓释纳他霉素	来自 Delvocid® Instant 的纳他霉素	差异
番茄汁	1	5.1	8.6	3.5
	2	13.1	13.7	0.6
	3	20.1	26.5	6.4
	4	23.2	27.9	4.7
	5	28.9	32.6	3.7
冰茶	1	3.4	14.9	11.5
	2	5.4	15.5	11.1
	3	3.2	15.3	12.1
	4	15.0	28.2	13.2
	5	17.4	31.7	14.3

数据显示与 Delvocid® Instant 中的纳他霉素相比，番茄汁和冰茶中更少的缓释纳他霉素被降解。由于只有纳他霉素配方的溶解级分容易腐败，所以该结果表明缓释的纳他霉素的溶解级分比 Delvocid® Instant 中的纳他霉素溶解级分更小。因此，在两种饮料中，缓释纳他霉素的释放率均低于 Delvocid® Instant 的释放率。