



Figur 1. Fabrikken i Grindsted.

**Produktet virker mod de fleste gær- og skimmelsvampe og er nyttigt til produkter, der kræver bakteriel modning såsom ost og tørrede polser. Her beskrives fremstillingsprocessen, den antibakterielle aktivitet og anvendelsesmuligheder**

Af Linda V. Thomas, linda.thomas@danisco.com og Robert J. Evans, Danisco, Beamminster, UK

## Natamax – et naturligt antimikrobielt konserveringsmiddel

Danisco har for nylig færdiggjort en fabrik i Grindsted (figur 1) til produktion af det svampehæmmende naturlige konserveringsmiddel Natamax (figur 2). Produktet indeholder 50% natamycin i en blanding med laktose eller glukose, og det supplerer et andet af firmaets naturlige konserveringsmidler, Nisaplin, der modvirker bakteriel nedbrydning. Natamycin er blevet brugt i mange år som et sikkert, godkendt konserveringsmiddel til at forhindre ødelæggelse som følge af gær- eller skimmelvækst forbundet med bestemte føde- og drikkevarer [1]. Det blev først opdaget i 1955 i et kulturfiltrat af bakterien *Streptomyces natalensis* fra en stamme isoleret fra jord. Navnet natamycin er afledt af stedet for opdagelsen – provinsen Natal i Sydafrika. Et tidligere navn var pimaracin (navngivet efter den nærliggende by Pietermaritzberg), men dette navn accepterer WHO ikke længere.



Figur 2. Natamax, handelspræparatet af den polyene macrolid natamycin produceret af Danisco.

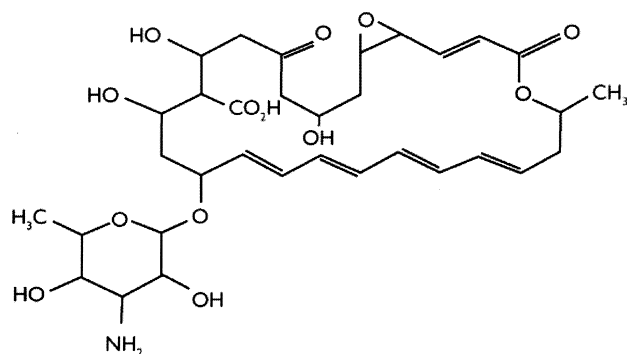
### Kemisk struktur og fysiske egenskaber

Natamycin er et tetraent polyen macrolid med en molekylvægt på 665,7 Dalton og den empiriske formel:  $C_{33}H_{47}NO_{13}$ . Strukturen er vist i figur 3, side 6. I dets almindelige krystallinske form findes natamycin som trihydrat, der med minimalt aktivitetstab kan opbevares i adskillige år som tørpulver. Faktorer såsom ekstreme pH-værdier, lys, oxidanter, chlor og tungmetaller påvirker stabiliteten. Ligesom mange andre polyene macrolider er natamycin en amforter og indeholder en syre- og en basegruppe. Lignende stoffer omfatter nystatin, rimodicyclin, lucenocylin, tetrin A, tetrin B og amphotericin [2–4].

### Produktion af natamycin

Handelspræparater fremstilles vha. kontrolleret gæring i dextrosebaseret medie af udvalgte *Strep. natalensis*-stammer i særligt designet gæringsudstyr. Varigheden af gæringen varierer fra 50 til over 200 timer afhængigt af podemængde, medie og ønsket udbytte. Gæringens inkubationstemperatur er mellem 25 og 30°C ved pH 6-8. Mange aspekter ved produktion af natamycin, især kulturmedieoptimering og natamycinudvinding, er beskrevet i litteraturen og er underlagt udstedte patenter. Eisenchink *et al.* [5] beskriver f.eks. et gæringsmedie, der indeholder proteinkomponenter af ikke-gær og af gær, som giver større udbytte. Optimering af næringsstoffer for *Strep. natalensis* i væskedækket batchkultur blev undersøgt af Farid *et al.* [6]. Produktion af natamycin krævede 20 g/l af glukose, og det højeste udbytte blev opnået i et medie med 0,05 g/l kaliumdihydrogenphosphat. En blanding af kødekstrakt (8 g/l) og gærekstrakt (2 g/l) så ud til synergistisk at øge produktionen.

Da natamycin er tungt opløseligt i vand (ca. 40 µg/ml), findes det først og fremmest som krystaller i gæringsvæsken og danner uopløselige partikler af forskellig størrelse. Når gæringen er afsluttet, oparbejdes natamycin normalt via en serie af ekstraktions-, filtrerings- og tørringsprocedurer. Tidlige patenter beskriver flere oprensningstrin, der normalt involverer relativt dyre processer. En mere enkel metode er at hæve gæringsvæskens pH til over pH 10 i nærværelse af et organisk opløsningsmiddel såsom methanol, butanol eller acetone for



Figur 3: Strukturen af natamycin.

at opløse natamycinen [8]. Den uopløselige biomasse og andre urenheder kan derefter fjernes ved filtrering. Når pH justeres til omkring pH 7, udfældes krystallinsk natamycin af opløsningen. Natamycin kan også oparbejdes ved at salte det ud af gæringsvæsken, hvorefter det bringes i opløsning i et opløsningsmiddel og udfældes ved inddampning [9]. Olsen *et al.* [10] har beskrevet en lignende proces, der omfatter methanolekstraktion ved lav temperatur og pH 1,0-4,5 efterfulgt af fjernelse af faste urenheder, justering til pH 6-9 og udvinding af udfældet natamycin. Opkoncentrering under vakuum eller butanolekstraktion af den filtrerede gæringsvæske, hvorfra natamycinen kan udvindes, er også blevet forsøgt [11]. En alternativ oparbejdningsmetode omfatter reduktion af biomassens partikelstørrelse, så natamycinen kan separeres fra væskeskulturen uden brug af et organisk opløsningsmiddel [1]. Det sker ved sønderdeling af det bakterielle mycelium vha. homogenisering eller meget kraftig omrøring. Separationsteknikker med gravitetsgradient bruges til at separere natamycinen.

Tørret natamycin udvundet af gæringsvæsken er hvidt til

cremefarvet, har næsten ingen lugt eller smag og er meget stabilt i krystallinsk form. Danisco-produktet er standardiseret til 50% natamycinstyrke blandet med laktose eller glukose og pakkes i flasker med 100 eller 500 g.

For at overholde kravene til brug i fødevarer skal indholdet af natamycin i det krystallinske materiale være over 95% på vandfri basis. Renheden af natamycin (og koncentrationen i fødevarer) kan bestemmes vha. methanolekstraktion efterfulgt af HPLC-analyse. Ultraviolet lys bruges normalt til at detektere natamycin, der har maksimum absorptionstoppe ved 220, 290, 303 og 318 nm og minimum ved 250, 295,5 og 311 nm. Alternativt kan natamycinkoncentrationer måles vha. en bioassay-metode med diffusion fra brønde og en standardgærindikatorstamme (figur 4).

### Antimikrobiel aktivitet

Gær og skimmel er et problem for både fødevarerproducenter og -forbrugere, da de kan forårsage ødelæggelse af fødevarer og forringe holdbarheden for mange produkter. Skimmelvækst er også en potentiel fare for forbrugeren, da nogle svampe producerer sekundære metabolitter herunder cancerfremkaldende mykotoksiner. Natamax virker mod de fleste gær- og skimmel-svampe, men har ingen effekt på bakterier, protozoer eller vira. Derfor er det nyttigt til produkter, der kræver bakteriel modning, f.eks. ost og tørrede pølser. Skimmelsvampe inhiberes normalt af koncentrationer på 1-12 mg/kg (figur 5). De fleste gærsvampe inhiberes af 2-10 mg/kg.

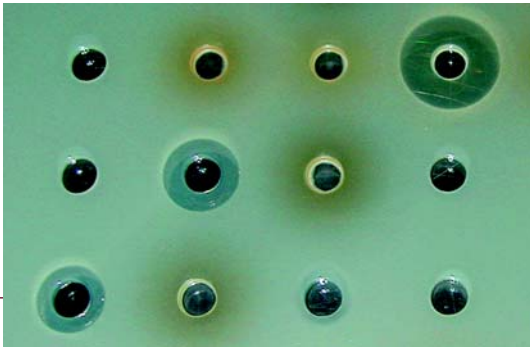
Natamycin har et meget bredt aktivitetspektrum over for gær- og skimmelsvampe, og det virker effektivt ved meget lave koncentrationer. I modsætning til sorbat er det et naturligt gæringsprodukt, og det har ingen negativ virkning på smagen, farven eller lugten af fødevareren. Det er også sikkert og kemisk stabilt med en forlænget aktivperiode.

En anden fordel ved natamycin er, at svampe ikke synes i stand til at udvikle resistens imod det. Det kan skyldes stoffets aktivitetsmekanisme, der involverer dannelsen af komplekser

Tabel 1. Anvendelser af Natamax med anbefalede doseringskoncentrationer og anvendelsesmetoder\*

Fødevareanvendelse	Anbefalet Natamax-koncentration mg/kg	Metode
Hård/fast ost	2500-4000	Overfladebehandling med spray eller neddykning
	1000	Direkte tilsætning til (oste)coatningsemulsionen
Kødprodukter: tørret pølse	2500-4000	Overfladebehandling med spray eller neddykning
Yoghurt	10-20	Direkte tilsætning til yoghurtblanding
Bageriprodukter	2500-4000	Overfladebehandling med spray
Tomatpuré/pasta	15	Direkte tilsætning under blanding
Frugtjuice	5-20	Direkte tilsætning
Vin	60-80	Direkte tilsætning for at stoppe gæring
	6-20	Tilsat efter gæring for at forhindre uønsket vækst af ødelæggende gær/skimmel

\* I nogle lande er Natamax mere anvendt end i andre. I Danmark begrænses anvendelsen til overfladebehandling af ost og tørrede pølser



Figur 4. Udsnit af en natamycin-bioassayplade med standardgærindikatoren *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763. Zoner med inhibering kan ses omkring brøndene, der er blevet påført prøver med forskellige koncentrationer af natamycin.

med steroler, især ergosterol, som er vigtige forbindelser i svampes cellemembraner (mutterede svampestammer, der ikke indeholder ergosterol, kan ikke overleve i naturen). Bindningen sprænger cellemembranen og øger dermed permeabiliteten, hvilket fører til celledød. Ergosterol er ikke til stede i cellemembraner på bakterier og protozoer, og derfor påvirkes disse mikroorganismer ikke af natamycin [12]. Natamycin er af samme grund også harmløst over for planter og dyr.

### Fødevareanvendelse

Omfattende toksikologiske test har vist, at natamycin er et sikkert tilsætningsstof i levnedsmidler, og mange lande tillader brugen af Natamax i specifikke fødevarer eller til generel brug som konserveringsmiddel. I EU er det f.eks. tilladt på overfladen af hård, fast og halvfast ost med en maksimal natamycin-koncentration på 1 mg/dm<sup>2</sup> med en penetrationsdybde i fødevareren på kun 5 mm. Regulatorerne et stort set de samme for overfladebehandling af tørrede pølser. Påføring sker normalt enten med spray eller ved neddykning i en koncentreret opslemning. Den lave opløselighed af natamycin i vand sikrer, at stoffet ikke trænger ind i fødevareren, men forbliver på overfladen, hvor aktiviteten er ønsket. Det er en særlig fordel, når det bruges til at konservere blåskimmelost. Vækst af ødelæggende skimmelsvampe på overfladen skal forhindres uden at inhibere den ønskede udvikling af den blå skimmel inde i osten. Det opnås ved, at osten først dyppes i en opløsning af produktet, hvorefter den blå skimmel indføres vha. et system af podepinde, der skubbes ind i osten. Sorbat kan ikke bruges på denne måde, da det vil trænge ned i podepindenes huller og inhibere den indre vækst af blå skimmel.

Ved anvendelser i f.eks. yoghurt, hytteost, vin og frugtjuice inkorporeres Natamax ved meget lave koncentrationer i levnedsmidlet [4]. Natamycin er også blevet brugt i sodavand, bær og rensed fjerkræ. Nyere arbejde i Daniscos laboratorier har bekræftet effektiviteten af natamycin (som Natamax) ved lave koncentrationer i æble-, appelsin- og ananasjuice. Væksten af en række ødelæggende gærarter og den varmeresistente skimmel *Byssoschlamys* kunne kontrolleres [4]. De mest almindelige anvendelser i forbindelse med fødevarer med anbefalede doseringskoncentrationer er vist i tabel 1. I Europa er det også blevet brugt til at behandle overfladen af kogte skinker. Den mest udbredte anvendelse og godkendelse af natamycin er i Sydafrika (hvor det blev opdaget), hvor det er almindeligt brugt i vin og juice. I USA er anvendelsen nu blevet udvidet, og natamycin er blevet tilladt på udskæringer og skiver af ost, creme



Figur 5. Demonstration af Natamax-aktivitet. De tre agarplader blev podet med en skimmel og inkuberet i 5 dage ved 25°C. Mikroorganismen er *Byssoschlamys fulva*, en varmeresistent skimmel, der ofte forårsager ødelæggelse i pasteuriseret frugtjuice. Den øverste plade til venstre viser omfanget af skimmelvækst uden natamycin. Den øverste plade til højre viser vækstinhibering med 2,5 ppm Natamax. Fuldstændig inhibering med 5 ppm Natamax er vist på den nederste plade.

fraiche, flødeost, hytteost og revet ost. Skimmelsvampes ødelæggelse af revet ost kan være et stort problem for producenter. Ødelæggelsen skyldes højst sandsynligt strimlernes store overflade kombineret med den ekstra håndtering ved rivning og pakning. Produkttab har været betydelige, men problemet kan nu kontrolleres effektivt.

Færdiggørelsen af den nye Danisco Natamax-fabrik i Grindsted vil gøre Danmark til en global leverandør af natamycin-produkter. Produkterne kan bruges til at øge fødevarsikkerheden og reducere spild som følge af svampeødelæggelse.

### Referencer

1. Stark, J. 1991. Permitted preservatives - natamycin. In: Encyclopaedia of Food Microbiology, Academic Press. pp 1776-1781.
2. Brik, H. 1981. Natamycin. pp. 513-561. In: Analytical profiles of drug substances, (red.) Flory, K. Academic Press, New York.
3. Hamilton-Miller, J.M.T. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bact. Rev. 37:166-196.
4. Thomas, L.V. og Delves - Broughton, J. 2001. Applications of the natural food preservative natamycin. Res. Adv. Food Sci. 2: 1-10.
5. Eisenchink, M. A., Millis, J. R., og Olson, P. T. 1996. A fermentation process for producing natamycin. EP600983.
6. Farid, M.A., El - Enhasy, H., El- Diwany, A.E og El Sayed, E-S.A. 2000. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. J. Basic Microbiol. 40:157-166.
7. Eisenchink, M. A., og Olson, P. T. 1993. Fermentation process for producing natamycin. US5231014.
8. Borden, G. W., Maher, J. og J., Sklavounos, C. 1999. Process for natamycin recovery. US Patent 5, 942,611.
9. Bridger, H. J. 1968. Tetraene antibiotic purification. US Patent 3,378,441.
10. Olsen, P. T., Millis, J. R., og Reimer, M. H. 1997. Natamycin recovery. US Patent 5,591,438.
11. Maldonado, F. S., Pla, L. C., Sousa-Faro, J. M. F. og Puentes, J. L. F. 1982. A process for the preparation of polyene antifungal antibiotics and new tetraene antifungal antibiotics. UK Patent Application 2,106,498A.
12. Hamilton-Miller, J.M.T. 1974. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. Adv. Appl. Microbiol. 17:109-134.