



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **304721**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ A 01 N 63/02

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19904729	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	27.02.1990, PCT/US90/01053
(22) Inng. dag	31.10.1990	(85) Videreføringsdag	31.10.1990
(24) Løpedag	27.02.1990	(30) Prioritet	01.03.1989, US, 317625
(41) Alm. tilgj.	15.11.1990		
(45) Meddelt dato	08.02.1999		
(73) Patenthaver	Ambi Inc, 4 Manhattanville Road, Purchase, NY 10577, US		
(72) Oppfinner	Peter Blackburn, New York, NY, US Sara-Ann Gusik, New York, NY, US June Polak, Brooklyn, NY, US Stephen D. Rubino, Harrison, NY, US		
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo		

(54) Benevnelse **Forsterket bredspektret baktericid sammensetning**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Bredspektrede bakteriocinsammensetninger er tilveiebragt. Sammensetningene kan bli oppløst eller suspendert i et egnet oppløsningmiddel eller en matrise og er mere aktive overfor et bredere område av bakterier enn noen av komponentpartene. De oppløste eller suspenderte sammensetningene utgjør forsterkede, bredspektrede baktericider. Sammensetningene omfatter lysostafin og lantionininneholdende peptidbakteriocin, lysostafin, et lantionin inneholdende peptidbakteriocin og et chelateringsmiddel; og lysostafin, et lantionininneholdende peptid, et chelateringsmiddel og et overflateaktivt middel. Hver komponent er tilstede i det forsterkede, bredspektrede baktericidet i tilstrekkelig mengde slik at baktericidet er mere effektivt overfor staphylococci enn lysostafin alene og er mere effektiv til å behandle en mengde mikrobielle infeksjoner.

Fremgangsmåte for behandling av bakterielle infeksjoner ved anvendelse av nevnte sammensetninger og baktericider, er tilveiebragt.

Foreliggende søknad vedrører forsterket bredspektret baktericid sammensetning.

5 Bakteriociner så som lysostafin og nisin er proteiner produsert av bakterier som hemmer veksten av, og noen ganger dreper, bakterier nær beslektet med arter med deres opprinnelse. Lysostafin er et bakteriocin som lyserer og dreper nesten alle kjente arter av *Staphylococcus*, men er inaktiv mot bakterier fra andre slekter. Lysostafin, isolert fra 10 kulturfiltrater av *Staphylococcus simulans* (NRRL B-2628) dyrket ifølge publiserte referanser, er en endopeptidase som spalter polyglycinkryssbindingene til peptidoglykan funnet i celleveggene til *Staphylococcus*. Kulterer av *S. simulans* dyrket under betingelser som induserer produksjon av 15 lysostafin er immune for bakteriocin, mens samme kulturer dyrket under betingelser hvorved lysostafin ikke blir produsert, er følsomme overfor bakteriocin.

Lysostafin er et naturlig forekommende bakteriocin utskilt 20 av en enkelt kjent *S. simulans*-stamme, opprinnelig isolert og betegnet *Staphylococcus staphylolyticus* av Schindler og Schuhardt. Produksjonen av lysostafin ved *S. staphylolyticus* er tidligere blitt beskrevet i US-patent nr. 3.278.378, utstedt 11. oktober 1966 og i Proceedings of the National 25 Academy of Sciences, 51:414-421 (1964). Enkeltorganismen *S. staphylolyticus* (NRRL B-2628) som produserte lysostafin, ble nylig identifisert som en biovar av *S. simulans* av Sloan et al., Int. J. System. Bacteriol., 32:170-174 (1982). På grunn av at navnet *S. staphylolyticus* ikke er på den godkjente 30 listen for bakterielle navn, er organismen som produserer lysostafin blitt betegnet på nytt som *S. simulans*.

Det er tidligere blitt vist at virkningen av lysostafin kan bli forsterket av penicillin og andre antibiotika. Se 35 inngitte US-patent nr. 4.980.163 til Blackburn et al.

Nisin, som noen ganger blir betegnet som et peptidanti-
biotika, kan heller bli betegnet som et bakteriocin. Nisin
blir produsert i naturen av forskjellige stammer av bakterien
Streptococcus lactis. Det er et matkonserveringsmiddel
5 anvendt for å hemme dannelsen av sporer fra visse arter av
gram positive bacilli, inkludert de som oppstår fra
Clostridium-stammene, kjent for å være ansvarlig for
Botulisme-matvareforgiftning. En oppsummering av nisins
egenskaper fremkommer i Hurst, *Advances in Applied Microbio-*
10 *logy*, 27:85-123 (1981). Publikasjonen beskriver hva som
generelt er kjent om nisin. Nisin, produsert av *Streptococcus*
lactis, er kommersielt tilgjengelig som et urent preparat,
Nisaplin, (Aplin & Barret Ltd., Dorset, England).

15 Nisin hører til klassen av peptider inneholdende lantionin.
Også innbefattet i den klassen er subtilin, epidermin,
cinnamycin, duramycin, ancovenin og Pep 5. Disse bakteriocin-
peptidene blir alle produsert av forskjellige mikroorganis-
mer. Subtilin tilveiebragt fra visse kulturer av *B. subtilis*
20 og epidermin tilveiebragt fra visse kulturer *Staphylococcus*
epidermis, har derimot molekulære strukturer som er meget lik
de til nisin, Hurst, s. 85-86; og Schnell et al. *Nature*
333:276-278. Strukturelt like lantionininneholdende peptid-
bakteriociner antas å være effektive i steden for nisin i
25 foreliggende oppfinnelse.

Nisin er blitt anvendt effektivt som et konserveringsmiddel i
bearbeidet ost og meieriprodukter. Anvendelse av nisin i
bearbeidede osteprodukter er blitt gjenstand for nye
30 patenter. Se US-patent nr. 4.584.199 og 4.597.972. Anvendelse
av nisin for å hemme utveksten av visse gram positive
bakterielle sporer er blitt godt dokumentert. Se Taylor, US-
patent nr. 5.584.199 og Taylor, US-patent nr. 4.597.972, Tsai
og Sandin, "Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from
35 *Streptococcus lactis* 7962 til *Leuconostoc dextranicum* 181",
Applied and Environmental Microbiology, s. 352 (1987); "A
Natural Preservative", *Food Engineering International*, s. 37-

38 (1987); "Focus on Nisin", Food Manufacture, s. 63 (1987). Nisin blir noen ganger funnet naturlig forekommende i lav konsentrasjon i melk og ost og ansees å være fullstendig ikke-toksiske og ikke-allergeniske overfor mennesker. Nisin er nylig blitt godkjent som trygg av FDA som en direkte matingrediens i pasteurisert smøreost, pasteurisert bearbeidet smøreost og pasteurisert eller pasteurisert bearbeidet smøreost med frukter, grønnsaker eller kjøtt. På grunn av at nisin er proteinholdig, blir en hvilken som helst rest i inntatte matvarer hurtig nedbrutt av fordøyelsesensymer.

Den generelle godtagbarheten av nisin som et matvarekonserveringsmiddel har vært begrenset til læringen om at, som et bakteriocin, var aktiviteten til nisin begrenset til bare å omfatte de gram positive bakteriene som er nær beslektet med bakterielle arter med dets opprinnelse. Nisin er ikke tidligere blitt vist å ha baktericid aktivitet overfor gram negative bakterier. På grunn av at matvarekontaminasjon og ødeleggelse er et resultat av forskjellige gram positive og gram negative bakterier, er det derfor ikke overraskende at nisin bare har ført til begrenset godtagbarhet som et matvarekonserveringsmiddel. På grunn av at den inntil nå begrensede aktiviteten til nisin som et bakteriocin, er anvendelse derav utenfor matvareområde ikke vært angitt.

Det er nylig blitt demonstrert at en sammensetning omfattende nisin og ikke-baktericidale midler så som chelateringsmidler og overflateaktive midler har baktericid aktivitet overfor et stort område av gram negative bakterielle arter og forsterket aktivitet mot et stort område av gram positive bakterielle arter. Gram negative bakterier som er blitt vist å være følsomme overfor det forsterkede baktericidet er *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterioides gingivalis* og *Actinobacillus actinomycetecomitans*. Gram positive bakterier som er vist å være følsomme overfor de forsterkede

baktericidene er *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* og coryneformbakterier. Se inngitte Blackburn et al., US-patentsøknad med tittel Nisin Compositions For Use as Enhanced, Broad
5 Range Bactericides som er en CIP av US-patentsøknad serie nr. 209.861, inngitt 22. juni 1988, som herved er inkorporert som referanse.

Det er blitt vist at aktiviteten til bakteriociner så som
10 lysostafin og nisin kan bli overraskende forsterket, og det helhetlige område og hastigheten til deres aktivitet kan bli økt ved kombinerings av de to bakteriocinene. Egenskapene til de nye bakteriocinsammensetningene inneholdende lysostafin og nisin kan også bli ytterligere forsterket ved tilsetning av
15 chelateringsmidler og/eller overflateaktive midler som forsterker og utvider området til nisin og lysostafin-aktiviteten.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig forsterket
20 bredspektret baktericid sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter lysostafin og et lantionin inneholdende bakteriocin.

De nye baktericidene inneholder lysostafin i en mengde som er
25 tilstrekkelig for å være effektiv som et baktericid mot *Staphylococcus*, og nisin er tilstede i en mengde som er tilstrekkelig for å forsterke den baktericidale virkningen av lysostafin mot *Staphylococci*. Andre sammensetninger omfatter lysostafin, nisin og et chelateringsmiddel, og kan også
30 inneholde et overflateaktivt middel. Denne sammensetningen i en bærer tilveiebringer et nytt baktericid hvori lysostafin og nisin er tilstede i samme konsentrasjonsområde som lysostafin/nisinsammensetningen, og chelateringsmidlet er tilstede i en mengde som er tilstrekkelig for å forsterke den
35 baktericide virkningen av nisin overfor gram positive og gram negative bakterier. En ytterligere sammensetning omfatter lysostafin, nisin og et overflateaktivt middel.

Denne sammensetningen i en bærer tilveiebringer et nytt baktericid der det overflateaktive midlet er tilstede i en mengde som er tilstrekkelig for å forsterke den baktericide virkningen av nisin og lysostafin overfor gram positive bakterier.

Sammensetningene kan bli anvendt direkte eller i bærere for behandling og forhindring av bakteriell kontaminasjon og infeksjon ved oppløsning av sammensetningen i et egnet oppløsningsmiddel eller suspendering i en egnet matrise og påføring av denne til et påvirket område eller ved tilsetning av den til en annen sammensetning for å overvinne og forhindre infeksjon.

De fleste kjemiske desinfiseringmidlene er for etsende eller ellers for toksiske til å bli anvendt i matvarer og mange medisinske anvendelser, hovedparten av antibiotika virker for sakte til å bli anvendt som desinfeksjonsmidler og er ikke tillatt i matvarer på grunn av risikoen for ervervet antibiotisk resistens som ville være en følge av en slik anvendelse. Nye baktericider er ikke-etsende, ikke-toksiske og egnede for anvendelse i matvarer og på åpne sår, effektive mot antibiotisk resistente bakterier og virker hurtig på delende eller ikke-delende bakterier, slik at de er nyttige også som et desinfeksjonsmiddel.

Sammensetningene eller baktericidene kan bli inkorporert i salver eller belegg for behandling av infeksjoner, sårbelegg eller kirurgiske implantater og andre medikasjoner så som nasale instillasjoner, orale skyllinger, desinfiseringsmidelskrubber, håndklær eller vann. Baktericidene kan bli anvendt for rensing av medisinske instrumenter o.l., og når det gjelder omgivelsesdesinfeksjon hvor kjemiske bakteriedrepende midler er utelukket på grunn av risikoen for etsende eller andre toksiske rester. Bredspektrede baktericider er spesielt egnet for matvarebeslektede anvendelser så som behandling av kjøtt, spesielt fjærfe, egg, ost og fisk

eller matvarepakking og håndteringsutstyr, og for kontroll og forhindring av kontaminasjon av råingredienser, bearbejdede matvarer og drikker ved bakterielle patogener og andre mikrobielle ødeleggende organismer.

5

Ulikt aktiviteten til de fleste bredspektrede bakteriedrepende midler som er innbefattet i tilstedeværelse av komplekse organiske stoffer, er bakteriocidsammensetningene og baktericider effektive i nærvær av organisk stoff, så som melk eller serum.

10

Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter lysostafin og nisin, lysostafin, nisin og et chelateringsmiddel, eller lysostafin, nisin, et chelateringsmiddel og et overflateaktivt middel. For å tilveiebringe forbedrede bredspektrede baktericider blir sammensetningene løst opp i et egnet oppløsningsmiddel eller suspendert i en egnet matrise. Sammensetninger omfattende lysostafin, nisin, et chelateringsmiddel og/eller et overflateaktivt middel løst opp i en egnet bærer for eksempel et vandig oppløsningsmiddel eller en buffer eller suspendert i en egnet matrise, antas å ha bredspektret, hurtig baktericid aktivitet overfor både gram positive og gram negative bakterier.

20

Sammensetningen blir fortrinnsvis løst opp i en flytende bærer eller suspendert i en væske, kolloid eller polymer matrise slik at lysostafin er tilstede i baktericidet i et område på 0,1 til 100 µg/ml og blir forsterket ved tilstedeværelse av bakteriocinet nisin i området 0,1 til 300 µg/ml og det resulterende baktericidet er betraktelig mere baktericidalt overfor Staphylococcus enn lysostafin alene. Den totale baktericidale aktiviteten til et slikt nytt baktericid antas å bli ytterligere potensiert og effektiv overfor et bredere område av både gram negative og gram positive bakterielle arter når niset i baktericidet blir forsterket av et chelateringsmiddel som hevdet av den inngitte søknaden til Blackburn et al. med tittel Nisin Compositions For Use as

30

35

Enhanced, Broad Range Bactericides. Kombinasjonen av lysostafin, nisin og chelateringsmiddel bør også inneholde ytterligere bredspektret baktericid aktivitet ved tilsetning av et overflateaktivt middel som også hevdet i søknaden til
5 Blackburn et al.

For eksempel blir nisin aktivert og forsterket mot et stort område gram positive bakterier av et chelateringsmiddel så som EDTA i området 0,1 til 20,0 mM. I nærvær av EDTA har
10 nisin baktericid aktivitet overfor gram negative organismer, og dets aktivitet overfor gram positive bakterier blir forsterket og er aktiv over et bredt pH-område og mot et bredere område av gram positive bakterier. I tillegg forbedrer tilstedeværelsen av et overflateaktivt middel i
15 området 0,01% til 1,0% i baktericidet effektiviteten av nisin mot gram positive bakterier. Egnede ikke-ioniske overflateaktive midler omfatter, men er ikke begrenset til, polyoksyalkylfenoler (f.eks. Triton X-100), polyoksyalkylsorbitaner (f.eks. Tweens) og glyserider (f.eks. monolaurin og
20 diolater). Egnede ioniske overflateaktive midler omfatter, men er ikke begrenset til, emulgeringsmidler, fettsyrer, kvaternære forbindelser og anioniske overflateaktive midler (f.eks. natriumdodecylsulfat) og amfoteriske overflateaktive midler, for eksempel cocamidopropylbetaine.

25 Egnede bærere for baktericid sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter, men er ikke begrenset til, generelt kjente vandige buffere. Egnede matriser for suspensjon av de nye sammensetningene ifølge foreliggende
30 oppfinnelse omfatter, men er ikke begrenset til, organiske oppløsningsmidler, kolloidal suspensjon og polymerer kompatible med baktericider.

Lysostafin anvendt i oppfinnelsen kan bli produsert ved
35 fermenteringsteknikker der *S. simulans* blir dyrket i flytende kultur. Slike fermenteringsteknikker er beskrevet i US-patent nr. 3.278.378 og i Proceedings of the National Academy of

Sciences. 51:414-421 (1964). Forskjellige forbedringer i produksjon av lysostafin ved fermenteringsteknikker er også blitt utført som angitt i US-patent nr. 3.398.056 og 3.594.284. De siste to referansene beskriver forbedringer av kulturmediet og inokuleringsteknikker hvorved produksjon av lysostafin ved fermentering kan bli akselerert og forbedret.

I tillegg kan lysostafin bli produsert av rekombinante mikroorganismer, inkludert stammer av *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Bacillus sphaericus*. En fremgangsmåte for tilveiebringning av lysostafin fra mikroorganismer transformert av rekombinante plasmider kodende for genet for lysostafin, er i sin helhet beskrevet i US-patentsøknad nr. 034.464, som er en CIP av US-patentsøknad nr. 852.407. Begge søknader er inkorporert heri som referanse. Lysostafin blir fortrinnsvis tilveiebragt fra *B. sphaericus*-stamme 00, inneholdende et rekombinant plasmid som leder syntesen av lysostafin. Dette tilveiebringer produksjon av høye nivåer lysostafin, vesentlig fri for staphylococciske immunogene kontaminanter og letter rensing av lysostafin på grunn av at lysostafin akkumulerer direkte i vekstmediet. *B. sphaericus* transformanter inneholdende plasmidene pBC16-1L eller pROJ6649-IL er blitt vist å være spesielt egnede for dette, til tross for at andre stammer også er nyttige som en lysostafinkilde. Disse plasmidene er i sin helhet beskrevet i de ovennevnte inngitte søknader.

Produsert av *S. simulans* i løpet av eksponensiell vekst, blir lysostafin først utskilt som en inaktiv forløper som blir prosessert ekstracellulært til det modne aktive bakteriocinet av en protease produsert i den stasjonære vekstfasen. I kontrast til den naturlige produksjon av lysostafin, akkumulerer lysostafin produsert av en rekombinant stamme av *B. sphaericus* som beskrevet i US-patentsøknad nr. 034.464, ekstracellulært, som et modent aktivt protein i løpet av den eksponensielle vekstfasen.

Nisin kan bli tilveiebragt kommersielt som et urent preparat, Nisalin fra Aplin & Barrett, Ltd., Dorset, England, og kan bli tilveiebragt ved isolering av naturlig forekommende nisin fra kulturer av *Streptococcus lactis* og deretter konsentrering av nisin ved hjelp av kjente fremgangsmåter. Det er også rapportert fremgangsmåte for produsering av nisin ved anvendelse av andre *Streptococcus*-stammer. Se Gonzalez et al., US-patent nr. 4.716.115, fra 29. desember 1987. Det bør også være mulig å produsere nisin ved rekombinant DNA. Nisin er et medlem av familien av lantionin inneholdende bakteriociner. Det er antatt at det på grunn av den strukturelle likheten vil andre lantionininneholdende bakteriociner være like effektive som nisin i kombinasjon med lysostafin.

Følgende eksempler vil ytterligere illustrere oppfinnelsen og demonstrere effektiviteten til de nye forsterkende bredspektrede baktericider. Det antas at på grunn av grad og område av nisinaktivitet også blir forsterket av gelateringsmidler, vil sammensetninger av lysostafin, nisin og et chelateringsmiddel også tilveiebringe nye baktericider med forsterket baktericidal aktivitet sammenlignet med sammensetningene av lysostafin og nisin alene.

Alle forsøkene i følgende eksempler ble utført ved 37°C. Effektiviteten til de forsterkede bredspektrede baktericidene ble bestemt ved analysering av baktericid aktivitet målt ved prosent bakteriell overlevelse etter behandling med baktericidet. Generelt ble bakteriene samlet ved sentrifugering i 2 minutter etter inkubasjon av en 10^7 celle pr. ml suspensjon av målartene med det nye baktericidet i spesifikke tidslengder. Den bakterielle pelleten ble vasket fri for baktericidet med en bergingsbuffer, betegnet fagbuffer (50 mM Tris-HCl buffer pH 7,8, 1mM $MgSO_4$, 4 mM $CaCl_2$, 0,1 M NaCl, og 0,1% gelatin), resuspendert og seriefortynnet i fagbuffer, og 100 μ l av de suspenderte bakteriene ble spredd på næringsagarskåler. Overlevende bakterier ble bestemt ved registrering av kolonidannende enheter (CFU) etter inkubasjon i 24-48

timer ved 37°C. Et effektivt baktericid ifølge foreliggende oppfinnelse er et som muliggjør at mindre enn 0,1% av det opprinnelige levedyktige tallet av bakterier overlever.

5

EKSEMPEL 1

Lysostafin og nisin

10

Staphylococcus aureus-celler ble suspendert og inkubert i melk ved 37°C i 2 timer med forskjellige konsentrasjoner av lysostafin, nisin eller en kombinasjon av lysostafin og nisin i melken. Den baktericid effektiviteten til baktericidene ble vurdert ved bestemming av prosent overlevelse av bakteriene som beskrevet ovenfor. Resultatene av et slikt eksperiment er angitt i tabell 1.

20

TABELL 1

Baktericid aktivitet til lysostafin, nisin og deres kombinasjoner mot Staphylococcus aureus

25

Lysostafin µg/ml	Nisin µg/ml					
	0	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0
0	100	45	33	9	2,5	0,5
0,1	43	0,7	2,6	0,15	0,04	0,004
1,0	$<10^{-3}$	$<10^{-4}$	-	-	$<10^{-4}$	-

30

^a Tellingar for opprinnelig levedyktighet: 5×10^7 cfu/ml.

35

Nisin alene i melk har liten praktisk baktericid aktivitet overfor Staphylococci. Lysostafin alene i melk er baktericidal overfor S. aureus, og kan produsere mer enn en fem

log reduksjon i levedyktige celler i en konsentrasjon på 1,0 µg/ml. Lysostafin, når kombinert med nisin i melk, tilveiebringer en sammensetning som er et nytt baktericid hvorved baktericid aktivitet til baktericidet er betraktelig og overraskende overlegen i forhold til den til enten baktericin alene og er mere aktiv enn deres anticiperte additive virkninger. Dette blir best illustrert ved en begrensende lysostafinkonsentrasjon (0,1 µg/ml) vist i tabell 1. Når anvendelse av lysostafin er begrenset av dets tilgjengelige aktivitet, kan en bakteriocinsammensetning omfattende lysostafin med nisin i en egnet bærer så som melk i dette eksempelet, ventes å tilveiebringe et forsterket bredspektret baktericid.

EKSEMPEL 2

Lysostafin + nisin + EDTA + overflateaktivt middel

Data i tabell 2 illustrerer den nye baktericidpotentheten til en sammensetning omfattende lysostafin, nisin, EDTA og monoglycerid overflataktivt middel overfor *S. aureus* og *S. agalactiae* i melk, et omfattende matvaremedium. Det ble tidligere vist at lave konsentrasjoner av EDTA potensierte aktiviteten av nisin, mens høyere konsentrasjoner av EDTA inhiberer aktiviteten til nisin, se søknaden til Blackburn et al. I melk er høyere konsentrasjoner av EDTA mindre hemmende overfor baktericid aktivitet til bakteriocinsammensetningen.

TABELL 2

Baktericid aktivitet til lysostafin, nisin
 EDTA og monoglycerid i melk ved 37°C overfor
Staphylococcus aureus og Streptococcus agalactiae

Arter	0,23L 1,0N 0,1%ML	0,1L 1,0N 1,0%ML	Kontroll ^c
		% overlevelse 2 t	
<u>S.agalactiae</u> ^b (McDonald)	0,0001 ^E	0,0007 ^E	100
<u>S.aureus</u> ^a (Newbould)	0,004 ^E	0,002 ^E	100

N = Nisin µg/ml; L = Lysostafin µg/ml; ML = monolaurin
 E = inneholdt 50 mM EDTA

a = *S. aureus* telling for opprinnelig levedyktighet; $8,1 \times 10^7$ celler/ml

b = *S. agalactiae* telling for opprinnelig levedyktighet: $6,6 \times 10^7$ celler/ml

c = ikke noe bakteriocin eller monoglyserid

P a t e n t k r a v

1.

5 Forsterket bredspektret baktericid sammensetning,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter lyso-
stafin og et lantionin inneholdende bakteriocin.

2.

10 Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det lantionin inneholdende bakteriocin blir valgt
fra gruppen bestående av nisin, subtilin, epidermin,
cinnamycin, duramycin, ancovenin og Pep 5.

15 3.

Sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den i tillegg omfatter et chelateringsmiddel.

4.

20 Sammensetning ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den omfatter et overflateaktivt middel.

5.

25 Sammensetning ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at chelateringsmidlet velges fra gruppen bestående
av EDTA, CaEDTA, Na₂CaEDTA, EGTA og citrat.

6.

30 Sammensetning ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det overflateaktive midlet blir valgt fra gruppen
bestående av trittoner, tweener, glycerider, emulgerings-
midler, fettsyrer, quarternære forbindelser og amfoteriske
midler.

35 7.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter et overflateaktivt middel.

5 8.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t lysostafin og
lantionin-inneholdende bakteriocin er tilstede i til-
strekkelige mengder, slik at baktericidet har forsterket
10 aktivitet overfor staphylococci og gram positive bakterier.

9.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t lysostafinet,
15 lantionininneholdende bakteriocin og chelateringsmiddel er
tilstede i mengder, slik at baktericidet har forsterket
aktivitet overfor staphylococci og overfor minst en av
bakteriene fra gruppen bestående av gram negative og gram
positive bakterier.

20

10.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 4 og 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det overflateaktive
midlet er tilstede i en mengde som er tilstrekkelig, slik at
25 baktericidet har forsterket aktivitet overfor staphylococci
og overfor minst en av gruppene bestående av gram negative
og gram positive bakterier.

11.

30 Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det overflateaktive
midlet blir valgt fra gruppen bestående av trittoner,
tweener, glycerider, fettsyrer, emulgeringsmidler, quaternære
forbindelser, amfoteriske og anioniske overflateaktive
35 midler.

12.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det gram negative bakterielle målet blir valgt fra gruppen bestående av
5 Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides gingivalis og Actinobacillus actinomycetescomitans.

13.

10 Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det gram positive bakterielle målet blir valgt fra gruppen bestående av spordannende bacilli, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae og coryne
15 formbakterier.

14.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den effektive konsentrasjonen av lysostafin er mellom 0,1 til 100 µg/ml og konsen-
20 trasjonen til nisin er mellom 0,1 til 300 µg/ml.

15.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av lyso-
25 stafin er mellom 0,1 til 100 µg/ml, konsentrasjonen av det lantionininneholdende bakteriocinet er mellom omtrent 0,1 til 300 µg/ml og konsentrasjonen av chelateringsmiddel er mellom 0,1 mM og 20 mM.

30

16.

Forsterket, bredspektret baktericid ifølge krav 4 og krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av overflateaktivt middel er mellom 0,01% og 1,0% av slutt-
35 volumet.