



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

98879

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 02 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

A 23L 3/3463, 3/3526, B 65D 81/28,
A 01N 33/02

SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	893008
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	19.06.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.12.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	19.06.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.05.97
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/NO88/00097
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
18.12.87 US 135004 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Tiedemanns - Joh. H. Andresen ANS, Joh. H. Andresens vei 5, 0655 Oslo, Norge, (NO)
2. Repligen Corporation, One Kendall Square, Building 700, Cambridge, MA 02139, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Witt, Daniel P., 288 Essex Street, South Hamilton, MA 01982, USA, (US)
2. Doten, Reed, 3206 8th Street, Charleston, MA 02129, USA, (US)
3. Lai, Chee Kong, 1 Silver Birch Lane, Littleton, MA 01460, USA, (US)
4. Vatne, Kaare, Prinsessestien 17, 1396 Bjoerkås, Norge, (NO)
5. Ulrichsen, Boerre B., Holmenkollveien 33B, 0376 Oslo 3, Norge, (NO)
6. Castberg, Helge B., Ingierkollveien 65, 1410 Kolbotn, Norge, (NO)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

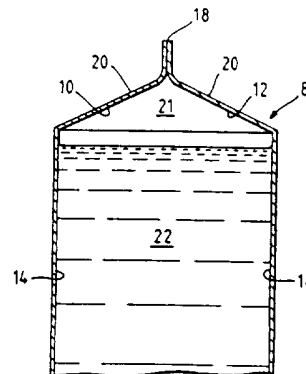
Menetelmä nesteen käsittävän pakatun tuotteen sisältämien mikro-organismien kasvun säätelymiseksi ja pakkausmateriaali
Förfarande för reglering av mikroorganismitillväxt i en förpackad produkt omfattande en vätska och förpackningsmaterialet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 2817854 (B 65D 81/24), DE A 2922347 (A 01N 1/00),
Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, nro 9, 1987, Y. Endo et al. "Antimicrobial activity of tertiary amine covalently bonded to a polystyrene fiber", p. 2050-2054

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee menetelmää kiinteän, nestemäisen tai kaasumaisen materiaalin (22) biologisten ominaisuuksien säätelymiseksi saattamalla materiaali kosketukseen yhden tai useamman liukenemattoman aineen kanssa, joilla on materiaalin (22) suhteen aktiivinen koostumus. Nämä aineet voivat olla esimerkiksi agglutinoivia polymeerejä, kuten lektiinejä, vasta-aineita tai polysakkarideja, joilla on suuri affiniteetti materiaalissa olevien biologisten solujen suhteen, ja/tai amiinipitoisia yhdisteitä, joilla on kyky estää solujen kasvua monia aineosia sisältävässä väliaineessa (22) ja/tai sitovia koostumuksia, joilla on affiniteetti ainakin yhden solujen kasvutekijän suhteen.



Uppfinningen avser ett förfarande för reglering av de biologiska egenskaperna hos ett fast, vätske- eller gasformat material (22) genom kontaktande av materialet med en eller flera väsentligen olösliga substanser av en komposition, vilken aktivt skall verka på materialet (22). Substansen (-erna) kan t.ex. bestå av en agglutinerande polymer, såsom ett lektin, en antikropp eller en polysackarid, med hög affinitet för biologiska celler i materialet och/eller en aminhaltig förening, vilken förmår hämma celltillväxt i ett komplexmedium (22) och/eller en bindningskomposition, vilken har affinitet för åtminstone en biologisk tillväxtfaktor i cellerna.

Menetelmä nesteen käsittävän pakatun tuotteen sisältämien mikro-organismien kasvun säätelemiseksi ja pakkausmateriaali

5 Tämä keksintö koskee menetelmää monimutkaisen eli
monia aineosia sisältävän väliaineen muodossa olevan, nes-
teen käsittävän pakatun tuotteen sisältämien mikro-orga-
nismien kasvun säätelemiseksi, jossa menetelmässä tuote
10 saatetaan kosketukseen pakkausmateriaalin pinnassa olevan,
olennaisilta osiltaan liukenemattoman, immobilisoidun,
kasvua ehkäisevän aktiivisuuden omaavan aineen kanssa,
jolla aineella on sellainen koostumus, että se on aktiivi-
nen mainitun pakatun tuotteen suhteen. Keksintö koskee
myös pakkausmateriaalia, jonka pinnalla pakkausmateriaali,
15 jonka pinnalla on käytännöllisesti katsoen liukenematon,
immobilisoitu, kasvua ehkäisevä aine, jotta saataisiin
kosketus kompleksisen väliaineen muodossa olevaan, nesteen
käsittävään tuotteeseen, mainitun aineen ollessa yhdistel-
mä, joka on aktiivinen tuotteeseen nähden estäen tuottees-
20 sa olevien mikro-organismien kasvu.

Tausta

Esimerkit mikro-organismien haitallisesta vaikutuk-
sesta teollisuudessa, terveydenhoidossa, henkilökohtaises-
sa hygieniassa samoin kuin maataloudessa ovat lukuisia.

25 Elintarvikkeiden pilaantuminen on normaalisti seu-
rausta mikro-organismien, joko bakteerien tai sienten tai
molempien, vaikutuksesta elintarvikkeen aineosiin. Alalla
tapahtuneista kehitysaskeleista mainittakoon maidon isku-
kuumennuskäsittely (UHT-käsittely), jolla voidaan saada
30 aikaan tuote, jonka säilyvyys on muutamia kuukausia ilman
kylmäsäilytystä. Tämä menetelmä perustuu kuitenkin käsit-
telyyn pastörintilämpötilaa korkeammassa lämpötiloissa
(yli 130 °C) ja johtaa käsitellyn maidon organoleptisten
ominaisuuksien merkittäviin muutoksiin. Monet kuluttajat
35 valittavat UHT-käsitellyn maidon olevan "keitetyn" makuis-

ta. He valittavat myös korkeahkoissa lämpötiloissa käsiteltyjen hedelmämeijerijäätöjen olevan vähemmän tuoreen makuisia.

Suurin osa pakattujen tuotteiden pilaantumisista johtuu kuitenkin lämpökäsittelyn jälkeen tuotteisiin tulleista mikro-organismeista.

Elintarviketuotteita käsitellään nykyisin sarjassa vaiheita raaka-aineiden korjuusta niiden pakkaamisen tai käsittelyyn tuotteiksi. Elintarviketeollisuuden hygieniataso on alhainen monissa maissa. Siksi saattaa olla edullista sijoittaa järjestelmä mikro-organismien kasvun estämiseksi useaan käsittelyketjun pisteeseen valmiiden tuotteiden korkean laadun takaamiseksi.

Olisi toivottavaa kehittää yleinen menetelmä mikro-organismien kasvun ja/tai metabolian säätelyksi raaka-aineessa, käsittelyn aikana ja pakatuissa elintarvikkeissa. Tällaisen menetelmän toivottavia piirteitä olisivat vaiheiden lisäämisen välttäminen, niin ettei muuteta olennaisesti elintarvikkeen luonnetta, ja se, että säätelymenetelmästä tehdään elintarvikkeen pakkausmateriaalin aktiivinen ominaisuus.

On tunnettua, että tietyt proteiinit voivat sitoa mikro-organismeja, kuten bakteereja.

Kansainvälisessä hakemuskustannuksessa W082/04264 esitetään esimerkiksi menetelmä mikro-organismeja koskevien biokemiallisten tietojen määrittämiseksi nopeasti, jossa menetelmässä ne sidotaan adsorboivalle aineelle, tavallisesti geelin muodossa olevalle kantajalle, joka on varustettu mikro-organismeja vastaavilla vasta-aineilla, ja lisätään ravintoalustaa solumetabolian käynnistämiseksi. Tätä menetelmää voidaan käyttää myös solumetaboliaan vaikuttavien biokemiallisten aineiden, esimerkiksi vitamiinien ja antibioottien, pitoisuuden määrittämiseen.

Eräänä toisena esimerkkinä mainittakoon Halina Lisin ja Nathan Sharonin artikkeli "Lectins as Molecules and Tools", Ann. Rev. Biochem. 55 (1986) 35 - 67, jossa

kuvataan yksityiskohtaisesti lektiinien sitoutumisominaisuuksia.

5 Kummassakaan julkaisussa ei kuitenkaan esitetä kaupallisesti käyttökelpoista menetelmää, joka olisi sovellettavissa elintarvikkeessa olevien mikro-organismien poistoon tai ehkäisyyn.

On myös tunnettua, että tietyt proteiinit voivat tuhota mikro-organismeja, kuten itiöitä.

10 Esimerkiksi nisiinin käyttöä mikrobisidiseina lisäaineena käsitellyissä elintarvikkeissa kuvataan K. C. Eapenin et al. julkaisussa, The Journal of the Association of Food Scientists & Technologists, India, 20, nro 5, syys-lokakuu 1983, 231 - 240.

15 Tällaisen lisäaineen käyttö käsitellyissä elintarvikkeissa on käymässä kuitenkin yhä kiistanalaisemmaksi, ja valmistajat välttävät tällaista käyttöä, kun se on koh- tuudella mahdollista.

20 Useilla immobilisoiduilla kvaternaarisilla ammoniumsuoloilla on myös osoitettu olevan mikro-organismien vastainen vaikutus, ja erityisesti 3-trimetoksisilyyllipro- pyylioktadekyylidimetyyliammoniumkloridia käytetään laa- jasti tekstiiliteollisuudessa. Endo et al. [Applied and Environmental Microbiology, maaliskuu 1987, 2050 - 2055] ovat osoittaneet ensimmäistä kertaa, että polystyreenikui-
25 tuun kovalenttisesti sidotulla tertiaarisella metyyliamiinilla (TAF) on mikrobien vastainen vaikutus puskuriliuok- sessa. Tämän tertiaarista amiinia sisältävän kuidun vaiku- tustapaan näyttää liittyvän mikrobisolujen sitoutuminen kuidun pintaan, mitä seuraa tertiaaristen amiiniryhmien ja
30 solujen välinen vuorovaikutus, joka saa aikaan tuntematto- malla mekanismilla tapahtuvan solukalvon vaurioitumisen ja lopulta solun hajoamisen.

35 Vaikka Endon et al. alkuperäinen havainto, että TAF on mikrobien vastainen, viittaa siihen, että muut immobi- lisoitua tertiaarista amiinia sisältävät pinnat saattavat

olla mikrobien vastaisia yksinkertaisessa suolaliuoksessa, se ei osoita, että tällainen mikrobien vastainen pinta olisi aktiivinen myös monimutkaisessa väliaineessa, kuten maidossa tai hedelmämehussa. Niinpä esimerkiksi immobi-

5 soitujen kvaternaaristen ammoniumsuolojen mikrobien vastainen aktiivisuus, joka on sangen korkea vedessä tai yksinkertaisissa suolaliuoksissa, salpautuu tai heikentyy erilaisten monia aineosia sisältävien väliaineiden vaikutuksesta. Termeillä "monimutkainen väliaine" ja "monia

10 aineosia sisältävä väliaine" tarkoitetaan tässä käytettynä mitä tahansa väliainetta, jolla on kyky edistää mikro-organismien kasvua, ja tällaisella väliaineella on seuraavat ominaisuudet: hiili- ja typpilähteet, joita on läsnä kasvua varten, eivät ole yksinomaan yksinkertaisia hiilihydraatteja ja aminohappoja vaan yhdisteseos, jossa yhdisteet

15 ovat esimerkiksi hiilihydraatteja, polysakkarideja, proteiineja, peptidejä, lipidejä, orgaanisia happoja, vitamiineja ja kotekijöitä, jotka ovat läsnä runsasravintoisina määrittämättöminä koostumuksina, esimerkiksi kasvien

20 ja eläinten tuottamina nesteinä, kasvi- ja eläinkudosuutteina ja kudoshydrolysaatteina, tai peräisin sellaisista.

On myös tunnettua, että vaihtoehtona mikro-organismien inaktivoimiselle lämmöllä tai muulla tavanomaisella käsittelyllä niiden inhibitio ja/tai inaktivointi voidaan

25 saada aikaan rajoittamalla välttämättömien kasvutekijöiden saantia. Välttämättömiä kasvutekijöitä voivat olla esimerkiksi hivenaineet, vitamiinit, orgaaniset hapot, sokerit tai kaasut (esimerkiksi happi). Mitkä näistä tekijöistä ovat välttämättömiä, riippuu mikro-organismin tyypistä.

30 Eräs tekijä, jota useimmat, elleivät kaikki, mikro-organismit tarvitsevat ympäristöstä, on alkuaine rauta. Rautaa tarvitaan kotekijänä monissa entsyymijärjestelmissä, joita solut käyttävät metaboliaprosesseissa, ja se on ehdottoman välttämätöntä useimmille mikrobien ribonukleotidireduktaaseille.

35

US-patenttijulkaisuissa 4 530 963 ja 4 585 559 (DeVoe et al.) esitetään menetelmä mikrobien kasvun estämiseksi rauta(III):a sisältävässä nestemäisessä väliaineessa saattamalla väliaine kosketukseen liukenemattomaan kantajaan kovalenttisesti sidotun sideroforin kanssa. DeVoe et al. esittävät sellaisten sideroforien kuin deferrioksamiini B:n käyttöä, jotka eivät ole käytännössä tehokkaita mikrobien kasvun estämisessä, sillä käytetyillä sideroforeilla on sellainen kineettinen vaihtonopeus raudan suhteen, joka johtaa sitoutuneen raudan myöhempään vapautumiseen sideroforista käsiteltävään väliaineeseen.

Nesteissä, joiden pH on alhainen, ja pelkistävässä ympäristöissä, kuten hedelmämehuiissa, rauta on lisäksi lähes kokonaan ferromuodossa [rauta(II):na].

Keksinnön kuvaus

Keksinnön kohteena on menetelmä monimutkaisen eli monia aineosia sisältävän väliaineen muodossa olevan, nesteen käsittävän pakatun tuotteen sisältämien mikro-organismien kasvun säätelemiseksi, jossa menetelmässä tuote saatetaan kosketukseen pakkausmateriaalin pinnassa olevan, olennaisilta osiltaan liukenemattoman, immobilisoidun, kasvua ehkäisevän aktiivisuuden omaavan aineen kanssa, jolla aineella on sellainen koostumus, että se on aktiivinen mainitun pakatun tuotteen suhteen.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että valitaan kasvua ehkäisevän aktiivisuuden omaavaksi aineeksi aine, joka ei ole entsyymi, ja jonka aktiivisuus ei oleellisesti esty pakatun tuotteen jonkun komponentin vaikutuksesta, ja että aktiivisuutta edistetään aikaansaamalla suhteellinen liike pakatun tuotteen ja aktiivisen aineen välillä.

Keksinnön kohteena on myös pakkausmateriaali, jonka pinnalla on käytännöllisesti katsoen liukenematon, immobilisoitu, kasvua ehkäisevä aine, jotta saataisiin kosketus kompleksisen väliaineen muodossa olevaan, nesteen käsittä-

vään tuotteeseen, mainitun aineen ollessa yhdistelmä, joka on aktiivinen tuotteeseen nähden estäen tuotteessa olevien mikro-organismien kasvu.

5 Keksinnön mukaiselle pakkausmateriaalille on tunnusomaista, että kasvua ehkäisevän vaikutuksen omaavan aineen, joka ei ole entsyymi, aktiivisuus ei oleellisesti esty jonkin tuotteessa olevan komponentin vuoksi.

10 Sen ansiosta, että aktiiviset aineet, joita on yksi tai useampia, immobilisoidaan pakkausmateriaalin pintaan, niitä ei ole olennaisia määriä materiaalissa eikä niitä myöskään tule olennaisia määriä materiaalin lisäaineeksi.

15 Aktiiviset aineet, joita on yksi tai useampia, voivat toimia mikro-organismien säätelijöinä, inhiboijina, tuhoajina ja/tai poistajina materiaaleissa, erityisesti monia aineosia sisältävissä väliaineissa, kuten nestemäisissä tai kiinteissä elintarvikkeissa.

20 Aktiivinen aine tai kukin niistä on edullisesti epäorgaaninen tai orgaaninen koostumus, joka pintaan sidottuna säilyttää affiniteetin mikro-organismien suhteen ja siten sitoo ja/tai hävittää mikro-organismeja.

25 Mainitut aktiiviset aineet, joita on yksi tai useampia, ovat sitovia aineita, joilla on sitoutumisaffiniteetti mainitussa toisessa materiaalissa olevien mikro-organismien suhteen ja jotka siten sitovat ja/tai hävittävät mikro-organismeja, tai aineita, joilla on sitoutumisaffiniteetti mikro-organismien vähintään yhden biologisen kasvutekijän suhteen ja jotka sitten rajoittavat mainittujen yhden tai useamman kasvutekijän tarjollaoloa.

30 Mainitulla sitovalla aineella on edullisesti suuri sitoutumisaffiniteetti mikro-organismien tai mahdollisesti niiden yhden tai useamman kasvutekijän suhteen, mutta alhainen sitoutumisaffiniteetti materiaalissa olevien muiden koostumusten suhteen.

35 Tapauksissa, joissa mainitulla sitovalla aineella on sitoutumisaffiniteetti mikro-organismien suhteen, aine

5 voi olla sitova polymeeri, esimerkiksi lektiini, vasta-
aine tai polysakkaridi. Sitovalla polymeerillä on edulli-
sesti spesifinen affiniteetti glykokonjugaatin tai poly-
sakkaridin suhteen, ja se on regeneroitavissa pesemällä
kilpailevalla sokerilla. Mikro-organismit voivat olla bak-
teereja tai sieniä.

10 Mainitut aineet, joita on yksi tai useampia, voivat
sisältää amiinipitoisen yhdisteen muodossa olevaa ainetta,
jolla on kyky vahingoittaa riittävästi mainitussa mate-
riaalissa olevia mikro-organismeja niiden kasvun estämi-
seksi. Yhdisteellä voi olla sitoutumisaffiniteetti mikro-
organismien suhteen, ja se voi olla tertiaarinen amiini
tai kvaternaarinen ammoniumsuola. Yhdiste voi erityisesti
15 sisältää dimetyyliaminopropyyli-, dimetyyliaminobutyyli-
tai dietyyliaminopropyyli-ryhmän.

20 Tapauksissa, joissa sitovalla aineella on sitoutu-
misaffiniteetti mainittujen yhden tai useamman kasvuteki-
jän suhteen, sitovalla koostumuksella on riittävä sitoutu-
misvakio ja kineettinen stabiilius mainittujen yhden tai
useamman kasvutekijän sitomisen suhteen, niin että koos-
tumus pystyy menestyksellisesti kilpailemaan mikro-orga-
nismien kanssa yhdestä tai useammasta kasvutekijästä.
Koostumuksella voi olla affiniteetti vähintään yhden kas-
vutekijöihin kuuluvan hivenaineen, esimerkiksi rau-
25 ta(III):n tai rauta(II):n suhteen. Rauta(III):n ollessa
kyseessä koostumus voi olla deferriferrikromi A, jonka
sitoutumisvakio rauta(III):n suhteen on vähintään 10^{30}
 $1 \cdot \text{mol}^{-1}$ ja jolla on kyky muodostaa rauta(III):n kanssa ki-
neettisesti stabiili kompleksi, joka stabiilius on vähin-
30 tään kymmenkertainen ferriokсамиini B -kompleksiin näh-
den. Rauta(II):n ollessa kyseessä koostumus voi olla pyri-
miini.

35 Aktiiviset aineet voivat olla omilla vyöhykkeillään
mainituissa pintaosissa tai, jossa aineet ovat keskenään
yhteensopivia, ne voivat olla mainitulla pintaosilla yh-
teensekoitettuna.

Pakkausmateriaali voi olla verkon tai säiliön muodossa.

Edellä esitetyn periaatteen eräässä erityissovel-
lutuksessa on sellaisia pintoja säilytys- tai jakelusäi-
liön sisällä, jotka on päällystetty yhdellä tai useammalla
5 aktiivisella aineella. Aktiivisia aineita voidaan immobi-
lisoida monille erilaisille pinnoille, mukaan luettuina
polymeerihartsit tai kopolymeerit, kuten polystyreeni,
polyeteeni, polypropeeni, polyamidit, polystyreeniaktyyli-
10 nitriili tms., pahvi, joka voi sisältää tai olla sisältä-
mättä polymeeriä, ja lasi. Tyypilliset elintarvikesäiliöt
ovat polymeeriä tai polymeerillä, kuten polyeteenillä,
päällystettyä metallia tai pahvia. Pahviset elintarvike-
säiliöt päällystetään tai kyllästetään tyypillisesti poly-
15 meerillä, kuten polyeteenillä.

Hyvä kontakti nestemäisen materiaalin ja yhden tai
useamman aktiivisen aineen välillä saadaan aikaan neste-
mäisen materiaalin ja yhdellä tai useammalla aktiivisella
aineella päällystetyn pinnan liikkeessä suhteessa toisiin-
20 sa jakelusäiliössä tämän normaalin käsittelyn seurauksena.
Vaihtoehtoisesti aktiivinen aine tai kukin niistä sidotaan
säiliöstä erillään olevan välineen, jolla saadaan aikaan
läheinen kosketus nestemäisen tuotteen kanssa, pintaan.

Jotta keksintö olisi selvästi ymmärrettävissä ja
25 helposti toteutettavissa, seuraavassa kuvataan sen kolmea
suoritusmuotoa viitaten kaikkien yhteydessä liitteenä ole-
vaan kaavamaiseen kuvioon, joka esittää nestemäisen elin-
tarvikkeen pakkaamiseen käytettävän muovilla päällystetyn
pahvisäiliön pystyleikkausta.

30 Säiliö 8 on US-patenttijulkaisussa 4 211 357 esi-
tettyä tyyppiä, mutta sen sisäpinnoille 10, 12, 14 ja 16
on sidottu yhtä tai useampaa aktiivista ainetta. Useiden
aktiivisten aineiden ollessa kyseessä nämä voidaan joko
sitoa omille pintavyöhykkeilleen (jotka voivat sekoittua)
35 tai ne voidaan sekoittaa yhteen (jos ne ovat yhteensopi-

via) ja sitoa seos pinnoille. Yhtä tai useampaa ainetta voidaan sitoa myös säiliön 8 pohjan sisäpintaan (ei kuvas-
sa). Säiliössä 8 on yläsauma 18, joka sulkee katon 20,
jolloin muodostuu avoin tila 21 ja nestemäinen elintarvike
5 22 suojataan ulkopuolella olevalta atmosfääriltä. Säiliön
8 sisäpintoihin 10, 12, 14 ja 16 sidotut aineet, joita on
yksi tai useampia, vaikuttavat nestemäiseen elintarvik-
keeseen 22. Eräässä toisessa esimerkissä vain katon 20
sisäpinnat 10 ja 12 päällystetään yhdellä tai useammalla
10 aineella, mutta nämä sisäpinnat 10 ja 12 joutuvat koske-
tukseen nestemäisen tuotteen 22 kanssa säiliön 8 normaalin
käsittelyn seurauksena tai liikuttamalla säiliötä 8 ja
nestemäistä tuotetta 22 kontrolloidusti tai säilyttämällä
tai kuljettamalla säiliötä 8 alassuin käännettynä.

15 Suoritusmuoto I (esimerkit 1 - 9)

Tätä suoritusmuotoa kuvataan viitaten erityisesti
bakteerien immobilisointiin elintarvikkeista, kuten mai-
dosta ja hedelmäpohjaisista juomista, hedelmäjuomat ja
nektarit mukaan luettuina. On kuitenkin ymmärrettävä, että
20 tätä suoritusmuotoa voidaan käyttää yleisesti bakteerien
immobilisointiin kaasumaisista, nestemäisistä ja kiinteis-
tä faaseista.

Tässä suoritusmuodossa käytetään matriksia, johon
yksi tai useampia spesifisesti sitovia polymeerejä on si-
dottu joko kovalenttisesti tai passiivisesti. Esimerkkei-
hin tällaisista matriksesta kuuluvat polymeerit, kuten
polyeteeni tai polystyreeni, lasi ja selluloosapohjaiset
koostumukset, joihin sitova polymeeri on sidottu passiivi-
sesti adsorboimalla tai kovalenttisesti sitomalla. Sito-
30 valla polymeerillä päällystetyt pinnat voidaan saattaa
kosketukseen nestemäisen tuotteen, kuten maidon, kanssa
joko käyttämällä in-line-patruunaa tai muuta kosketusta
edistävää järjestelmää siirtovaiheen aikana tai osana lo-
pullista pakkausmateriaalia. Tämän tehtävänä on poistaa
35 kontaminoivat bakteerit adsorboimalla tai kompleksoimalla

ne kiinteään faasiin, jolloin lopullisena seurauksena on pakatun tuotteen säilymisajan piteneminen ja/tai epätoivottavien organismien eliminointi.

Jos lopullinen pakkausmateriaali on jakelusäiliö 8, hyvä kontakti nestemäisen tuotteen 22 ja matriksiin sidotun sitovan polymeerin välillä saadaan aikaan tuotteen 22 ja säiliössä olevien sitovalla polymeerillä päällystettyjen pintojen 10, 12, 14, 16 liikkumisella suhteessa toisiinsa, joka on seurausta säiliön normaalista käsittelystä. Sitova polymeeri sidotaan vaihtoehtoisesti nestemäistä tuotetta liikuttavan ja sekoittavan erillisen välineen pintaan. Bakteerien erotus saadaan aikaan, kun väline poistetaan tai nestemäinen tuote 22 kaadetaan pois säiliöstä 8, jolloin bakteerit jäävät kiinni tyhjennetyn säiliön sisäpintaan 10, 12, 14, 16.

Sitovia polymeerejä ovat sellaiset polymeerit kuin lektiinit, polysakkaridit ja vasta-aineet. Sitoutumisen välittäjänä on spesifinen vuorovaikutus bakteerisolun pinnalla esillä olevan jonkin molekyylin ja sitovan polymeerin välillä.

Sitovien polymeerien immobilisointi kiinteään alustaan voi olla luonteeltaan joko kovalenttista tai ei-kovalenttista. Tämän vuorovaikutuksen tärkeänä ominaispiirteenä on se, että sitovat polymeerit pysyvät tiukasti sitoutuneina eivätkä vapaudu bakteeriensitomisvaiheiden aikana. Sitovien polymeerien kovalenttinen sitominen voidaan toteuttaa monin eri menetelmin, jotka ovat alalla hyvin tunnettuja.

Vaihtoehtona kovalenttiselle immobilisoinnille voi olla joissakin olosuhteissa edullista kiinnittää sitovat polymeerit ei-kovalenttisesti materiaalin kanssa kosketukseen tulevaan pintaan hydrofobisen vuorovaikutuksen kautta. Sitovan polymeerin vesiliuosta inkuboidaan kosketuksessa materiaalin kanssa kosketukseen tulevan pinnan kanssa, johon proteiini on määrää sitoa. Tämä johtaa ajasta,

lämpötilasta ja pitoisuudesta riippuvaan sitovasta poly-
meeristä koostuvan molekyylikerroksen muodostumiseen hyd-
rofobiselle materiaalin kanssa kosketukseen tulevalle pin-
nalle passiivisen adsorption kautta.

5 Läsnä olevista mikro-organismeista sekä käyttöpara-
metreista riippuen erotusprosessi voi olla joko selektiivinen,
jolloin poistetaan jokin tietty epätoivottava mikro-organismilaji,
tai epäselektiivinen siinä mielessä,
10 että useimmat tai kaikki kontaminoivat mikro-organismit
poistuvat.

 Tämä suoritustapa yhdyessä testatuille sitovilla
polymeereillä on suuri bakteriensitomiskapasiteetti
joko spesifisesti tietyn tyyppisten bakteerien suhteen tai
epäspesifisesti muutamien tyyppien suhteen. Sitovina poly-
15 meereinä käytettävien lektiinien ollessa kyseessä sitou-
tuminen pysähtyy ja prosessi kääntyy päinvastaiseen suun-
taan lisättäessä kilpailevia sokeriliuoksia, ja siksi si-
tovalla polymeerillä päällystetyt pinnat voidaan "pestä"
puhtaiksi tällä tavalla.

20 Säiliön 8 sisäpintoihin sidottu sitova polymeeri
sitoo ja immobilisoi nestemäisessä tuotteessa 22 olevia
mikro-organismeja. Haluttaessa voidaan säiliön 8 joihinkin
tai kaikkiin sisäpintoihin sitoa myös aktiivista ainetta,
joka salpaa mikro-organismin metaboliaa.

25 Suoritusmuotoa I valaisevat seuraavat keksintöä
rajoittamattomat esimerkit 1 - 9:

Esimerkki 1

 Tutkittiin olosuhteita, joissa sitovia polymeerejä
kiinnitetään passiivisella adsorptiolla materiaalin kanssa
30 kosketukseen joutuviin pintoihin. Hyviä tuloksia saatiin
aikaan muutamilla polymeereillä, esimerkiksi *Dolichos*
biflorus ja *Vicia villosa* -lajeista saatavilla lektiineil-
lä. Muilla lektiineillä, mukaan luettuna konkanavaliini A,
saatiin samanlaisia tuloksia, mikä viittaa siihen, että
35 tämä on lektiineille yhteinen ominaispiirre. Myös immu-

noglobuliinimolekyyileillä on samankaltaisia ominaisuuksia.

Lektiinit leimattiin radioaktiivisesti ja niistä valmistettiin varastoliuokset puskuriin. Näistä valmistettiin sitten laimennussarja ja asetettiin annoksia pisteiksi joko polystyreeni- tai polyeteenipinnalle ja inkuboi-
5 tiin 1 tunti lämpötilassa 37 °C, minkä jälkeen tehtiin pesu puskurilla. Näissä tutkimuksissa käytetty polyeteenipinta oli tavallista maitotölkkimateriaalia, joka koostui polyeteenilevyllä päällystetystä pahvista.

10 Tulokset osoittivat, että sitoutuminen läheni kyl-
lästyspistettä tiheyden ollessa 5 - 10 ng/mm² tutkitusta lektiinistä riippuen. Tästä päätellen lektiinit sitoutuvat hydrofobisiin muovipintoihin ja sitoutumisen ylärajan määrää hydratoituneiden molekyylien pakkautumistiheys pinnal-
15 la.

Esimerkki 2

Kun sitovia polymeerejä adsorboitiin passiivisesti polymeeripintaan (katso esimerkki 1) ja saatettiin pinta sitten kosketukseen suspension kanssa, joka sisälsi pes-
20 tyjä ihmisen punasoluja puskurissa, tapahtui punasolujen sitoutumista immobilisoituun proteiiniin.

Kun polymeerejä oli inkuboitu 30 min punasolujen kanssa, käsitellyn polymeerin pinnalla näkyi mikroskoopil-
la tarkasteltaessa yhtenäinen solumatto useimpien tutkit-
25 tujen polymeerien yhteydessä.

Hyviä tuloksia saavutettiin erilaisilla sitovilla polymeereillä, mukaan luettuna Dolichos biflorus -lektiini ja Vicia villosa -lektiini.

Esimerkki 3

30 Tutkittiin kaupan olevasta pastöroidusta maidosta eristettyjen kolmen tyyppillisen maitoa pilaavan bakteerin kykyä sitoutua erilaisiin polymeeripinnalle passiivisesti adsorboituihin sitoviin polymeereihin. Näiden kolmen or-
ganismin todettiin alalla hyvin tunnetuin luokitusmenetel-
35 min olevan Bacillus brevis, Enterobacter sp. ja Pseudomo-

nas sp. Sitovia polymeerejä adsorboitiin passiivisesti polymeeripintaan edellisessä esimerkeissä kuvatulla tavalla. Bakteereja suspendoitiin fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen ja näitä kolmea organismia sisältäviä suspensioita saatettiin sitten kosketukseen käsiteltyjen polymeeripintojen kanssa. Bakteerien sitoutuminen arvioitiin mikroskoopin avulla tarkastelemalla. Tämän tutkimuksen tulokset osoittivat, että muutamat sitovat polymeerit, kuten *Dolichos biflorus*, *Vicia villosa*, *Limulus polyphemus* ja *Solanum tuberosum* -lektiinit, sitoivat tehokkaasti näiden erilaisten mikrobiluokkien tyypillisiä lajeja.

Esimerkki 4

Bacillus sp. -soluja suspendoitiin tiheydeksi 100 CFU/ml (pesäkkeenmuodostusyksikköä/ml) tris-puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen ja inkuboitiin polymeerimatriksin kanssa, johon oli kytketty kovalenttisesti sitovia polymeerejä. Määritettiin vapaiden bakteerien lukumäärä suspensiossa tutkimalla mikroskoopin alla supernatanttinäyte (matriksin laskeutumisen jälkeen). Tällä menetelmällä osoitettiin immobilisoitujen polymeerien kyky sitoa ja siten poistaa kontaminoivia mikrobeja ja todettiin bakteerisolujen affiniteetti sitovalla polymeerillä päällystettyjen matriksien suhteen koeolosuhteissa. Havaittiin, että bakteerien poistoteho oli tällä menetelmällä käytettäessä esimerkiksi *Dolichos biflorus* -lektiiniä joissakin tapauksissa lähes 100 %.

Esimerkki 5

Pure-Pak, Inc., Walled Lake, MI, USA, luovutti erään *Saccharomyces* -kannan. Tämä kanta oli alunperin eristetty karpalomehusta ja sen oli havaittu kasvavan erilaisissa hedelmämehuissa ja pilaavan niitä.

Soluja kasvatettiin joko omenamehussa, joka oli steriloitu suodattamalla, tai synteettisessä alustassa, jonka toimitti Difco.

Saatiin kasvatusolosuhteista riippumatta samanlaisia tuloksia.

5 Dolichos biflorus -lektiinin toimitti Sigma Chemical Co., ja se immobilisoitiin joko absorboimalla passiivisesti polystyreenipintaan tai kytkemällä syano-geenibromidin avulla agaroosihelmiin.

Kun Saccharomyces-solut saatettiin kosketukseen immobilisoitua lektiiniä sisältävän pinnan kanssa, niiden havaittiin sitoutuvan nopeasti ja tiukasti pintaan.

10 Havaittiin esimerkiksi, että vähintään 90 % suspensiossa olevista soluista sitoutui 1 - 2 tunnissa liukene-mattomiin agaroosihelmiin, joilla oli immobilisoitua Dolichos biflorus -lektiiniä.

15 Tämä sitoutuminen oli hyvin stabiilia, eikä merkitsevää irtoamista tapahtunut 24 tunnin aikana. Tällä tavalla sidotut solut oli helppo poistaa mehusta joko antamalla helmien laskeutua ja dekanttoimalla supernatantti tai joh-tamalla mehu suurihuokoisen suodattimen, kuten lasivillan, läpi.

20 Esimerkki 6

Solanum tuberosum -lektiini sidottiin polystyreenistä valmistettuun petrimaljaan passiivisesti adsorboimalla ja malja saatettiin kosketukseen maidon kanssa, johon oli lisätty tiheydeksi 10^6 solua/ml joko Bacillus bre-vusta tai Pseudomonas fluorescensi. Kun maljoja oli inkuboitu 30 min, ne huuhdottiin ja tutkittiin optisella mikroskoopilla. Kummassakin tapauksessa havaittiin bakteerien sitoutumista lektiinillä päällystettyyn pintaan, mutta sitoutumispinta-alan havaittiin olevan olennaisesti pie-nempi kuin alueen, jonka havaittiin peittyneen rakkuloil-la, jotka identifioitiin maitorasvapallosiksi. Tämä koe osoittaa, että tällä lektiinillä, jolla on kyky sitoa mai-toa pilaavia bakteereja, on myös kyky sitoa maitorasvapal-losten kalvojen pintakomponentteja ja tämä viimeksi mai-nittu aktiivisuus johtaa menetelmän tehon heikkenemiseen.

25
30
35

Tämä tehon heikkeneminen sulkee pois tämän lektiinin käytön maidossa.

Esimerkki 7

Tehtiin tutkimus liukenemattomalla alustamatriksilla olevan sitovan polymeerin optimaalisen tiheyden määrittämiseksi. CnBr:lla aktivoituihin agaroosihelmiin kytkettiin vaihtelevia määriä lektiiniä käyttäen pitoisuuksia 1 - 50 mg/ml ja annettiin helmien olla kosketuksessa solujen kanssa tunnin ajan. Sitoutumistehokkuus määritettiin mittaamalla liuosfaasiin jääneiden vapaiden solujen lukumäärä. Havaittiin, että solujen sitoutuminen oli tehokkaimmillaan lektiinikuormituksen helmillä ollessa 15 - 30 mg/ml. Sitoutumisaste oli näissä olosuhteissa yli 95 %. Lisäsitoutumista ei havaittu kuormituksen kasvaessa arvoon 50 mg/ml. Merkittävä sitoutumisen väheneminen havaittiin lektiinikuormituksten ollessa alle 10 mg/ml.

Esimerkki 8

(Tämä esimerkki voidaan katsoa kuuluvaksi myös suoritustyyppimuodon II piiriin.)

Saccharomyces cerevisiaen sitoutuminen tertiaariin amiineihin osoitettiin kahdella menetelmällä. Ensimmäisessä menetelmässä täytettiin pylväät (90 x 6 mm) IRA-68- ja IRA-94-helmillä. Pylväät tasapainotettiin Ringersin liuoksella (vahvuus 1/4). 1 ml Ringersin liuokseen valmistettua S. cerevisiae -solususpensiota (10^6 solua/ml) laitettiin pylvääseen ja eluoitiin Ringerin liuoksella. Eluaattifraktioille (1 ml) tehtiin laskenta bakteerilaskentakammiossa ja laskettiin eluoituneiden solujen lukumäärä. 45 % soluista pidättyi sekä IRA-68- että IRA-94-pylvääseen. Toisessa menetelmässä, joka suunniteltiin osoittamaan suoraan sitoutuminen liuoksessa, IRA-68-helmet tasapainotettiin Ringersin liuoksessa ja laitettiin 250 mg helmiä 10 ml:n koeputkeen. 2 ml Ringersin liuokseen valmistettua S. cerevisiae -solususpensiota siirrettiin putkeen. Koeputkea inkuboitiin pystysuorassa asennossa huoneen läm-

pötilassa 2 tuntia, mitattiin pH (5,4) ja dekantoitiin supernatantti. Lisättiin kahdesti steriiliä Ringersin liuosta sitoutumattomien solujen pesemiseksi pois. *S. cerevisiae* -solujen sitoutuminen IRA-68-helmiin osoitettiin mikroskooppitutkimuksella.

Esimerkki 9

Tutkittiin erilaisten mikro-organismien sitoutumista muihin valittuihin proteiineihin. Kytettiin lysotsyymiä, fibronektiiniä ja naudan seerumialbumiinia (BSA) kovalenttisesti CNBr:lla aktivoituihin agaroosihelmiin.

Voimakas sitoutuminen (peitto yli 80 %) lystosyymin osoitettiin *Pseudomonas fluorescens* TP2:n, *Streptococcus lactisin*, *Streptococcus thermophilus*in ja *Staphylococcus xylosus*in kohdalla, kun taas vegetatiiviset *Bacillus subtilis* -solut sitoutuivat vähäisemmässä määrin. *Saccharomyces cerevisiae*en, *Escherichia coli*n, *Serratia marcescens*in ja *B. subtilis* -itiöiden kohdalla ei havaittu ollenkaan sitoutumista.

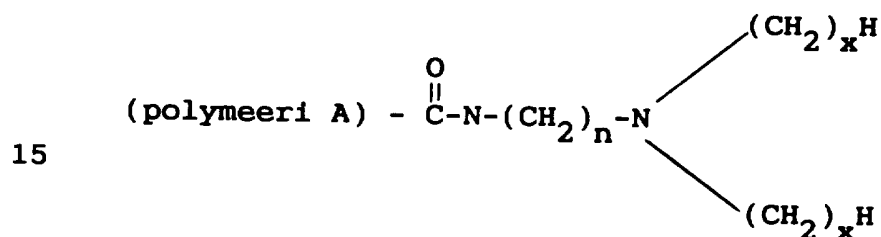
Suoritusmuoto II (esimerkit (i) - (xi))

Tätä suoritusmuotoa kuvataan viitaten erityisesti mikrobien kasvun estämiseen monia aineosia sisältäviä väliaineita edustavissa elintarvikkeissa, kuten maidossa ja hedelmäpohjaisissa juomissa, mukaan luettuina hedelmäjuomat ja -nektarit.

Tässä suoritusmuodossa käytetään matriksia, johon on liitetty joko kovalenttisesti tai passiivisesti yhtä tai useampaa amiinipitoista yhdistettä, jotka estävät mikrobien kasvua monia aineosia sisältävissä väliaineissa. Esimerkkeihin tällaisista matrikseista kuuluvat polymeerit, kuten polyeteeni tai polystyreeni, metalli, lasi ja selluloosapohjaiset koostumukset, joihin yhdiste on sidottu joko passiivisesti adsorboimalla tai kovalenttisesti sitomalla. Päälystetty pinta voidaan saattaa kosketukseen elintarviketuotteen, esimerkiksi nestemäisen tuotteen, kuten maidon, kanssa joko in line -patruunana tai muuna

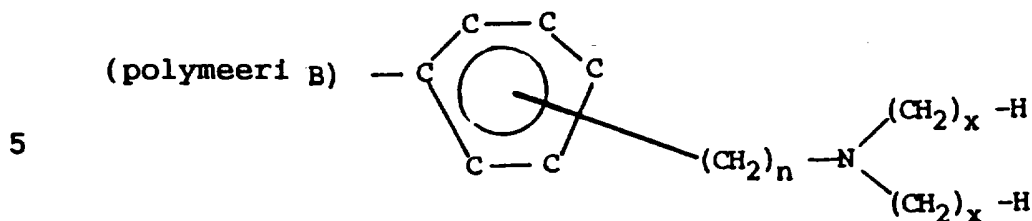
kosketusta edistävänä järjestelmänä siirtovaiheen aikana tai osana lopullista pakkausmateriaalia. Tämän tarkoituksena on kontaminoivien bakteerien tuhoaminen.

Tässä suoritussuodossa käytettävät amiinipitoiset yhdisteet ovat tertiäärisiä amiineja, osittain hapetettuja tertiäärisiä amiineja tai kvaternaarisia ammoniumsuoloja, erityisesti sellaisia, joilla on kyky estää mikrobien kasvua monia aineosia sisältävissä väliaineissa. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvia tyyppillisiä soveltuvia amiinipitoisia yhdisteitä ovat yhdisteet, joilla on kaava



jossa n on 1 - 6, erityisesti 1, 2, 3, 4 tai 6, ja x on 1 - 18, erityisesti 1, 2, 4 tai 18. Yhdiste, jolla on kaava I, jossa n on 3 ja x on 1, on aktiivinen *Saccharomyces cerevisiae* vastaan, ja yhdisteet, joilla on kaava I, jossa n on 2 ja x on 1 tai jossa n on 3 ja x on 2, ovat aktiivisia *E. coli* vastaan.

Toista ryhmää edustavat yhdisteet, joita muodostetaan hapettamalla osittain polystyreeniin kytkettyjä tertiäärisiä amiineja. Eräs esimerkki tällaisista yhdisteistä ovat yhdisteet, joita muodostetaan käsittelemällä styreeni-divinyylibentseenikopolymeeriin (polystyreeniin) kytkettynä dimetyylimetyyliamiinia vetyperoksidilla. Yleisemmin ilmaistuna yhdisteryhmää, josta voidaan tehdä tehokas käsittelemällä vetyperoksidilla tai vastaavalla hapettimella, voi edustaa kaava



Näillä yhdisteillä on tyypillisesti alhainen mikrobien vastainen aktiivisuus, tai sitä ei ole ollenkaan, monia aineosia sisältävässä väliaineessa ennen hapetusta. Ennen tätä keksintöä tertiaarisilla amiineilla ja kvaternaarisilla ammoniumsuoloilla on ilmoitettu olevan mikrobien vastainen vaikutus puskuriliuoksissa tai vedessä. Ennen tätä keksintöä ei ole kuitenkaan kuvattu amiinipitoisia yhdisteitä, joilla on merkittävä mikrobien vastainen vaikutus monia aineosia sisältävissä väliaineissa.

Amiinipitoinen yhdiste on tämän suoritusmuodon mukaisesti käyttökelpoinen, kun se estää bakteerien tai sienten kasvua monia aineosia sisältävässä väliaineessa seuraavassa testissä. Lisätään bakteerisoluja (10^1 - 10^3 solua/ml) pastöroituun maitoon ja inkuboidaan 120 - 192 tuntia lämpötilassa 11 °C. Amiinipitoinen yhdiste lisätään maitoon immobilisoidussa muodossa helmillä tai maidolle tarkoitetun säiliön sisäpinnalla ennen inkubointia. Kun maitoa on inkuboitu vähintään 24 tuntia amiinipitoisen yhdisteen lisäämisen jälkeen, siitä testataan bakteerien läsnäolo laimentamalla ja tekemällä maljalaskenta. Bakteripitoisuutta alle 10^5 solua/ml pidetään hyväksyttävänä. Tämä koe voidaan tehdä myös hedelmämehussa, kuten appelsiinimehussa, omenamehussa tms. Kokeessa käytettävät mikro-organismit voivat olla bakteereja, hiivoja tai homeita. Amiinipitoinen yhdiste sidotaan kovalenttisesti polymeerirunkoon sidoksella, kuten amidi- tai fenyleenisidoksella. Immobilisoidun amiinipitoisen yhdisteen pitoisuus on yleensä 0,3 - 16 µg·cm⁻². Ylimääräinen amiinipitoinen

yhdiste voidaan poistaa pesemällä lyhyen inkubointijakson jälkeen. Immobilisoidun amiinipitoisen yhdisteen pitoisuus on riittävä aikaansaamaan mikro-organismin esto suurin piirtein kokonaan käsiteltävässä nesteessä.

5 Läsnä olevista mikro-organismeista ja käyttöparametreista riippuen inhibitioprosessi on joko selektiivinen, johonkin tiettyyn epätoivottavaan mikro-organismilajiin kohdistuva, tai epäselektiivinen siinä mielessä, että useimmat tai kaikki kontaminoivat mikro-organismit tulevat
10 inhiboituiksi. Tämä voitaisiin toteuttaa bakteerit joko siirtoprosessilinjassa olevan komponentin avulla tai itse nestesäiliössä olevalla komponentilla.

 Säiliön 8 sisäpinnan päällysteenä oleva amiinipitoinen yhdiste toimii mikro-organismien sitojana ja niiden
15 kasvun estäjänä nesteessä.

 Suoritusmuotoa II valaisevat seuraavat keksintöä rajoittamattomat esimerkit (i) - (xi).

Esimerkki (i)

 Amiinipitoisen pinnan mikrobien vastainen aktiivisuus osoitettiin lisäämällä 100 mg "Amberlite" IRA-68-helmiä, erä nro 66F-0148 (toimittajana Sigma Chemical Co.,
20 St. Louis, Mo., USA) 50 mM Tris-puskuriin, pH 7,5 (2 ml), joka oli inokuloitu elintarvikkeita pilaavilla mikro-organismeilla, kuten *Pseudomonas fluorescens*illa, *Escherichia coli*lla tai *Bacillus brevis*illa (10^5 solua/ml), koeputkissa. Nämä helmet edustavat polyakryyliamidipintoja, jotka sisältävät polymeerin amidityypiatomeihin kytkettynä
25 N,N-dimetyyliaminopropyyliiryhmiä. Putkia sekoitettiin lämpötilassa 22 °C ja jäljellä olevat elävät solut mitattiin
30 maljalaskennalla. Elävien *Bacillus brevis* -solujen lukumäärä oli vähentynyt yli yhdellä kertaluvulla ja *Pseudomonas fluorescens* ja *Escherichia coli* -solujen lukumäärä yli neljällä kertaluvulla kahdessa tunnissa tertiaarisen pinnan läsnä ollessa.

Esimerkki (ii)

Erään toisen amiinipinnan mikrobien vastainen aktiivisuus osoitettiin lisäämällä 100 mg "Amberlite" IRA-94-helmiä, erä nro 123F-0163 (toimittaja mainittu Sigma Chemical Co.) koeputkissa 2 ml:aan 50 mM Tris-puskuria (pH 7,5), joka oli inokuloitu *Pseudomonas fluorescens*illa, *Escherichia coli*lla tai *Saccharomyces cerevisiae*lla (10^5 solua/ml). Helmen pinta edustaa pintoja, jotka sisältävät 4 mekv/g osittain hapetettua dimetyyliamiinia kytkettynä styreeni-divinyylibentseenikopolymeeriin. Putkia sekoitettiin lämpötilassa 22 °C ja mitattiin jäljellä olevat elävät solut maljalaskennalla. Elävien solujen lukumäärä oli laskenut tertiaarisen pinnan läsnä ollessa kahdessa tunnissa yli neljän kertaluvun verran kaikkien kolmen tutkitun organismin ollessa kyseessä.

Esimerkki (iii)

Tölkki, joka sisältää mikrobien vastaisesti vaikuttavan pinnan, pidentäisi pastöroidun hedelmämehun säilymisaikaa estämällä läsnä olevan mikrobiflooran kasvua. Tämän osoittamiseksi lisättiin 100 mg dimetyyliamino-propyyliipolyakryyliamidihelmiä (IRA-68) koeputkeen, joka sisälsi 2 ml steriiliä omenamehua. Putket inokuloitiin *Saccharomyces cerevisiae* -viljelmällä solutiheyteen 10^3 /ml ja inkuboitiin lämpötilassa 11 °C. Tertiaarista amiinia sisältävän pinnan läsnäolo rajoitti sekä kasvunopeutta että solujen kokonaismäärää. Tutkittavien näytteiden organoleptinen arviointi seitsemän vuorokauden kuluttua osoitti, että vertailunäytteet olivat pilaantuneet, kun taas amiinipitoisen pinnan sisältävät näytteet eivät olleet. Tämä esimerkki valaisee testiä, jota käytetään tämän suoritusmuodon mukaisten vaikuttavien amiinipitoisten yhdisteiden identifioinnissa.

Esimerkki (iv)

Tämä esimerkki valaisee tertiaarista amiinia sisältävää pintaa, jolla on vähäinen vaikutus *Saccharomyces*

cerevisiaen kasvun estäjänä esimerkissä (iii) kuvatuissa olosuhteissa. 100 mg "Dowex" WGR-2-helmiä, erä nro 83F-0120 (toimittaja mainittu Sigma Chemical Co.) lisättiin omenamehuun (2 ml), joka oli inokuloitu *S. cerevisiaella* solutiheyteen $10^3/\text{ml}$, ja sekoitettiin lämpötilassa 11 °C. Nämä helmet edustavat pintoja, jotka sisältävät styreeni-divinyylibentseenikopolymeeriin kytkettyä dimetyylimetyyliamiinia. Kasvua seurattiin maljalaskennalla; vain pieni ero elävien solujen lukumäärässä havaittiin amiinipinnan sisältävien putkien ja vertailuputkien välillä 6 vuorokauden aikana. Samanlaisissa kokeissa, jotka tehtiin puskuroiduissa suolaliuoksissa monia aineosia sisältävien väliaineiden sijasta, WGR-2-helmillä osoitettiin olevan mikrobien vastaisia ominaisuuksia yhtäpitävästi Endon et al. havaintojen kanssa, ja siten osoitettiin, että yksinkertaisissa väliaineissa havaittava mikrobien vastainen aktiivisuus ei korreloi tällaisen aktiivisuuden kanssa monia aineosia sisältävissä väliaineissa.

Esimerkki (v)

Sen osoittamiseksi, että dimetyyliaminopropyyli-polyakryyliamidipinta on tehokas pastöroidun maidon säilymisajan pidentäjänä, toistettiin esimerkin (iii) mukainen koe käyttämällä rasvatonta kuivamaitoa monia aineosia sisältävänä väliaineena, "Amberlite" IRA-68-helmiä amiinipitoisena pintana ja *Pseudomonas fluorescens* testiorganismina. Amiinipinnan läsnäolo vähensi merkittävästi *Pseudomonas fluorescens*in kasvunopeutta tässä väliaineessa.

Esimerkki (vi)

Tämä esimerkki osoittaa erään toisen amiinia sisältävän pinnan käyttökelpoisuuden mikrobien kasvun kontrolloijana monia aineosia sisältävässä väliaineessa. 100 mg "Amberlite A-21" -helmiä, jotka koostuivat styreeni-divinyylibentseenikopolymeeriin kytketystä osittain hapetusta dimetyylimetyyliamiinista, lisättiin steriiliin omenamehuun (2 ml). Näiden helmien osittainen hapetus saa-

tiin aikaan käsittelemällä ne ennalta vetyperoksidilla. Putket inokuloitiin *Saccharomyces cerevisiae* -viljelmällä siten, että solutiheydeksi tuli 10^2 - 10^3 /ml, ja inkuboitiin lämpötilassa 6, 11 tai 25 °C. Näiden pintojen läsnä-
5 olo vähensi dramaattisesti solujen kasvua kaikissa tapauksissa. Lisäksi mehun pilaantumisen havaittiin viivästyvän suuresti vertailunäytteisiin verrattuna.

Esimerkki (vii)

Tämä esimerkki osoittaa, että immobilisoitu kvaternaarinen ammoniumyhdiste, joka tunnetaan aktiivisena mikrobien vastaisena pintana, on epäaktiivinen monia aineosia sisältävän väliaineen läsnä ollessa. Valmistettiin 3-trimetoksisilylpropyylioktadekyyliidimetyyliammoniumkloridiliuos (US-patenttijulkaisu 4 259 103, Sylgard) li-
10 säämällä tätä ainetta veteen ja päällystettiin sen avulla viljelyputken sisäpinta. Putkiin lisättiin joko yksinkertaista puskuriliuosta tai steriiliä omenamehua ja nämä väliaineet inokuloitiin sitten *S. cerevisiaella*, jota lisättiin 10^5 solua/ml puskurin ollessa kyseessä ja 10^3 so-
15 lua/ml omenamehun tapauksessa. Näytteitä inkuboitiin lämpötilassa 11 °C. Otettiin näytteitä eri aikoina inokuloinnin jälkeen ja määritettiin elävät pesäkkeenmuodostusyksiköt maljalaskennalla. Sienten vastaisen aktiivisuuden osoitti hiivasolujen nopea kuoleminen (8 tunnissa) pusku-
20 riliuoksessa. Tämä havainto sopi yhteen aiempien tietojen kanssa. Solujen elinkyvyn heikkenemistä ei sen sijaan havaittu omenamehunäytteissä ja vertailunäytteisiin nähden kasvu oli normaalia 5 vrk:n ajan. Tämä osoitti, että tämän aineen mikrobien vastainen aktiivisuus hävisi monia aine-
25 osia sisältävässä väliaineessa.

Esimerkki (viii)

Aminipitoisen pinnan sienten vastainen aktiivisuus osoitettiin hiivaelatusalustassa (Bacto Malt Extract Broth, Difco). Koeputkiin laitettiin 250 mg "Amberlite"
35 IRA-68- ja IRA-94-helmiä ja lisättiin kuhunkin putkeen

5 ml kasvualustaa, joka sisälsi 10^3 solua/ml *Saccharomyces cerevisiaeta*. Helmiä sisältävissä putkissa ja vertailuputkessa esiintyvää kasvua mitattiin maljalaskennalla 6 vrk:n ajan. *S. cerevisiae* -solujen lukumäärä oli saavuttanut 6 vrk:n kuluttua vertailunäytteissä arvon 10^9 solua/ml, kun taas ORA-68- ja IRA-94-putkissa ei havaittu mitään kasvua. Solujen lukumäärät näissä putkissa olivat alle 10^3 solua 6 vrk:n inkuboinnin jälkeen.

Esimerkki (ix)

10 *Saccharomyces cerevisiaen* sitoutuminen tertiaari-
siin amiineihin osoitettiin kahdella menetelmällä. Ensimmäisessä menetelmässä pylväät (90 x 6 mm) täytettiin "Amberlite" IRA-68- ja IRA-94-helmillä. Pylväät tasapainotettiin Ringersin liuoksella (1/4 vahvuudesta). Pylväälle
15 le laitettiin 1 ml Ringersin liuokseen valmistettua *S. cerevisiae* -solususpensiota (10^6 solua/ml) ja eluoitiin Ringersin liuoksella. Eluaattifraktioille (1 ml) tehtiin laskenta bakteerilaskentakammiossa ja laskettiin eluoituneiden bakteereiden lukumäärä. Soluista jäi 45 % eluotumatta sekä IRA-68- että IRA-94-pylväissä käytettäessä Ringersin liuosta. Toisessa menetelmässä, joka suunniteltiin sitoutumisen osoittamiseen suoraan liuoksessa, IRA-68-helmet tasapainotettiin Ringersin liuoksessa ja laitettiin 250 mg helmiä 10 ml:n koeputkeen. Putkeen siirrostettiin 2 ml *S. cerevisiae* -suspensiota Ringersin liuoksessa. Koeputkea inkuboitiin pystyasennossa huoneen lämpötilassa 2 tuntia, mitattiin pH (5,4) ja dekantoitiin supernatantti. Lisättiin kahdesti steriiliä Ringersin liuosta sitoutumattomien solujen pesemiseksi pois. *S. cerevisiaen* sitoutuminen IRA-68-helmiin osoitettiin mikroskooppisesti
30 tutkimalla.

Esimerkki (x)

Sen osoittamiseksi, että amiinipitoisten pintojen *Saccharomyces cerevisiaeta* inhiboiva vaikutus kohdistuu solukalvoon, *S. cerevisiae* -solut suspendoitiin puskuriin
35

(10^5 solua/ml), joka sisälsi 5 % sakkaroosia yhdessä "Amberlite" IRA-68:n (50 mg/ml) kanssa tai ilman sitä. Otettiin näytteitä ja määritettiin niiden siirrostustehokkuus alustalla, joka sisälsi 0,01 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS). SDS on pinta-aktiivinen aine, ja sillä on kyky hajottaa biologisia kalvoja. Käytetty SDS-pitoisuus (0,01 %) on kuitenkin pienempi, kuin *S. cerevisiae* -suhteen tappava pitoisuus. Kun solut olivat olleet 70 tuntia IRA-68:n vaikutuksen alaisina, niiden siirrostustehokkuus 0,01 % SDS:ää sisältävällä alustalla oli 80 % pienempi kuin alustalla, joka ei sisältänyt SDS:ää. Näytteissä, joita ei käsitelty IRA-68:lla, ei havaittu eroja siirrostustehokkuudessa, mikä osoittaa, että IRA-68-käsittely herkisti *S. cerevisiae* -solut SDS:n kalvoja hajottavalle vaikutukselle tämän normaalisti ei-tappavan pitoisuuden vallitessa.

Esimerkki (xi)

Lisätodisteita siitä, että IRA-68:n vaikutus heikentää *Saccharomyces cerevisiae* kalvojen yhtenäisyyttä, saatiin värjäämällä solut Trypan Blue -värjäysaineella. Trypan Blue -värjäys osoittaa eukaryoottisolujen elinkyisyyden värinhylkimismekanismilla. Solut, joiden solukalvo on ehjä, eivät päästä väriä sisäänsä eivätkä siten värjäydy. Kuolleet tai vaurioituneet solut, joiden kalvo on läpäisevä, päästävät värin sisäänsä ja värjäytyvät sinisiksi. *S. cerevisiae* -solut suspendoitiin puskuriin (10^5 solua/ml), joka sisälsi 5 % sakkaroosia yhdessä IRA-68:n kanssa (50 mg/ml) tai ilman sitä. Kun IRA-68 oli vaikuttanut näytteeseen 120 tuntia, yli 80 % *S. cerevisiae* -soluista värjäytyi sinisiksi, kun taas vain 2 - 3 % vertailusoluista, joita ei ollut käsitelty IRA-68:lla, värjäytyi.

Suoritusmuoto III

Tätä suoritusmuotoa kuvataan tässä viitaten erityisesti raudan sitomiseen elintarvikkeista, kuten maidosta

ja hedelmäpohjaisista juomista, mukaan luettuina hedelmäjuomat ja -nektarit. On kuitenkin ymmärrettävä, että tämä suoritustyyli on käyttökelpoinen raudan sitomiseen nestemäisestä faaseista yleisesti.

5 Edullisesti käytetään matriksia, johon rautaa sitova koostumus on sidottu joko kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti. Esimerkkeihin tällaisista matrikseista kuuluvat polymeerit, kuten polyeteeni tai polystyreeni, lasi ja selluloosapohjaiset koostumukset, joihin rautaa sitova
10 koostumus on sidottu passiivisesti adsorboimalla tai kovalenttisesti sitomalla. Rautaa sitovalla koostumuksella päällystetty pinta voidaan saattaa kosketukseen elintarviketuotteen, esimerkiksi nestemäisen tuotteen, kuten hedelmämehun, kanssa joko käyttämällä in line -patruunaa tai
15 muuta kontaktia edistävää järjestelmää siirtovaiheen aikana, tai pinta voi olla osana pakkausmateriaalia. Tämä poistaa rautaa, joka edistää mikro-organismien kasvua, kelatoimalla se kiinteään faasiin, jolloin lopputuloksena on pakatun tuotteen säilymisajan piteneminen ja/tai epätoivottavien tai patogeenisten organismien kasvun vähentäminen tai estäminen.

Hyvä kontakti säiliössä 8 olevan nestemäisen tuotteen ja säiliössä olevaan matriksiin sidotun rautaa sitovan koostumuksen välillä saadaan aikaan nesteen 22 ja säiliössä olevan sitovan pinnan liikkumisella suhteessa toisiinsa. Rautaa sitova koostumus voidaan vaihtoehtoisesti sitoa erillisen liikkuvan ja nestetuotetta sekoittavan välineen pintaan. Sidotun raudan erotus saadaan aikaan, kun väline poistetaan tai nestemäinen materiaali kaadetaan
25 pois säiliöstä, jolloin rauta jää sidotuksi tyhjennetyn säiliön sisäpintaan.

Soveltuviin rautaa sitoviin koostumuksiin kuuluvat deferriferrikkromi A, dipyridyyli, pyrimiini tai niiden seokset.

35 Rautaa sitovan koostumuksen immobilisointi kiinteään alustaan voi olla luonteeltaan joko kovalenttista

tai ei-kovalenttista. Tämän vuorovaikutuksen tärkeänä ominaispiirteensä on, että alustaan immobilisoidun koostumuksen tulisi pysyä tiukasti sitoutuneena eikä sitä saisi vapautua raudansitomisvaiheen aikana. Rautaa sitovan koostumuksen kovalenttinen sitominen voidaan toteuttaa monin erilaisin menetelmin, jotka ovat alalla hyvin tunnettuja. Joissakin tapauksissa saattaa olla toivottavaa sisällyttää yhdistelmään kytkentäryhmiä tai välihaaroja antamaan rautaa sitovalle koostumukselle jonkin verran lisää liikkumisvapautta ja/tai parantamaan kontaktia nestemäisen materiaalin kanssa. Nämä voidaan tuoda mukaan immobilisointivaiheen aikana.

Vaihtoehtona kovalenttiselle immobilisoinnille voi joissakin olosuhteissa olla toivottavaa sitoa rautaa sitova koostumus ei-kovalenttisesti materiaalin kanssa kosketukseen tulevaan pintaan hydrofobisen vuorovaikutuksen kautta. Rautaa sitovan koostumuksen vesiliuosta inkuboidaan kosketuksessa kontaktipinnan kanssa, johon rautaa sitova koostumus on määrää sitoa.

Materiaalin kanssa kosketukseen tuleviin pintoihin tällä tavalla sidotut rautaa sitovat koostumukset ovat stabiileja, ja valmistettuja substraatteja voidaan säilyttää joko puskurilioksessa tai kuivattuina aktiivisuuden häviämättä. Immobilisoidun rautaa sitovan koostumuksen pitoisuus on riittävä saamaan aikaan käsitellyssä nesteessä tai kiinteässä aineessa olevien mikro-organismien olennainen inhibitio.

Kun rautaa sisältävät välineet saatetaan kosketukseen liukenemattoman matriksin kanssa, joka sisältää rautaa sitovaa koostumusta substraattiin kytkettynä, rauta voidaan muuttaa kvantitatiivisesti vapaasta sidottuun muotoon, jossa se ei enää ole saatavilla mikrobien kasvua varten. Tämä kvantitatiivinen muuttuminen tapahtuu niin kauan, kun liukenemattomassa matriksissa on ylimäärin sitomiskapasiteettia vapaaseen rautaan nähden eikä rauta

kompleksoidu saavuttamattomissa olevaan muotoon, kuten helmiksi.

5 Raudan muuttumisesta liukenemattomaan muotoon on seurauksena, että vapaan raudan pitoisuus alenee merkittävästi mikrobien kasvun tarvitseman alarajan alapuolella. Niinpä kontaminoivien mikro-organismien kasvu väliaineessa, joka on kosketuksessa rautaa sitovan matriksin kanssa, vähenee verrattuna tilanteeseen, jossa väliainetta ei saateta kosketukseen tällaisen pinnan kanssa, ja säilyvyys 10 paranee vastaavasti. Näissä olosuhteissa ainoat tavat, joilla mikro-organismit pystyvät voittamaan inhibition, on rautaa sitovan matriksin hajoaminen tai rautaa sitovien aineiden (sideroforien) muodostuminen, joilla on suurempi sitoutumisvakio kuin matriksilla. Näissäkin tapauksissa 15 havaitaan olennainen viive ennen kasvun alkamista. Tämä pätee erityisesti viimeksi mainittuun tapaukseen liukene-mattomien kompleksien kineettisen stabiiliuden ansiosta.

Säiliön 8 sisäpintoihin sidottu rautaa sitova koostumus sitoo ja immobilisoi rautaa nestemäisestä elintarvikkeesta 22. Sitovaa proteiinia ja/tai ainetta, joka es- 20 tää mikro-organismin metaboliaa, voidaan haluttaessa lisätä säiliön 8 joihinkin tai kaikkiin sisäpintoihin. Biosidinen aine voi olla hajottava entsyymi.

25 Suoritusmuotoa valaisevat seuraavat esimerkit I - VI.

Esimerkki I

Tämä esimerkki valaisee rautaa sitovan koostumuksen immobilisointia lasihelmille.

30 Ferrikromi A puhdistettiin suoraan Ustilago spherogena -väliaineesta uudelleenkiteytyksellä.

Tämä rautaa kelatoiva aine sidottiin kovalenttisesti lasiin raudalla kyllästetyssä muodossa, mikä suojaa raudansitomiskohtia.

35 40 mg uudelleenkiteytettyä ferrikromi A:ta liuotettiin asetoniin (40 ml), joka sisälsi 0,4 ml pyridiiniä.

Tähän lisättiin sitten 40 mg tosyylidikloridia ja reaktio-
seoksen annettiin sekoittua huoneen lämpötilassa tunnin
ajan. Tässä vaiheessa seokseen lisättiin 2 g aminopropyy-
lisäädelyjä huokoslasihelmiä ja reaktion annettiin edetä
5 vielä 4 tuntia. Väriltään punaisen ferrikromi A:n havait-
tiin tällöin liittyneen suurelta osin lasihelmiin. Reak-
tioseos suodatettiin ja pestiin kahdesti asetonilla, kah-
desti vedellä ja lopuksi vielä kahdesti asetonilla. Orans-
sinpunaisten helmien annettiin kuivua.

10 Esimerkki II

Esimerkin I mukaisella menettelyllä valmistetun
immobilisoidun ferrikromi A -tuotteen arvioimiseksi eli-
minoitiin epäspesifinen tausta sitoutumattoman raudan
kanssa esiintyvän reaktiivisuuden suhteen tämän esimerkin
15 mukaisella menettelyllä.

Ferrikromi A -lasihelmillä olevat reagoimattomat
primaariset aminoryhmät suojattiin saattamalla ne reagoi-
maan etikkahappoanhydridin kanssa. 2 g ferrikromi A -lasi-
helmiä suspendoitiin seokseen, joka sisälsi suhteessa
20 100:1 asetonia ja pyridiiniä (10 ml). Tähän seokseen li-
sättiin 2,73 ml etikkahappoanhydridiä ja reaktioseosta
inkuboitiin vähintään 1 tunti. Helmet pestiin asetonilla,
kahdesti vedellä ja vielä kahdesti asetonilla. Derivati-
soidut helmet kuivattiin alipaineessa.

25 Esimerkki III

Tämä esimerkki valaisee menetelmää sidottua rautaa
sisältävän rautaa sitovan koostumuksen regeneroimiseksi.

Sitoutunut rauta poistettiin immobilisoidusta fer-
rikromi A:sta suspendoimalla 1 g ferrikromi A -lasihelmiä
30 veteen (5 ml) ja lisäämällä 0,25 ml 1 M KSCN-liuosta ja
5 mg natriumditioniittia. Reaktioseoksen annettiin seistä
vähintään tunnin ajan, jona aikana värin havaittiin hä-
viävän lasihelmistä. Helmet, joista oli poistettu rauta,
(deferriferrikromi A -helmet) pestiin sitten kahdesti ve-
35 dellä ja kahdesti asetonilla. Sitten deferriferrikromi A

-helmet kuivattiin ja steriloidittiin käsittelemällä 80-%:isella etanolilla.

Esimerkki IV

5 Tämä esimerkki valaisee bakteerien kasvun estämistä tämän suoritustavan mukaisella menetelmällä.

Psyktrooppinen *Pseudomonas fluorescens* -kanta eristettiin pilaantuneesta maidosta. 10^3 CFU näitä soluja lisättiin 5 ml:n annokseen alustaa, joka sisälsi 6 g Na_2HPO_4 :a, 3 g KH_2PO_4 :a, 0,5 g NaCl :a, 1 g NH_4Cl :a, 2 g glukosia 0,002 mol/l MgSO_4 ja 0,0001 mol/l CaCl_2 :a. Alustan rautapitoisuuden määritettiin olevan 1,2 $\mu\text{mol/l}$. Samaan aikaan helmien lisäämisen kanssa joihinkin näytteisiin lisättiin 10 mg DFFA-derivatisoituja lasihelmiä ja joihinkin etikkahappoanhydridillä suojattuja aminopropyyllilasihelmiä. Näytteitä inkuboitiin lämpötilassa 11 °C ja kasvu arvioitiin määrittämällä CFU/ml-arvo maljalaskennalla eri aikoina. Tulokset osoittivat, että immobilisoidun rautaa kelatoivan aineen lisääminen esti merkittävästi bakteerisolujen kasvua. Näissä näytteissä tapahtui lopulta kasvua pidentyneen viiveen jälkeen.

Esimerkki V

Tämä esimerkki valaisee sitä, ettei deferrioksamiini B sovellu rautaa sitovaksi koostumukseksi keksinnön mukaisen menetelmän yhteydessä.

25 Deferrioksamiini B (Desferal™, Ciba-Geigy) kytkettiin agaroosihelmiin, jotka oli muunnettu CNBr:lla alalla tunnetulla tavalla. Kovalenttinen sitoutuminen tapahtui Desferalin primaarisen aminoryhmän ja agaroosihelmien välillä, ja rautaa kelatoiva aine säilytti raudansitomiskyynsä määritettynä edellisissä esimerkeissä kuvattujen kanssa analogisin kokein. Tehtiin muuten samanlainen kasvatus tutkimus kuin esimerkissä IV yksityiskohtaisesti kuvattu, mutta lisättiin vastaava määrä Desferal-agaroosia DFFA-lasihelmien sijasta. Kasvun estymistä ei havaittu edes lisättäessä olennainen ylimäärä rautaa sitovaa mat-

riksia saatavilla olevaan rautamäärään nähden; niinpä bakteereilla oli kyky ottaa vastaan Desferal -agaroosiin sidottua rautaa joko suoran tai epäsuoran kilpailun kautta.

Esimerkki VI

5 (Tämä esimerkki voitaisiin katsoa myös suoritusmuodon II piiriin kuuluvaksi.)

Tämä esimerkki valaisee sitä, miten kasvualustassa olevat tertiaariset amiinit estävät *Saccharomyces*-hiivan kasvulle välttämättömien komponenttien saannin.

10 IRA-94:ä ja IRA-68:n (Rohm & Haas) inkuboitiin monia aineosia sisältävän alustan kanssa, joka sisälsi muutamia kasvutekijäyhdistelmiä; alusta sisälsi seuraavia aineosia.

Typpilähde

15 Ammoniumsulfaatti 3,5 g/l

Hiililähde

Sakkaroosi 5,0 g/l

Vitamiinit

Yhdistelmä 1 Biotiini 2,0 µg/l

20 Kalsiumpantotenaatti 400,0 µg/l

Foolihappo 2,0 µg/l

Yhdistelmä 2 Isositoli 2000,0 µg/l

Niasiini 400,0 µg/l

p-aminobentsoehappo 200,0 µg/l

25 Yhdistelmä 3 Pyridoksiini HCl 400,0 µg/l

Riboflaviini 200,0 µg/l

Tiamiini HCl 400,0 µg/l

Hivenaineet

Yhdistelmä 4 Boorihappo 500,0 µg/l

30 Kuparisulfaatti 40,0 µg/l

Kaliumjodidi 100,0 µg/l

Yhdistelmä 5 Mangaanisulfaatti 400,0 µg/l

Natriummolybdaatti 200,0 µg/l

Sinkkisulfaatti 400,0 µg/l

35 Rautakloridi 200,0 µg/l

Suolat

	Yksiemäksinen kaliumfosfaatti	1,0 g/l
	Magnesiumsulfaatti	0,5 g/l
	Natriumkloridi	0,1 g/l
5	Kalsiumkloridi	0,1 g/l

Kun alusta oli ollut 48 tuntia kosketuksessa IRA-68:n tai IRA-94:n kanssa, käsitelty alusta inokuloitiin Saccharomyces-soluilla. IRA-94-helmillä käsitelty alusta ei edistänyt kasvua, kun taas IRA-68-helmillä käsitellyssä alustassa esiintyi käsittelemättömän alustan kanssa vertailukelpoista kasvua. IRA-94:llä käsitelty alusta ei edistänyt Saccharomyces-solujen kasvua, kun kaikki ravintoaineyhdistelmät lisättiin takaisin samanaikaisesti.

Tällä menetelmällä on seuraavat edut:

15 A) Aktiiviset aineet on helppo sitoa matriksiin joko passiivisesti tai aktiivisesti (kovalenttisesti) kemiallisella käsittelyllä.

B) Matriksi voi olla polymeeriä, lasia, ruostumatonta terästä jne.

20 C) Käytetään pelkästään myrkyttömiä, elintarvikkeiden kanssa yhteensopivia materiaaleja.

D) Aktiivisten aineiden ja matriksimateriaalien siirtyminen käsitteltävään materiaaliin on mitätöntä.

25 E) Elintarvikkeen organoleptiset ja ravitsemukselliset ominaisuudet säilyvät ennallaan.

F) Saadaan aikaan aktiivisia, affiniteettiin perustuvia solujen ja kasvutekijöiden poistojärjestelmiä, jotka jättävät muut rakenneosat koskemattomiksi ja vahingoittumattomiksi.

30 G) Järjestelmät perustuvat biologisiin ilmiöihin.

H) On käytettävissä spesifinen ja epäspesifinen affiniteetti suoritusmuotojen I ja II yhteydessä kuvatulla tavalla.

35 I) Aktiivisten aineiden regenerointi on mahdollista suoritusmuotojen I ja III yhteydessä.

J) Tarjotaan käyttöön aktiivisia mikrobiologisia säätelyjärjestelmiä mikrobiologisen tilanteen stabiloimiseksi säiliöiden täytön jälkeen.

Teollinen käyttökelpoisuus

- 5 Keksinnön mukaiset suoritusmuodot ovat käyttökelpoisia teollisuuden eri aloilla, erityisesti pakkausala-
- la.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä monimutkaisen eli monia aineosia sisältävän väliaineen muodossa olevan, nesteen käsittävän pakatun tuotteen (22) sisältämien mikro-organismien kasvun säätelemiseksi, jossa menetelmässä tuote (22) saatetaan kosketukseen pakkausmateriaalin (8) pinnassa (10, 12, 14, 16) olevan, olennaisilta osiltaan liukenemattoman, immobilisoidun, kasvua ehkäisevän aktiivisuuden omaavan aineen kanssa, jolla aineella on sellainen koostumus, että se on aktiivinen mainitun pakatun tuotteen (22) suhteen, t u n n e t t u siitä, että valitaan kasvua ehkäisevän aktiivisuuden omaavaksi aineeksi aine, joka ei ole entsyymi, ja jonka aktiivisuus ei oleellisesti esty pakatun tuotteen (22) jonkun komponentin vaikutuksesta, ja että aktiivisuutta edistetään aikaansaamalla suhteellinen liike pakatun tuotteen (22) ja aktiivisen aineen välillä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine valitaan ryhmästä, joka käsittää lektiinit, polysakkaridit, vasta-aineet, metallia kelatoivat yhdisteet ja amiinin sisältävät yhdisteet.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine on sitova aine, jolla on korkea sitomisaffiniteetti pakatun tuotteen (22) tiettyjen komponenttien suhteen ja joka siten sitoo näitä komponentteja, mutta vähäinen sitomisaffiniteetti tuotteessa (22) olevien muiden komponenttien suhteen, jotka muut komponentit siten eivät estä mainittujen tiettyjen komponenttien sitoutumista.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut tietyt komponentit ovat tuotteen sisältämät mikro-organismit.

5. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen

aine käsittää amiinin sisältävän yhdisteen, joka amiini on mainitussa tuotteessa (22) oleville mikro-organismeille saatavissa ja kykenee aiheuttamaan niille riittävästi vahinkoa niiden kasvun estämiseksi tuotteessa (22).

5 6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine käsittää sitovan yhdistelmän muodossa olevan sitovan aineen, jolla yhdistelmällä on affiniteetti vähintään yhdelle sellaiselle hivenainemetallille, joka toimii tuotteessa (22) olevien mikro-organismien biologisena kasvutekijänä, ja jolla yhdistelmällä on sellainen sitoutumisvakio ja kineettinen stabiilisuus, että tapahtuu riittävä hivenainemetallin (metallien) sitoutuminen ja että se siten menestyksellisesti kilpailee mikro-organismien kanssa ja pidättää sitoutuneen hivenainemetallin (sitoutuneet hivenainemetallit), ja siten rajoittaa hivenainemetallin (metallien) saatavuutta mikro-organismeille.

15 7. Pakkausmateriaali (8), jonka pinnalla (10, 12, 14, 16) on käytännöllisesti katsoen liukenematon, immobilisoitu, kasvua ehkäisevä aine, jotta saataisiin kosketus kompleksisen väliaineen muodossa olevaan, nesteen käsittävään tuotteeseen (22), mainitun aineen ollessa yhdistelmä, joka on aktiivinen tuotteeseen (22) nähden estäen tuotteessa (22) olevien mikro-organismien kasvu, t u n n e t t u siitä, että kasvua ehkäisevän vaikutuksen omaavan aineen, joka ei ole entsyymi, aktiivisuus ei oleellisesti esty jonkin tuotteessa (22) olevan komponentin vuoksi.

25 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen pakkausmateriaali, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine on valittu ryhmästä, joka käsittää lektiinit, polysakkaridit, vasta-aineet, metallia kelatoivat yhdisteet ja amiinin sisältävät yhdisteet.

30 9. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukainen pakkausmateriaali, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine käsittää amiinin sisältävän yhdisteen, jossa amiini on mainitussa tuotteessa (22) oleville mikro-organismeille

saatavilla ja kykenee aiheuttamaan niille riittävästi vahinkoa niiden kasvun estämiseksi tuotteessa (22).

5 10. Patenttivaatimuksen 7, 8 tai 9 mukainen pakkausmateriaali (8), t u n n e t t u siitä, että aktiivinen aine käsittää sitovan yhdistelmän muodossa olevan sitovan aineen, jolla yhdistelmällä on affiniteetti vähintään yhdelle sellaiselle hivenainemetallille, joka toimii biologisena kasvutekijänä, ja jolla yhdistelmällä on sellainen sitoutumisvakio ja sellainen kineettinen stabiili-
10 suus mainitun metallin (mainittujen metallien) sitomiseksi, joka on riittävä, jotta sitova yhdistelmä pystyisi tehokkaasti kilpailemaan mainitusta metallista (mainituista metalleista) mikro-organismien kanssa ja pidättämään metallin (metallit) täten rajoittaen tämän (näiden) saata-
15 vuutta mikro-organismeille.

 11. Patenttivaatimuksen 7, 8, 9 tai 10 mukainen pakkausmateriaali, t u n n e t t u siitä, että sen pinnassa myös on biosidinen aine, joka soveltuu mikro-organismien inaktivoimiseksi.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen pakkausmateriaali, t u n n e t t u siitä, että biosidinen aine on hajottava entsyymi.

Patentkrav

1. Förfarande för reglering av mikroorganismtill-
växt i en förpackad produkt (22) i form av ett komplext,
5 dvs många komponenter innehållande medium och omfattande
en vätska, i vilket förfarande produkten (22) bringas i
kontakt med en praktiskt taget olöslig, immobiliserad,
tillväxt förhindrande substans på en yta (10, 12, 14, 16)
av ett förpackningsmaterial (8), vilken substans har en
10 sådan sammansättning, att den uppvisar en aktivitet visavi
den nämnda förpackade produkten (22), k ä n n e t e c k -
n a t därav, att såsom substans med tillväxt förhindran-
de aktivitet väljes en substans som inte är ett enzym, och
vars aktivitet inte väsentligt inhiberas av någon i den
15 förpackade produkten (22) ingående komponent, och att ak-
tiviteten befrämjas genom att åstadkomma en relativ rörel-
se mellan den förpackade produkten (22) och den aktiva
substansen.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att den aktiva substansen väljs ur
en grupp omfattande lektiner, polysackarider, motkroppar,
metall kelaterande föreningar och amin innehållande före-
ningar.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n -
25 n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansen är en
bindande substans med hög bindingsaffinitet till särskil-
da komponenter i den förpackade produkten (22) och sålunda
binder dessa komponenter, men med en låg bindingsaffini-
tet till andra komponenter i produkten (22), vilka andra
30 komponenter sålunda inte förhindrar bindning av nämnda
särskilda komponenter.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att nämnda särskilda komponenter är
i produkten befintliga mikroorganismer.

5. Förfarande enligt något av föregående patent-
35 krav, k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva

substansen omfattar en amin innehållande förening, vilken amin är disponibel för i nämnda produkt (22) befintliga mikroorganismer och kapabel att åstadkomma dessa tillräcklig skada för att förhindra deras tillväxt i produkten (22).

6. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansen omfattar en bindande substans i form av en bindande komposition med affinitet för åtminstone en sådan spårämnesmetall, som utgör en biologisk tillväxtfaktor för mikroorganismerna i produkten (22), vilken komposition har en sådan bindingskonstant och en sådan kinetisk stabilitet, att en tillräcklig bindning av spårämnesmetall (metaller) äger rum, och att den sålunda framgångsrikt konkurrerar ut mikroorganismerna och kvarhåller den bundna spårämnesmetallen (de bundna spårämnesmetallerna), och sålunda inskränker spårämnesmetallens (metallernas) tillgänglighet för mikroorganismerna.

7. Förpackningsmaterial (8), på vars yta (10, 12, 14, 16) finns en praktiskt taget olöslig, immobiliserad, tillväxt förhindrande substans, för att åstadkomma kontakt med en produkt (22) i form av ett komplext medium och omfattande en vätska, varvid nämnda substans är en sammansättning, som uppvisar aktivitet visavi nämnda produkt (22) och förhindrar mikroorganismtillväxt i produkten (22), k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansens, vilken har en tillväxtförhindrande verkan och vilken inte är ett enzym, aktivitet inte väsentligt inhiberas av någon av de i produkten (22) ingående komponenterna.

8. Förpackningsmaterial enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansen är utvald ur en grupp omfattande lektiner, polysacrider, motkroppar, metall kelaterande föreningar och amin innehållande föreningar.

9. Förpackningsmaterial enligt patentkrav 7 eller 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansen omfattar en en amin innehållande förening, vilken amin är disponibel för i nämnda produkt (22) befintliga mikro-
5 organismer och kapabel att åstadkomma dessa tillräcklig skada för att förhindra deras tillväxt i produkten (22).

10. Förpackningsmaterial enligt patentkrav 7, 8 eller 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att den aktiva substansen omfattar en bindande substans i form av en
10 bindande komposition med affinitet för åtminstone en sådan spårämnesmetall som utgör en biologisk tillväxtfaktor, vilken komposition har en sådan bindningskonstant och en sådan kinetisk stabilitet för bindning av nämnda metall (metaller) som är tillräcklig för att den bindande kompo-
15 sitionen framgångsrikt konkurrerar ut mikroorganismerna och kvarhåller metallen (metallerna), varvid sålunda dennas (dessas) tillgänglighet för mikroorganismerna inskränks.

11. Förpackningsmaterial enligt patentkrav 7, 8, 9 eller 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att på dess yta
20 även finns ett biocida medel lämpligt för inaktivering av mikroorganismer.

12. Förpackningsmaterial enligt patentkrav 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att det biocida medlet är en lytisk enzym.

