(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 950672 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 950672

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
D21H 17/22
C07K 2/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **27.05.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.02.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **10.03.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **27.05.1994 PCT/US1994/006040**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

16.06.1993 US 078932

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Ranpak Corp.,** 8023 Crile Road Concord Township, OH 44077, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Hughes, Kenneth E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Masterson, David C.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Fink, David J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Pickett, Gordon E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • **Metz, Barbara A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 • **Gemmer, Paul M.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 • **Brody, Richard S.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Solubilisoidulla kollageenilla vahvistettu paperi ja menetelmä sen val mistamiseksi

Papper förstärkt med solubiliserat kollagen och metod för att framstäl la detta

Solubilisoidulla kollageenilla vahvistettu paperi ja menetelmä sen valmistamiseksi

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee menetelmää solubilisoidun kollageenin valmistamiseksi ja solubilisoidulla kollageenilla vahvistetun paperin valmistamiseksi, menetelmän tuottaessa etuja muihin tunnettuihin, parannettuja papereita tuottaviin menetelmiin verrattuna. Keksintö koskee myös parannettua solubilisoitua kollageenia ja parannettua paperia, jotka on valmistettu menetelmää käyttäen. Keksinnöllä on käyttöä valmistettaessa vähillä kustannuksilla solubilisoitua kollageenia ja selluloosatuotteiden sideaineissa, erityisesti tuotettaessa uusiselluloosapaperia, jolla on parannetut mekaaniset ominaisuudet ja matalat kustannukset.

Keksinnön tausta

Eläinvuotien käsittely nahan tuottamiseksi on ikivanha taito ja nykyään se on hyvin kehittynyttä teollisuutta. Erinomaiset viitteet koskien nahanvalmistuksen kemiaa, McLaughlin, G. D. et al., The Chemistry of Leather Manufacture, Reinhold Publishing Corp., N.Y. (1945), ja kollageenin reaktiivisuutta, Gustavson, K. H., The Chemistry and Reactivity of Collagen, Academic Press Inc., N.Y. (1956), ovat peräisin 1940- ja 1950-luvuilta ja ovat yhä tänään harjoitetun alan peruskuvauksia. Nimi "kollageeni" on peräisin kreikankielisestä sanasta, joka tarkoittaa liimaa, kuten myös termi "kolloidi", joka tarkoittaa "liimankaltaista" kreikankielessä.

Iho koostuu neljästä selvästi toisistaan erottuvasta kerroksesta, jotka ovat ulkopuolelta sisäänpäin: (1) ohut ulkoinen epiteelikerros, josta käytetään termiä "orvaskesi", joka sisältää runsaasti keratiiniproteiinia, mutta ei kollageenia; (2) tiivis, kollageenia runsaasti sisältävä kerros, josta käytetään termiä "dermaalinen"

kerros tai "jyväiskerros", vanhemmassa kirjallisuudessa sitä kutsutaan myös "termostaatti"-kerrokseksi; (3) paksumpi kerros, joka koostuu vähemmän tiiviistä, kollageenia runsaasti sisältävistä sidekudoksista ja josta käytetään termiä "verinahka" ja (4) "ihonalaiskudoksen" sisäkerros, jonka parkitsija tuntee nimellä "lihapuoli", jolla iho on kiinnittynyt alla olevaan kudokseen.

Vaikka vuodat voidaan pelkästään "säilöä" suolaamalla suolaliuoksessa ja/tai muussa biosidisessä liuoksessa mikrobien aiheuttaman hajoamisen pysäyttämiseksi, monet vuodat, jotka on tarkoitettu käytettäväksi nahkateollisuudessa, "kalkitaan", so. liotetaan sammutetun kalkin (kalsiumhydroksidin) ja veden kyllästetyssä liuoksessa. Kalkitusprosessi aloittaa orvaskeden ja ihonalaiskerroksen pehmittämisen ja on ensimmäinen vaihe kalttausprosessissa. Kun kalkitus on saatu päätökseen, karvat, orvaskesi ja mikä tahansa jäljellä oleva liha, rasva ja pintalihakset poistetaan kaapimalla mekaanisesti ja dermaalinen kerros leikataan mekaanisesti yhdessä riittävän määrän kanssa verinahkakerrosta jäljellä olevasta sisemmästä verinahkakerroksesta antaen lopulliselle nahalla sen halutun paksuuden.

Nahanvalmistuksessa ensisijainen mielenkiinnon kohde on tiivis, runsaasti kollageenia sisältävä dermaalinen kerros, joka on noin 25 % verinahkakerroksen paksuudesta. Nahanvalmistusprosessin aikana dermaalinen kudos saa osakseen useita erillisiä kemiallisia käsittelyjä ja parkitsemiskäsittelyjä kollageenirakenteen stabiloimiseksi.

Jäljellä olevasta verinahkakerroksen osasta, joka on erotettu dermaalisesta kerroksesta, käytetään termiä "kalkittu haljas" ja se on nahanvalmistusprosessin sivutuotteena syntyvä jäte. Juuri näitä kalkittuja haljaksia käytetään esimerkiksi kollageenia runsaasti sisältävänä raaka-aineena makkaran kuoren tuotannossa ja niitä on käy-

tetty kollageenin lähteinä tässä esitettävissä esimerkeissä.

Kalkitusprosessin aikana nahka imee itseensä ja sitoo vettä ja turpoaa suuresti; prosessissa se saavuttaa hyvin emäksisen pH-arvon, noin 12,5. Kalkitusprosessin kemia on aika hyvin ymmärretty. Ennen muuta nahankäsittelyä ja tässä tarkastellussa kollageenintuotantoprosessissa nahoista täytyy "poistaa kalkki" liottamalla niitä happamissa liuoksissa tai suolaliuoksissa.

Selluloosamateriaalien kierrätys luonnonvarojen säästämiseksi ja kustannusten vähentämiseksi on nykyisin toivottava ympäristöä koskeva tavoite. Kierrätettyjä selluloosamateriaaleja käytetään edullisesti lopputuotteiden korvaamiseksi siellä, missä ensiöselluloosa-materiaaleja on käytetty historiallisesti. Valitettavasti kierrätetyistä selluloosamateriaaleista valmistetuilla tuotteilla on fysikaaliset tunnuspiirteet, jotka poikkeavat ensiömateriaaleista valmistettujen tunnuspiirteistä. Yksi näistä tärkeistä tunnuspiirteistä on lujuus, joka on usein merkitsevästi vähentynyt.

Aikaisempiin yrityksiin paperin paremman lujuuden tuottamiseksi sisältyvät yritykset, jotka on julkaistu Youngin US-patentissa 3 532 593. Young kuvaa mekaanisen menetelmän edeltä käsin olemassa olevien geeliytyneiden kollageenikuitujen eristämiseksi, ei entsymaattista menetelmää kollageenin solubilisoimiseksi, kuten tässä keksinnössä. Tämä patentti kuvaa menetelmän rasvan poistamiseksi kollageenista. Kollageeni käsitellään mekaanisesti jauhamalla hollanterissa happoliuoksessa, mutta se jää liukenemattomaksi. Liukenematon, mekaanisesti käsitelty kollageeni yhdistettiin sitten selluloosan hollanterissa jauhettuun massaan ja valmistettiin paperiarkeiksi.

Ranskalaisessa lehtiartikkelissa G. Sauret et al., Le collagne ans la fabrication du papier, Revue A.T.P.I., Vol 33, No. 8, Octobre 1979, sivut 374 - 365, julkaistaan

mekaaninen menetelmä kollageenin valmistamiseksi käyttäen Turmix-Waring-sekoitinta. Mekaanisesti käsitelty kollageeni on liukenematonta. Se yhdistetään selluloosamassan kanssa ja valmistetaan paperiarkeiksi.

Sitä vastoin tässä keksinnössä käytetään menetelmää, jossa yhdistetään pienet määrät liuokoista kollageenia selluloosamateriaaliin, kuten tässä jäljempänä kuvataan tarkemmin.

Keksinnön yhteenveto

Keksinnön tyypillinen suoritusmuoto on menetelmä solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete ja säädetään lietteen pH-arvo myöhemmin lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

(b) lisätään proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

(c) annetaan vaiheen b lietteen ja entsyymin ja/tai vaiheen e kierrätetyn liukenemattoman kollageenin ja entsyymin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, jossa on lisääntynyt määrä solubilisoitua kollageenia;

(d) lisätään uutta vettä ja liukenematonta kollageenia vaiheen (c) liuokseen ja sekoitetaan;

(e) erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen d liuoksesta, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista, jolloin ainakin osa liukenemattomasta kollageenista ja proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään vaiheeseen c ja erotettu liuos, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena. Toisessa tyypillisessä suoritusmuodossa ei käytetä kierrätysvaihetta, vaan siinä käytetään solubilisoitua kollageenia suoraan ilman entsyymin poistamista. Tyypillisesti vaihe c

voidaan toistaa kaksi, kolme, neljä kertaa tai useamman kerran. Vaiheesta e kierrätettyyn liukenemattomaan kollageeniin voidaan lisätä ylimääräistä entsyymiä, joka korvaa oleellisesti tuotteen poistamisen mukana poistuneen entsyymin tai kun reaktion nopeus heti kierrätyksen jälkeen hidastuu edeltä määrätyn tason alapuolelle. Yhdessä tyypillisessä suoritusmuodossa menetelmä toimii keskeytymättömänä prosessina.

Reaktio voidaan pysäyttää tyypillisesti säätämällä pH arvoon, jossa proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen; ja/tai laskemalla lämpötilaa lämpötilaan, jossa proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen. Toisessa tyypillisessä suoritusmuodossa vaiheessa a märän jauhetun lietteen nestepitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus säädetään edullisesti siten, että kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,1 - 1,0 paino-%; vaiheessa c lämpötila, T, on edullisesti noin 5 - 30 °C ja edullisemmin noin 15 - 28 °C. Muussa edullisessa suoritusmuodossa kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,3 - 0,35 paino-% ja vaiheen c reaktio tapahtuu lämpötilassa, joka on noin 10 - 30 °C, reaktioajan ollessa 10 - 72 tuntia; edullisemmin lämpötila on 15 - 28 °C. Tyypilliset proteolyyttiset entsyymit valitaan ryhmästä, joka koostuu sian limakalvon pepsiinistä, bromelaiinista, kymopapaiinista, kymotrypsiinistä, kollagenaasista, fikiinistä, papaiinista, peptidaasista, proteinaasi A:sta, proteinaasi K:sta, trypsiinistä, mikrobiproteaasista ja tällaisten entsyymien yhdistelmistä. Edullisemmin proteolyyttinen entsyymi on pepsiini tai mikrbinen happoproteaasi. Kun valitaan sian limakalvon pepsiini, pH-arvo on edullisesti noin 1,5 - 3,0 ja lämpötila noin 15 - 28 °C. Tyypillisesti vähintään 80 paino-% liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi, jonka lukukeskimääräinen moolimassa on 300 000 daltonia ja enemmän; vaikkakin edullisemmin vähintään 90 paino-% liukenemattomasta kollagee-

nista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi ja lukukeskimääräinen moolimassa on yli 1 000 000 daltonia.

Keksinnön muu tyypillinen suoritusmuoto sisältää menetelmän solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

(b) säädetään märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteän aineen pitoisuus, jolloin liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota lopputuotteessa;

(c) säädetään vaiheen b lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

(d) lisätään ja sekoitetaan proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

(e) annetaan vaiheen d lietteen ja/tai vaiheen g kierrätetyn liukenemattoman kollageenin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, joka sisältää liukenemattomista kollageenihiukkasista peräisin olevaa solubilisoitua kollageenia;

(f) lisätään vielä vettä ja liukenematonta kollageenia liuokseen, joka sisältää vaiheessa e solubilisoitua kollageenia ja sekoitetaan;

(g) erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen f liuoksesta, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan liukenematon kollageeni vaiheeseen e, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään, ja erotettu liuos, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena. Muussa tyypillisessä suoritusmuodossa ei käytetä kierrätysvaihetta, vaan siinä käytetään solubilisoitu kollageeni suoraan ilman entsyymin poistamista. Tyypillisesti vaihe e

voidaan toistaa kaksi, kolme, neljä kertaa tai useamman kerran. Vaiheesta e kierrätettyyn liukenemattomaan kollageeniin voidaan lisätä ylimääräistä entsyymiä, joka korvaa oleellisesti entsyymin, joka on poistettu tuotteen mukana, tai kun reaktion nopeus heti kierrätyksen hidastuu ennalta määrätyn tason alapuolelle. Yhdessä tyypillisessä suoritusmuodossa menetelmä toimii keskeytymättömän prosessina. Reaktio voidaan tyypillisesti pysäyttää säätämällä pH arvoon, jossa proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen; ja/tai laskemalla lämpötilaa lämpötilaan, jossa proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen. Toisessa tyypillisessä suoritusmuodossa vaiheessa b märän jauhetun lietteen nestepitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus säädetään edullisesti siten, että kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,1 - 1,0 paino-%; vaiheessa e lämpötila, T, on edullisesti noin 5 - 30 °C ja edullisemmin noin 15 - 28 °C. Muussa edullisessa suoritusmuodossa kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,3 - 0,35 paino-% ja vaiheen e reaktio tapahtuu lämpötilassa, joka on noin 10 - 30 °C, reaktioajan ollessa 10 - 72 tuntia; edullisemmin lämpötila on 15 - 28 °C. Tyypilliset proteolyyttiset entsyymit valitaan ryhmästä, joka koostuu sian limakalvon pepsiinistä, bromelaiinista, kymopapaiinista, kymotrypsiinistä, kollagenaasista, fikiinistä, papaiinista, peptidaasista, proteinaasi A:sta, proteinaasi K:sta, trypsiinistä, mikrobiproteaasista ja tällaisten entsyymien yhdistelmistä. Edullisemmin proteolyyttinen entsyymi on pepsiini tai mikrobinen happoproteaasi. Kun valitaan sian limakalvon pepsiini, pH-arvo on edullisesti noin 1,5 - 3,0 ja lämpötila noin 15 - 28 °C.

Tyypillisesti vähintään 80 paino-% liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi ja lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia; vaikkakin edullisemmin vähintään 90 paino-% liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi.

Keksinnön muu suoritusmuoto on menetelmä solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi käyttäen vaiheita, joissa tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete; säädetään märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus, jolloin liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota, joka on sopiva paperin vahvistamiseksi lopputuotteessa; säädetään vaiheen b lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi; lisätään proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty, ja annetaan sen reagoimaan lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita solubilisoidun kollageenin muodostamiseksi liukenemattomista kollageenihiukkasista; kontrolloidaan reaktio-olosuhteita liukoisen kollageenin suuren konsentraation saavuttamiseksi mittaamalla solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja solubilisoidun kollageenin moolimassaa, jolloin reaktio on tapahtunut täydellisesti, kun lukukeskimääräinen moolimassafraktio on yli 300 000 daltonia ja konsentraatio on oleellisesti maksimoitu; ja solubilisoidun kollageenin vesiliuos poistetaan tuotteena.

Prosessin syötettävä raaka-aine voi olla peräisin tyypillisesti eri lähteistä, mikäli syöttöaine on suhteellisen puhdasta ja sen kollageenia sisältävän materiaalin hiukkaskoko on suhteellisen pieni, ks. esim. jäljempänä selostettu Komanowskyn et al. menetelmä. Yksi tyypillinen menetelmä syöttömateriaalin valmistamiseksi eläinkudoksista saadun liukenemattoman kollageenin märästä jauhetusta lietteestä sisältää seuraavat vaiheet:

(a) hankitaan kollageenia sisältävät pehmeät eläinkudokset;

(b) puhdistetaan kollageenia sisältävät kudokset karvan, rasvan, hiilihydraattien ja muiden epäpuhtauksien poistamiseksi;

(c) leikataan puhdistetut, kollageenia sisältävät kudokset pieniksi paloiksi;

(d) sekoitetaan pienet palat veteen lietteen saamiseksi;

(e) säädetään lietteen pH-arvo oleellisesti kudoksista saadun kollageenin isoelektrisen pisteen lähelle;

(f) märkäjauhetaan tulokseksi saatu liete, jonka pH-arvo on säädetty, liukenemattoman kollageenin lietteen saamiseksi. Tässä menetelmässä pH-arvo on tyypillisesti noin 3 - 7. Keksintö sisältää lisäksi solubilisoidun kollageenin ainutlaatuiset vesiliuokset, jotka on tuotettu edellä esitettyjen menetelmien avulla.

Vielä muu keksinnön suoritusmuoto sisältää menetelmän kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan selluloosamassaliete;

(b) lisätään solubilisoitu kollageeni massalietteeseen ja lietettä sekoitetaan aika, joka on tehokas selluloosamassalietteen ja solubilisoidun kollageenin vuorovaikutukselle;

(c) muodostetaan keskenään vuorovaikutuksessa olleesta selluloosamassalietteestä ja solubilisoidusta kollageenista arkki; ja

(d) kuivataan arkki.

Tyypillisesti muodostettu arkki voi olla arkki, kuten paperi. Toinen suoritusmuoto sisältää menetelmän solubilisoidun kollageenin käyttämiseksi paperin vahvistamiseksi sekoittamalla solubilisoitu kollageeni selluloosamassalietteeseen, valamalla seos muottiin ja kuivaamalla.

Vielä muu suoritusmuoto sisältää solubilisoidun kollageenin ja selluloosamassan seoksen kuivatun reaktiotuotteen muodostaman vahvistetun selluloosamassakoostumuk-

sen. Toinen tyypillinen suoritusmuoto on solubilisoidun kollageenin ja selluloosamassan seoksesta valmistetun paperin muodostama vahvistettu paperituote.

Vielä muu tyypillinen suoritusmuoto sisältää menetelmän kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja emästä, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

(b) laimennetaan massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

(c) lisätään noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) laimennettuun massalietteeseen ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaat laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa liukoisesta kollageenista sitoutuu paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

(d) laimennetaan kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%;

(e) muodostetaan kollageeni-massaliete arkiksi ja kuivataan arkki.

Tyypillisesti sekoittaminen vaiheessa c kestää noin 15 minuuttia. pH-arvo voidaan säätää hapolla, joka on valittu ryhmästä, joka käsittää suolahapon (muriatic acid), HCl:n, HNO_3:n, H_2SO_4:n ja etikkahapon. Jos halutaan, menetelmä voi sisältää ylimääräisen vaiheen, jossa vaiheen e arkki päällystetään liimalla ennen kuivaamista. Tyypilli-

sesti liima voi olla kollageenihydrolysaatti, jonka lukukeskimääräinen moolimassa on 100 000 daltonia tai vähemmän. Kuivattu arkki voidaan kalanteroida. Tyypillisesti vaiheen a emäs voi olla NaOH-liuos, jonka konsentraatio on noin 0,25 - 1,00 paino-% laskettuna selluloosamassan kiinteiden aineiden kuivapainosta ja pH-arvo on 10 - 14.

Tyypillisesti solubilisoidun kollageenin lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia ja edullisimmin noin yli 1 000 000 daltonia. Sekoitusleikkausnopeus ja muut olosuhteet sopeutetaan kollageeni-massa-vuorovaikutusten edistämiseksi denaturoimatta kollageenin kolmoiskierrerakennetta. Joissakin sovellutuksissa kollageenipaperilietteen konsistenssi on edullisesti noin 0,5 kuivapaino-%. Haluttaessa lisätään aluna/hartsilisäainetta vaiheessa a tapahtuvan kuiduttamisen jälkeen tai vaiheessa b tapahtuvan laimentamisen jälkeen tai jauhamisen jälkeen. Myös vaiheessa e tapahtuvan arkin muodostamisen jälkeen muodostettu arkki voidaan märkäpuristaa ennalta valittuun paksuuteen ennen kuivaamista.

Yhdessä tyypillisessä suoritusmuodossa, kun vaiheessa a on valittu vain vesi, ylimääräinen vaihe vaiheesta a saadun massa/vesilietteen jauhamiseksi on edullinen selluloosakuitujen fibrilloimiseksi valitun jauhautuneisuusasteen saavuttamiseksi arkin muodostamisen jälkeen vaiheessa e. Kun on valittu oleellisesti keräyssanomalehtipaperi, jauhautuneisuusaste on edullisesti noin 100 - 150 CSF, ja kun on valittu oleellisesti keräyslaatikkokartonki, jauhautuneisuusaste on edullisesti noin 300 - 400 CSF.

Vielä muu suoritusmuoto sisältää menetelmän vaiheet kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi vaiheiden ollessa seuraavat:

(a) sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokarton-

gista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

(b) laimennetaan massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

(c) lisätään aluna/hartsilisäaine massalietteeseen vaiheen a jälkeen tai laimennettuun massalietteeseen vaiheen b jälkeen;

(d) muodostetaan arkki laimennetusta massalietteestä, joka sisältää alunahartsia;

(e) päällystetään arkin toinen puoli tai molemmat puolet kollageenihydrolysaatilla, jonka lukukeskimääräinen moolimassa on 100 000 daltonia tai vähemmän; ja kuivataan arkki.

Muu tyypillinen suoritusmuoto sisältää menetelmän kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

(b) laimennetaan massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

(c) tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

(d) säädetään märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteän aineen pitoisuus, jolloin liukenemattomalla

kollageenilla on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa lopputuotteessa;

(e) säädetään vaiheesta d saadun lietteen pH-arvo vaiheessa f lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

(f) lisätään proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty, ja annetaan sen reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, jolloin mainittu lämpötila ja reaktioaika ovat tehokkaita suuren moolimassan omaavan solubilisoidun kollageenin liuoksen muodostamiseksi liukenemattomista kollageenihiukkasista;

(g) kontrolloidaan reaktiota suuren kollageenin solubilisaatioasteen ja solubilisoidun kollageenin moolimassan saavuttamiseksi, jolloin kollageeni kykenee sitoutumaan selluloosamassaan, mittaamalla samanaikaisesti solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa, jolloin reaktio on tapahtunut täydellisesti, kun moolimassa ja konsentraatio on oleellisesti maksimoitu;

(h) lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä liuokseen, joka sisältää vaiheen f suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia ja sekoitetaan;

(i) erotetaan ainakin jonkin verran liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan liukenematon kollageeni vaiheeseen d, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään, ja poistetaan erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa liukoista kollageenia;

(j) lisätään vaiheen i erotettu liuos, joka sisältää noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) laimennettuun massalietteeseen, ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita laimennetun massa-

lietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa liukoisesta kollageenista sitoutuu paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

(k) laimennetaan kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%;

(l) muodostetaan kollageeni-massalietteestä arkki ja kuivataan arkki.

Vielä muu suoritusmuoto sisältää menetelmän kollageenilla vahvistetun arkin tuottamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete ja säädetään lietteen pH-arvo vaiheessa b lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

(b) lisätään proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

(c) annetaan vaiheen b tai vaiheen e lietteen ja entsyymin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, jossa on lisääntynyt määrä suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia;

(d) lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä vaiheen c liuokseen ja sekoitetaan;

(e) erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen d liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään vaiheeseen c ja erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa liukoista kollageenia, poistetaan tuotteena;

(f) sekoitaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista

tai edellä mainittujen seoksesta, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja emästä, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

(g) laimennetaan massaliete konsistenssiin, joka on noin 1 - 3 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

(h) lisätään vaiheesta e saatua liukoista kollageenia laimennettuun massalietteeseen noin 0,1 - 2 kuivapaino-% (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa liuokoisesta kollageenista sitoutuu paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

(i) laimennetaan kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%; ja

(j) muodostetaan kollageeni-massalietteestä arkki ja kuivataan arkki.

Muu tyypillinen suoritusmuoto sisältää menetelmän suuren moolimassan omaavan solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

(b) säädetään märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus, jolloin liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa lopputuotteessa;

(c) säädetän vaiheesta b saadun lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

(d) lisätään ja sekoitetaan proteolyyttinen entsyymi lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

(e) annetaan vaiheen d lietteen reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, jolloin lämpötila ja reaktioaika ovat tehokkaita suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia sisältävän liuoksen muodostamiseksi liukenemattomista kollageenihiukkasista;

(f) lisätään uutta vettä ja liukenematonta kollageenia liuokseen, joka sisältää vaiheen e suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, ja sekoitetaan;

(g) erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen f liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan liukenematon kollageeni vaiheeseen e, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään, ja erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena;

(h) sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksesta, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

(i) laimennetaan massaliete konsistenssiin, joka on noin 1 - 3 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista, ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

(j) lisätään vaiheesta e saatua liukoista kollageenia laimennettuun massalietteeseen määrä, joka on noin 0,1 - 2 kuivapaino-% (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin oleellinen osa liuokoisesta kol-

lageenista sitoutuu paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

(k) laimennetaan kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%; ja

(l) muodostetaan kollageeni-massalietteestä arkki ja kuivataan arkki.

Keksinnön muu suoritusmuoto sisältää menetelmän kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi seuraavien vaiheiden avulla:

(a) tuotetaan selluloosamassaliete;

(b) lisätään solubilisoitua kollageenia mainittuun massalietteeseen, jolloin mainitun selluloosamassan ja mainitun solubilisoidun kollageenin konsistenssi on enemmän kuin noin 2 paino-%, ja seosta sekoitetaan aika, joka on tehokas mainitun selluloosamassalietteen ja solubilisoidun kollageenin vuorovaikutukselle ja jolloin mainittu sekoittaminen tapahtuu lämpötilassa, joka on korkeampi kuin noin 35 °C tai edullisesti korkeampi kuin 40 °C;

(d) muodostetaan mainituista keskenään vuorovaikutuksessa olleista selluloosamassalietteestä ja solubilisoidusta kollageenista arkki; ja

(e) kuivataan mainittu arkki.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuvio 1A on graafinen esitys, joka esittää kollageeniliuosten ei-newtonilaista käytöstä. Keksinnön solubilisoidun kollageenin laimennettujen liuosten viskositeetti (A) ja BA-1-kollageeniliuosten viskositeetti (B) määritettynä kahdella eri leikkausnopeudella (20 ja 100 rpm). Viskositeetti senttipoiseina (1 P = 1/10 Pa.s) on piirretty ordinaatalle (pystysuora asteikko) ja likimääräinen kiinteiden aineiden konsentraatio, mg/ml, on piirretty abskissalle (vaakasuora asteikko).

Kuvio 1B on graafinen esitys, joka esittää kierrosnopeudella 20 rpm määritetyn viskositeetin ja kierrosnopeudella 100 rpm määritetyn viskositeetin suhdetta, josta

käytetään tässä termiä "viskositeettisuhde". Sekä keksinnön solubilisoitua kollegeenia (A) että BA-1-kollageeniliuoksia (B) koskevat tiedot on laskettu kuviossa 1A esitetyistä tiedoista. Viskositeettisuhde on piirretty ordinaatalle (pystysuora asteikko) ja likimääräinen kiinteiden aineiden konsentraatio, mg/ml, on piirretty abskissalle (vaakasuora asteikko).

Kuvio 2 on graafinen esitys esimerkin 1A tiedoista esittäen viskositeettia kierrosnopeuksilla 20 rpm ja 100 rpm. Viskositeetti senttipoiseina on piirretty ordinaatalle (pystysuora asteikko) ja reaktion kesto tunteina on piirretty abskissalle (vaakasuora taso).

Kuvio 3 on graafinen esitys pienen mittakaavan erässä tapahtuvasta kollageenin solubilisointireaktiosta osoittaen esimerkin 3A pepsiinin kierrätystä. Viskositeettisuhde on piirretty ordinaatalle (pystysuora asteikko) ja reaktioaika tunteina on piirretty abskissalle (vaakasuora asteikko).

Kuvio 4 on graafinen esitys viskositeettisuhteiden kehittymisestä esimerkeissä 5A (merkitty A:lla) ja 6A (merkitty B:llä). Viskositeettisuhde on piirretty ordinaatalle (pystysuora asteikko) ja reaktioaika tunteina on piirretty abskissalle (horisontaalinen asteikko).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Havaittiin, että solubilisoitu kollageenimateriaali, joka oli lisätty selluloosamassaan ennen paperinvalmistusprosessia (so. sekoitettu selluloosamassakuitujen kanssa konekyypissä), tuotti tulokseksi merkittävän paperi-kollageenikomposiitin lujuuden lisääntymisen. Tämä tulos on yllättävä, koska aikaisempi tekniikan taso opettaa, että välttämättömiä ovat suuremmat liukenemattomat kollageeniryhmittymät, kuten kollageeniryhmittymät, jotka on tuotettu pienentämällä mekaanisesti naudan vuodat. Yksi syy siihen, että liukoisen kollageenin käyttöä ei ehkä ole harkittu paperinvalmistuksessa, on se että liukoisen kol-

lageenin voidaan odottaa denaturoituvan lämmön vaikutuksesta fluidien lämpötiloissa, joita käytetään paperinvalmistuksessa (yli noin 40 °C). Denaturoituneen kollageenin ei odoteta olevan yhtä käyttökelpoista kuin luontaisten kollageeniryhmittymien. Lisäksi se on yllättävää, koska olettaisi, että selluloosamassan voisivat sitoa parhaiten yhteen suuremmat hiukkaset kuin selluloosamassan itsensä hiukkaset eikä vesiliukoiset hiukkaset. Kuten on osoitettu tässä esimerkeissä, solubilisoitu kollageeni, jota oli lingottu hyvin suurilla gravitaatiovoimilla, jotka poistavat oleellisesti kaikki liukenemattomat materiaalit, oli hyvin tehokas paperin lujuuden lisäämisessä. Lisäksi tällä hetkellä ei ole laajamittaista käyttöä tai kaupallista lähdettä tämän tyyppiselle kustannustehokkaalle kollageeniliuokselle. Liukoisen kollageenin pienen mittakaavan sovellutuksia esiintyy elintarvike-, kosmetiikka- ja lääketeollisuudessa, joita varten tuotteet ovat paljon kalliimpia kuin on taloudellisesti hyväksyttävää keksinnön selluloosamassa- ja paperisovellutuksissa.

Määritelmät

Seuraavat määritelmät ovat käyttökelpoisia luettaessa tätä julkaisua:

Happamaksi tehty kollageeni - kollageeni, joka on käsitelty hapolla tai uutettu happoliuoksella.

Jauhatus - paperimassan sekoittaminen suhteellisen suurella leikkausnopeudella massakuitujen erottamiseksi ja koon laajentamiseksi.

Hylkypaperi - hylkypaperi paperinvalmistusprosessista.

Kalanterointi - menetelmä pinnan tasaisuuden ja kovuuden luomiseksi paperiin tyypillisesti puristamalla suoraan (vastakkaiseen suuntaan pyörivien) sylintereiden välissä.

Selluloosamassa - selluloosamateriaaleista saadut kuidut, jotka voisivat olla märkiä tai kuivia ja tuotettu mekaanisin tai kemiallisin keinoin tai muulla tavoin.

Kollageenigeeli - kollageeni, joka esiintyy luontaisessa molekyylitilassaan jatkuvassa, erittäin hydratoituneessa fibrilliverkostossa.

Kollageeniliimaus - kollageeni on lisätty päällysteenä paperiarkin valmistamisen jälkeen.

Jauhautuneisuusaste - mitta, joka esittää kuinka helposti (vapaasti) vesi valuu pois paperiarkista tuotannon aikana, määritys toteutetaan standardisoidussa testilaitteessa; yksi teollisuuden yleisesti hyväksymä standardi on Canadian Standard Freeness (CSF).

Kuiduttaminen mekaanisesti - selluloosakuitujen mekaaninen erottaminen erityisesti suunnitelluilla teholeikkaussekoittimilla.

Työskentely mekaanisesti - kollageenia runsaasti sisältävien materiaalien mekaaninen leikkaaminen hiukkaskoon pienentämiseksi ja geelinmuodostuksen aloittamiseksi.

Kollageenin ja selluloosan (esim. paperimassan) sekoittaminen - sekoittaminen tapahtuu suhteellisen pienellä leikkausnopeudella (verrattuna jauhamiseen), mikä johtaa suuremman moolimassan omaavan kollageenin reaktioon selluloosamassan kanssa siten, että saadaan solubilisoidun kollageenin ja selluloosamassan vuorovaikutus.

Moolimassa - tässä käytettynä tämän termin on tarkoitus viitata lukukeskimääräiseen moolimassaan, ellei toisin todeta.

Luonnollinen tai luontainen kollageeni - kollageenimolekyylit, jotka säilyttävät alfaketjujen normaalin kolmoiskierteisen kokonaisuuden.

Vanha laatikkoaaltopahvi (OCC) - toisioselluloosakuitu, joka on uusiolaatikkoaaltopahvista tai vastaavasta Kraft-kuidutusprosessilähteestä.

Vanha sanomalehtipaperi (ONP) - toisiokuitu uusiosanomalehtipaperista tai vastaavista lähteistä.

Keräyspaperi - kierrätystoiminnasta vastaanotettu paperi.

Uusiopaperi - keräyspaperi, joka on käsitelty uudelleen ja tehty uudeksi käyttökelpoiseksi paperiksi.

Hierto - paperimassan esikäsittely, joka laajentaa ja erottaa selluloosamassakuidut.

Solubilisoitu kollageeni - kollageeni, joka on käsitelty kollageenisyiden erottamiseksi niiden muuttamiseksi liukoiseksi samalla säilyttäen luontaisen kollageenin normaali kolmoiskierrekokonaisuus; kovalenttiset sidokset kollageenisyiden välillä katkaistaan siten, että pienemmät kollageenimolekyylit voivat liueta; tämä on vertailuna mekaanisesti työskentelemällä käsiteltyyn ja/tai hapolla käsiteltyyn kollageeniin, jolloin nämä käsittelyt tekevät kollageenipalaset pelkästään fysikaalisesti pienemmiksi, mutta eivät katko syiden välisiä kovalenttisia sidoksia; tässä käytetty solubilisoitu kollageeni on solubilisoitu entsyymikäsittelyn avulla, joka katkoo kovalenttiset sidokset kollageenisyiden väliltä.

Viskositeettisuhde - liuoksen kahdella eri leikkausnopeudella saadun viskositeetin suhde. Tämä on yksi tyypillinen tapa seurata viskositeetin lisääntymistä tai vähenemistä johtuen liukenemattoman kollageenin lietteestä tuotetun solubilisoidun kollageenin lisäyksestä tai vähentymisestä. Toinen tyypillinen menetelmä olisi vain viskositeettimittauksen käyttäminen solubilisoidun kollageenin lisäyksen tai vähentymisen seuraamiseksi.

A. Ensimmäinen yleinen suoritusmuoto

Ensimmäisen yleisen suoritusmuodon yksi tyypillinen suoritusmuoto saavuttaa matalammat käyttökustannukset hyödyntämällä kierrätysvaiheita entsyymin talteenottamiseksi ja käyttämiseksi uudelleen, jolloin normaalisti entsyymi häviäsi poistettaessa liuokoisen kollageenin tuoteliuok-

sia. Ensimmäisen yleisen suoritusmuodon toisella tyypillisellä suoritusmuodolla on myös matalat käyttökustannukset, mutta siinä ei hyödynnetä kierrätysvaiheita entsyymin talteenottamiseksi uudelleen. Tässä jälkimmäisessä suoritusmuodossa solubilisoitu kollageeni lähetetään suoraan sen lopulliseen käyttökohteeseen, kuten paperinvalmistukseen, yrittämättä poistaa entsyymiä tai muuten puhdistaa solubilisoitua kollageenia.

Keksinnön ensimmäisen yleisen suoritusmuodon edut ovat:

(1) minimoidaan liukoisen kollageenin valmistuskustannukset prosessoimalla se suoraan jauhetusta nahkamateriaalista maksimimäärään liukoisia makromolekyylejä; ja

(2) samanaikaisesti maksimoidaan muuttumisaste liukoiseksi kollageenimateriaaliksi, joka kykenee sitoutumaan selluloosamassaan, ja kontrolloidaan liuokoisen kollageenimateriaalin moolimassaa sitoutumisvaikutuksen lisäämiseksi massakuituihin, maksimoiden siten paperituotteen tulokseksi saatava vetolujuus ja/tai muut mekaaniset ominaisuudet. Toinen tärkeä solubilisoidun kollageenin käytöstä aiheutuva etu aikaisemman tekniikan tason mukaisiin liukenemattomiin, suurempiin ryhmittymiin nähden selluloosatuotteiden, kuten paperin, tuotannossa, on suurempi kollageenin jakautumisen yhdenmukaisuus selluloosamassassa.

Naudan nahka valittiin kollageenilähteeksi tässä kuvatuissa esimerkeissä, koska kollageenin valmistusmenetelmät nahasta on laajalti selostettu ja materiaali on naudanlihantuotannon ja nahanvalmistuksen tärkeimpien teollisuusalojen suuren volyymin sivutuote; kuitenkin oletetaan, että muista lähteistä (esim. jänteestä) saatu kollageeni toimii myös prosessissa.

Nahan kollageenin solubilisaatio on toteutettu entsymaattisen hydrolyysiprosessin avulla käyttäen eläimen mahan entsyymiä (esim. pepsiiniä) ja useita muita entsyymejä ilman muita puhdistusvaiheita. Prosessi tuottaa tu-

lokseksi jauhettujen vuotavalmisteiden lähes täydellisen solubilisaation 10 - 30 tunnissa huoneenlämpötilassa happamissa liuoksissa. Muut (tutkimattomat) entsyymit voivat tuottaa kollageenia sisältävien kudosten nopeamman tai halvemman muuttumisen eikä menetelmää välttämättä ole optimoitu entsyymin vaatimusten ja tuotantoajan minimoimiseksi. Tähän mennessä menetelmän on arvioitu tuottavan suunnilleen 1 893 l (500 gallonaa) 0,3 - 0,4-%:ista kollageeniliuosta ja sen on osoitettu olevan suhteellisen helppo kontrolloida.

Esimerkit

Seuraavat esimerkit, jotka kuvaavat uusia koostumuksia ja uusia menetelmiä niiden valmistamiseksi, on annettu tarkoittamatta, että keksintö olisi rajoitettu niihin.

Materiaalit

Käytettävä pepsiini oli raakaa (suhteellisen puhdistamatonta) jauhetta, joka oli saatu sian mahalaukun limakalvosta (Cat. No. P7125) ja joka oli hankittu yhtiöltä Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. Tämän tuotteen erä nro 070H0437, jota käytettiin esimerkeissä, sisältää suunnilleen 15 % proteiinia (UV:n mukaan), aktiivisuuden ollessa 91 pepsiiniyksikköä/mg kiinteitä aineita ja 620 yksikköä/mg proteiinia. Jäljellä olevat kiinteät aineet valmisteessa näyttävät olevan saostussuolojen, puskurisuolojen ja/tai hiilihydraattien yhdistelmä. Kiteytyneen pepsiinin maksimaalinen spesifinen aktiivisuus on noin 3 500 yksikköä/mg proteiinia.

Muut kokeet suoritettiin käyttäen pepsiiniä, raakaa jauhetta, yhtiö Sigma Chemical Company; AFP 2000:ta, hapanta sieniproteaasia, joka on peräisin Aspergillus niger -kannasta, yhtiö Solvay Enzymes; Newlase A:ta, joka on peräisin Aspergillus niger -kannasta, ja Newlase II:ta (joka on peräisin Rhizopus niveus -kannasta), yhtiö Amano Enzyme U.S.A.; Quest AP:tä, quest -hapan proteaasi, joka

on peräisin Aspergillus niger -kannasta, yhtiö Quest International; EDC-APA:a, EDC-happoproteaasi A:ta, ja EDC-APB:tä, EDC-happoproteaasi B:tä, yhtiö Enzyme Development Corporation.

Kollageeniliete, jota käytettiin tässä esimerkeissä 1A - 6A, valmistettiin naudan nahan jauhetuista kalkituista haljaksista. Kollageenin toimitti yhtiö Teepak's Sandy Run Plant, Columbia, SC. Esimerkin 6A materiaalin tyypillinen analyysi on seuraava: pH-arvo 6,4; kiinteiden aineiden pitoisuus 15,67 %; gelatiinipitoisuus 2,62 %; rasvapitoisuus 2,1 %. 1974 USDA-raportissa Komanowski, M., et al., "Production of Comminuted Collagen for Novel Applications", J. American Leather Chem. Assoc., 6, 410 - 422 (1974), kuvataan tekniikka kalkittujen haljasten esileikkaamiseksi, happamoittamiseksi ja märkäjauhamiseksi "hienonnettujen" (jauhettujen) kollageenituotteiden tuottamiseksi, jotka luokitellaan jauhamisen määrän mukaan ja tulokseksi saadun hiukkaskoon ja rakenteen mukaan. Myöhempi julkaisu (1978) Turkot et al., "Comminuted Collagen: Estimated Costs of Commercial Production", Food Tech., 48 - 57 (huhtikuu, 1978) esittää näiden samojen viiden tuotteen tuotantokustannusten taloudellisen analyysin. Tämän tehtaan tuote muistuttaa läheisesti jauhettua kalkittua haljasmateriaalia, jota käytetään kollageenilähteenä näissä esimerkeissä.

Esimerkeissä 7A - 11A, ellei toisin esitetä, entsymaattinen kollageenin solubilisaatio toteutettiin seuraavasti. Kollageenilähdettä (joko jauhetut kokonaiset vuodat tai jauhetut kalkitut haljaskset), joka oli jauhettu, kuten esimerkissä 7A on kuvattu 0,15 cm:n (0,06 tuuman) leikkauspäällä ja vesiliietteessä, lingottiin 4 °C:n lämpötilassa Beckman J2-21 -lingossa (JA-20-roottori) kierrosnopeudella 10 000 rpm 20 minuutin ajan ylimääräisen nesteen poistamiseksi. Tämä linko tuotti kierrosnopeuden rpm ja painovoiman välisen suhteen, joka oli noin 1:1, siten

kierrosnopeudella 10 000 rpm G-voimat olivat noin 10 000 x painovoima. Päällysneste poistettiin ja lingotut kiinteät aineet (7,5 g) lisättiin yhden litran Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi deionisoitua vettä (750 ml). Suspensiota sekoitettiin 5,08 cm:n (2 tuuman) magneettisekoitusharkolla ja pH-arvo säädettiin käyttäen väkevää suolahappoa. Sitten lisättiin entsyymi pulloon, joka pantiin inkubaattoriin, joka oli asetettu haluttuun lämpötilaan. Viskositeettimittaukset tehtiin kaatamalla suunnilleen 100 ml kutakin reaktioseosta dekantterilasiin ja saattamalla seokset huoneenlämpötilaan. Viskositeetti mitattiin Brookfield Synchro-lectric Viscometer model RVT -viskometrillä. Mittaukset tehtiin kierrosnopeudella 20 rpm ja 100 rpm, kierrin (spindle) nro 3. Otettiin kolme lukemaa kumpaakin nopeutta käyttäen ja lukemista laskettiin keskiarvo viskositeetin laskemiseksi senttipoiseina (1 P = 1/10 Pa.s). Näytteet otettiin viskositeettimittauksia varten määrätyin ajoin ja sitten ne palautettiin alkuperäisiin pulloihinsa.

Kollageeniliuoksen ("BA-1"), jota käytettiin kontrolliliuoksena esimerkeissä, toimitti liukoisena nahkatuotteena, Secolan BA-1:nä, yhtiö Kensey Nash Biomaterials, Exton, PA. Kollageeniliuos on tyypillisesti väriltään valkoista ja maitomaista; pH-arvo 3,1 - 3,3; kiinteiden aineiden kokonaismäärä 1 % ± 0,2 %; aktiivinen kollageeni > 0,67 % (nimellisesti 1 % esimerkeissä). Tämän tuotteen havaitaan joskus olevan hiukan geeliytynyttä vastaanoton jälkeen. Kuitenkin perustuen malliin, joka on havaittu elektroforeettisen analyysin jälkeen, uskotaan, että BA-1 on tuotettu happouuttomenetelmällä, ei entsymaattisen reaktion avulla, kuten tässä keksinnössä.

Havaittiin, että kollageenia sisältävien kiinteiden aineiden solubilisaatiota voidaan seurata tehokkaasti mittaamalla jaksottain liuoksen viskositeetti. Fluidin viskositeetit voidaan mitata tarkoituksenmukaisesti käyttäen erilaisia suhteellisen yksinkertaisia menetelmiä, kuten

Brookfield Model #RVT Viscometer -viskometriä (nro 3 kierrin), jota on käytetty esimerkeissä. Tässä Brookfield-järjestelmässä fluidin kehittämää voimaa, joka kohdistuu levyn pintaan, joka pyörii vakiopyörimisnopeudella fluidissa, käytetään fluidin viskositeetin arvioimiseksi. Tässä kuvatuissa kollageeniliuoksissa fluidiviskositeetti on voimakkaasti riippuvainen liuenneen kollageenin konsentraatiosta, liukoisen kollageenin moolimassajakautumasta ja fluidin lämpötilasta ja vähemmässä määrin fluidin pH-arvosta ja ionivahvuudesta.

Kun viskositeetti on riippumaton käytetystä voimasta (leikkauksesta), niin fluidin sanotaan olevan "newtonilainen". Kun kysymyksessä ovat monien makromolekyylien liuokset, mukaan luettuna tässä käsiteltyjen sauvankaltaisen kollageenimolekyylien liuokset, liuosviskositetti on erittäin riippuvainen voimasta, joka kohdistuu nesteeseen ja nesteen sanotaan olevan "ei-newtonilainen". Kun liuenneet makromolekyylit ovat erittäin pitkiä ja leikkausnopeus (suhteessa pyörimisnopeuteen) on riittävän suuri, molekyylit pyrkivät suuntautumaan fluidin virtaviivojen mukaan ja niiden vaikutus fluidin nopeuteen pyrkii vähenemään tavalla, joka on erittäin riippuvainen leikkausnopeudesta.

Kollageeniliuosten ei-newtonilainen käytös on osoitettu kokeissa, joista esitetään yhteenveto kuviossa 1A, jossa solubilisoidun kollageenivalmisteen ja BA-1-valmisteen viskositeetti määritettiin huoneenlämpötilassa, kun liuokset oli laimennettu asteittain tislatulla vedellä. Tässä kokeessa on saattanut ilmetä joitakin korjaamattomia liuoksen pH-arvon lisäyksiä, kun näytteitä on laimennettu; kuitenkin tietojen suuntaus on pätevä.

Kunkin liuoksen osalta viskositeetti määritettiin kahdellä pyörimisnopeudella, 20 ja 100 rpm. Avoimet ympyrät (–O–) ja täytetyt ympyrät (–●–) edustavat keksinnön solubilisoitua kollageenia koskevia tietoja, jotka on saa-

tu kierrosnopeuksilla 20 ja 100 rpm. Avoimet neliöt (–□–) ja täytetyt neliöt (–■–) edustavat BA-1-kollageenikontrollia koskevia tietoja, jotka on saatu kierrosnopeuksilla 20 rpm ja 100 rpm. Molemmat liuokset olivat sakeampia pienemmällä pyörimisnopeudella, kuten odotettiin. Esimerkeissä tuotetun kollageenin ja BA-1-valmisteiden viskositeetit olivat oleellisesti erilaisia, jolloin tuotetulla kollageeniliuoksella oli paljon suurempi viskositeetti pienemmillä kollageenikonsentraatioilla ja jyrkempi käyrän kaltevuus. Nämä vaikutukset näyttävät johtuvan ensisijaisesti kollageenimolekylien keskimääräisten moolimassojen erosta näissä kahdessa liuoksessa, jolloin keksinnön kollageeniliuoksella on suurempi lukukeskimääräinen molekyylikoko. Vertailu osoittaa, että keksinnön menetelmä oli menestyksellinen valmistettaessa suuremman viskositeetin omaavaa kollageenimateriaalia konsentraation ollessa pienempi, osoittaen siten, että lukukeskimääräinen moolimassa oli suurempi.

Kierrosnopeudella 20 rpm määritetyn viskositeetin ja kierrosnopeudella 100 rpm määritetyn viskositeetin välinen suhde, josta käytetään tässä termiä "viskositeettisuhde", on tämän ei-newtonilaisen, moolimassasta riippuvaisen vaikutuksen tarkoituksenmukainen mitta. Tämä on kuvattu kuviossa 1B, jossa tämän keksinnön kollageeniliuoksilla on suurempi viskositeettisuhde kuin BA-1-valmisteella. Kuviossa 1B avoimat ympyrät (–○–) edustavat keksinnön solubilisoidusta kollageenista saatuja tietoja ja avoimet neliöt (–□–) edustavat BA-1-kollageeniliuoksesta saatuja tietoja. Tässä käytetty viskositeettisuhde on mitta, joka kuvaa kiinteiden kollageenimateriaalien "muuttumisastetta" liukoisiksi kollageenimolekyyleiksi ja myös moolimassan mitta, jolloin viskositeettisuhteen suuremmat arvot korreloivat liuenneen kollageenin haluttujen suurempien lukukeskimääräisten moolimassojen kanssa. Kuviossa 1B on tärkeätä huomata, että koska materiaali on

laimennettu, viskositeettisuhteen lisäys mittaa liukoisen kollageenin konsentraation lisäystä, koska materiaalin moolimassa pysyy samana. Jäljempänä esitettyjen esimerkkien kokeissa viskositeetin ja viskositeettisuhteen muutokset mittaavat konsentraation muutoksia. Haluttaessa liukoisen kollageenin huippupitoisuus voidaan mitata käyttäen kromatografista ja elektroforeettista tekniikkaa.

Vaihtoehtoisesti solubilisoidun kollageenikoostumuksen analyysi toteutettiin rutiininomaiseti SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin (PAGE) avulla, jossa käytettiin 3 % tiivistämisgeeliä; 6 % ajogeeliä, sitten toteutettiin denaturoiminen keittämällä 8-merkaptoetanolin kanssa. Jonkin verran palautumatonta saostumista ilmenee denaturointiprosessin aikana. Geelit värjättiin Coomassie Blue -väriaineella ja väri poistettiin vain värjäyspuskurissa.

Tällä tekniikalla saadut PAGE-tulokset osoittavat (tuloksia ei esitetä tässä), että BA-1-liuokset sisältävät pääasiallisesti tropokollageenimonomeeriryhmittymiä (moolimassa 300 000 daltonia). Ilmeni, että tämän menetelmän avulla tuotettujen, hyväksyttävät paperin sitomisominaisuudet omaavien kollageeniliuosten lukukeskimääräinen moolimassa näytti olevan vähintään 300 000 daltonia, ja joillakin aineosilla oli alfa-, beta- ja gammaketjujen vahingoittumaton kolmoiskierre PAGE:n avulla todettuna, muilla valmisteilla saattoi olla hajonnut kierre.

Solubilisoidun kollageenikoostumuksen analyysi toteutettiin myös rutiininomaisesti SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin (PAGE) avulla käyttäen järjestelmää Pharmacia PhastGel System. Käytettiin PhastGel -gradienttia 4 - 15 % polyakryyliamidigeelejä. Puskurijärjestelmä geelissä on 0,112 M Tris-asetaatti, pH-arvo 6,4. Geelien ajamiseksi käytettiin PhastGel SDS Buffer Strips -suikaleita, jotka sisältävät pH-arvon ollessa 8,1 0,2 M trisiiniä, 0,2 M tris-puskuria ja 0,55 % SDS:ää. Erottamis-

menetelmä oli julkaisusta PhastSystem Separation Technique File No. 130, taulukko 2.

Geelielektroforeesia varten valmistettiin näytteet lisäämällä SDS:n (20-%:isen) väkevöityjä varastoliuoksia ja puskureita (5 x varastoliuos). Lopulliset konsentraatiot olivat 10 mM Tris/HCl:a (pH-arvo 8,0), 1 mM EDTA:a, 2 - 2,5 % SDS:ää ja 0,01 % bromifenolisinistä. Sitten jokaista näytettä kuumennettiin 100 °C:n lämpötilassa 5 minuutin ajan ja suunnilleen 1 µl levitettiin geelille. Joissakin varhaisissa kokeissa näytteeseen lisättiin 2-merkaptoetanolia (pelkistävää ainetta) ennen kuumentamista. 2-merkaptoetanolin lisäämisellä ei ollut vaikutusta geelimalliin.

Kun elektroforeesi oli saatu päätökseen, geeli(t) värjättiin Pharmacia Silver Kit -menetelmällä. Käytetty värjäysmenetelmä oli ohjekirjasta PhastSystem Silver Kit Instruction Manual, taulukosta 2. Kehittymisaika ja taustan pelkistysaika olivat kaksinkertaiset paremman näkyväisyyden saamiseksi geeleille.

SDS-detergentti geeleissä dispergoi kaikki ei-kovalenttiset kollageeniryhmittymä jättäen vain kovalenttisesti liittyneet molekyylit. Aste, jolla nämä molekyylit siirtyvät geelillä, on suhteessa niiden moolimassoihin ja likimääräiset moolimassat on järjestetty kollageenikaistoille moolimassastandardien yhteiselektroforeesin avulla samoilla geeleillä. Solubilisoidun kollageenin PAGE-analyysi osoittaa kaistoja moolimassojen ollessa ~ 100 000 daltonia (alfa-kollageeni), ~ 200 000 daltonia (beta-kollageeni), ~ 300 000 daltonia (gamma-kollageeni) ja kaistoja, jolloin moolimassa on > 300 000 daltonia. Kaistojen intensiteetti on niiden moolimassojen suhteen vastakkaisessa järjestyksessä.

Liukoisen tai liukenemattoman kollageenin analyysi toteutettiin tyypillisesti mittaamalla ensin hydroksiproliinin määrä näytteessä, sitten saattamalla tämä konsen-

traatio korrelaatioon kollageenin kanssa. Hydroksiproliini määritettiin 0,1 ml:n näytteistä, jotka kuivattiin polypropyleeniputkissa 125 °C:n lämpötilassa. Näytteet liuotettiin 0,05 ml:aan 4 M natriumhydroksidia, putket suljettiin tulpalla ja sitten ne pantiin autoklaaviin 30 minuutin ajaksi. Lisätiin sitruunahappoa (0,05 ml 1,4 M liuosta) ja kloramiini T -reagenssia (1 ml liuosta, joka sisälsi 1,41 g kloramiini T:tä, 10 ml 1-propanolia, 10 ml deionisoitua vettä ja 30 ml sitruunahappo/etikkahappopuskuria, jonka pH-arvo oli 6) kaikkiin putkiin, joita sitten inkuboitiin 20 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten lisättiin PDAB-liuosta (1 ml liuosta, joka sisälsi 15 g p-dimetyyliaminobentsaldehydiä, 62 ml isopropyylialkoholia ja 26 ml 60-%:ista perkloorihappoa). Näytteitä inkuboitiin 65 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan, jonka jälkeen 0,2 ml kutakin näytettä siirrettiin mikrotitrausmaljalaskimeen ja absorbanssi luettiin aallonpituudella 570 nm. Puhdistetun kollageeninäytteen (Vitrogen 100™, Celtrix), joka sisälsi 3,0 mg/ml kollageenia, havaittiin sisältävän 0,33 mg/ml hydroksiproliinia. Käyttäen tätä kollageenivalmistetta standardina hydroksiproliinin konsentraation kertominen tekijällä 9,1 tuottaa kollageenin konsentraation.

Suuren erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) toteutettiin käsittelemättömän kollageenin moolimassajakauman analysoimiseksi. HPLC toteutettiin käyttäen TOSOHAAS TSK-GEK G6000PW -pylvästä (30 cm x 7,8 mm) ja järjestelmää Waters 650 Advanced Protein Purification System. Absorbanssia seurattiin aallonpituudella 220 mm virtausnopeuden ollessa 0,25 ml/min (ellei toisin mainita). Liikkuva faasi sisälsi 10 mM suolahappoa. Käytettiin pylvään esisuodatinta, jossa oli 10 um:n suuruista frittiä.

Eluenttifraktiot, jotka sisälsivät HPLC-piikit, analysoitiin PAGE-elektroforeesin avulla aineosana olevien kollageenimolekyylien koon määrittämiseksi. SDS geeleissä rikkoo kollageeniryhmittymät siten, että vain kovalentti-

sesti kiinnittyneiden molekyylien moolimassat voidaan määrittää tällä menetelmällä. Ensimmäinen eluointipiikki (piikki 1) sisältää molekyylejä, joiden lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia, sekä molekyylejä, joiden lukukeskimääräinen moolimassa on suunnilleen 200 000 daltonia ja suunnilleen 100 000 daltonia. Pienemmät molekyylit näyttävät olevan SDS:n rikkomien suurempien ryhmittymien aineosia. Toinen eluointipiikki (piikki 2) sisälsi molekyylejä, joiden lukukeskimääräinen moolimassa oli suunnilleen 300 000 daltonia, suunnilleen 200 000 daltonia ja suunnilleen 100 000 daltonia. Molekyylit, joiden moolimassa on 200 000 daltonia ja 100 000 daltonia, näyttävät olevan osa 300 000 painoisista ryhmittymistä, jotka SDS-detergentti rikkoi. Kolmas HPLC-eluointipiikki (piikki 3) sisältää kollageenifragmentteja, joiden lukukeskimääräinen moolimassa on vähemmän kuin noin 100 000.

Jäljempänä esitetyissä esimerkeissä määritettiin, että naudan vuodan jauhetut kalkitut haljakset voidaan solubilisoida lähes täydellisesti, kun ne saatetaan pepsiinihydrolyysin kohteeksi pH-arvon ollessa 2,0 - 2,2. Erän reaktioaika on tyypillisesti 10 - 30 tuntia huoneenlämpötilassa (22 - 26 °C). Tässä prosessissa tyypillisesti tuotetun liuokoisen kollageenin maksimikonsentraatio on suunnilleen 0,30 - 0,40 % (3 - 4 mg liuennutta kollageenia/ml). Menetelmä on osoitettu enintään 2,0 l:n mittakaavassa ja käyttäen oleellisesti samaa ohjetta, suunnilleen 1893 l:n (500 gallonan) mittakaavassa, kuten jäljempänä on selostettu. Mikrobiproteaasit tuottivat samanlaisia tuloksia, kuten jäljempänä on selostettu.

Esimerkki 1A

Suunnilleen 15 g märän Teepak-kollageenin kiinteitä aineita suspendoitiin magneettisekoittimen avulla 750 ml:aan vesijohtovettä (Columbus, OH) huoneenlämpötilassa. Liuoksen pH säädettiin arvoon 2,1 väkevän suolahapon (HCl) avulla - suunnilleen 65 - 70 tippaa. Sitten kollageenisus-

pensioon lisättiin raakaa pepsiinijauhetta (0,38 g) sekoittaen reaktion aloittamiseksi. Suspensiota sekoitettiin yön yli, jona aikana ilmeni joskus liuoksen kuumenemista 26 - 27 °C:n lämpötilaan tai korkeampaan lämpötilaan johtuen lämmönjohtumisesta sekoitinlevystä. Liuoksen viskositeetti mitattiin (20 ja 100 rpm) jaksottain reaktion toisen päivän aikana, kunnes saavutettiin viskositeettisuhteen maksimi, jolloin liuos stabiloitiin nostamalla pH arvoon 3,0 - 3,5 ja/tai asettamalla liuos jääkaappiin. Liuoksen pH-arvon nostaminen yli 4:ään voi aloittaa kollageeniliuoksen palautumattoman geeliytymisen.

Esimerkin 1A tulokset esitetään graafisesti kuviossa 2. Kuvio 2 esittää viskositeetin (senttipoiseina) käyrää reaktioajan (tunteina) funktiona. Viskositeettimittaukset tehtiin kierrosnopeudella 20 rpm (neliöt) ja 100 rpm (ympyrät). Kun reaktio oli saatu päätökseen pH-arvon ollessa 2,1, otettiin kolme näytettä ja pH säädettiin arvoon 2,1 (-■-), 2,8 (-●-) ja 3,5 (-⊗-). Viskositeettikokeet kierrosnopeudella 20 rpm, jotka oli otettu useita päiviä myöhemmin, vahvistivat, että näytteet pH-arvon ollessa 3,5 olivat todellakin stabiilimpia ja säilyttivät enemmän alkuperäisestä viskositeetista kuin näytteet, joiden pH-arvo oli 2,1.

Esimerkki 2A

Teepak-kollageenin hydrolyysi 30 - 35 °C:n lämpötilassa tutkittiin suunnilleen 10 kokeen sarjassa, jotta voitiin määrittää mahdollisuus pepsiinin käytön minimoimiseksi solubilisaatioprosessissa. Tyypillisesti entsyymin katalysoiman reaktion nopeudet kaksinkertaistuvat aina lämpötilan noustessa 5 - 10 °C. Näissä kokeissa ruostumattomasta teräksestä valmistettu 4 l:n dekantteri käärittiin nauhalämmittimeen, sitten se eristettiin asbestinauhalla. Liuoksen lämpötilaa kontrolloitiin Variac-laitteella linjassa nauhalämmittimen kanssa siten, että vaihtelu oli ± 1 - 2 °C. Edellä esitetty menetelmä oli mitoitettu 2 l:n

reaktiotilavuuteen ja tutkittiin pienempien pepsiinikonsentraatioiden ja lämmitysprofiilien vaihtelualuetta. Lähes kaikissa tapauksissa kiinteiden Teepak-aineiden täydellinen solubilisaatio saavutettiin 10 - 15 tunnissa eikä missään tapauksessa kehittynyt merkittävää viskositeettia solubilisoituun tuotteeseen.

Kymmenestä kokeesta tyypillinen koe oli seuraava: lisättiin 2 l vettä dekantterilasiin, johon lisättiin 40 g Teepak-kollageenia, sitten pH säädettiin arvoon 2,13 vävän suolahapon avulla ja lopuksi lisättiin 1,0 g raakaa pepsiiniä. Aluksi hauteen lämpötila oli 30,0 °C, noin 2,5 tuntia myöhemmin lämpötila oli 33 °C ja viskositeetti kierrosnopeudella 100 rpm oli 19 cps ja noin 5,5 tuntia myöhemmin lämpötila oli 36,5 °C viskositeetin ollessa 8 cps. Näyte solubilisoitui täydellisesti alle 8 tunnissa 33 - 36 °C:n lämpötilassa ilman viskositeetin lisäystä osoittaen suuremman moolimassan omaavan aineen tuotantoa. Nämä kokeet osoittavat, että pepsiinin säilyttämisen odotetaan olevan vaikeampaa tässä prosessissa toimittaessa korkeammissa reaktiolämpötiloissa, myös varhain hydrolyysiprosessin aikana. Maksimaalinen mahdollinen lämpötila tämän suuren moolimassan omaavan erityisen kollageenin kerääntymiseksi näyttää olevan noin 30 °C.

Esimerkki 3A

Toista lähestymistapaa pepsiinin käytön minimoimiseksi tässä prosessissa kuvaa koe, josta esitetään yhteenveto kuviossa 3. Tässä kokeessa edellä esitetty resepti (750 ml vesjohtovettä, Columbus, OH; 15,5 g teepak-kollageenia, 0,38 g pepsiiniä, pH-arvo 2,1) sekoitettiin päivänä 0 reaktion aloittamiseksi 2 l:n pullossa huoneenlämpötilassa (roomalainen numero I). Suunnilleen yhden päivän kuluttua lisättiin vielä 750 ml vettä ja toinen annos kiinteätä Teepak-kollageenia (16,1 g), mutta ylimääräistä pepsiiniä ei lisätty reaktoriin (roomalainen numero II). Pulloa sekoitettiin noin 5 minuutin ajan sisällön sekoit-

tamiseksi ja pH-arvo säädettiin uudelleen 30 tipalla väkevää suolahappoa, sitten sekoitin pysäytettiin ja kiinteiden aineiden annettiin kerrostua. Suunnilleen 30 minuutin kuluttua 750 ml päällysnestettä, "päivän 1" päällysnestettä (D1), dekantoitiin toiseen pulloon ja kummankin pullon sekoittaminen aloitettiin uudelleen. Päivän 1 päällysneste sisälsi jonkin verran hienojakoisia kollageenihiukkasia, mutta se sisälsi paljon pienemmän määrän suspendoituja kiinteitä aineita kuin pohjafraktio. Sama menetelmä laimentaen (755 ml vettä), lisäten kollageenin kiinteitä aineita (15,2 g Teepak-kollageenia), säätäen pH-arvo 30 tipalla väkevää suolahappoa (roomalainen numero III) ja dekantoiden "päivän 2" päällysneste (D2) toistettiin ensimmäisessä pullossa suunnilleen 2 reaktiopäivän jälkeen.

Yhtenäiset viivat (-X-) kuviossa 3 kuvaavat hydrolyysireaktion etenemistä. Ympyrät (-O-) osoittavat päivän 1 päällysnesteen hydrolyysireaktion etenemiskäyrää, kun taas neliöt (-□-) osoittavat päivän 2 päällysnesteen käyrää. Tässä esimerkissä kolme tyypillistä Teepak-kollageenin annosta hydrolysoitiin käyttäen yhtä annosta pepsiiniä, vaikka hydrolyysin nopeus näyttää olevan vähenevä jokaisen syklin myötä. Koska sekä päivän 1 että päivän 2 päällysnesteiden viskositeettisuhteet näyttivät lisääntyvän sen jälkeen, kun ne oli dekantoitu pääreaktorista, on ilmeistä, että jonkin verran pepsiiniä ja liukenematonta kollageenia siirtyi päällysnesteen mukana. Kuitenkin näyttää siltä, että pepsiinillä on suurempi affiniteetti kiinteisiin kollageenihiukkasiin kuin liukoiseen kollageeniin, siten enin osa entsyymistä voidaan kierrättää useita kertoja ennen kuin se poistetaan järjestelmästä, minimoiden näin tämän reagenssin kustannukset. Edullisesti saavutetaan nesteen ja kiinteiden aineiden parempi erottaminen, jos päällysneste erotetaan liukenemattomasta kollageenista linkoamalla.

Edullisimmin vakiotila on toivottu prosessin kierrätysvaiheissa. Tämä saavutetaan lisäämällä ylimääräistä entsyymiä tuotteen poistamisvaiheen jälkeen, kun reaktionopeus kierrätysvaiheissa hidastuu ennalta määrätyn tason alapuolelle. Edullisimmin ylimääräistä entsyymiä lisätään siten, että se juuri korvaa määrän, joka on menetetty tuotteen poistamisen mukana.

Esimerkki 4A

Toteutettiin koe, jossa vesijohtovesi korvattiin 750 ml:lla nollavettä (kierrätysvettä paperinvalmistusprosessista) edellä esitetyn esimerkin 3A standardireseptissä. Sitten lisättiin 15,5 g Teepak-kollageenia, pH säädettiin arvoon 2,14 40 tipalla väkevää suolahappoa ja sitten lisättiin 0,375 g pepsiiniä. Koska huoneenlämpötilaa nostettiin tämän kokeen aikana, reaktio toteutettiin 29 - 31 °C:ssa ja solubilisaatio näytti etenevän nopeammin kuin standardireaktioissa 25 - 26 °C:ssa. Tässä yhdessä reaktiossa kehittyi hyvä viskositeetti, kiinteät aineet solubilisoitiin lähes täydellisesti eikä reaktion toteuttamisessa näyttänyt olevan ongelmaa tässä liuoksessa (katso taulukko 1A). Nollaveden kierrättäminen paperinvalmistusprosessista tällä tavalla vähentää suuresti prosessiin tuotavan veden määrää.

Taulukko 1A

Solubilisoitu kollageeni, joka on valmistettu paperinvalmistuksesta saadussa nollavedessä

Aika (h)	Viskositeetti		Viskositeettisuhde
	20 rpm	100 rpm	
0	--	--	--
18,5	415	177	2,34
22	440	186	2,37
26,7	365	166	2,20
42	280	136	2,06

Esimerkki 5A

Tässä esimerkissä lisättiin 1 893 l (500 gallonaa) vesijohtovettä (Savannah, GA) ruostumattomasta teräksestä valmistettuun kaksoismelan omaavaan 2 271 l:n (600 gallonan) säiliöön ja veteen dispergoitiin Teepak-kollageenia 75# (13,5 # kiinteitä aineita, @ 18 % kiinteitä aineita). Lisättiin suunnilleen 1,4 l väkevää suolahappoa seoksen pH:n saattamiseksi arvoon 2,14. Lisättiin hitaasti pepsiiniä (1,01 kg; Sigma erä nro 70H0437), sitten säiliö peitettiin polyeteenikalvolla ja säiliötä sekoitettiin yön yli. Suunnilleen 20 tunnin kuluttua hydrolyysi oli tapahtunut epätäydellisesti (viskositeettisuhde = 1,32). Koska nesteen lämpötila ja huoneenlämpötila olivat suhteellisen matalia (noin 20 °C), päätettiin yrittää nesteen lämpötilan nostamista saattamalla välitöntä höyryä säiliön pohjan ulkopuolelle. Höyryä käytettiin noin 2,5 tunnin ajan, johon mennessä nesteen lämpötila oli 23 °C, viskositeettisuhde oli 2,15 ja höyrylämmitys keskeytettiin.

Suunnilleen 31 tunnin kuluttua viskositeettisuhde oli 2,43, joka on suhteellisen suuri arvo tässä reaktiossa. Päätettiin säätää pH-arvo säiliössä suunnilleen arvoon 3,0 lisäämällä noin 450 g NaOH-hiutaleita liuoksen stabiloimiseksi (pepsiinireaktion hidastamiseksi/pysäyttämiseksi) sen käyttämiseksi seuraavana päivänä paperissa. Noin 208 l (55 gallonaa) liuosta, jonka pH-arvo oli 2,1, säilytettiin 18,9 l:n (5 gallonan) säiliöissä ennen pH-arvon säätämistä. Koska viskositeettisuhde laski hiukan yön kuluessa liuoksessa, jonka pH-arvo oli 2,1 (avoimet ympyrät, —O—, kuviossa 4 ja merkitty A-kirjaimella), verrattuna liuokseen, jonka pH-arvo oli 3,0 (suljetut ympyrät, —●—), vedettiin johtopäätös, että pH-arvon säätäminen on avuksi ylläpidettäessä suurinta mahdollista moolimassaa tuotteessa varastoinnin aikana huoneenlämpötilassa.

Noin 24 tuntia kestäneen reaktion jälkeen havaittiin jonkin verran kelluvaa kiinteätä ainetta (sen oletet-

tiin olevan rasvaa sen pienen tiheyden vuoksi) kollageeniliuoksen pinnalla lähellä sekoittimen akselia. Vaikka tässä kokeessa ei yritettykään poistaa tätä jäännöstä, se voidaan helposti kuoria pois valmisteesta, jos jäännösrasvan havaittaisiin olevan haitallista kollageenin suorituskyvylle.

Ennen tässä esimerkissä ja jäljempänä kuvatussa esimerkissä 6A valmistetun kollageenin käyttöä liuos suodatettiin kuljettamalla se kudotun muoviseulan läpi, jonka aukot olivat kooltaan noin 1 x 3 mm, hyvin hitaasti hajoavien nahkahiukkasten pienen määrän poistamiseksi. Näille hiukkasille on tunnusomaista, että ne ovat viimeinen aine, jonka pepsiini liuottaa ja niitä voidaan usein havaita koon vaihtelualueella 3 - 5 mm. Suuri näyte näitä jäännöshiukkasia suodatettiin kollageeniliuoksesta ja niiden kuivapaino mitattiin. Laskien tämä näyte koskemaan koko kollageeniliuoserää, arvioitiin, että tässä prosessissa solubilisoitiin enemmän kuin 95 % alussa olleista kiinteistä aineista.

Esimerkki 6A

Tässä esimerkissä sama säiliö täytettiin 1 893 l:lla (500 gallonalla) vesijohtovettä (Savannah, GA), joka oli tammikuussa hyvin kylmää, noin 11 °C. Teepak-kollageeni (79,5 #; 12,5 # kiinteitä aineita kuivapainon ollessa 15,6 %) dispergoitiin tähän veteen, sitten lisättiin 1,5 l väkevää suolahappoa pH:n saattamiseksi arvoon 2,18. Lisättiin hitaasti pepsiiniä (1,01 kg; Sigma erä nro 70H0437), sitten säiliö peitettiin polyeteenikalvolla. Välitöntä höyryä saatettiin säiliön pohjan ulkopinnalle noin 4 tunnin ajan nesteen lämpötilan nostamiseksi 11,5 °C:sta 25 °C:seen. Tänä ajankohtana pH-arvo oli 2,40; lisättiin vielä 0,4 l väkevää suolahappoa pH:n saattamiseksi arvoon 2,29. Säiliö verhottiin polyeteenikalvolla säiliön lämpöeristämiseksi yöksi. Suunnilleen 28 tunnin kuluttua viskositeettisuhde oli 2,51 lämpötilan ollessa noin 22 °C pH-

arvon 2,46. Noin 600 g NaOH-hiutaleita lisättiin säiliön sisällön pH:n saattamiseksi arvoon 2,98, säiliö peitettiin kuten edellä ja sitä sekoitettiin yön yli. Lopullinen viskositeettisuhde oli 2,61. Tulokset esitetään kuviossa 4, B (-X-).

Koska esimerkin 6A kollageeniliuos tuotettiin noin 2 - 3 °C:ta korkeammassa lämpötilassa ensimmäisen päivän aikana kuin esimerkin 5A liuos, reaktio näyttää edenneen nopeammin, jolloin reaktio on tapahtunut täydellisesti noin 4 - 5 tuntia nopeammin. Kun pH säädettiin arvoon noin 3,0, lopullinen liuos näyttää hidastaneen entsymaattista reaktiota siten, että liukoisen tuotteen vähäistä hajoamista havaittiin yön kuluttua.

Prosessi on tarkoitettu tuottamaan naudan vuotien lähes täydellisen muuttumisen kollageeniliuokseksi käyttäen entsymaattista hydrolyysireaktiota. Prosessin tavoitteena on liuokoisen kollageenin tuotanto maksimaalisena saantona, samalla kun muuttumiskustannukset ja kiinteät pääomakulut minimoidaan. Prosessia ei ole tarkoitettu elintarvike- tai lääkelaatua olevan kollageenin tuottamiseksi ja sen vuoksi vaatimukset puhtaiden liuosten tuottamiseksi ovat minimaalisia eikä odoteta liukoisen kollageenin puhdistamista. Ei ole tehty yrityksiä muiden nahan aineosien(rasvan, proteoglykaanien, muiden proteiinien, suolojen jne.) jäännösten poistamiseksi, joita on läsnä jauhetussa haljasraaka-aineessa pienempinä konsentraatioina kuin kollageenia.

Prosessi vaatii sarjan leikkaimia ja jauhimia syöttöaineena käytettävien kalkittujen haljasten hienontamiseksi revityksi materiaaliksi, joka voidaan muuttaa helposti liukoiseksi kollageeniksi. Kuten edellä on siteerattu, prosessin "etupää" näyttää todennäköisesti samanlaiselta kuin USDA-prosessi hienoksi jauhetun kollageenin tuottamiseksi. Riippuen käytettyjen vuotien esikäsittelystä mikrobikasvun estämiseksi, saattaa olla, että vuodista

täytyy poistaa kalkki tai tehdä ne happamiksi jäljellä olevien kalsiumsuolojen tai muiden biosidien poistamiseksi. Jauhetut kiinteät aineet sekoitetaan sitten prosessin veteen (ehkä paperitehtaasta tulevaan nollavesivirtaan, josta on poistettu kiinteitä aineita), pH titrataan arvoon 2,0 - 2,2 ja entsyymi lisätään solubilisaatioprosessin aloittamiseksi. Muuttumisen jälkeen liukoiset kiinteät aineet voidaan pumpata suoraan paperinvalmistusprosessiin ja sekoittaa jauhettujen massan kiinteiden aineiden kanssa tai stabiloida ja varastoida.

Pienen mittakaavan kokeissa tuloksena näyttää olevan maksimaalinen vuorovaikutus kollageenin ja massan kiinteiden aineiden välillä, jos liuoksen pH-arvo on noin 4,0 tai vähemmän ja massan konsistenssi on 1,0 % tai vähemmän. Sen vuoksi massan pH:n säätäminen pitosäiliössä arvoon noin ≤ 4,0 näyttää olevan hyödyllistä, vaikka tyypillinen ajo tapahtui pH-arvon ollessa 5 - 6, koska paperi oli stabiilimpi.

Esimerkki 7A

Syötettävät "USDA"-kollageenimateriaalit valmistettiin käyttäen tässä lainattua Komanowskyn et al. menetelmää seuraavasti. Kaksi kalkittua haljasta ja yksi kaltattu ja kalkittu haljas rullattiin ja leikattiin, jolloin saatiin 30,5 cm:n (12 tuuman) levyisiä suikaleita. Nämä suikaleet kuljetettiin suikaleleikkaimen läpi ja sitten pyörivän veitsileikkaimen läpi. Hapan liuos valmistettiin liuottamalla 102,15 g bentsoehappoa 1021,5 g:aan propionihappoa. Happamaksi tekeminen toteutettiin ruostumattomasta teräksestä valmistetuissa 208 l:n (55 gallonan) rummuissa lisäämällä 92 kg (203 naulaa) vettä ja 521 g edellä mainittua happoliuosta materiaaliin, joka oli saatu kalkituista haljaksista, ja 107 kg (235 naulaa) vettä ja 603 g happoliuosta koko vuotamateriaaliin. Rumpuja pyöritettiin 15 minuuttia/tunti neljän tunnin ajan. Lopulliset pH-arvot olivat vastaavasti 5,1 ja 5,2. Lopuksi osa kumpaakin mate-

riaalia kuljetettiin 0,15 cm:n (0,06 tuuman) Urschel Comitrol -leikkausterän kautta. Jäljellä oleva osa kuljetettiin 0,51 cm:n (0,200 tuuman) leikkausterän kautta. Tuotteet kaadettiin pieniin muovipusseihin ja pantiin pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan myöhempää käyttöä varten.

Esimerkki 8A

Jauhettuja, kalkittuja USDA-haljaksia lingottiin 4 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan kierrosnopeudella 10 000 rpm. Päällysneste poistettiin ja lingotut kalkitut haljakset (15 g) lisättiin 2 l:n Erlenmeyerpulloon, joka sisälsi deionisoitua vettä (1 500 ml). Suspensiota sekoitettiin magneettisekoittimella (5,08 cm:n eli 2 tuuman sekoitusharkko) ja pH säädettiin arvoon 2,1 väkevällä suolahapolla. Pepsiini (0,76 g) lisättiin pulloon, jota sekoitettiin inkubaattorissa, joka oli asetettu 18 °C:n lämpötilaan. Reaktioseosten näytteet (100 ml) poistettiin eri aikoina ja niiden viskositeetti analysoitiin (taulukko 2A). Kun näytteen pH säädettiin arvoon 3 - 3,5 ja näytteitä varastoitiin 4 °C:n lämpötilassa. Viimeisen näytteen ottamisen jälkeen (50 tuntia), analyyttiset näytteet (0,7 ml) yhdistettiin etikkahappoon (1,4 ml), jonka pH-arvo oli 3,5, ja seoksia ultralingottiin yhden tunnin ajan kierrosnopeudella 45 000 rpm 4 °C:n lämpötilassa. Päällysnesteistä ja pelleteistä (sen jälkeen kun ne oli suspendoitu uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen puskuria) analysoitiin hydroksiproliini, kuten taulukossa 2A on esitetty.

Eri fraktioiden suuremmat näytteet (50 ml) yhdistettiin etikkahappoon (100 ml), jonka pH-arvo oli 3,5, ja seoksia lingottiin kierrosnopeudella 20 000 rpm 4 tunnin ajan 4 °C:n lämpötilassa. Näytteitä varastoitiin 4 °C:n lämpötilassa 9 - 10 päivän ajan, jolloin niitä käytettiin paperin valmistamiseksi.

Taulukko 2A

Yhteenveto esimerkin 8A tuloksista

Näytteenottoaika (h)	Viskositeetti (20 rpm) (cps)	Hydroksiproliinin määrä päällysnesteessä (mg/ml)	Hydroksiproliinin määrä pelletissä (mg/ml)	ΔTS (muutos kontrollista ilman lisäainetta, %
3	35	0,10	0,28	15
7	400	0,15	0,18	17
11	1 055	0,23	0,12	21
15	1 030	0,28	0,06	31
26	800	0,29	0,05	35
30	745	0,26	0,05	--
50	605	0,27	0,04	27

Nämä tiedot osoittavat, että kollageeni solubilisoitui lisääntyvästi tässä reaktiossa noin 15 tuntiin saakka. Tästä olivat todisteena hydroksiproliinin määrän lisääntyminen päällysnesteessä, pelletin koon ja hydroksiproliinin väheneminen lingotessa ja viskositeetin lisääntyminen alussa. Liukoisen kollageenin lisääntyminen korreloi kollageenilisäyksen sisältävän paperin vetolujuuden lisääntymisen kanssa, jolloin ΔTS edustaa vetolujuuden lisäystä prosentteina verrattuna kontrollipaperiin, johon ei ollut lisätty kollageenia.

Esimerkki 9A

Kalkittuja Teepak-haljaksia lingottiin 4 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan kierrosnopeudella 10 000 rpm. Päällysneste poistettiin ja lingotut kalkitut haljakset (35 g) lisättiin 4 l:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi deionisoitua vettä (3 500 ml). Suspensiota sekoitettiin magneettisekoittimella (5,08 cm:n eli 2 tuuman sekoitusharkko) ja pH säädettiin arvoon 2,1 väkevällä suolahapolla. Pepsiini (1,75 g) lisättiin pulloon, jota sekoitettiin sitten inkubaattorissa, joka oli asetettu 20,5 °C:n lämpö-

tilaan. Reaktioseosten näytteet (200 ml) otettiin eri aikoina ja niistä analysoitiin viskositeetti (taulukko 2A). Kunkin näytteen pH säädettiin arvoon 3 - 3,5 ja näytteitä varastoitiin 4 °C:n lämpötilassa, kunnes ne käytettiin paperin valmistamiseksi.

Sitten 27 tunnin kuluttua 20,5 °C:n lämpötilassa, yksi kolmasosa inkuboidusta kollageeninäytteestä poistettiin ja sitä sekoitettiin huoneenlämpötilassa. Sitten inkubaattorin lämpötila säädettiin arvoon 30 °C ja jäljellä olevaa näytettä sekoitettiin tässä lämpötilassa. Määrätyin ajoin otettiin 200 ml:n näytteet, pH-arvo säädettiin ja näytteet varastoitiin 4 °C:n lämpötilaan, kuten edellä on kuvattu. Kun viimeinen näyte oli otettu, analyyttiset näytteet (0,7 ml) yhdistettiin etikkahapon (1,4 ml) kanssa, jonka pH-arvo oli 3,5, ja seoksia ultralingottiin yhden tunnin ajan kierrosnopeudella 45 000 rpm 4 °C:n lämpötilassa. Päällysnesteistä ja pelleteistä (sen jälkeen kun ne oli suspendoitu uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen puskuria) analysoitiin hydroksiproliinipitoisuus. Päällysnesteet analysoitiin myös kokoekskluusio-HPLC:n avulla, kuten taulukossa 3A on esitetty.

Taulukko 3A

Yhteenveto

Inkubointi-aika (h)	Piikin pinta-ala			Viskositeetti (cps kierrosnopeudella 20 rpm)	Hydroksiproliini päällysnesteessä (mg/ml)	ΔTS[e] (%)	
	Piikki 1 ~ 31 min	Piikki 2 ~ 34 min	Piikki 3 ~ 45 min			ONP	OCC
5,5	9,0	14,9	5,7	25	0,09	14	27
21	17,5	21,0	9,5	375	0,17	27	42
23	16,4	24,7	10,1	425	0,17	--	--[f]
27	9,9	24,7	9,8	650	0,21	28	46
30[a]	12,6	20,9	8,7	840	0,23	32	42
45,5[b]	15,9	23,4	0,7	1 095	0,28	37	--
30[c]	18,5	30,2	40,2	750	0,20	26	43
45,5[d]	18,4	24,5	54,4	45	0,30	36	46

a. Tätä näytettä inkuboitiin 27 tunnin ajan 20,5 °C:n lämpötilassa ja 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa.
b. Tätä näytettä inkuboitiin 27 tunnin ajan 20,5 °C:n lämpötilassa ja 18,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa.
c. Tätä näytettä inkuboitiin 27 tunnin ajan 20,5 °C:n lämpötilassa ja 3 tunnin ajan 30 °C:n lämpötilassa.
d. Tätä näytettä inkuboitiin 27 tunnin ajan 20,5 °C:n lämpötilassa ja 18,5 tunnin ajan 30 °C:n lämpötilassa.
e. ΔTS = paperin vetoluujuuden lisääntyminen prosenttina verrattuna kontrolliin (ei kollageenia), jolloin mainittu paperi on valmistettu käyttäen 1 % kollageenia, joka on lisätty massoihin, jotka on valmistettu vanhasta sanomalehtipaperista (ONP) tai vanhasta laatikkoaaltopahvista (OCC).
f. (--) osoittaa, että analyysiä ei toteutettu.

Nämä tiedot kuvaavat liukoisen kollageenin lisääntymistä koko reaktion ajan, kuten viskositeetin ja hydroksiproliinin lisääntyminen päällysnestefraktiossa osoittaa. Liukoisen kollageenin lisäys korreloi kollageenilisäyksen sisältävän paperin vetoluujuuden lisääntymisen kanssa. Näytteet, joita pidettiin 30 °C:n lämpötilassa 27 tunnin reaktioajan jälkeen, osoittivat suuren moolimassan omaavan kollageenin etenevää muuttumista hajoamistuotteiksi (lisäys HPLC-piikissä 3), mutta tässä tapauksessa pienempi moolimassa ei tuottanut tulokseksi tällaista kollageenia sisältävän paperin vetolujuuden samanlaista vähenemistä. Tämä jälkimmäinen vaikutus osoitti, että kollageenilla on positiivinen vaikutus paperiin myös silloin, kun jonkin verran materiaalista on digestoitu suhteellisen pienen moolimassan omaavaksi. Geelielektroforeesi osoittaa, että läsnä on merkittäviä konsentraatioita kollageeneja, joiden moolimassat ovat noin 200 000 daltonia ja noin 100 000 daltonia, jopa reaktion jälkeen, joka on toteutettu 30 °C:n lämpötilassa 18,5 tunnin kuluessa. Siten detergentin puuttuessa voi olla merkittäviä määriä materiaalia, jonka moolimassa on 300 000 tai enemmän. Todellista suuren moolimassan omaavaa kollageenia oli läsnä, kuten osoittavat HPLC-piikkien 1 ja 2 suuret alat näytteissä, jotka on osoitettu alaindekseillä c ja d.

Esimerkki 10A

Solubilisoidun kollageenin kaksi valmistetta yhdistettiin seuraavasti. Kumpikin valmiste valmistettiin kalkituista Teepak-haljaksista, joita lingottiin 4 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan kierrosnopeudella 10 000 rpm. Päällysneste poistettiin ja lingotut kalkitut haljakset (35 g) lisättiin 4 l:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi deionisoitua vettä (3 500 ml). Suspensiota sekoitettiin magneettisekoittimella (5,08 cm:n eli 2 tuuman sekoitusharkko) ja pH säädettiin arvoon 2,1 väkevällä suolahapolla. Pepsiini (1,75 g) lisättiin pulloon, jota sitten se-

koitettiin inkubaattorissa, joka oli asetettu 19 °C:n lämpötilaan. Yhtä valmistetta inkuboitiin 31,5 tunnin ajan (lopullinen viskositeetti kierrosnopeudella 20 rpm oli 1 160 cps) ja toista valmistetta inkuboitiin 21 tunnin ajan (lopullinen viskositeetti kierrosnopeudella 20 rpm oli 1 025 cps). Näitä kahta valmistetta varastoitiin 4 °C:n lämpötilassa ilman pH-arvon säätämistä 6 päivän ajan, sitten 1,5 l kumpaakin valmistetta yhdistettiin 4 l:n pulloon, sekoitettiin seokseksi ja kuumennettiin sitten nopeasti noin 30 °C:n lämpötilaan vesihauteessa. Sitten pulloa sekoitettiin 32 °C:n lämpötilassa inkubaattorissa ja määrätyin ajoin otettiin 200 ml:n näytteet, pH-arvo säädettiin välille 3,0 - 3,5 ja näytteet varastoitiin 4 °C:n lämpötilaan. Tämän reaktion tulokset ja näitä aineita käyttäen valmistettujen papereiden vetokokeiden tulokset esitetään jäljempänä taulukossa 4A.

Nämä tiedot osoittavat, että vaikka kaikki kollageeni ei ollutkaan aluksi liukoista (hydroksiproliinin määrät lisääntyivät koko reaktion ajan), kollageenin lukukeskimääräisessä moolimassassa ilmeni nopea väheneminen 30 °C:n lämpötilassa tapahtuvan reaktiojakson kuluessa, mitä osoittavat esimerkiksi viskositeetin väheneminen ja HPLC-piikin 3 alan lisääntyminen. Tämä moolimassan väheneminen ei vaikuta vetolujuuden lisääntymiseen, ennen kuin HPLC-piikki 1 kokonaan (lukukeskimääräinen moolimassa > 300 000 daltonia) ja HPLC-piikki 2 lähes kokonaan (lukukeskimääräinen moolimassa ~ 300 000 daltonia) ovat muuttuneet pienemmiksi fraktioiksi. Geelielektroforeesi osoitti, että läsnä oli pieni määrä kollageenia, jonka moolimassa oli ~ 100 000 daltonia, myös 25,5 tunnin kuluttua 32 °C:n lämpötilassa. Suurin osa kollageenista oli muuttunut fragmenteiksi, joiden lukukeskimääräinen moolimassa oli vähemmän kuin 100 000 daltonia tähän mennessä. Tämän näytteen HPLC-analyysi, joka tehtiin ilman detergenttiä, ei osoita lainkaan piikkiä 1 ja vähän piikkiä 2. Jäljellä olevat

geelillä havaitut fragmentit, joiden lukukeskimääräinen moolimassa on 100 000 daltonia, kasautuvat luultavasti detergentin puuttuessa muodostaen 300 000 daltonin painoisen kolmoiskierteen, joka nähdään HPLC-piikkinä 2. Juuri tämä kolmoiskierrekollageeni näyttää antavan paperille parantuneet ominaisuudet.

Taulukko 4A

Yhteenveto esimerkin 10A tuloksista

Inkubointiaika (h)	Piikin pinta-ala			Viskositeetti (cps)	Hydroksiproliini päällysnesteessä (mg/ml)	ΔTS (muutos kontrollista, %)
	Piikki 1 ~ 31 min	Piikki 3 ~ 34 min	Piikki 3 ~ 45 min			
0	2,1	29,1	--	1 260	0,28	+48
2	25,8	25,6	12,5	705	0,27	--
3	26,8	24,9	19,3	520	0,29	--
4	20,4	31,1	37,2	215	0,32	+46
5	18,8	28,8	46,1	165	0,29	--
6	19,9	31,7	65,3	75	0,34	+37
7	13,3	28,8	72,2	35	0,35	+41
8	14,7	23,8	83,9	20	0,37	+41
9	10,6	22,1	93,9	15	0,37	+47
12,5	6,5	16,7	105,5	10	0,39	+41
25,5	0	5,0	127,6	5	0,38	+30

Esimerkki 11A

Mikrobiproteaasien reaktiosta kollageenin kanssa, joka on peräisin kalkituista haljaksista, kuten edellä on kuvattu, esitetään yhteenveto taulukoissa 5A ja 6A.

Mikrobiproteaasit saatettiin reagoimaan kahdesta lähteestä peräisin olevien jauhettujen kalkittujen haljasten kanssa 17 °C:n lämpötilassa. Yhteenveto optimaalisista tuloksista koskien proteaasikonsentraatiota ja pH-arvoa esitetään taulukossa 5A.

Taulukko 5A

Mikrobiproteaasien reaktio jauhettujen kalkittujen haljasten kanssa

Entsyymi	pH	Maksimiviskositeetti (20 rpm)	Aika maksimiviskositeetin saavuttamiseksi (h)
Newlase II (0,08 g)	2,6	1 840	18
Quest AP (0,08 g)	2,6	1 535	22
AFP 2000 (0,08 g)	2,6	1 415	22
EDC-APA (0,08 g)	2,5	1 085	18

Taulukko 6A

Mikrobiproteaasien reaktio kalkittujen Teepak-haljasten kanssa

Entsyymi	pH	Maksimiviskositeetti (20 rpm)	Aika maksimiviskositeetin saavuttamiseksi (h)
Newlase II (0,075 g)	2,6	1 386	19
Quest AP (0,08 g)	2,6	945	24
EDC-APA (0,08 g)	2,5	745	20
Newlase A (0,04 g)	2,6	665	23
AFP 2000 (0,08 g)	2,6	515	41
EDC-APB (0,08 g)	3,0	435	39

Kaikki mikrobiproteaasit tuottavat merkitsevästi sakeita kollageeniliuoksia osoittaen niiden käyttöä jauhetuista kalkituista haljaksista saadun kollageenin solubilisoimiseksi.

Edellä esitettyjen esimerkkien mukaan valmistetut kollageeniliuokset näyttävät olevan stabiileja huoneenlämpötilassa 12 - 24 tunnin ajan ja stabiilisuutta voidaan lisätä nostamalla liuoksen pH arvoon 3,0 - 3,5 ja/tai alentamalla liuoksen lämpötila 5 - 10 °C:seen.

Prosessi on osoittanut vähän kustannuksia vaativan liukoisen kollageenituotteen tuotannon toteuttamiskelpoisuuden solubilisoimalla olennaisilta osin täydellisesti naudan vuodan kollageenin (jauhetut kalkitut haljakset). Menetelmä voidaan toteuttaa lähes ympäröivissä olosuhteissa ja sitä on suhteellisen helppo kontrolloida. Erityisen mielenkiintoinen on kierrätysmenetelmä, joka vähentää suhteellisen kalliiden proteolyyttisten entsyymien kustannuksia.

B. Toinen yleinen suoritusmuoto

Toisessa yleisessä suoritusmuodossa käytetään tyypillisesti solubilisoitua kollageenia, joka on tuotettu ensimmäisessä yleisessä suoritusmuodossa, tai haluttaessa solubilisoitu kollageeni voidaan saada muista menetelmistä. Yksi tärkein etu ensimmäisen yleisen suoritusmuodon solubilisoidun kollageenin käyttämiseksi on tietysti näin tuotetun materiaalin matalat kustannukset. Tämä kustannustekijä on tärkein etu paperinvalmistuksen alalla.

Keksintö parantaa uusiopaperin, tavanomaisen paperin ja niiden seosten lujuutta. Keksintö on erityisen käyttökelpoinen tuotettaessa uusiopaperia, koska kierrätetyistä selluloosakuiduista valmistettu uusiopaperi on yleensä heikompaa kuin ensiöselluloosakuiduista valmistettu paperi. Tässä keksinnössä käytettävät raaka-aineet ovat tyypillisesti: ensiöpaperimassa, joka on kierrättämättömistä materiaaleista valmistettua paperimassaa; hylkypape-

ri, joka hylkytavaraa paperitehtaassa; keräyssanomalehtipaperi, joka on kierrätettyä sanomalehtipaperia ja vastaavaa paperia; keräyslaatikkoaaltopahvi, joka on kierrätettyä laatikkoaaltopahvia ja vastaavaa materiaalia, samanlaisia selluloosapohjaisia papereita ja niiden seoksia.

Keksintö julkaisee entsyymien avulla solubilisoidun kollageenin käytön selluloosakuiduista vamistettujen paperityyppisten tuotteiden lujuuden ja muiden ominaisuuksien parantamiseksi. Tyypillisesti menetelmä kollageenilla vahvistetun paperin valmistamiseksi käsittää raaka-aineen sekoittamisen veden kanssa tai veden ja emäksen (esim. NaOH:n) kanssa ja mekaanisen kuiduttamisen, kunnes massaliete on muodostunut. Edullisesti massalietteen konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista. Sitten massaliete laimennetaan konsistenssiin, joka on noin 1 - 3 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja pH säädetään arvoon noin 3,5 - 7,0. Kuivapainon mukaan noin 0,1 - 2 paino-% solubilisoitua kollageenia lisätään laimennettuun massalietteeseen ja tulokseksi saatua lietettä sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaat laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin oleellinen osa solubilisoidusta kollageenista sitoutuu paperimassaan muodostaen kollageeni-massalietteen. Sitten kollageeni-massaliete laimennetaan edullisesti konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%, ja lopuksi kollageeni-massalietteestä muodostetaan arkki ja kuivataan arkki.

Esimerkki 1B

Kollageeniliuokset päällysteenä

Vanha sanomalehtipaperi (ONP) tai vanha laatikkoaaltopahvi (OCC) revittiin ja sitä liuotettiin 1-%:isessa natriumhydroksidiliuoksessa yön yli.

Revittyä materiaalia kuidutettiin Tappi-hajottimessa 15 minuutin ajan. Massa sekoitettiin veden kanssa ja

arkki muodostettiin Noble and Wood -perälaatikossa Duotex 162-DD-226 -arkinmuodostusviiralla. Arkki märkäpuristettiin Noble and Wood -laitteessa ja sitten se kalanteroitiin tiheyden lisäämiseksi (imupaperia käytettiin kummallakin puolella ja kalanteritelojen väli oli asetettu 0,019 mm:iin (0,76 mil). Arkkia kuivattiin 1 minuutin ajan jännittäen kuumalla levyllä, jonka pinnan lämpötila oli noin 100 °C. Kollageenihydrolysaatti (moolimassa < 2 000 daltonia), jonka oli toimittanut Secol-yhtiö (Exton, PA), tai liukoinen luontainen kollageeni (moolimassa > 300 000 daltonia), jonka oli toimittanut Gattefosse' Corp. (Elmsford, NY), levitettiin uusiopaperiarkeille käyttäen joko nro 10 tai nro 20 metallilankasauvaa. Päällystettyjä arkkeja kuivattiin joko kiertoilmauunissa 37,8 cm:n (100 °F) lämmössä 10 minuutin ajan tai niiden annettiin kuivua ympäröivissä olosuhteissa yön yli. Päällystetyistä arkeista arvioitiin neliömetripaino, puhkaisulujuus ja veto-ominaisuudet, jotka on raportoitu taulukossa 1B. Tässä taulukossa esitetään myös yksityiskohtaisesti massan määrä ja päällysteen paino, joita käytettiin.

Vetolujuuden lisääntyminen havaittiin kaikissa tutkituissa näytteissä, lisääntymisen vaihtelualueen ollessa noin 125 - 300 % verrattuna tarkoituksenmukaiseen kontrolliin ilman kollageenia. Vaikka ONP- ja OCC-kontrollit olivat vain noin 25-%:isesti niin vahvoja kuin kraftpaperistandardi, useat päällystetyt näytteet olivat yhtä vahvoja tai vahvempia kuin kraft-standardi.

Taulukko 1B

Päällysteenä käytetty kollageeni

Näyte nro	Arkin koostumus			Sauva	Kuivaustekniikka	Fysikaaliset tunnuspiirteet			Veto-ominaisuudet		
	Gms.-kuitu	Kuitu	Kollageeniliuos/%			Neliömetripaino kg/279 m^2	Mullen-puhkaisulujuus, MPa	Paksuus mm	Vetolujuus/neliömetripaino	Vetolujuus TS MPa	Muutos kontrollista, %
CC-1	5,5	kraft	-	--	--	13,1	0,159	0,11	1,30	17,01	--
CC-2	5,5	ONP	-	--	--	12,5	0,034	0,18	0,33	4,08	--
CC-4	5,5	ONP	hydrolysaatti	20	uusi	17,6	0,108	0,13	1,27	22,34	+289
CC-5	5,5	ONP	hydrolysaatti	20	ilma	17,1	0,109	0,13	1,06	18,20	+151
CC-6	5,5	ONP	hydrolysaatti	10	ilma	15,3	0,092	0,12	1,32	20,24	+304
CC-7	5,5	ONP	hydrolysaatti	10	uusi	16,8	0,108	0,13	1,15	19,38	+253
CC-8	5,5	ONP	luontainen	10	ilma	13,3	0,102	0,11	1,11	14,71	+238
CC-9	5,5	ONP	luontainen	10	uusi	14,0	0,109	0,12	1,02	14,22	+211
CC-10	5,5	ONP	luontainen	20	ilma	14,4	0,112	0,12	1,09	15,76	+235
CC-11	5,5	ONP	luontainen	20	uusi	13,8	0,098	0,12	1,10	15,22	+238
CC-12	4,5	OCC	-	--	--	14,4	0,055	0,19	0,38	5,50	--
CC-14	4,5	OCC	hydrolysaatti	20	uusi	18,2	0,178	0,14	1,47	26,68	+283
CC-15	4,5	OCC	hydrolysaatti	20	ilma	18,8	0,137	0,15	1,09	20,45	+185
CC-16	4,5	OCC	hydrolysaatti	10	ilma	17,7	0,161	0,14	1,47	25,98	+284
CC-17	4,5	OCC	hydrolysaatti	10	uusi	17,2	0,161	0,13	1,54	26,41	+302
CC-18	4,5	OCC	luontainen	10	ilma	13,8	0,124	0,12	1,02	14,01	+166
CC-19	4,5	OCC	luontainen	10	uusi	13,8	0,13	0,12	1,12	15,5	+194
CC-20	4,5	OCC	luontainen	20	ilma	14,0	0,12	0,13	0,86	12,1	+126
CC-21	4,5	OCC	luontainen	20	uusi	14,0	0,13	0,13	0,93	13,0	+146

ONP = vanha sanomalehtipaperi
OCC = vanha laatikkoaaltopahvi

Esimerkki 2B

Perälaatikossa massaan lisätty luontainen kollageeni

Vanha sanomalehtipaperi (ONP) tai vanha laatikkoaaltopahvi (OCC) revittiin ja sitä liotettiin 1-%:isessa natriumhydroksidiliuoksessa yön yli. Ainetta kuidutettiin Tappi-hajottimessa 15 minuutin ajan. Massa pantiin Nobel and Wood -laitteen perälaatikkoon ja siihen lisättiin vettä, jonka lämpötila vaihteli (14 - 17 °C tai 36 - 38 °C). Lietteen pH-arvo oli 7. Lisättiin eri määriä luontaista kollageeniliuosta (0,3 % kiinteitä aineita). Lietteen annettiin laskeutua ja sitä seisotettiin 4 - 10 minuutin ajan. Arkki muodostettiin Duotex 162-DD-226 -arkinmuodostusviiralla. Arkki märkäpuristettiin Noble and Wood -laitteessa ja sitten se kalanteroitiin tiheyden lisäämiseksi. (Imupaperia käytettiin kummallakin puolella ja kalanterirullien väli oli asetettu 0,762 mm:iin). Arkkia kuivattiin kuumalla levyllä 1 minuutin ajan. Muodostetuista arkeista arvioitiin neliömetripaino, puhkaisulujuus ja veto-ominaisuudet, jotka on raportoitu taulukossa 2B. Tässä taulukossa esitetään myös yksityiskohtaisesti massan ja kollageenilisäaineen määrä, jota käytettiin. Vetolujuuden lisääntyminen havaittiin kaikissa tutkituissa näytteissä, niiden vaihtelualueen ollessa noin 140 - 350 % verrattuna tarkoituksenmukaiseen kontrolliin ilman solubilisoitua kollageenia. Vaikka ONP- ja OCC-kontrollit olivat noin 25-%:isesti niin vahvoja kuin kraftpaperistandardi, useat näytteet olivat vahvempia kuin kraft-standardi. Ei havaittu korrelaatiota lisätyn kollageenin määrän ja vetolujuuden lisääntymisen välillä.

Taulukko 2B

Massaan lisätty kollageeni

Näyte nro	Arkin koostumus			Aika perälaatikossa	Lietteen lämpötila, °C	Fysikaaliset tunnuspiirteet			Veto-ominaisuudet		
	Gsm.-kuitu	Kuitu	Lisätty luontainen kollageeni, %			Neliömetripaino kg/279 m^2	Mullenpuhkaisulujuus MPa	Paksuus mm	Vetolujuus/neliömetripaino	Vetolujuus MPa	Muutos kontrollista, %
CP-1	5,5	kraft	--	--	--	13,1	0,159	0,11	1,30	16,97	--
CP-2	5,5	ONP	--	--	--	12,5	0,034	0,18	0,33	4,07	--
CP-5	5,5	ONP	1	4	17,1	14,3	0,092	0,13	1,11	15,82	+240
CP-6	5,5	ONP	1	4	35,9	13,1	0,071	0,12	1,01	13,19	+210
CP-7	5,5	ONP	2	4	15,4	13,3	0,103	0,11	1,48	19,70	+353
CP-8	5,5	ONP	2	4	15,4	13,9	0,081	0,12	0,98	13,62	+201
CP-9	5,5	ONP	1	10	37,6	13,2	0,089	0,12	1,08	14,20	+231
CP-10	5,5	ONP	10	10	35,7	16,2	0,110	0,14	1,07	17,33	+227
CP-11	4,5	OCC	--	--	--	14,4	0,055	0,19	0,38	5,48	--
CP-14	4,5	OCC	1	4	14,5	13,0	0,132	0,11	1,48	19,24	+289
CP-15	4,5	OCC	1	4	38,3	13,5	0,111	0,12	0,90	12,18	+138
CP-16	4,5	OCC	2	4	14,9	13,2	0,146	0,11	1,79	23,68	+371
CP-17	4,5	OCC	2	4	37,1	12,4	0,089	0,11	1,06	13,3	+179
CP-18	4,5	OCC	1	10	35,3	12,7	0,096	0,11	1,10	13,91	+189

a. Kaikkia näytteitä paitsi CP-1:tä liotettiin NaOH:ssa

ONP = vanha sanomalehtipaperi
OCC = vanha laatikkoaaltopahvi

Esimerkki 3B

Alla olevat esimerkit kuvaavat: (1) kuitumassalietteitä, jotka on valmistettu vanhasta laatikkoaaltopahvista (OCC) ja vanhasta sanomalehtipaperista (ONP); (2) 1-%:isen solubilisoidun kollageenin lisäämistä näihin massalietteisiin ennen paperiarkin muodostusta tai sen jälkeen. Raaka-aineet käytettiin kevyen paperin valmistamiseksi, jonka neliömetripaino oli 13,6 kg/279 m^2. Jotkut massalietteet käsiteltiin natriumhydroksidilla ympäröivässä veden lämpötilassa. Solubilisoitu kollageeni lisättiin massakyyppiin ennen paperintuotantoa määrän ollessa 1 % kuivan massan kiinteistä aineista ja seosta sekoitettiin vähintään 15 minuutin ajan lämpötilassa, joka oli alle 39 °C. Paperit tuotettiin seuraavasti:

A. Materiaalit

1. Solubilisoitu kollageeni, joka oli valmistettu kuten esimerkissä 5A.

2. Vanha sanomalehtipaperi (ONP).

3. Vuorauspahvi (rullat), joita oli käytetty vanhana laatikkoaaltopahvina, ei sisältänyt aallotuskartonkia - Stone Container, Savannah, GA. Kuidutettu materiaali on kuitenkin ikäänkuin aallotettua materiaalia olisi ollut käytetty.

4. Väkevä HCl (31-%:inen).

B. Laite

1. Black Clawson 2,4 m HCVY Hydrapulperi, pohjassa 61 cm:n Vokes-roottori ja käyttökokoonpano - tilavuus 7 570 l.

2. Sprout-Waldron 30 cm:n Twin-Flow-jauhin - 1 770 rpm, varustettu levyillä, D5B053-moottoripäällä ja D5B054-kontrollipäällä.

3. Sandy Hill Corporationin valmistama (1967) Fourdrinier-tyyppinen paperikone, jonka viiran leveys on 97 cm. Pöydän arkinmuodostuspituus on 44,3 m. Perälaatikon huuliraon leveys on 84 cm ja kone toimii käpristäen reu-

nan. Koneen puristusosasto koostui kahdesta puristimesta, joista ensimmäinen on suora kaksoishuovitettu (through double felted) ja toinen on pohjahuovitettu käänteinen puristin. Kummankin puristimen nippi on rajoitettu 2,06 MPa:iin. Pohjapuristimen teloilla on kumiset uritetut pintapäällysteet. Toisessa puristimessa puristusrullilla on stonite-päällyste. Koneen kuivainosasto koostuu kahdesta penkistä, joissa on halkaisijaltaan 91 cm:n kuivainrumpujaa, ensimmäisessä osastossa on seitsemän rumpua ja toisessa osastossa on viisi rumpua. Kuivainosastojen välillä on liimapuristinkokoonpano, joka voi toimia horisontaalisena tai vertikaalisena osastona. Kun telat on asennettu sopivasti, yksikköä voidaan käyttää myös välikalanterina. Toisen kuivainosaston jälkeen on kahdeksan telan, seitsemän nipin konekalanteri. Halkaisijaltaan enintään 102 cm:n rullat voidaan kelata puolalle.

C. Paperisulppu

100 % vanhaa laatikkoaaltopahvia (OCC)/530 kg (uunikuivattu)

Vanha laatikkoaaltopahvi dispergoitiin ympäröivässä lämpötilassa olevaan veteen käyttäen sulputinta nro 1. Dispergoitu vanha laatikkoaaltopahvisulppu pumpattiin 26 500 l:n jauhinkyyppiin ja jauhettiin 644 Canadian standard freeness (CSF) -jauhautuneisuustilasta 325 CSF -jauhautuneisuustilaan 145 minuutissa.

100 % vanhaa sanomalehtipaperia (ONP)/552 kg (uunikuivattu)

Vanha sanomalehtipaperi dispergoitiin 66-°C:iseen veteen käyttäen sulputinta nro 1. Dispergoitu vanha sanomalehtipaperisulppu pumpattiin 26 500 l:n jauhinkyyppiin ja jauhettiin 135 CSF -jauhautuneisuustilasta 107 CSF -jauhautuneisuustilaan 30 minuutissa.

100 % vanhaa laatikkoaaltopahvia (OCC)/854 kg (uunikuivattu)

1. Dispergoidaan vanha laatikkoaaltopahvi ympäröivässä lämpötilassa olevaan veteen käyttäen sulputinta nro 1.

2. Pumpataan dispergoitu sulppu 26 500 l:n jauhinkyyppiin.

3. Jauhetaan sulppu 638 CSF -jauhautuneisuustilasta 353 CSF -jauhautuneisuustilaan 200 minuutissa.

100 % vanhaa sanomalehtipaperia (ONP)/871 kg (uunikuivattu)

1. Dispergoidaan vanha sanomalehtipaperi 66 °C:n lämpötilassa olevaan veteen käyttäen sulputinta nro 1.

2. Pumpataan dispergoitu sulppu 26 495 l:n (7 000 gallonan) jauhinkyyppiin.

3. Jauhetaan sulppu 119 CSF-jauhautuneisuustilasta 99 CSF -jauhautuneisuustilaan 42 minuutissa.

D. Paperikoneen toiminnat

Sulppu paperikoneen konekyypistä pumpattiin Fischer-Porter-virtauksen säätimen kautta puhallinpumpun imupuolelle. Sitten paksu sulppu laimennettiin nollavedellä sulpun virtausjärjestelmän toimiseksi. Tuotantonopeutta koneessa kontrolloiin puhallinpumppuun virtaavan paksun sulpun määrän avulla. Sulppu pumpattiin sitten räjähdyskammion jakoputkiston kautta primaariseen perälaatikkoon. Perälaatikkoa käytettiin tyhjössä yläpuolisen reikätelan avulla. Koneen nopeus oli suunnilleen 53,3 m (175 jalkaa)/minuutti tuottaen tulokseksi paperin määrän, joka oli 136 kg (300 naulaa)/tunti.

Viiran asetus

Arkinmuodostava viira 91 cm:n Fourdrinier-paperikoneessa oli mallin 463 Monoflex JDL 145 x 120 mesh-yksikön kaksoiskerros; arkinmuodostava Board, kolme halkaisijaltaan 7,6 cm:n suuruista rekisteritelaa, viisi foililaatikkoa, joissa kussakin neljä foilia, neljä laakalaatikkoa, joissa säädettävä tyhjö.

Paperin ominaisuuksien (esim. vetolujuuden, repäisylujuuden, puhkaisulujuuden) parannukset saatiin lisäämällä 1 % solubilisoitua kollageenia (taulukko 4B). Kuitumassalietteiden seosten tapauksessa koneen suunnan vetolujuuden parannukset olivat 25 - 30 %, kun taas 100-%:isesti vanhasta laatikkoaaltopahvista muodostetussa sulpussa ja vanhasta sanomalehtipaperista muodostetussa sulpussa parannukset olivat 15 - 20 %.

Biologisen hapentarpeen (BOD) vaikutukset, jotka aiheutuivat solubilisoidun kollageenin lisäämisestä sekoitettuun kuituun, paranivat oleellisesti verrattuna yhdestä massasta valmistettuihin kuitupapereihin sinänsä osoittaen paperin kiinteiden aineiden lisääntynyttä retentiota, kun paperiin oli lisätty solubilisoitua kollageenia.

Kaikkien kokeiden aikana tuotettujen paperien pinnan pH-arvot olivat happamia, vaikka paperinvalmistuksessa käytetyn veden pH-arvo oli keskimäärin 7 tammikuussa, mikä on tyypillistä vesilähteelle. Solubilisoitua kollageenia sisältävät paperit osoittivat jonkin verran pienempiä pH-arvoja (happamampia) kuin muut paperit. Joitakin mahdollisia lopullisia käyttösovellutuksia varten voi olla mahdollisesti toivottavaa, että solubilisoitua kollageenia sisältävien papereiden pH-arvot saatetaan neutraalimmalle tasolle papereiden muodostamisen jälkeen.

Taulukko 3B

Esimerkin 3B[1] kontrollipapareiden ominaisuudet

Näyte nro	Paperin identifiointi	pH	BW	Vetolujuus		MD TS/BW	Repäisy		Paksuus	Mullen-puhkaisu	BOD
				MD	CD		MD	CD			
Kontrollipaperit											
16A	100 % OCC	--	14,2	--	--	1,68	71,3	76,1	0,10	0,189	380
19A	75/25 OCC/ONP	--	--	--	--	1,49*	--	--	--	0,151	--
17CA	50/50 OCC/ONP	--	14,1	--	--	1,23	53,7	58,8	0,12	0,113	170
18A	25/75 OCC/ONP	--	--	--	--	1,08*	--	--	--	0,105*	--
15A	100 % ONP	--	14,3	--	--	0,93	37,1	41,1	0,14	0,096	190

(1) Lyhenteet ja yksiköt ovat seuraavat: BW = neliömetripaino, kg/279 m^2 paperia (naulaa/3 000 neliöjalkaa); TS = vetolujuus, MPa; MD = koneen suunta; CD = poikkisuunta; Repäisy = repäisyvoima, g; Paksuus, mm; Mullen-puhkaisu, MPa; BOD = biologinen hapentarve, mg/l.

*Arviot, joita on käytetty lisäaineiden vertailemiseksi taulukossa 4B.

Taulukko 4B

Esimerkin 3B[1] kokeellisten papereiden ominaisuudet

Näyte nro	Paperin identifiointi	pH	BW	Veto		MD		Repäisy[2]		Paksuus	Mullen-puhtaus[2]	BOD[2]
				MD	CD	TS/BW	ΔTS/BW	MD	CD			
Kokeelliset paperit, joissa 1 % solubilisoitua kollageenia												
16	100 % OCC	(3,9)	13,3	25,79	11,9	1,94	15 %	54,0 (24 %)	71,4 (6 %)	0,10	0,170 (10 %)	260 (32 %)
19	75/25 OCC/ONP	(3,9)	13,3	25,87	10,73	1,91	29 %	58,8	68,6	0,11	0,145 (4 %)	--
17C	50/50 OCC/ONP	(3,9)	13,9	22,52	11,02	1,62	32 %	56,4 5 %	60,0 2 %	0,12	0,133 18 %	160 6 %
18	25/75 OCC/ONP	(3,9)	14,1	19,01	9,14	1,35	25 %	47,6	51,2	0,13	0,22 17 %	--
15	100 % ONP	(3,9)	14,2	15,49	8,08	1,09	18 %	37,6 1 %	40,8 (1 %)	0,13	0,111 16 %	150 21 %

(1) Lyhenteet ja yksiköt ovat seuraavat: BW = neliömetripaino, kg/279 m^2 paperia (naulaa/3 000 neliöjalkaa); TS = vetolujuus, MPa; MD = koneen suunta; CD = poikkisuunta; Repäisy = repäisyvoima, g; Paksuus, mm; Mullen-puhkaisu, MPa; BOD = biologinen hapentarve, mg/l. Neliömetripaino on paperin paino kg/279 m^2 paperia (naulaa/3 000 neliöjalkaa).

(2) Näissä sarakkeissa esitetyt prosenttiluvut osoittavat, että kokeellisista papereista saadut tiedot lisääntyivät/vähenivät vastaavien päivittäisten kontrollipapereiden tiedoista.

Esimerkki 4B

Liukoisen kollageenin ja massakuidun sekoittaminen ennen perälaatikkoa

Seitsemän näytettä solubilisoidun kollageenin näytteistä, jotka oli valmistettu kuten esimerkissä 8A on kuvattu ja kerätty talteen 16 tai 20 tunnin kuluttua, yhdistettiin, jolloin saatiin kollageeniliuos, jossa oli suunnilleen 3,5 mg kollageenin kiinteitä aineita/ml ja jonka viskositeetti oli 1 150 cps kierrosnopeudella 20 rpm. Tämän liuoksen näytteet laimennettiin joko 8-, 4- tai 2-kertaisesti tislatulla vedellä tai niitä käytettiin laimentamattomina, jolloin saatiin seuraava konsentraatioiden sarja: noin 0,44, 1,75 ja 3,5 mg kollageenin kiinteitä aineita/ml.

Massalietteet valmistettiin vanhasta sanomalehtipaperista muodostetusta sulpusta ja vanhasta laatikkoaaltopahvista muodostetusta sulpusta konsistenssin ollessa 3 % repimällä materiaalit, liottamalla niitä 1-%:isessa NaOH:ssa yön yli, huuhtelemalla liotetut kiinteät aineet vesijohtovedellä ja kuiduttamalla huuhdottuja kiinteitä aineita Tappi-hajottimessa 15 minuutin ajan.

Massaliete kuumennettiin kuumalla levyllä sekoittaen käsivoimin noin 49 - 52 °C:n (120 - 125 °F) lämpötilaan. Kuumennetun massalietteen näyte (183 g) yhdistettiin yhden laimennetun kollageeniliuoksen (63 g) kanssa ja yhdistettyä kollageeni-massalietettä sekoitettiin siipityyppisellä sekoittimella noin 15 minuutin ajan. Tulokseksi saatu massan konsistenssi lietteessä oli noin 2,2 %. Kollageenin kiinteiden aineiden ja massan kiinteiden aineiden suhde näissä kokeissa oli siten noin 0,5 %, 1 %, 2 % ja 4 %. Massa-kollageenilietteen alkulämpötila oli noin 41 °C ± 2 °C (106 °F ± 3 °F) ja tämä lämpötila laski noin 35 °C:seen (95 °F) sekoittamisjakson loppuun mennessä.

Sekoittamisjakson lopussa kollageeni-massaliete pantiin Nobel and Wood -koearkkijärjestelmän (arkin val-

mistus käsin) perälaatikkoon ja kerättiin poistamalla vettä Duotex 162-DD-226 -arkinmuodostusviiralle. Muodostettu arkki märkäpuristettiin, sitten se kalanteroitiin imupaperien välissä, jolloin kalanterin telojen väli oli asetettu 0,76 mm:iin (30 mil). Sitten arkkia kuivattiin kuumalla levyllä jännitettynä 1 minuutin ajan. Käsin tehtyjen arkkien annettiin tasapainottua yön yli kontrolloidun ympäristön omaavassa huoneessa (22 °C eli 72 °F/suhteellinen kosteus 50 %), sitten niistä arvioitiin neliömetripaino (BW) ja vetolujuus (TS). Valmistettiin kolme arkkia ja tutkittiin kunkin näyteolosuhteen osalta. Tuloksista esitetään yhteenveto taulukossa 5B.

Tämä esimerkki kuvaa sitä, että liuenneen kollageenin lisääntyvät konsentraatiot, kun ne on lisätty toisiomassakuidun vakiomääriin, tuottaa yleensä tulokseksi yhdistelmästä muodostettujen arkkien vetolujuuden lisääntymisen. Ainoa poikkeus taulukon 4B tiedoissa on OCC-arkit, joihin oli lisätty 0,5 % kollageenia, mikä tuotti korjatun keskimääräisen vetolujuuden (TS/BW), joka oli hiukan matalampi kuin OCC-kontrollin vetolujuus (-8,1 %). Tämän ilmeisen yhteensopimattoman arvon uskotaan johtuneen kollageenia sisältäneiden papereiden yhdenmukaisesti suuremmista neliömetripainoista (suunnilleen 15 % suuremmat kuin OCC-arkkien kontrollin arvot), minkä uskotaan olevan seurausta massan hienojakoisen aineen (pienten massakuitujen) lisääntyneestä retentiosta näissä näytteissä. Suurempi määrä hienojakoista ainetta, joka tuottaisi yleensä heikompaa paperia, pyrkisi vähentämään tulokseksi saadun paperin lujuutta, kuten mainitussa tiedossa koskien 0,5 %:a/OCC. Tämä tieto kuvaa selvästi kollageenilisäaineen yleistä ominaisuutta retentioapuaineena paperin muodostuksessa.

Taulukko 5B

Yhteenveto esimerkin 4B kokeiden käsin tehtyjen arkkien ominaisuuksista

Massa	Lisätty kollageeni, %	Neliömetripaino keskimäärin (kg/279 m^2)*	Keskimääräinen vetolujuus*	Keskimääräinen vetolujuus/-neliömetripaino*	ΔTS (%)
OCC	0**	31,0	1 330	42,9	--
OCC	0,5	36,3	1 430	39,4	-8,1
OCC	1	35,2	1 790	50,9	+19
OCC	2	34,9	1 840	52,7	+23
OCC	4	35,7	1 930	54,1	+26
ONP	0**	28,0	1 370	48,9	--
ONP	0,5	32,7	1 740	53,2	+8,8
ONP	1	33,2	1 930	58,1	+19
ONP	2	31,8	2 020	63,5	+30
ONP	4	34,1	2 400	70,4	+44

*Keskiarvo kolmesta käsin tehdystä arkista.

**Käsin tehdyt kontrolliarkit.

BW = neliömetripaino, kg/279 m^2 (naulaa/3 000 neliöjalkaa) paperia.

TS = vetolujuus.

Kun jompaan kumpaan massalietteeseen lisättiin enemmän kollageenia, tulokseksi saatu paperin lujuus lisääntyi, mutta lujuuden lisäys ei ollut lineaarisesti suhteessa lisätyn kollageenin määrään; lujuuden lisääntyminen

pyrki vähenemään, kun kollageeni/massa-suhde lisääntyi. Tämä havainto on yhdenmukainen liukoisten kollageenimolekyylien ja massakuitujen välisen vuorovaikutusprosessin kanssa, joka tuottaa kuidun pintojen kyllästämisen adsorboituneilla kollageenimolekyyleillä. Tässä sitoutumisprosessissa havaitun lujuuden lisääntymisen uskotaan olevan tulosta kuitujen välisistä silloista, jotka liukoiset kollageenimolekyylit muodostavat; kuitupintojen kyllästäminen sitoutuneella kollageenilla pyrkisi rajoittamaan tällaisten kuitujen välisten siltojen määrää ja siten rajoittamaan maksimaalista lujuuden lisääntymistä, jonka tämä prosessi tuottaa.

Mainitussa esimerkissä ilmeinen havaittu kyllästysprosessi tulkitaan vahvistukseksi sille, että vuorovaikutukset liukoisten kollageenimolekyylien ja massakuidun pintojen välillä ovat lujuuden lisääntymisen vallitseva mekanismi, vastakohtana suoralle lisäaineen lujuuden lisäämiskäyttäytymiselle, jota voisi ennakoida, ellei samassa suhteessa sekoitettujen liukenemattomien kuitujen kahden populaation välillä olisi vuorovaikutuksia. Näissä esimerkeissä, joista esitetään yhteenveto taulukossa 5B, OCC-kuidut näyttivät kyllästyvän kollageenin ja massan kiinteiden aineiden suhteen ollessa pienempi kuin ONP-kuidut.

Tämä esimerkki kuvaa myös sitä, että lujuuden lisääntymistä johtuen liukoisen kollageenin ja massakuitujen välisistä vuorovaikutuksista voi ilmetä yli 40 °C:n lämpötiloissa, joissa kollageenimolekyylien odottaisi yleensä denaturoituvan lämmön vaikutuksesta. Aikaisemmissa lainauksissa on mainittu, että kollageeni täytyy lisätä paperiin tätä denaturoitumislämpötilaa matalammassa lämpötilassa (G. Sauret et al., Le collagne ans la fabrication du papier, Revue A.T.P.I., Vol. 33, No. 8, Octobre 1979, sivut 374 - 365). Alustavassa koesarjassa (tiedot eivät sisälly tähän) havaittiin, että jos massaliete ja kolla-

geeniliuos sekoitettiin noin 40 °C:n lämpötilassa tai sitä korkeammassa lämpötilasa massalietteen konsistenssin ollessa pieni (esim. 0,5 % massan kiinteitä aineita), niin kollageeni pyrki saostumaan liuoksesta ennen sitoutumista massakuituihin johtaen epätyydyttäviin (kirjaviin) paperipintoihin, mutta ei vetolujuuden merkittävään lisääntymiseen. Toisaalta jos massaliete ja kollageeniliuokset sekoitettaisiin siten, että massan konsistenssi olisi suurempi (esim. 2,2 % massan kiinteitä aineita, kuten taulukossa 5B), kollageeni ei saostu ja sitoutuu menestyksellisesti massakuituihin.

Seuraava esimerkki tuottaa lisäesimerkin yli 30°:n lämpötilojen vaikutuksesta kollageenivalmisteeseen. Jauhettuja kalkittuja USDA-haljaksia (0,15 cm:n eli 0,06 tuuman leikkausterä) lingottiin 4 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan kierrosnopeudella 10 000 x g ja päällysneste poistettiin. Lingotut kalkitut haljakset lisättiin 7,5 g:n annoksina kahteen 1 l:n Erlenmeyer-pulloon, jotka kumpikin sisälsivät 750 ml deionisoitua vettä. Suspensioita sekoitettiin magneettisekoittimella (5,08 cm:n eli 2 tuuman sekoitusharkko), pH säädettiin arvoon 2,1 käyttäen väkevää suolahappoa ja kumpaankin pulloon lisättiin 0,19 g pepsiiniä. Toista pulloa sekoitettiin 19 °C:n lämpötilassa ja toista 32 °C:n lämpötilassa. Sitten 60 tunnin kuluttua pullojen sisältöjen pH:t säädettiin suunnilleen arvoon 3,5 ja viskositeetit mitattiin kierrosnopeudella 20 rpm. 19 °C:n lämpötilassa olleen reaktioseoksen viskositeetti oli 620 cps ja 32 °C:n lämpötilassa olleen 10 cps.

Molemmat kollageenivalmisteet lisättiin massaan (kollageenia noin 1 % massasta) ja näiden valmisteiden kyky parantaa paperin ominaisuuksia mitattiin. Valmiste, joka oli valmistettu 19 °C:n lämpötilassa, ei tuottanut vetolujuuden/neliömetripainon lisäystä.

Tämä osoittaa, että täysin hydrolysoitu liukoinen kollageeni ei näytä edistävän osaltaan vetolujuuden li-

sääntymistä. Viskositeetti, joka on alle 20 cps, ei näytä olevan riittävä näitä liuoksia käyttäen valmistetun paperin lujuuden lisääntymisasteen ennustamiseksi.

Vaikka erilaiset edellä esitetyt esimerkit on keskitetty paperinvalmistukseen, keksintöä voitaisiin käyttää myös erilaisten tuotteiden, kuten muottiin valettujen tuotteiden tai pahvin, valmistamiseksi, joissa solubilisoitu kollageeni voi sitoa selluloosamassan.

Käytettiin erilaisia vesityyppejä, kuten Columbus, OH, vesijohtovettä; Savannah, GA, vesijohtovettä, nollavettä paperinvalmistusprosessista ja nollavettä, josta kiinteiden aineiden pitoisuutta oli vähennetty; siten näyttää siltä, että keksinnössä vesityyppi ei ole ratkaiseva kollageenin valmistusprosessin kannalta eikä paperinvalmistusprosessin kannalta ja on mahdollista käyttää laajaa valikoimaa vesilähteitä.

Vaikka tässä julkaistut keksinnön muodot muodostavat tällä hetkellä edulliset suoritusmuodot, monet muut muodot ovat mahdollisia. Tässä ei ole aikomus mainita keksinnön kaikkia mahdollisia ekvivalenttimuotoja eikä haarautumia. On ymmärrettävä, että tässä käytetyt termit ovat pelkästään kuvaavia, pikemmin kuin rajoittavia, ja että erilaisia muutoksia voidaan tehdä poikkeamatta keksinnön hengestä ja piiristä.

49

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan selluloosamassaliete;

b. lisätään solubilisoitua kollageenia mainittuun massalietteeseen ja sekoitetaan aika, joka on tehokas mainitun selluloosamassalietteen ja solubilisoidun kollageenin vuorovaikutukselle;

c. muodostetaan mainituista keskenään vuorovaikutuksessa olleista selluloosamassalietteestä ja solubilisoidusta kollageenista arkki; ja

d. kuivataan mainittu arkki.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu arkki on paperiarkki.

3. Menetelmä solubilisoidun kollageenin käyttämiseksi paperin vahvistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan mainittu solubilisoitu kollageeni selluloosamassalietteeseen, valetaan mainittu seos muottiin ja kuivataan.

4. Vahvistettu selluloosamassakoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää solubilisoidun kollageenin ja selluloosamassan seoksen kuivatun reaktiotuotteen.

5. Vahvistettu paperituote, t u n n e t t u siitä, että se käsittää paperin, joka on valmistettu solubilisoidun kollageenin ja selluloosamassan seoksesta.

6. Menetelmä kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja emästä, ja kuidutetaan

mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

b. laimennetaan mainittu massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

c. lisätään noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) mainittuun laimennettuun massalietteeseen ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita mainitun laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa mainitusta liukoisesta kollageenista sitoutuu mainittuun paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

d. laimennetaan mainittu kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%;

e. muodostetaan mainitusta kollageeni-massalietteestä arkki; ja

f. kuivataan mainittu arkki.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu sekoittaminen vaiheessa c kestää vähintään 15 minuuttia.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu pH-arvo säädetään hapon avulla, joka on valittu ryhmästä, joka käsittää suolahapon, HCl:n HNO_3:n, H_2SO_4:n ja etikkahapon.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ylimääräisen vaiheen mainitun vaiheen e arkin päällystämiseksi liimalla ennen kuivaamista.

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu liima käsittää lisäksi kollageenihydrolysaatin, jonka lukukeskimääräinen moolimassa on 100 000 daltonia tai vähemmän.

11. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mainitun kuivan arkin kalanteroinnin.

12. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun NaOH-liuoksen konsentraatio vaiheessa a on noin 0,25 - 1,00 paino-% laskettuna kiinteiden aineiden kuivapainosta ja pH-vaihtelualue on 10 - 14.

13. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun solubilisoidun kollageenin lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia.

14. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun solubilisoidun kollageenin lukukeskimääräinen moolimassa on yli 1 000 000 daltonia.

15. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu sekoittaminen tapahtuu leikkausnopeudella, joka on sopeutettu kollageeni-massa-vuorovaikutusten edistämiseksi denaturoimatta kollageenin kolmoiskierrerakennetta.

16. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun kollageeni-paperilietteen konsistenssi on noin 0,5 kuivapaino-%.

17. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aluna/hartsilisäaine lisätään vaiheessa a tapahtuvan kuiduttamisen jälkeen tai vaiheessa b tapahtuvan laimentamisen jälkeen.

18. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa e tapahtuvan arkin muodostamisen jälkeen mainittu arkki märkäpuristetaan ennalta valittuun paksuuteen ennen kuivaamista.

19. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kun vaiheessa a on valittu

pelkästään vesi, menetelmä käsittää ylimääräisen vaiheen, jossa

a1. vaiheesta a saatu mainittu massa/vesiliete jauhetaan mainitussa lietteessä olevien selluloosakuitujen fibrilloimiseksi jauhautuneisuusasteen saamiseksi, jolla saadaan valittu veden poistuminen muodostettaessa arkkia vaiheessa e.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kun on valittu oleellisesti keräyssanomalehtipaperi, jauhautuneisuusaste on noin 100 - 150 CSF, kun on valittu oleellisesti keräyslaatikkokartonki, jauhautuneisuusaste on noin 300 - 400 CSF.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aluna/hartsilisäaine lisätään vaiheessa a1 tapahtuvan jauhamisen jälkeen.

22. Menetelmä kollageenilla vahvistetun selluloosaarkin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

b. laimennetaan mainittu massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

c. lisätään aluna/hartsilisäaine mainittuun massalietteeseen vaiheen a jälkeen tai mainittuun laimennettuun massalietteeseen vaiheen b jälkeen;

d. muodostetaan arkki mainitusta laimennetusta massalietteestä, joka sisältää alunahartsia;

e. päällystetään mainitun arkin toinen puoli tai molemmat puolet kollageenihydrolysaatilla, jonka lukukes-

kimääräinen moolimassa on 100 000 daltonia tai vähemmän; ja

f. kuivataan mainittu arkki.

23. Menetelmä kollageenilla vahvistetun selluloosaarkin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksista, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

b. laimennetaan mainittu massaliete noin 1 - 3 paino-%:n konsistenssiin laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

c. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

d. säädetään mainitun märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteän aineen pitoisuus, jolloin mainitulla liukenemattomalla kollageenilla on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa lopputuotteessa;

e. säädetään mainitun vaiheesta d saadun lietteen pH-arvo vaiheessa f lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

f. lisätään mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty, ja annetaan sen reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, jolloin mainittu lämpötila ja reaktioaika ovat tehokkaita suuren moolimassan omaavan solubilisoidun kollageenin liuoksen muodostamiseksi mainituista liukenemattomista kollageenihiukkasista;

g. kontrolloidaan mainittua reaktiota suuren kollageenin solubilisaatioasteen ja mainitun solubilisoidun

kollageenin moolimassan saavuttamiseksi, jolloin kollageeni kykenee sitoutumaan selluloosamassan kanssa, mittaamalla samanaikaisesti solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja mainitun solubilisoidun kollageenin moolimassaa, jolloin mainittu reaktio on tapahtunut täydellisesti, kun mainittu moolimassa ja mainittu konsentraatio on oleellisesti maksimoitu;

h. lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä mainittuun liuokseen, joka sisältää vaiheen f suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia ja sekoitetaan;

i. erotetaan ainakin jonkin verran liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan liukenematon kollageeni vaiheeseen d, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään, ja erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa liukoista kollageenia, poistetaan;

j. lisätään mainittu vaiheen i erotettu liuos, joka sisältää noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) mainittuun laimennettuun massalietteeseen, ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita mainitun laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa mainitusta liukoisesta kollageenista sitoutuu mainittuun paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

k. laimennetaan mainittu kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%;

l. muodostetaan mainitusta kollageeni-massalietteestä arkki; ja

m. kuivataan mainittu arkki

24. Menetelmä kollageenilla vahvistetun arkin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete ja säädetään mainitun lietteen pH-arvo vaiheessa b lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

b. lisätään mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

c. annetaan vaiheen b tai vaiheen e lietteen ja entsyymin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, jossa on lisääntynyt määrä suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia;

d. lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä mainittuun vaiheen c liuokseen ja sekoitetaan;

e. erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen d liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään vaiheeseen c, ja erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena;

f. sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksesta, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja emästä, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

g. laimennetaan mainittu massaliete konsistenssiin, joka on noin 1 - 3 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

h. lisätään vaiheesta e saatua liukoista kollageenia mainittuun laimennettuun massalietteeseen määrä, joka on noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (las-

kettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita mainitun laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa mainitusta liukoisesta kollageenista sitoutuu mainittuun paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

i. laimennetaan mainittu kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%; ja

j. muodostetaan mainitusta kollageeni-massalietteestä arkki ja kuivataan arkki.

25. Menetelmä kollageenillä vahvistetun selluloosaarkin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

b. säädetään mainitun märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus, jolloin mainittua liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa lopputuotteessa;

c. säädetään mainitun vaiheesta b saadun lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

d. lisätään ja sekoitetaan mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

e. annetaan vaiheen d lietteen reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, jolloin lämpötila ja reaktioaika ovat tehokkaita suuren moolimassan omaavaa, mainituista liukenemattomista kollageenihiukkasista peräisin olevaa solubilisoitua kollageenia sisältävän liuoksen muodostamiseksi;

f. lisätään uutta vettä ja liukenematonta kollageenia mainittuun liuokseen, joka sisältää vaiheen e suuren

moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, ja sekoitetaan;

g. erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen f liuoksesta, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan liukenematon kollageeni vaiheeseen e, jolloin ainakin osa proteolyyttisestä entsyymistä kierrätetään, ja erotettu liuos, joka sisältää suuren moolimassan omaavaa solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena;

h. sekoitetaan selluloosamateriaali, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ensiöpaperimassasta, hylkypaperista, keräyssanomalehtipaperista, keräyslaatikkokartongista tai edellä mainittujen seoksesta, liuoksen kanssa, joka sisältää vettä tai vettä ja NaOH:a, ja kuidutetaan mekaanisesti, kunnes on muodostunut massaliete, jonka konsistenssi on noin 3 - 6 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista;

i. laimennetaan mainittu massaliete konsistenssiin, joka on noin 1 - 3 paino-% laskettuna kuivan massan kiinteistä aineista, ja säädetään pH arvoon noin 3,5 - 7,0;

j. lisätään vaiheesta e saatua liukoista kollageenia mainittuun laimennettuun massalietteeseen määrä, joka on noin 0,1 - 2 kuivapaino-% liukoista kollageenia (laskettuna selluloosamateriaalin kuivapainosta) ja sekoitetaan siten, että leikkausnopeus ja sekoitusaika ovat tehokkaita mainitun laimennetun massalietteen kiinteiden aineiden ja liukoisen kollageenin vuorovaikutukselle, jolloin ainakin merkittävä osa mainitusta liukoisesta kollageenista sitoutuu mainittuun paperimassaan, jolloin muodostuu kollageeni-massaliete;

k. laimennetaan kollageeni-massaliete konsistenssiin, joka on noin 0,1 - 1 kuivapaino-%; ja

l. muodostetaan mainitusta kollageeni-massalietteestä arkki ja kuivataan arkki.

26. Menetelmä kollageenilla vahvistetun selluloosa-arkin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan selluloosamassaliete;

b. lisätään solubilisoitua kollageenia mainittuun massalietteeseen, jolloin mainitun selluloosamassan ja mainitun solubilisoidun kollageenin konsistenssi on enemmän kuin noin 2 paino-%, ja seosta sekoitetaan aika, joka on tehokas mainitun selluloosamassalietteen ja solubilisoidun kollageenin vuorovaikutukselle ja jolloin mainittu sekoittaminen tapahtuu lämpötilassa, joka on korkeampi kuin noin 40 °C;

c. muodostetaan mainituista keskenään vuorovaikutuksessa olleista selluloosamassalietteestä ja solubilisoidusta kollageenista arkki; ja

d. kuivataan mainittu arkki.

27. Menetelmä solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete ja säädetään mainitun lietteen pH-arvo vaiheessa b lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

b. lisätään mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

c. annetaan mainitun vaiheen b lietteen ja entsyymin ja/tai vaiheen e kierrätetyn liukenemattoman kollageenin ja entsyymin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, jolloin lämpötila ja reaktioaika ovat tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, jossa on lisääntynyt määrä solubilisoitua kollageenia;

d. lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä mainittuun vaiheen c liuokseen ja sekoitetaan;

e. erotetaan ainakin jonkin verran vaiheen d liuoksesta, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, mainitusta liukenemattomasta kollageenista, jolloin ainakin osa

mainittua liukenematonta kollageenia ja proteolyyttistä entsyymiä kierrätetään vaiheeseen c, ja erotettu liuos, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe c, vaihe d ja vaihe e toistetaan kaksi kertaa tai useamman kerran.

29. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää jatkuvatoimisen prosessin.

30. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheesta e kierrätettyyn liukenemattomaan kollageeniin lisätään ylimääräistä entsyymiä, joka korvaa oleellisesti entsyymin, joka on poistettu tuotteen poistamisen mukana.

31. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisätään vaiheesta e kierrätettyyn liukenemattomaan kollageeniin ylimääräistä entsyymiä, kun reaktionopeus heti kierrätyksen jälkeen hidastuu ennalta määrätyn tason alapuolelle.

32. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu reaktio pysäytetään

(1) säätämällä mainittu pH-arvo arvoon, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen ja/tai

(2) lasketaan lämpötila lämpötilaan, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen.

33. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a mainitun märän jauhetun lietteen nestepitoisuus tai mainittujen kiinteiden aineiden pitoisuus säädetään siten, että kiinteiden aineiden määrä säädetään konsentraatioon, joka on noin 0,1 - 1,0 paino-%.

34. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila, T, on noin 5 - 30 °C.

35. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila, T, on noin 15 - 28 °C.

36. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittujen kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,3 - 0,35 paino-% ja mainittu vaiheen c reaktio tapahtuu lämpötilassa, joka on noin 10 - 30 °C reaktioajan ollessa 10 - 72 tuntia.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila on 15 - 28 °C.

38. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteolyyttinen entsyymi on valittu ryhmästä, joka koostuu sian limakalvon pepsiinistä, bromelaiinista, kymopapaiinista, kymotrypsiinistä, kollagenaasista, fikiinistä, papaiinista, peptidaasista, proteinaasi A:sta, proteinaasi K:sta, trypsiinistä, mikrobiproteaaseista ja tällaisten entsyymien yhdistelmistä.

39. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteolyyttinen entsyymi on mikrobinen happoproteaasi.

40. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että säädetään mainittu pH arvoon noin 1,5 - 3,0 ja mainittu lämpötila noin 18 - 28 °C:seen, kun on valittu sian limakalvon pepsiini.

41. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vähintään 80 paino-% mainitusta liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi ja lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia.

42. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vähintään 90 paino-% mainitusta liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi.

43. Menetelmä solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

b. säädetään mainitun märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus, jolloin mainittua liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja moolimassaa lopputuotteessa;

c. säädetään vaiheen b mainitun lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

d. lisätään ja sekoitetaan mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty;

e. annetaan vaiheen d lietteen ja/tai vaiheen g mainitun kierrätetyn liukenemattoman kollageenin reagoida lämpötilassa, T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita liuoksen muodostamiseksi, joka sisältää mainituista liukenemattomista kollageenihiukkasista peräisin olevaa solubilisoitua kollageenia;

f. lisätään liukenematonta kollageenia ylimääräisen veden kanssa tai ilman sitä mainittuun liuokseen, joka sisältää vaiheessa e solubilisoitua kollageenia ja sekoitetaan;

g. erotetaan ainakin jonkin verran mainitusta vaiheen f liuoksesta, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, mainitusta liukenemattomasta kollageenista ja palautetaan mainittu liukenematon kollageeni vaiheeseen e, jolloin ainakin osa mainitusta proteolyyttisestä entsyy-

mistä kierrätetään, ja erotettu liuos, joka sisältää solubilisoitua kollageenia, poistetaan tuotteena.

44. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe e - vaihe g toistetaan kaksi kertaa tai usemman kerran.

45. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu reaktio pysäytetään

(1) säätämällä mainittu pH-arvo arvoon, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen ja/tai

(2) lasketaan lämpötila lämpötilaan, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen.

46. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheesta e saatuun mainittuun liukenemattomaan kollageeniin lisätään ylimääräistä entsyymiä, joka korvaa oleellisesti entsyymin, joka on poistettu tuotteen poistamisen mukana.

47. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisätään vaiheesta e saatuun mianittuun liukenemattomaan kollageeniin ylimääräistä entsyymiä, kun reaktionopeus heti kierrätyksen jälkeen hidastuu ennalta määrätyn tason alapuolelle.

48. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b mainitun märän jauhetun lietteen mainittu nestepitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus säädetään siten, että mainittujen kiinteiden aineiden määrä säädetään konsentraatioon, joka on noin 0,1 - 1,0 paino-%.

49. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa e mainittu lämpötila, T, on noin 5 - 30 °C.

50. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa e mainittu lämpötila, T, on noin 15 - 28 °C.

51. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b mainittujen kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,3 - 0,35 paino-% ja vaiheessa e mainittu reaktio tapahtuu lämpötilassa, joka on noin 10 - 30 °C reaktioajan ollessa 10 - 72 tuntia.

52. Patenttivaatimuksen 51 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila on 15 - 28 °C.

53. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteolyyttinen entsyymi on valittu ryhmästä, joka koostuu sian limakalvon pepsiinistä, bromelaiinista, kymopapaiinista, kymotrypsiinistä, kollagenaasista, fikiinistä, papaiinista, peptidaasista, proteinaasi A:sta, proteinaasi K:sta, trypsiinistä, mikrobiproteaaseista ja tällaisten entsyymien yhdistelmistä.

54. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteolyyttinen entsyymi on mikrobinen happoproteaasi.

55. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa c säädetään mainittu pH arvoon noin 1,5 - 3,0 ja vaiheessa e mainittu lämpötila noin 18 - 28 °C:seen, kun on valittu sian limakalvon pepsiini.

56. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vähintään 80 paino-% mainitusta liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi ja lukukeskimääräinen moolimassa on yli 300 000 daltonia.

57. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vähintään 90 paino-% mainitusta liukenemattomasta kollageenista muutetaan liukoiseksi kollageeniksi.

58. Menetelmä solubilisoidun kollageenin vesiliuoksen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a. tuotetaan liukenemattoman kollageenin vesipitoinen jauhettu liete;

b. säädetään mainitun märän jauhetun lietteen vesipitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus, jolloin mainittua liukenematonta kollageenia on konsentraatio, joka edistää oleellisesti maksimaalista solubilisoidun kollageenin konsentraatiota, joka sopii paperin vahvistamiseksi lopputuotteessa;

c. säädetään vaiheen b mainitun lietteen pH-arvo vaiheessa d lisättävän proteolyyttisen entsyymin aktiivisuuden saavuttamiseksi;

d. lisätään mainittu proteolyyttinen entsyymi mainittuun lietteeseen, jonka pH-arvo on säädetty, ja annetaan sen reagoida lämpötilassa T, reaktioajan, t, lämpötilan ja reaktioajan ollessa tehokkaita solubilisoidun kollageenin muodostamiseksi mainituista liukenemattomista kollageenihiukkasista;

e. kontrolloidaan mainittuja reaktio-olosuhteita liukoisen kollageenin suuren konsentraation saamiseksi mittaamalla solubilisoidun kollageenin konsentraatiota ja mainitun solubilisoidun kollageenin moolimassaa, jolloin mainittu reaktio on saatu täydellisesti päätökseen, kun mainittu lukukeskimääräinen moolimassafraktio on yli 300 000 daltonia ja mainittu konsentraatio on oleellisesti maksimoitu; ja

f. poistetaan mainittu solubilisoidun kollageenin vesiliuos tuotteena.

59. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu reaktio pysäytetään

(1) säätämällä mainittu pH-arvo arvoon, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiivinen ja/tai

(2) laskemalla lämpötila lämpötilaan, jossa mainittu proteolyyttinen entsyymi on oleellisesti inaktiviinen.

60. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu viskositeetti on vähintään 75 % maksimista.

61. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b mainitun märän jauhetun lietteen mainittu nestepitoisuus tai kiinteiden aineiden pitoisuus säädetään siten, että mainittujen kiinteiden aineiden määrä säädetään konsentraatioon, joka on noin 0,1 - 1,0 paino-%.

62. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila, T, on noin 5 - 30 °C.

63. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpötila, T, on noin 15 - 30 °C.

64. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b mainittujen kiinteiden aineiden konsentraatio on noin 0,3 - 0,35 paino-% ja vaiheessa e mainittua reaktiota kontrolloidaan siten, että lämpötila on noin 15 - 30 °C ja reaktioaika 10 - 48 tuntia.

65. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteolyyttinen entsyymi on valittu ryhmästä, joka koostuu sian limakalvon pepsiinistä, bromelaiinista, kymopapaiinista, kymotrypsiinistä, kollagenaasista, fikiinistä, papaiinista, peptidaasista, proteinaasi A:sta, proteinaasi K:sta, trypsiinistä, mikrobiproteaaseista ja tällaisten entsyymien yhdistelmistä.

66. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH-arvo säädetään arvoon noin 1,5 - 3,0 ja lämpötila noin 15 - 28 °C:seen, kun on valittu sian limakalvon pepsiini.

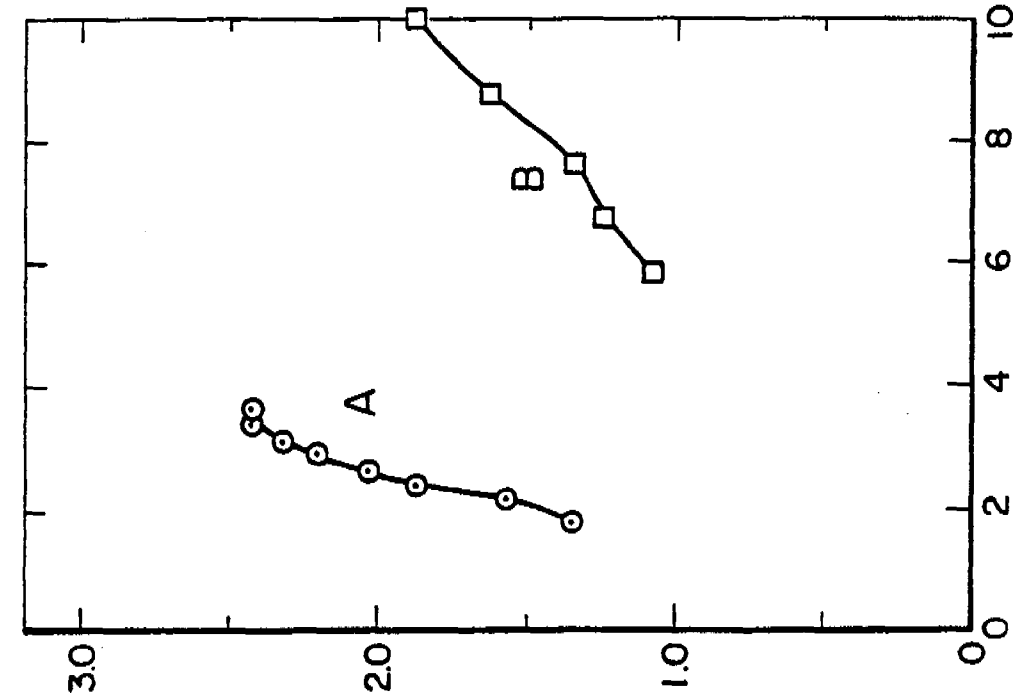
A
B
0
2
4
6
8
10
3.0
2.0
1.0
0

FIG. 1B

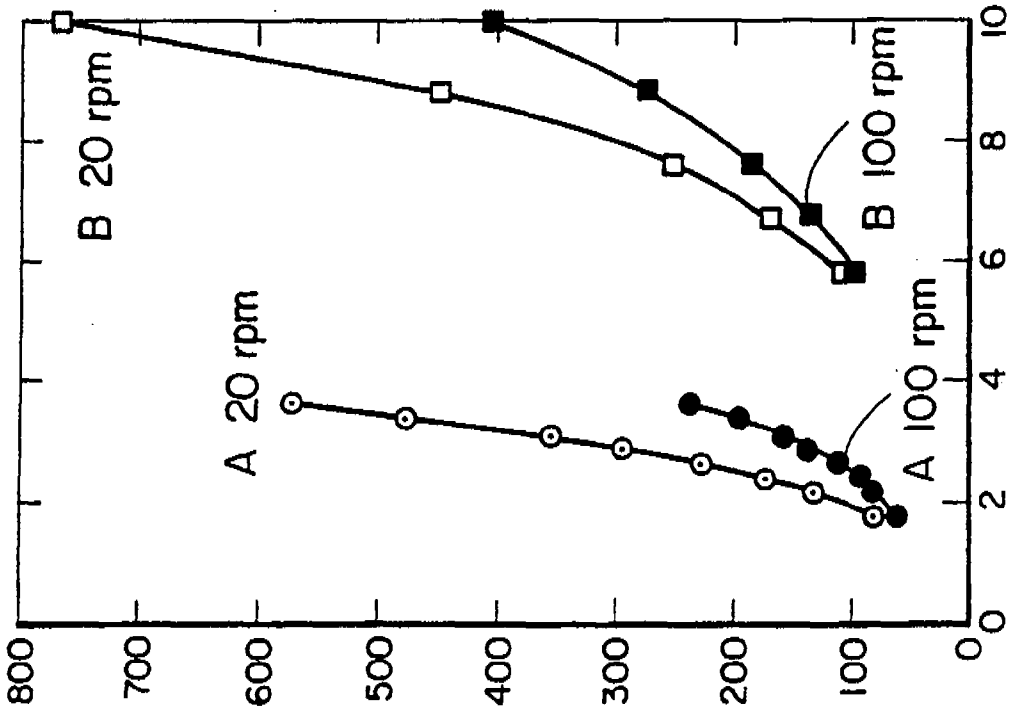
B 20 rpm
A 20 rpm
B 100 rpm
A 100 rpm
0
2
4
6
8
10
800
700
600
500
400
300
200
100
0

FIG. 1A

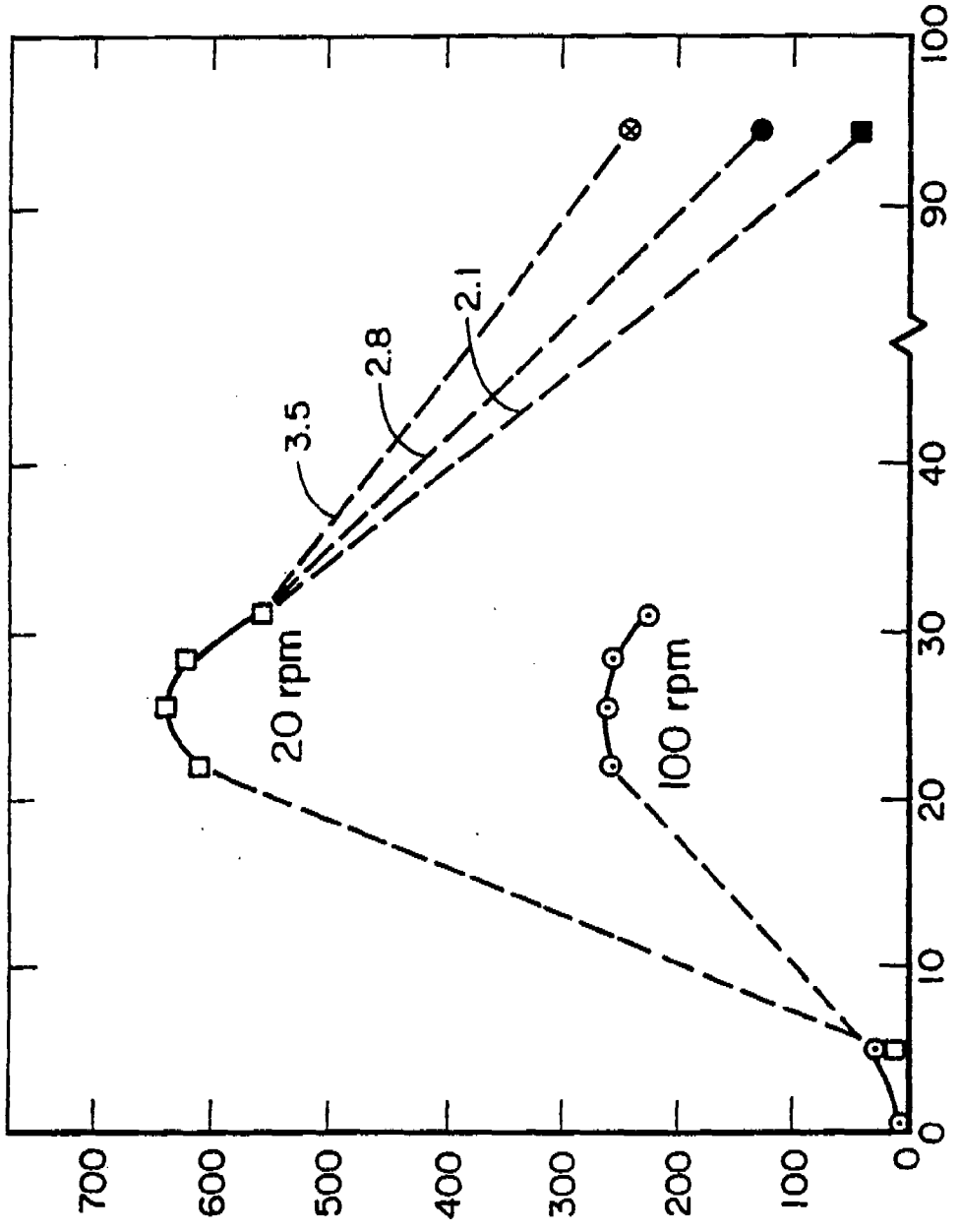
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
90
100
20 rpm
100 rpm
3.5
2.8
2.1

FIG. 2

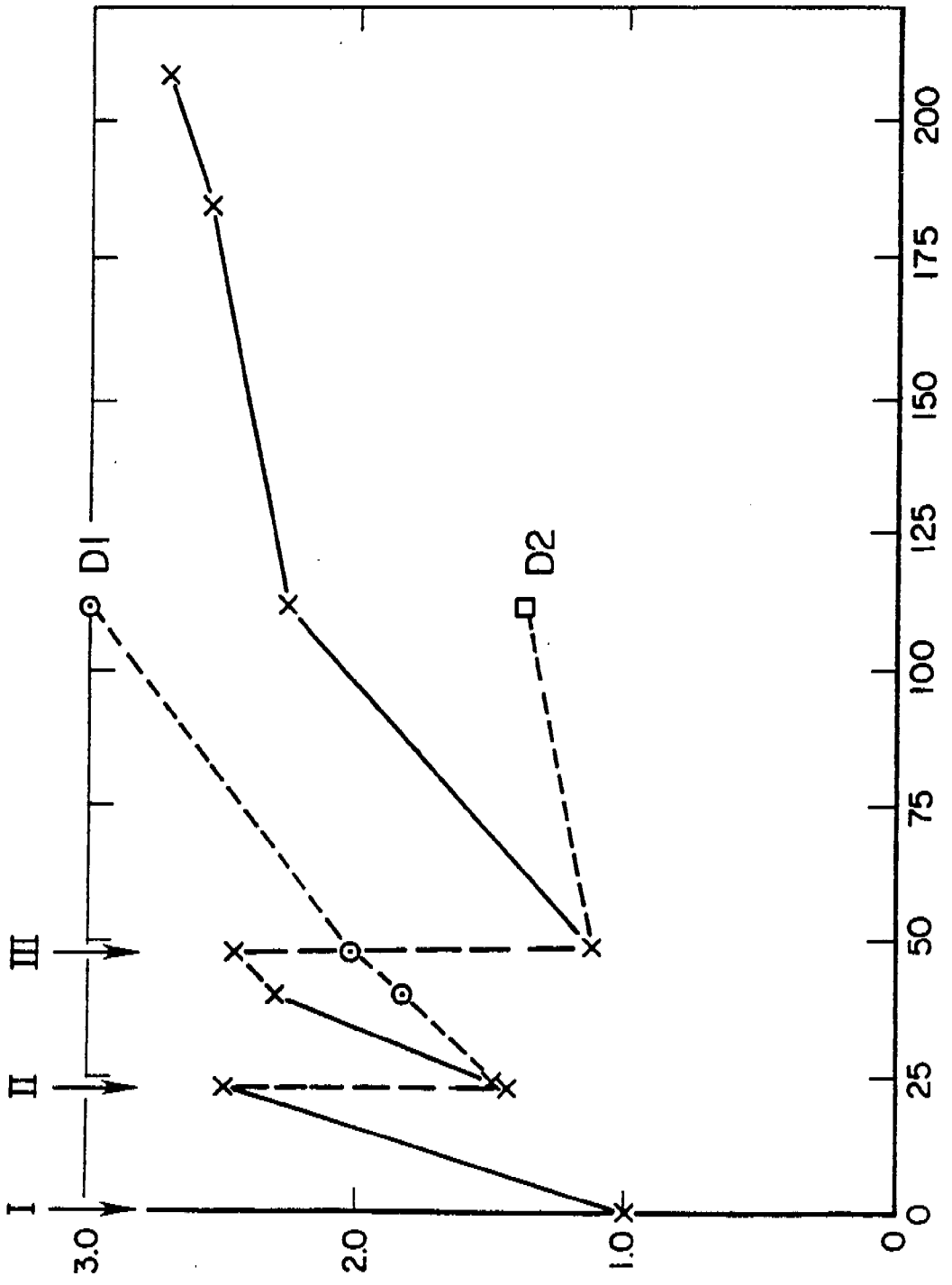

FIG. 3

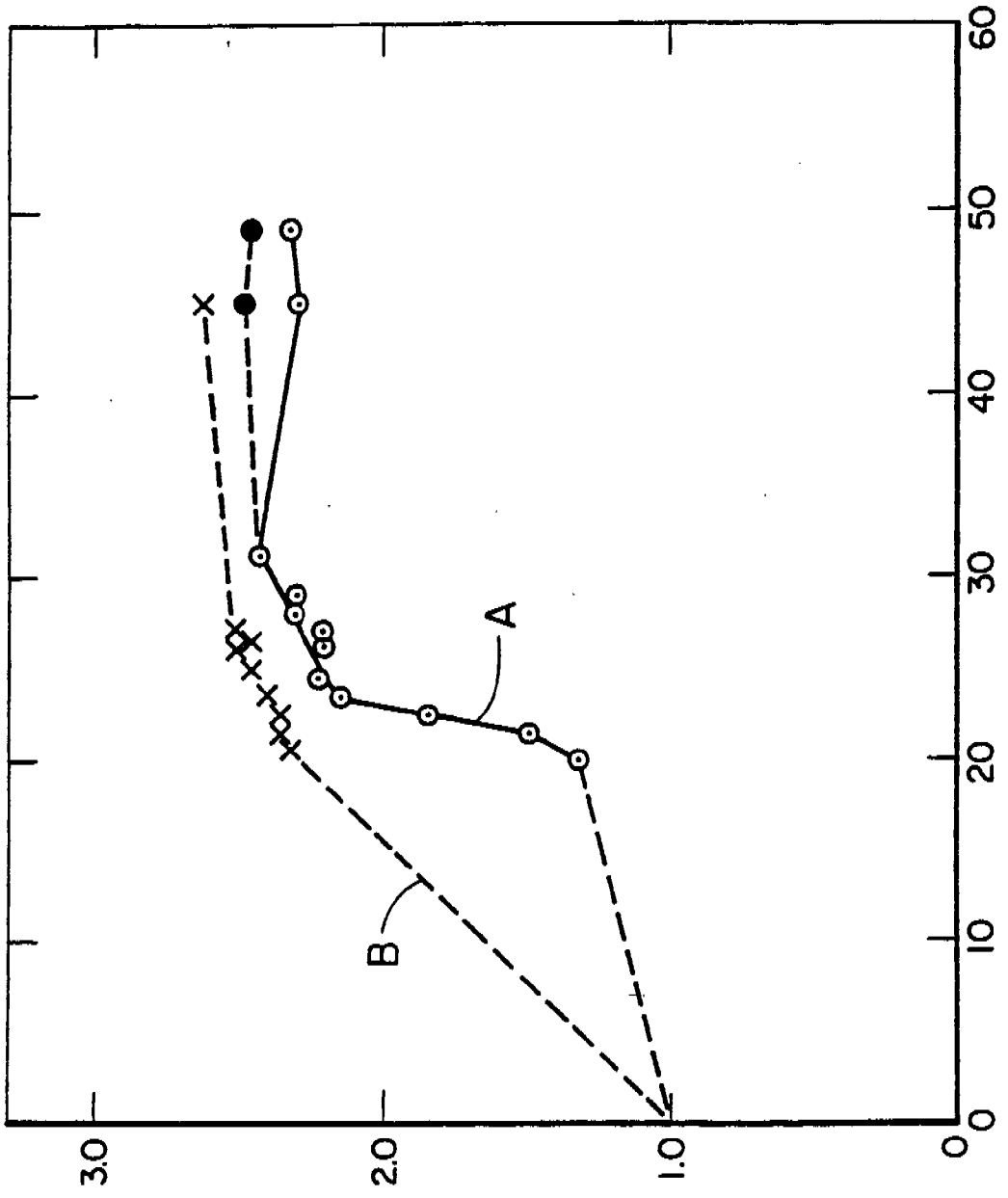

FIG. 4