



F100098880B



SUOMI-FINLAND  
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT 98880  
C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 10 09 1987

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

A 23L 3/3463, A 23C 3/08, 19/11,  
A 01N 63/02, A 61L 2/16 // A 61K 38/16

(21) Patentihakemus - Patentansökning	895878
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	08.12.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.06.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	23.12.89
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.05.97
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US89/02625
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	22.06.88 US 209861 P
	01.03.89 US 317626 P

(71) Hakija - Sökande

1. Applied Microbiology, Inc., 170 53rd Street, Brooklyn, NY 11232, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Blackburn, Peter, 426 West 44th Street, New York, NY 10036, USA, (US)  
2. Polak, June, 57 Montague Street, Brooklyn, NY 11201, USA, (US)  
3. Gusik, Sara-Ann, 317 First Avenue, New York, NY 10003, USA, (US)  
4. Rubino, Stephen D., 111 Henry Avenue, Harrison, NY 10528, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Keijo Heinonen Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Lantioniinia sisältävät bakteriosiinikoostumukset käytettäväksi parannettuina,  
laaja-alaisina bakterisideina  
Lantioninhaltiga bakteriocinkompositioner för användning som förbättrade baktericider med  
ett brett spektrum

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB B 738655, US A 4597972 (B 29D 29/00),  
Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 11th Ed., 1987, Van Nostrand Reinhold Company,  
New York, p. 1102, Chemical Abstracts, vol. 83, 1975, 126868w, Sb. Nauchn. Rab.,  
Volgogr. Gos. Med. Inst. 1973, vol. 26, p. 411-413 (venäjänkiel.), Kirk-Othmer  
Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd Ed., vol. 16, 1968, John Wiley & Sons, Inc. USA,  
p. 314-315, 330

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö käsittää bakteriosiinikoostumukset, jotka sisältävät lantioniinipitoisia bakteriosiineja ja ei-bakterisidisia aineita. Kun bakteriosiinikoostumukset yhdistetään sopivan kantajan kanssa siten, että kutakin komponenttia on läsnä riittävät määrät niin, että koostumus on vaikuttava gram-negatiivisia bakteereita vastaan gram-positiivisten bakteereiden lisäksi, ne tulevat paremmiksi, nopeasti vaikuttaviksi, laaja-alaisiksi bakterisideiksi, jotka sopivat erilaisiin tarkoituksiin.

Uppfinningen avser bakteriocinsammansättningar, vilka innehåller lantioninhaltiga bakteriociner och icke-baktericida ämnen. Då bakteriocinsammansättningarna förenas med lämplig bärare på sätt att vardera komponenten är närvarande i tillräckliga mängder så att sammansättningen har även verkan mot Gram-negativa bakterier förutom Gram-positiva, blir de bättre, snabbt verkande, bredspektra baktericider, som lämpar sig för olika ändamål.

LANTIONIINIA SISÄLTÄVÄT BAKTERIOSIINIKOOSTUMUKSET KÄYTETTÄ-  
VÄKSI PARANNETTUINA, LAAJA-ALAISINA BAKTERISIDEINA

Keksinnön tausta

Nisiini on polypeptidi, jolla on antimikrobisia ominaisuuksia ja jota luonnossa tuottavat *Streptococcus lactis*-bakteerin eri kannat. Se tunnetaan ruoan säilöntäaineena, joka estää gram-positiivisten basillien tiettyjen lajien itiöiden kasvun.

Vaikka nisiinistä joskus virheellisesti ja epätarkasti puhutaan antibioottina, se oikeammin luokitellaan bakteriosiiniksi, t.s. bakteerien tuottamaksi proteiiniaineeksi, jolla on antibakteerinen vaikutus vain lajeja kohtaan, jotka ovat läheisesti sukua samaa alkuperää oleville lajeille. Nisiini on luonnossa esiintyvä säilöntäaine, jota on pieniä määriä maidossa ja juustossa, ja jonka uskotaan olevan täysin myrkytöntä ja ei-allergeenista ihmisille.

FDA on äskettäin todennut nisiinin turvallisiksi selvänä ruoan ainesosana pastöroidussa juustolevitteessä, pastöroidussa sulatejuustolevitteessä ja pastöroidussa sulatejuustolevitteessä, jossa on hedelmiä, vihanneksia tai lihaa. Lisäksi, koska se on polypeptidi, kaikki ruoassa jäljellä olevat nisiinijäämät hajoavat nopeasti.

Yhteenveto nisiinin ominaisuuksista on julkaisussa Hurst, A., Advances in Applied Microbiology 27:85-123 (1981). Tämä julkaisu kuvaa sitä, mitä nisiinistä yleensä tiedetään. Streptococcus lactis-bakteerien tuottama nisiini on kaupallisesti saatavana epäpuhtaana valmisteena, Nisaplin®, Aplin & Barrett Ltd.:ltä, Dorset, England, ja sitä voidaan saada eristämällä luonnossa esiintyvä nisiini Streptococcus lactis-viljelmistä ja konsentroimalla nisiini tunnettujen menetelmien mukaan. On raportoitu myös nisiinin tuottamisesta käyttäen erilaisia Streptococcus-kantoja. Katso Gonzalez et al., US-patentti nro 4,716,115, hyväksytty

29.12.1987. Pitäisi olla mahdollista tuottaa nisiiniä myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Nisiiniä on käytetty tehokkaasti säilöntäaineena meijerituotteissa, kuten sulatejuustossa, kermassa ja maidossa. Nisiinin käyttö sulatejuustotuotteissa on ollut viimeaikaisten patenttien kohteena. Katso US-patentit nro 4,584,199 ja 4,597,972. Nisiinin käyttö tiettyjen gram-positiivisten bakteerien kasvun estämiseen on tarkoin dokumentoitu. Sen täydellisen menestyksen ja ruoan säilöntäaineksi hyväksymisen esteenä on tähän asti ollut usko, että nisiini on tehoton gram-negatiivisia bakteereita ja monia gram-positiivisia bakteereita vastaan. Gram-negatiivisia bakteereita on lähes aina mukana yhdessä gram-positiivisten bakteereiden kanssa ja ne ovat ruoan pilaantumisen ja kontaminoitumisen pääasiallinen syy. Katso Taylor, US-patentti nro 5,584,199, myönnetty 22.4.1986, ja Taylor, US-patentti nro 4,597,972, myönnetty 1.7.1986; Tsai and Sandine, "Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from Streptococcus Lactis 7962 to Leuconostoc Dextranicum 181, Applied and Environmental Microbiology, Feb. 1987, p. 352; "A Natural Preservative," Food Engineering Int'l, May 1987, pp. 37-38; "Focus on Nisin," Food Manufacture, March 1987, p.63.

#### Keksinnön yhteenveto

Keksinnön kohteena ovat laaja-alaisena bakterisidinä käytökelpoiset koostumukset joille on tunnusomaista se, että de sisältävät lantioniinipitoista bakteriosiinia ja kelatoivaa ainetta ja vaihtoehtoisesti pinta-aktiivista ainetta.

Keksintö tarjoaa käyttöön bakteriosiinikoostumukset nisiinistä tai muista lantioniinipitoisista bakteriosiineista, yhdessä erilaisten ei-bakterisidisten aineiden, esimerkiksi kelatoivien aineiden tai pinta-aktiivisten aineiden kanssa. Keksintö tarjoaa edelleen käyttöön koostumukset

liuotettuna tai suspendoituna sopivaan kantajaan laaja-alaisempien bakterisidien saamiseksi.

On havaittu, että vastoin aikaisempia uskomuksia koostumuksilla, jotka sisältävät nisiiniä yhdessä erilaisten ei-bakterisidisten aineiden kanssa, on parempi, laaja-alainen bakterisidinen vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin, sekä parempi vaikutus suurempaa joukkoa gram-positiivisia bakteereita vastaan kuin nisiinillä yksinään. Parantunut bakterisidinen vaikutus gram-positiivisia bakteereita vastaan ilmenee laajemmalla pH-alueella kuin aikaisemmin on luultu.

#### Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Spesifisesti on havaittu, että liuos, jossa on noin 0,1 µg/ml - 300 µg/ml nisiiniä sekä noin 0,1 mM - 20 mM kela-toivaa ainetta, esimerkiksi EDTA:a, tehokkaasti eliminoi gram-negatiivisten bakteereiden, kuten Salmonella typhimuriumin, Escherichia colin, Pseudomonas aeruginosan, Bacterioides gingivaliksen, Actinobacillus actinomycetemcomitansin, ja Klebsiella pneumoniaen, kasvua ja on aktiivisempi gram-positiivisia bakteereita vastaan, kuten Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae ja Coryneform-bakteerit, kuin nisiini yksinään. Vaikka nisiinin vaikutuksen lisääntyminen kelaattorin vaikutuksesta oli konsentraatiosta riippuva, olivat EDTA:n konsentraatiot yli 20 mM vastoin odotuksia inhiboivia nisiinin bakterisidi-aktiivisuudelle. Kuitenkin, jos läsnä oli proteiinikantaja ja polyvalenttisia polymeereja, kuten seerumin albumiini, kollageeni, gelatiini, kaseiini ja keratiini, nisiinin inhiboituminen yli 20 mM:n EDTA-konsentraatioiden vaikutuksesta väheni merkittävästi, jolloin nisiinin EDTA-lisäyksen käyttökelpoinen alue laajentuu.

On myös havaittu, että liuos, jossa on noin 0,1 µg/ml - 300 µg/ml nisiiniä ja noin 0,1 mM - 20 mM kelatoivaa ainetta, edelleen lisää nisiinin tehokkuutta gram-negatiivisia ja

gram-positiivisia bakteereita vastaan, jos läsnä on noin 0,01% - 1,0% pinta-aktiivista ainetta. Lisäksi on havaittu, että kun läsnä on pelkkä pinta-aktiivinen aine, nisiinillä on parempi vaikutus gram-positiivisiin bakteereihin.

Tässä keksinnössä sopivia kelatoivia aineita ovat, mutta ei näihin rajoittuen, EDTA, CaEDTA, CaNa<sub>2</sub>EDTA, ja muut alkyylidiamiinitetra-asetaatit, EGTA ja sitraatti. Pinta-aktiivisia aineita, jotka ovat arvokkaita pesuaineina, sopivia yhdistettäväksi nisiinin kanssa, EDTA:n kanssa tai ilman, ovat, mutta ei näihin rajoittuen, ionittomat pinta-aktiiviset aineet, Tweenit, Tritonit ja glyseridit, ioniset pinta-aktiiviset aineet, kuten rasvahapot, kvaternääriset yhdisteet, anioniset pinta-aktiiviset aineet, kuten kokamidopropylibetaini, ja emulgoijat.

Koska gram-positiiviset ja gram-negatiiviset bakteerit melkein aina löydetään yhdessä ruoista, on nisiinikoostumusten tehokkuus gram-negatiivisia bakteereita, kuten Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacterioides gingivalis, Actinobacillus actinomycescomitans, ja muita gram-negatiivisia patogeeneja ja gram-positiivisia bakteereita vastaan erittäin hyödyllinen. Bakterisidit sopivat erityisesti raaka-aineiden, valmisruokien ja virvoitusjuomien bakteeripatogeenien ja muiden mikrobisten pilajaorganismien aiheuttaman kontaminaation kontrolloimiseen ja ehkäisyyn. Potentiaalisia ruokiin liittyviä käyttöjä ovat lihojen, erityisesti siipikarjan, munien, juuston ja kalan käsittely ja ruoan pakkaus- ja käsittelylaitteiden käsittely. Muita käyttöjä ovat käyttö säilöntäaineena ruoassa, kuten sulatejuustossa, kermassa, maidossa, meijerituotteissa ja puhdistettaessa siipikarjan, kalan, lihojen, vihannesten ja meijerituotteiden ja ruoan käsittelylaitteita. Nisiinikoostumusten käytön ei pitäisi rajoittua ruokaan liittyviin käytöihin ja nisiinikoostumusten pitäisi olla käyttökelpoisia missä tahansa tilanteessa, jossa tarvitaan tai halutaan

eliminoida gram-negatiivisia ja gram-positiivisia bakteereita.

Koostumukset voidaan liuottaa sopivaan kantajaan, esimerkiksi vesiliuokseen tai puskuriin, tai suspendoida mihin tahansa sopivaan nesteeseen, kolloidiseen tai polymeerimatriisiin, bakterisidien saamiseksi. Koostumukset tai bakterisidit voidaan liittää voiteisiin tai päällysteisiin lääketieteellistä käyttöä varten, kuten infektioiden hoitoon, haavapeitteisiin tai kirurgisiin siirrännäisiin sekä laajakirjoisena desinfiointiaineena ihon tai suun huuhtelunesteissä, desinfiointipesimissä, pyyhkeissä tai nesteissä. Bakterisidejä voidaan käyttää lääketieteellisten instrumenttien puhdistukseen, ennen leikkausta käytettävissä kirurgisissa pesimissä ja vastaavissa. Bakterisidit ovat erityisen sopivia olosuhteissa, jolloin halutaan desinfioida ympäristöä, mutta kemialliset pieneliöitä tuhoavat aineet ovat poissuljettuja, korrodoivien tai muuten myrkyllisten jäämien riskien takia.

Vastoin useimpien laajakirjoisten pieneliöitä tuhoavien aineiden aktiivisuutta, jota monimutkaisten orgaanisten aineiden läsnäolo haittaa, tämän keksinnön koostumukset ovat tehokkaita bakterisideinä orgaanisen aineen, kuten maidon tai seerumin läsnäollessa.

Nisiinin tiedettiin optimaalisesti inhiboivan muutaman gram-positiivisille bakteereille läheistä sukua olevien bakteerien kasvua, erityisesti tiettyjen gram-positiivisten itiöitä muodostavien basillien kasvua pH:ssa 5,0. Nisiinin bakterisidivaikutus liuoksessa kelatoivan aineen kanssa oli yllättävän nopea ja suuresti lisääntynyt gram-positiivisia bakteereita kohtaan pH-arvoilla yli 5,0, ja lisäksi se aktivoitui gram-negatiivisille bakteereille sekä happamassa että emäksisessä pH:ssa, edullisesti alueella 5,0-8,0. Tämä kelaattorilla aktivoitunut nisiinin odottamattoman nopea ja laaja-alainen bakterisidivaikutus tekee sen sopivaksi käytettäväksi muun muassa desinfektioaineena.

Nisiini kuuluu lantioniinia sisältävien peptidibakteriosiinien joukkoon. Tähän luokkaan kuuluvat myös subtiliini, epidermiini, sinnamysiini, duramysiini, ancoveniini ja Pep 5. Kutakin näitä bakteriosiinipeptideitä valmistavat eri mikro-organismit. Tietyllä Bacillus subtilis-viljelmistä saadulla subtiliinilla sekä tietyllä Staphylococcus epidermidis-viljelmistä saadulla epidermiinillä on kuitenkin todettu olevan molekyyli rakenne, joka on hyvin samanlainen kuin nisiinillä (katso Hurst, pp. 85-86, ja Schnell et al., Nature, 333:276-278). Sen vuoksi uskotaan, että molekyyli-rakenteiden samanlaisuuden vuoksi muut lantioniinipitoiset peptidibakteriosiininit ovat yhtä tehokkaita kuin nisiini-koostumukset yhdessä kelatoivien aineiden ja ionittomien pinta-aktiivisten aineiden kanssa eliminoitaessa gram-negatiivisia ja gram-positiivisia bakterikontaminaatioita.

Nisiinin, sekä laajemmin muiden lantioniinia sisältävien peptidibakteriosidien, koostumusten tehokkuus bakterisidina gram-negatiivisia bakteereita vastaan on yllättävää, koska tekniikan tasossa yleensä todetaan muuta tästä nisiinin vaikutuksesta. Nisiinin lisääntynyt aktiivisuus gram-positiivisia bakteereita vastaan EDTA:n läsnäollessa pH:ssa yli 5,0 on odottamatonta, koska aikaisemmin uskottiin, että nisiinin aktiivisuus on optimaalinen pH:ssa 5,0. Lisäksi nisiinin ja lantioniinipitoisten peptidibakteriosiinien tällaisen tehokkuuden löytäminen toteuttaa pitkäaikaisen tarpeen ruoansäilytysalalla, joka on kärsinyt sopivan, luonnollisen, myrkyttömän aineen puutteesta, joka olisi tehokas suurta joukkoa bakteereita vastaan.

Nisiiniä, EDTA:ta ja/tai erilaisia pinta-aktiivisia aineita sisältävän koostumuksen erinomaisen ja odottamattoman nopean vaikutuksen esittelemiseksi suoritettiin useita kokeita bakterisideilla. Nämä kokeet on tarkoitettu valaisemaan asiaa eikä niiden ole tarkoitus rajoittaa tätä keksintöä. On odotettavissa, että muut lantioniinia sisältävät peptidibakteriosidit olisivat tehokkaita korvikkeita nisiinille,

ja että muut kelatoivat aineet kuin EDTA olisivat tehokkaita korvikkeita EDTA:lle.

Kaikki kokeet seuraavissa esimerkeissä suoritettiin 37°C:ssa. Laaja-alaisempien bakterisidien tehokkuus määritettiin tutkimalla bakterisidiaktiivisuus mitattuna prosenttisena bakteerien eloonjäämisinä bakterisidilla käsittelyn jälkeen. Yleensä bakteerit kerättiin sentrifugoimalla 2 minuuttia sen jälkeen, kun oli inkuboitu 10<sup>7</sup> solua ml:aa kohden kohdeaineen suspensiota uuden bakterisidin kanssa määrätyn pituiset ajat. Bakteeripelletti pestiin puhtaaksi bakterisidista apupuskurilla, jota tässä nimitetään Phage-puskuriksi (50 mM Tris-HCl-puskuri, pH 7,8, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl ja 0,1% gelatiinia), suspendoitiin uudelleen ja sarjalaimennettiin Phage-puskuriin, ja 100 ml suspendoituja bakteereja levitettiin ravinneagarlevyille. Eloonjääneet bakteerit määritettiin arvioimalla pesäkkeitä muodostavat yksiköt (CFU) sen jälkeen, kun oli inkuboitu 24-48 tuntia 37°C:ssa. Tehokas tämän keksinnön mukainen bakterisidi on sellainen, joka antaa alle 0,1%:n alkuperäisestä elinkykyisten bakteerien lukumäärästä jäädä eloon.

Esimerkki 1

Nisiinin ja kelatoivan aineen vaikutus gram-negatiivisia bakteereita (*S. typhimurium*) vastaan

Kuten taulukossa 1 on esitetty, suoritettiin kaksi koetta 20 mM:ssa Tris, pH 8,0 37°C:ssa nisiiniä ja kelatoivaa ainetta EDTA:a yksinään sisältävän bakterisidin tehon osoittamiseksi. Koe 1, kontrollikoe, suoritettiin ilman EDTA:a ja se osoittaa pelkän nisiinin vaikutuksen gram-negatiivista bakteeria *S. typhimuriumia* vastaan. Nisiinin suuremmilla konsentraatioilla on jonkin verran vaikutusta, mutta jopa suurempien konsentraatioiden vaikutus ilman EDTA:a, 1,6% eloonjääminen nisiinin konsentraatiolla 100 µg/ml, on täysin riittämätön ruoan säilöntäaineelle. Ni-

siinillä ja EDTA:lla saatu bakterisidivaikutuksen määrä on huomattava.

TAULUKKO 1

Koe #	Alkup. elinkyk. bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	Nisiini ( $\mu\text{g/ml}$ )					
			0	10	30	50	100	300
S.typhimuriumin prosenttinen eloonjääminen 3 h kuluttua								
1	$3,0 \times 10^6$	0	100	51,3	-	7,0	1,6	-
2	$5,7 \times 10^6$	20	2,5	-	10-3	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

Koe #2, joka suoritettiin käyttäen nisiiniä sekä 20 mM EDTA:a, osoittaa nisiinikoostumuksen yllättävän vaikutuksen eliminoitaessa kohteena olevia gram-negatiivisia bakteereita.

Taulukko 1 osoittaa, että kokeessa #2 konsentraatiolla 20 mM EDTA:a ja 30  $\mu\text{g/ml}$  nisiiniä bakterisidilla on merkittävä bakterisidiaktiivisuus S.typhimuriumia vastaan, kun taas nisiinin konsentraatiolla 100  $\mu\text{g/ml}$  ja sitä enemmän nisiinin ja EDTA:n muodostama bakterisidi tehokkaasti eliminoi bakteerit (prosenttinen eloonjääminen alle  $10^{-4}$ , joka osoittaa, ettei kokeessa ollut yhtään eloonjäänyttä bakteeria). Niinpä EDTA:n ja nisiinin yhdistelmällä on yhteisvaikutus, joka on yli 1000 kertaa suurempi kuin nisiinillä yksinään.

#### Esimerkki 2

#### Nisiinin, kelatoivan aineen ja pinta-aktiivisen aineen vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (S. typhimurium)

Suoritettiin neljä koetta (taulukko 2) nisiiniä ja sekä EDTA:a että pinta-aktiivista ainetta Triton X-100:a 20 mM:ssa Trisiä, pH 8,0, 37°C, sisältävän bakterisidin vaikutuksen määrittämiseksi S.typhimuriumiin. Kontrollikoe (koe 1) on identtinen esimerkin 1 kontrollikokeen kanssa (taulukko 1).

TAULUKKO 2

Koe #	Alkup. elinkyk. bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	Triton X-100 (%)	Nisiini ( $\mu\text{g/ml}$ )				S. typhimurium in prosenttinen eloonjääminen 3 h kuluttua	
				0	10	30	50		100
1	$3.0 \times 10^6$	0	0	100	51.3	-	7.0	1.6	-
2	$3.0 \times 10^6$	0	1.0	37.4	93.0	-	64.0	47.0	-
3	$5.7 \times 10^6$	20	0.1	0.03	-	$< 10^{-3}$	-	-	-
4	$5.7 \times 10^6$	20	1.0	$< 10^{-4}$	-	$< 10^{-4}$	-	$< 10^{-4}$	$< 10^{-4}$

Koe #2 (taulukko 2) suoritettiin käyttäen nisiiniä ja 1,0% Triton X-100:aa, mutta ilman EDTA:a. Pelkän detergentin läsnäolo inhiboi nisiinin vaikutuksen gram-negatiivisiin bakteereihin, ja nisiini oli tehotonta. Kokeissa #3 ja #4 (taulukko 2), jotka edustavat keksintöä, 20 mM EDTA:a yhdessä Triton X-100:n kanssa muodostaa kuitenkin bakterisidin, joka merkittävästi nostaa nisiinin bakterisidivaikutusta S.typhimuriumia kohtaan. Triton X-100:n ja EDTA:n yhdistelmä ilman nisiiniä oli todellakin tehokas, vaikka pienemmässä määrin kuin nisiinin läsnäollessa. Vaikka sekä kokeessa #3 että #4 (taulukko 2) olivat nisiiniyhdistelmät hyvin tehokkaita, oli konsentraatio 1,0% Triton X-100:aa (koe #4, taulukko 2) kaikkein tehokkain.

Ionittoman pinta-aktiivisen aineen Triton X-100:n läsnäolo yhdessä EDTA:n kanssa lisää nisiinin vaikutusta gram-negatiivisiin bakteereihin jopa enemmän kuin bakterisidi, joka sisältää nisiiniä ja EDTA:a yksinään (esimerkki 1).

### Esimerkki 3

#### Nisiinin, kelatoivan aineen ja pinta-aktiivisen aineen vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (S. typhimurium)

Taulukko 3 osoittaa lisääntyneen vaikutuksen S. typhimuriumia kohtaan bakterisidissa, joka sisältää nisiiniä, 20 mM kelatoivaa ainetta EDTA:a ja ionitonta pinta-aktiivista ainetta Tween 20:ä 20 mM:ssa Tris, pH 8,0, 37°C:ssa. Samoin kuin Triton X-100:n kanssa (esimerkki 2), on nisiinin ja EDTA:n yhdistelmä, jossa on 1% Tween 20:ä, kaikkein tehokkain.

TAULUKKO 3

Alkup.  
elinkyk.

Koe #	bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	Tween20 (%)	Nisiini ( $\mu\text{g/ml}$ )					
				0	10	30	50	100	300
<u>S.typhimuriumin</u> prosenttinen eloonjääminen 3 h kuluttua									
1	$3.0 \times 10^6$	0	0	100	51.3	-	7.0	1.6	-
2	$5.7 \times 10^6$	20	0	2.5	-	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
3	$4.3 \times 10^6$	20	1.0	$<10^{-2}$	-	$<10^{-4}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

Esimerkki 4Nisiinin, kelatoivan aineen ja pinta-aktiivisen aineen vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (Escherichia coli)

Nisiiniä ja EDTA:a sisältävän bakterisidin teho gram-negatiivisiin E.coli-bakteereihin todettiin, kuten taulukossa 4 on esitetty.

TAULUKKO 4

Alkup.  
elinkyk.

Koe #	bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	Tween20 (%)	Nisiini ( $\mu\text{g/ml}$ )			
				0	30	100	300
<u>E. colin</u> prosenttinen eloonjääminen 2 h kuluttua							
1	$1.0 \times 10^7$	0	0	100	27	25	8.5
2	$1.0 \times 10^7$	20	0	14.5	0.86	0.01	0.001
3	$1.0 \times 10^7$	0	1.0	100	-	30	-
4	$1.0 \times 10^7$	20	1.0	1.2	0.8	0.05	$<10^{-4}$

Kokeet ilman EDTA:a ja sen kanssa suoritettiin 20 mM:ssa Tris-puskuriliuosta, pH 8,0, 37°C:ssa, alkuperäisen elinkykyisten E.coli-solujen lukumäärän ollessa  $1 \times 10^7$  solua/ml. Bakterisidin vaikutukset mitattiin prosenttisen bakteereiden eloonjäämisen funktiona 2 tunnin kuluttua.

Kokeessa #1, (kontrollikoe, taulukko 4) ilman EDTA:a, nisiinillä oli jonkin verran merkityksellistä vaikutusta E.colin eliminointiin. Kokeessa #2 (taulukko 4), jossa on mukana 20 mM EDTA:a, oli bakterisidikoostumuksella kuitenkin olennainen vaikutus E. coli-bakteereihin. Vaikutuksen tehokkuus lisääntyi, kun nisiinin konsentraatiota lisättiin. Nisiinin yhdistelmä EDTA:n kanssa bakterisidina osoittaa 1000-kertaisen yhteisvaikutuksen tehokkuuden lisääntymisen E.coliin. Kokeissa #3 ja #4 (taulukko 4) voidaan nähdä, että Triton X-100:lla ei ole mitään merkittävää bakterisidivaikutusta E.coliin. Itse asiassa Triton X-100 näyttää inhiboivan nisiinin vaikutusta gram-negatiivisiin bakteereihin kuten todettiin S. typhimuriumilla (taulukko 2). EDTA:n lisääminen nisiiniin kuitenkin muuttaa Triton X-100:n vaikutukset käänteiseksi, kuten voidaan nähdä taulukoista 2 ja 4.

Niinpä näyttää siltä, että bakterisidi, joka sisältää nisiiniä ja kelatoivaa ainetta, kuten EDTA:a, on tehokas ruoan säilöntäaine erilaisia gram-negatiivisten bakteereiden lajeja vastaan jopa pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa.

#### Esimerkki 5

#### Nisiinin ja kelatoivan aineen vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (Klebsiella pneumoniae)

Nisiiniä ja EDTA:a yksinään sisältävän bakterisidin vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin K. pneumoniae osoitettiin taulukossa 5 esitetyllä tavalla.

TAULUKKO 5

Koe	Alkup. elinkyk. bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	Triton X-100 (%)	Nisiini $\mu\text{g/ml}$			
				0	30	100	300
				% eloonjääminen 2 tunnissa			
1	$10^7$	0	0	100	-	50	38
2	$10^7$	20	0	22	0,5	1,1	0,085

Kaksi koetta, toinen EDTA:n kanssa ja toinen ilman sitä (kontrollikoe), suoritettiin 20 mM Tris-puskurissa, pH 8,0 ja 37°C:ssa, alkuperäisen elinkykyisten K. pneumoniae-solujen lukumäärän ollessa  $10^7$  solua/ml. Tehokkuus mitattiin prosenttisen bakteereiden eloonjäämisen funktiona 2 tunnin kuluttua.

Kokeessa #1, (kontrollikoe, taulukko 5) ilman EDTA:a, nisiinillä oli jonkin verran merkityksellistä bakterisidivaikutusta K. pneumoniae-bakteereihin. Kokeessa #2 (taulukko 5), jolloin mukana oli 20 mM EDTA, oli bakterisidilla kuitenkin oleellinen vaikutus K. pneumoniae-bakteereihin. Vaikutuksen tehokkuus lisääntyi, kun nisiinin konsentraatio kasvoi.

#### Esimerkki 6

Nisiinin vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (Salmonella typhimurium) on riippuvainen kelaattorin konsentraatiosta

Taulukossa 6 olevat tiedot osoittavat, että nisiinin lisääntynyt vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (S. typhimurium) on riippuvainen EDTA:n konsentraatiosta joko 50 mM natriumasetaatissa, pH 5,0, tai 20 mM Tris:ssä, pH 8,0, 37°C:ssa.

TAULUKKO 6

Koe #	pH	Alkup. elinkyk. bakteerien lukumäärä	Nisiini $\mu\text{g/ml}$	0	0.2	2.0	$\frac{\text{EDTA (mM)}}{10}$	$\frac{\text{EDTA (mM)}}{50}$	100
1	5.0	$3 \times 10^6$	0	100	-	38.7	15.2	3.5	-
2	5.0	$3 \times 10^6$	100	0.6	$10^{-4}$	$10^{-4}$	0.004	0.02	-
3	8.0	$5 \times 10^6$	0	100	-	8.7	14	11.4	45
4	8.0	$5 \times 10^6$	100	4	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	0.6	30

Eloojäämis-% 2 h:n kuluttua

14

Kokeissa #1 ja #3, (kontrollikokeet, taulukko 6), joissa käytettiin EDTA-konsentraatioita aina 100 mM:iin asti ilman nisiiniä, oli hiukan merkityksellistä vaikutusta S. typhimuriumiin joko pH:ssa 5,0 (#1) tai pH:ssa 8,0 (#3). Kokeissa #2 ja #4 (taulukko 6) oli kuitenkin 100 µg/ml nisiiniä yhdessä EDTA:n kanssa, jolloin bakterisideilla oli huomattava vaikutus S. typhimuriumiin. Bakterisidien vaikutus oli samanlainen sekä happamassa pH:ssa (5,0) että emäksisessä pH:ssa (8,0), huolimatta siitä seikasta, että nisiinin vaikutus yksinään gram-negatiivisiin bakteereihin on optimaalinen pH:ssa 5,0.

Nisiinin parannus EDTA:lla oli konsentraatiosta riippuvainen, ollen optimaalinen alueella 0,2 mM - 10 mM pH-arvoissa 5,0-8,0. Yllättäen konsentraatioilla yli 10 mM EDTA:a nisiinin EDTA:n avulla tapahtuva paraneminen vähenee; vaikutuksen vähentyminen on merkittävästi suurempi pH-arvolla 8,0 kuin pH-arvolla 5,0.

#### Esimerkki 7

#### Nisiini ja kelatoiva aine gram-negatiivisia bakteereita (S. typhimurium) vastaan

Nisiinin vaikutuksen parantaminen EDTA:lla gram-negatiivisia bakteereita vastaan biologisen kudoksen läsnäollessa osoitettiin S. typhimuriumilla kanan lihaksessa, ja on esitetty taulukossa 7.

TAULUKKO 7

Koe #	pH	Nisiini $\mu\text{g/ml}$	0	0.1	0.3	1	3	EDTA (mm)			
								10	20	30	
1	5.0	0	11.8	-	-	-	-	6.4	-	-	-
2	5.0	300	0.1	0.2	0.05	0.01	0.003	0.016	0.03	0.02	0.07
3	8.0	0	100	-	-	-	-	5.2	-	-	-
4	8.0	300	7.5	0.1	0.02	0.02	0.09	0.47	0.5	-	2.2
5	8.0	300 <sup>b</sup>	0.02	0.09	0.0002	$<10^{-4}$	0.0004	0.003	-	0.03	0.09

Eloonjäämis-%<sup>a</sup> 2 h:n kuluttua

16

a Tarttumattomat solut

b Sisältää 1 % naudan seerumin albumiinia (BSA)

Inkuboinnit suoritettiin joko 50 mM natriumasetaatissa, pH 5,0, tai 20 mM Trisissä, pH 8,0, lämpötilassa 37°C.

Kuutiot kanan lihaksesta huuhdottiin natriumhypokloriitilla ja povidonijodilla ennen käyttöä. Kudoksen siirrostamiseksi kanan lihaskuutiot kastettiin suspensioon, jossa oli  $10^8$  S. typhimurium-solua 20 mM:ssa Tris-HCl, pH:ssa 8,0. Ylimääräinen kosteus poistettiin kastetuista kuutioista valuttamalla. Kananäytteet pantiin riittävään määrään nisiinikoostumusta sisältävää puskuria peittämään kudokset, ja inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa, jonka jälkeen kudokset siirrettiin riittävään määrään Phage-puskuria peittämään kudokset. Koeliuoksessa jäljellä olevat bakteerit kerättiin sentrifugoimalla, pestiin Phage-puskurilla, ja yhdistettiin bakteereiden kanssa, jotka oli pesty kudoksesta Phage-puskurilla. Yhdistetyt näytteet (nimitetään "tarttumattomiksi" soluiksi) sarjalaimennettiin ja 100 µl:n erät pantiin levyille elossa olevien bakteereiden määrittämiseksi.

Kokeissa #1 ja #3 (taulukko 7), ilman nisiiniä joko pH:ssa 5 tai pH:ssa 8, ei EDTA:lla yksinään ollut merkittävää vaikutusta S. typhimurium-bakteereiden eloonjäämiseen. Kokeissa #2 ja #4 (taulukko 7), jolloin mukana oli 300 µg/ml nisiiniä, oli bakterisideilla kuitenkin huomattava vaikutus S. typhimuriumiin kanan lihaksessa sekä pH:ssa 5,0 että pH:ssa 8,0.

Nisiinin parantaminen EDTA:lla oli konsentraatiosta riippuvainen, optimaalisen konsentraation ollessa alueella 0,3 mM - 10 mM EDTA sekä pH-arvossa 5,0 että 8,0. Konsentraation ollessa yli 10 mM EDTA pH:ssa 8,0 EDTA:lla aikaansaatu nisiinin aktivoituminen vähenee. Kuten kokeessa #5 (taulukko 7) kuitenkin on esitetty, kun läsnä on 1,0 % naudan seerumin albumiinia pH:ssa 8,0, nisiinin tehokkuus S. typhimuriumia vastaan kanan lihaksessa ilmenee koko EDTA-konsentraatioiden alueella aina 100 mM:iin saakka.

Niinpä bakterisidit, jotka sisältävät nisiiniä ja pienen konsentraation kelatoivaa ainetta, kuten EDTA:a, alueella 0,1 mM - 20 mM, voivat olla äärettömän tehokkaita eliminoimaan tai ehkäisemään gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttaman ruoan kontaminoitumisen.

#### Esimerkki 8

#### Nisiinin gram-negatiivisiin bakteereihin (*S. typhimurium*) kohdistuvan vaikutuksen titraaminen.

Kelatoivan aineen optimaalisessa konsentraatiossa Tris-puskurissa olevan bakterisidin tehokkuus gram-negatiivisiin bakteereihin osoitettiin huomattavaksi, kuten taulukossa 8 on esitetty.

TAULUKKO 8

Koe #	Alkup. elinkyk. bakteerien lukumäärä	EDTA (mM)	BSA %	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
1	$6 \times 10^6$	0	0	100	-	-	-	-	51.3	-	1.6
2	$6 \times 10^6$	1.0	1.0	63	0.7	0.08	0.01	0.05	0.01	$< 10^{-4}$	-

Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua

Kokeessa #2 (taulukko 8) voidaan nähdä, että niinkin vähän kuin 0,3 µg/ml nisiiniä yhdessä 1,0 mM:n kanssa EDTA 20 mM:ssa Trisiä pH:ssa 8,0 ja siten, että läsnä oli 1 % naudan seerumin albumiinia (BSA), merkittävästi vähensi S.typhimuriumin eloonjäämistä. Bakterisidi on yhtä vaikuttava gram-negatiivisiin bakteereihin kuin nisiinillä yksinään on gram-positiivisiin Streptococci-bakteereihin.

### Esimerkki 9

#### Nisiinin gram-negatiivisiin bakteereihin (S. typhimurium) suuntautuvan vaikutuksen titraaminen

Kelatoivan aineen optimaalisella konsentraatiolla bakterisidin tehokkuus gram-negatiivisiin bakteereihin biologisen kudoksen läsnäollessa osoitettiin S.typhimuriumilla kanan lihaksessa, ja on esitetty taulukossa 9.

TAULUKKO 9

Koe #	Alkup. elinkyk.		EDTA (mM)	BSA (%)	Nisiini µg/ml				
	pH	lukumäärä			0	10	100	200	300
Eloonjäämis-% 2 tunnin kuluttua									
1	8,0	3x10 <sup>7</sup>	0	0	100	-	-	-	-
2	8,0	3x10 <sup>7</sup>	1,0	1,0	27	0,26	0,008	0,007	0,006

Kananlihaskuutiot huuhdeltiin natriumhypokloriitilla ja povidonijodilla ennen käyttöä. Kudoksen siirrostamiseksi kananlihaskuutiot kastettiin S.typhimurium-suspensioon, jossa oli 10<sup>8</sup> solua/ml 20 mM:ssa Tris HCl, pH:ssa 8,0. Ylimääräinen kosteus poistettiin valuttamalla. Kudoksen pantiin riittävään määrään nisiinikoostumusta sisältävää puskuria kudoksen peittämiseksi, ja inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa, jonka

jälkeen kudosisirrettiin riittävään määrään Phage-puskuria kudoksen peittämiseksi. Koeliuoksessa jäljellä olevat bakteerit kerättiin sentrifugoimalla, pestiin Phage-puskurilla, ja yhdistettiin bakteereihin, jotka oli pesty kudoksesta Phage-puskurilla. Yhdistetyt näytteet (nimitettiin "tarttumattomiksi" soluiksi) sarjalaimennettiin ja 100 µl:n erät pantiin levyille elossa olevien bakteereiden määrittämiseksi.

### Esimerkki 10

#### Nisiini-EDTA:n ja metyyliparabeenin vaikutus gram-negatiivisiin bakteereihin (S. typhimurium)

Nisiiniä ja EDTA:a sisältävän bakterisidin yhdistettynä tunnetun ruoan säilöntäaineen, metyyliparabeenin kanssa, osoitettiin olevan erinomaisen tehokkaan gram-negatiivisiin bakteereihin, kuten taulukossa 10 on esitetty.

TAULUKKO 10

Koe #	Alkup. elinkyk.		EDTA <sup>b</sup> (mM)	% metyyliparabeenia		
	bakteerien lukumäärä	Nisiini g/ml		0	0,1	0,2
				Eloonjäämis-% <sup>c</sup> 2 tunnin kuluttua		
1	3x10 <sup>6</sup>	0	10	11,8	1,0	10 <sup>-4</sup>
2	3x10 <sup>6</sup>	300	10	0,03	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-4</sup>

<sup>b</sup> 50 mM Na-asetatipuskuria, pH 5,0

<sup>c</sup> tarttumattomat solut

Kananlihaskuutiot puhdistettiin natriumhypokloriitilla ja povidonijodilla ennen käyttöä. Kudoksen siirrostamiseksi kananlihaskuutiot kastettiin S.typhimurium-suspensioon, jossa oli 10<sup>8</sup> solua/ml 50 mM:ssa natriumasetatipuskurissa, pH 5,0.

Ylimääräinen kosteus poistettiin kastetuista kuutioista valuttamalla. Kudos pantiin riittävään määrään nisiinikoostumusta sisältävään puskuria, jotta se peittyi, ja inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa, jonka jälkeen kudos siirrettiin riittävään määrään Phage-puskuria sen peittämiseksi. Koeliuksessa jäljellä olevat bakteerit pestiin kudoksesta Phage-puskurilla. Yhdistetyt näytteet (nimitettiin "tarttumattomiksi" soluiksi) sarjalaimennettiin ja 100  $\mu$ l:n erät levitettiin levyille e-lossa olevien bakteerien määrittämiseksi.

Kokeessa #1 (taulukko 10) on metyyliparabeenin osoitettu 10 mM:n läsnäollessa EDTA:a olevan vaikuttava S. typhimuriumia kohtaan vain konsentraatiolla 1,0  $\%$ . Kokeessa #2 (taulukko 10), kun läsnä oli 300  $\mu$ g/ml nisiiniä, parani metyyliparabeenin ja nisiinin tehokkuus S. typhimuriumia vastaan oleellisesti.

Nisiiniä ja EDTA:a sisältävät koostumukset paransivat merkittävästi ruoan säilöntäaineen metyyliparabeenin hyödyllisyyttä. Lisäksi bakterisidien avulla voidaan oleellisesti vähentää näiden yleisesti tunnettujen, vaikkakin vähemmän haluttujen ruoan säilöntäaineiden, kuten metyyliparabeenin, konsentraatioita, tai poistaa niiden tarvetta.

### Esimerkki 11

#### Nisiinin ja kelatoivan aineen vaikutus gram-positiivisiin bakteereihin (Staphylococcus aureus)

Nisiinin aktivoiminen kelatoivalla aineella on pH-riippuvainen. Taulukossa 11 olevat tiedot vahvistavat, että pH:ssa 5,0 nisiini on jonkin verran bakterisidisempi S. aureusta vastaan kuin pH:ssa 8,0. pH:ssa 5,0 EDTA ei lisää nisiinin vaikutusta S. aureusta vastaan ja EDTA:n konsentraatioilla yli 10 mM EDTA inhiboi nisiinin bakterisidivaikutusta. EDTA:N avulla aktivoitu bakterisidivaikutus pH:ssa 8,0 on merkittävästi suurempi kuin yksin nisiinin bakterisidivaikutus, tai yhdessä EDTA:n kanssa pH:ssa 5,0.

## Taulukko 11

pH:n vaikutus EDTA:n vaikutuksiin nisiinin bakterisidiaktiivisuuteen Staphylococcus aureukseen

pH	Nisiini $\mu$ g/ml	EDTA mM							
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua <sup>a</sup>									
8.0	0	100	-	100	81	100	100	100	-
8.0	3.0	7.4	0.03	0.01	0.2	0.4	3	56	-
5.0	0	100	-	-	-	100	-	-	-
5.0	3.0	0.6	1.0	1.3	1.4	1.8	-	34	80

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä:  $8,0 \times 10^6$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin 50 mM:ssa natriumasetaattipuskuria, pH 5,0, tai 20 mM:ssa Tris-HCl-puskuria, pH 8,0, 37°C:ssa.

Pelkän nisiinin bakterisidivaikutuksen on raportoitu (katso Hurst) olevan suurimmillaan pH:ssa 5,0 tai sen alapuolella, ja taulukossa 11 olevat tiedot tukevat tätä. Tämän informaatian perusteella uskottiin, että EDTA:lla parannetun nisiinin bakterisidivaikutus S. aureusta vastaan olisi samoin suurempi alhaisemmassa pH:ssa. Kuten taulukosta 11 voidaan kuitenkin nähdä ja vastoin odotuksia (katso taulukko 6), EDTA:n ei havaittu lisäävän nisiinin vaikutusta gram-positiivisiin bakteereihin pH:ssa 5,0. Suurten EDTA-konsentraatioiden inhiboiva vaikutus nisiinin aktiivisuuteen havaittiin kuitenkin vielä pH:ssa 5,0. Niinpä nisiinin aktivoituminen kelatoivan aineen avulla tapahtuu vain kelaattorin konsentraatioalveilla, ja gram-positiivisten bakteereiden suhteen on riippuvainen pH:sta edullisen pH-alueen ollessa yli 5,0.

Esimerkki 12Nisiinin ja kelatoivan aineen vaikutus gram-positiivisiin bakteereihin

EDTA:n vaikutus nisiinin bakterisidiaktiivisuuteen pH:ssa 8,0 ei ole rajoittunut S. aureukseen, tärkeään ihmisen patogeeniin, vaan on havaittavissa myös Streptococcus mutansilla, joka on syyllinen hammasplakkiin (taulukko 12A), Listeria monocytogenesillä, ruokaperäisellä patogeenillä (taulukko 12B), ja sekapopulaatiolla kainalokuopan Coryneform-bakteereilla, jotka synnyttävät kehon hajun (taulukko 12C).

Taulukko 12AEDTA:n vaikutukset nisiinin bakterisidiaktiivisuuteen Streptococcus mutansia kohtaan

pH	Nisiini $\mu$ g/ml	EDTA mM								
		0	0.01	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua <sup>a</sup>										
8.0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-
8.0	0.1	4.3	1.8	0.04	0.02	0.06	1	25	100	100

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä:  $6,0 \times 10^6$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin 37°C:ssa 20 mM:ssa Tris-HCl:ää, pH:n ollessa 8,0.

Taulukko 12B

EDTA:n vaikutukset bakterisidiaktiivisuuten Listeria monocytogenesiä kohtaan

Nisiini		EDTA mM							
pH	$\mu\text{g/ml}$	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua <sup>a</sup>									
8.0	0	100	-	-	84	-	-	-	-
8.0	3.0	0.71	0.04	0.04	0.02	0.1	0.64	10	14

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä  $6,0 \times 10^6$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin  $37^\circ\text{C}$ :ssa 20 mM:ssa Tris-HCl:ää, pH:ssa 8,0.

Taulukko 12C

EDTA:n vaikutukset nisiinin bakterisidiaktiivisuuteen Coryneform bakteereita kohtaan

Nisiini		EDTA mM					
pH	$\mu\text{g/ml}$	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua <sup>a</sup>							
8.0	0	100	-	4.6	3.6	8	36
8.0	3	0.22	0.03	0.0009	0.1	--	0.16

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä:  $1,0 \times 10^6$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin  $37^\circ\text{C}$ :ssa 20 mM:ssa Tris-HCl:ää pH:ssa 8,0.

Esimerkki 13Kelaattorilla aktivoidun nisiinin nopea bakterisidivaikutus

Nisiiniä EDTA:n kanssa sisältävä bakterisidi on nopeasti bakterisidinen, kuten taulukossa 13A olevista tiedoista käy ilmi. Gram-positiivisen bakteerin S. mutansin suspensioita  $10^7$  solua/ml inkuboitiin 20 mM:ssa Tris-puskuria, pH:ssa 7,3 37°C:ssa 1 mM:lla EDTA:a aktivoidun nisiinin konsentraatioalueella. Suspensioita inkuboitiin eri aikoja 0,5-60 minuuttia bakterisidien kanssa. Bakterisidien bakterisiditehokkuus arvioitiin määrittämällä bakteereiden eloonjäämisen prosentti. EDTA:lla täydennettynä niinkin pieni määrä kuin 10 µg/ml nisiiniä tässä koostumuksessa pystyy vähentämään bakteerikuormitusta arvoon  $<10^{-4}$  (6 logs) 1 minuutissa.

Nopea bakterisidiaktiivisuus on edellytys tehokkaalle desinfektioille. Niinpä koostumusten ennustetaan olevan tehokkaita bakterisideja erityisesti tässä esitellyllä tavalla, suuveden, huuhteluaineen, hammastahnan tai muun samanlaisen hampaidenpuhdistusaineen komponenttina, joka vaikuttaa plakkia muodostavaan S. mutansiin.

EDTA:lla parannetun nisiinin aktiivisuus gram-negatiivisia bakteereita vastaan 2-3 tunnissa osoitettiin esimerkeissä 1-7. EDTA:lla täydennetyn nisiinin nopea bakterisidivaikutus myös gram-negatiivisiin bakteereihin on nähtävissä ja tämä käy ilmi taulukossa 13B esitetyistä tiedoista..

Taulukko 13A

EDTA:lla täydennetyn nisiinin bakterisidiaktiivisuuden kinetiikka Streptococcus mutansia kohtaan

Inkubointi- aika (minuuttia)	Nisiini $\mu\text{g/ml}$ sekä 1,0 mM EDTA:a					
	0	1	3	10	30	100
	Eloonjäämis-% 2 h:n kuluttua <sup>a</sup>					
0.5	-	-	-	-	-	$<10^{-4}$
1	-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
3	100	0.5	0.002	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-
15	-	0.03	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-	-
30	-	-	$<10^{-4}$	-	-	-
60	100	0.003	-	-	-	-

<sup>a</sup> elinkykyisten solujen vertailulukumäärä:  $1,0 \times 10^7$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin 20 mM:ssa Tris-HCl, pH:ssa 7,3, 37°C:ssa.

Taulukko 13B

EDTA:lla parannetun nisiinin nopea bakterisidiaktiivisuus Escherichia colia kohtaan

mM EDTA	Nisiini $\mu\text{g/ml}$						
	0	0.3	1.0	3	10	30	100
	Eloonjäämis-% 1 min:ssaa						
1.0	100	100	56	0.37	0.013	0.015	0.008

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä:  $1,0 \times 10^7$  cfu/ml

Inkuboinnit suoritettiin 20 mM:ssa Tris, pH 7,0, 37°C:ssa.

#### Esimerkki 14

#### Kaksiarvoisten kationien vaikutus EDTA:n avulla tapahtuvaan nisiinin aktiivisuuden lisäämiseen

Kaksiarvoiset kationit sitoutuvat EDTA:an ja muihin kelatoiviin aineisiin ja niiden voisi odottaa neutraloivan nisiinin aktivoimista EDTA:lla. Kuten taulukossa 14 olevista tiedoista voi kuitenkin nähdä, nisiinin bakterisidiaktiivisuus S. mutansia kohtaan lisääntyy 1 mM:lla EDTA:a jopa silloin kun läsnä on 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ioneja; vain 3 mM:n yläpuolella oli  $\text{Ca}^{2+}$ -ioni inhiboiva EDTA:lla aktivoitulle nisiinille. Tämä on erityisen tärkeää suuvesissä käytettäessä, jolloin kalsiumionikonsentraatiot ovat relevantteja.

TAULUKKO 14

#### EDTA:lla aktivoitun nisiinin nopea bakterisidivaikutus Streptococcus mutansia kohtaan kahdenarvoisen kationin läsnäollessa

Nisiini	$\text{CaCl}_2$ mM					
	0	0.1	0.3	1.0	3	10
	Eloonjäämis-% 1 min:ssa <sup>a</sup>					
0	100					
3	2.9					
3 <sup>E</sup>	0.0042	0.0042	0.052			18
30 <sup>E</sup>	0.0019		0.0003	0.0004	0.06	6.8
100 <sup>E</sup>	$<10^{-4}$		$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	0.0001	1.5

E 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA:a

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä 1,0x10<sup>2</sup> cfu/ml.

Inkuboinnit suoritettiin 10 % sikiövasikan seerumissa 37°C:ssa.

#### Esimerkki 15

#### Nisiinin ja pinta-aktiivisen aineen vaikutus gram-positiivisiin bakteereihin

Nisiinin bakterisidiaktiivisuutta voidaan myös merkittävästi lisätä yhdistämällä pelkkään pinta-aktiiviseen aineeseen. Tätä kuvataan parhaiten rajoitetulla nisiinikonsentraatiolla (0,2 µg/ml), kuten taulukossa 15A on esitetty. Aina konsentraatioihin 0,1 % saakka oli ruokaan sopivalla pinta-aktiivisellä aineella monolauriinilla vähän bakterisidivaikutusta Streptococcus agalactiae vastaan kompleksikasvualustassa maidossa. Myöskään nisiinillä ei konsentraatioilla aina 0,2 µg/ml:aan saakka myöskään ole merkittävää bakterisidivaikutusta maidossa. Näiden kahden aineen yhdistelmä, 0,1% monolauriinia ja nisiiniä 0,2 µg/ml, on kuitenkin äärimmäisen potentiaalinen S. agalactiae-bakteeria kohtaan. Tämä bakterisidi on yli 100 kertaa aktiivisempi kuin voisi odottaa lisävaikutuksesta, ja 10 000 kertaa aktiivisempi kuin kumpikaan komponentti yksinään. Niinpä kun nisiinin käyttöä rajoittaa sen käytettävissä oleva aktiivisuus, voidaan bakterisidin, joka sisältää nisiiniä sekä pinta-aktiivista ainetta, odottaa olevan käyttökelpoisempi.

Esimerkki siitä, kun nisiininkäyttöä rajoittaa sen käytettävissä oleva aktiivisuus, on esitetty taulukossa 15B olevissa tiedoissa. Vaikka nisiini, ja erityisesti bakterisidi, joka sisältää nisiiniä ja EDTA:a, on bakterisidinen L. monocytogenesiä vastaan, taulukon 15B tiedot osoittavat, että kompleksikasvualustassa kuten maidossa käytettävissä oleva nisiinin aktiivisuus tälle organismille on rajoitettu. Nisiiniä glyseridin, mono-oleaatin kanssa sisältävä bakterisidi on

kuitenkin tehokas maidossa tälle ruokaperäiselle patogeenille vaikka mono-oleaatilla ei sellaisenaan ole bakterisidiaktiivisuutta tähän organismiin.

Taulukko 15A

Nisiinin bakterisidiaktiivisuus Streptococcus agalactiaeen maidossa 37°C:ssa  
(Nisiinin aktivointi monolauriinilla)

Nisiini ( $\mu$ g/ml)	Monolauriini (%)		
	0	0.01	0.1
	Eloonjäämis-% 2 h:ssa <sup>a</sup>		
0	100	100	4.5
0.02	100	100	0.2
0.2	2.2	0.05	0.0008

<sup>a</sup> alkuperäinen elinkykyisten lukumäärä  $6,0 \times 10^7$  cfu/ml.  
Inkubointi maidossa 37°C:ssa

Taulukko 15B

Nisiinin bakterisidiaktiivisuus Listeria monocytogenesiin maidossa 37°C:ssa  
(Nisiinin aktivointi mono-oleaatilla)

Nisiini ( $\mu$ g/ml)	% Mono-oleaattia		
	0	0.1	1.0
	Eloonjäämis-% 2 h:ssa <sup>a</sup>		
0	100	67	63
100	0.56	$10^{-3}$	$10^{-4}$

<sup>a</sup> alkup. elinkyk. lukum.:  $5,0 \times 10^7$  cfu/ml. Inkubointi maidossa lämpötilassa 37°C.

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Koostumus, joka on käyttökelpoinen laaja-alaisena bakteriosidina, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lantioniinipitoista bakteriosiinia ja kelatoivaa ainetta ja vaihtoehtoisesti pinta-aktiivista ainetta.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että lantioniinipitoinen bakteriosiini on nisiini, subtiliini, epidermiini, sinnamysiini, duramysiini, ankoveniini tai Pep 5.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että kelatoiva aine on alkyylidiamiinitetra-asetatti, CaEDTA, Na<sub>2</sub>EDTA, EGTA tai sitraatti.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että alkyylidiamiinitetra-asetatti on EDTA ja bakteriosiini on nisiini.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että pinta-aktiivinen aine on nonioninen pesuaine, joka on johdettu nonoksinolista, oktoksinolista ja tyloksopolista, nonioninen pesuaine, joka käsittää polyoksietyleen-(20)sorbitaanimonorasvahappojohdannaisia, glyseridi, rasvahappo, emulgaattori, kvarternaarinen yhdiste, amfoteerinen tai anioninen pinta-aktiivinen aine.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää myös ruoan säilöntäaineen.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että lantioniinipitoinen bakteriosiini on nisiini, subtiliini, epidermiini, sinnamysiini, duramysiini, ankoveniini tai Pep 5, ja kelatoiva aine on alkyylidiamiinitetra-asetatti, EGTA tai sitraatti, jotka ovat läsnä sellaisina määrinä, että bakteriosidin tehokkuus on lisääntynyt ainakin yhdenlaisia bakteereita kohtaan ryhmästä Staphylococcus aureus, Streptococ-

cus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, Coryneform-bakteerit, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacteriocides gingivalis ja Actinobacillus actionomycetescomitans.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että nisiinin pitoisuus on välillä noin 0,1 - 300 µg/ml, ja kelatoivan aineen pitoisuus on välillä noin 0,1 - 20 mM.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että pinta-aktiivisen aineen pitoisuus on välillä noin 0,01 - 1,0%.

#### PATENTTKRAV

1. En sammansättning, som är användbar som en bred-spektrum baktericid, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en lantioninhaltig bakteriocin och ett chelaterande ämne och alternativt ett ytaktivt ämne.

2. En sammansättning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den lantioninhaltiga bakteriociden är nisin, subtilin, epidermin, sinnamycin, duramycin, ancovenin eller Pep 5.

3. En sammansättning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att det chelaterande ämnet är alkyldiamintetraacetat, CaEDTA, Na<sub>2</sub>EDTA, EGTA eller citrat.

4. En sammansättning enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att alkyldiamintetra-acetatet är EDTA och bakteriocinen är nisin.

5. En sammansättning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ytaktiva ämnet är ett nonioniskt tvättmedel som är deriverad av nonoxinol, oktoxinol och tyloxopol, ett nonioniskt tvättmedel som innefattar polyoxietylen(20)-

sorbitanmonofettsyraderivater, en glycerid, en fettsyra, ett emulgeringsmedel, en kvartärförening, ett amfoteriskt eller en anjoniskt ytaktivt ämne.

6. En sammansättning enligt patentkrav 1-5, k ä n n e t e c k n a d därav, att den ytterligare innehåller ett livsmedelskonserveringsämne.

7. En sammansättning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den lantioninhaltiga bakteriocinen är nisin, subtilin, epidermin, sinnamycin, duramycin, ancovenin och Pep 5, och det chelaterande ämnet är alkyldiamintetra-acetat, EGTA eller citrat, är närvarande i sådana mängder att baktericidens verkan har ökat mot åtminstone en bakterietyp i gruppen bestående av Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, Coryneform-bakterie, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Bacteriocides gingivalis och Actinobacillus actinomycetemcomitans.

8. En sammansättning enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att koncentrationen av nisin är mellan ca. 0,1 - 300,0  $\mu\text{g/ml}$ , och koncentrationen av chelaterande ämne är mellan ca. 0,1 - 20 mM.

9. En sammansättning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ytaktiva ämnets koncentration är mellan ca. 0,01% och 1,0%.