

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5345781号  
(P5345781)

(45) 発行日 平成25年11月20日(2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月23日(2013.8.23)

(51) Int. Cl.	F I		
AO1N 63/00 (2006.01)	AO1N 63/00		D
AO1N 63/02 (2006.01)	AO1N 63/02		E
AO1P 3/00 (2006.01)	AO1P 3/00		
C12N 9/28 (2006.01)	C12N 9/28	ZNA	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00		A

請求項の数 26 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2007-531293 (P2007-531293)  
 (86) (22) 出願日 平成17年9月7日(2005.9.7)  
 (65) 公表番号 特表2008-512468 (P2008-512468A)  
 (43) 公表日 平成20年4月24日(2008.4.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/031813  
 (87) 国際公開番号 W02006/031554  
 (87) 国際公開日 平成18年3月23日(2006.3.23)  
 審査請求日 平成20年8月21日(2008.8.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/608,535  
 (32) 優先日 平成16年9月10日(2004.9.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500132074  
 ノボザイムス ノース アメリカ、インコーポレイティド  
 アメリカ合衆国、ノース カロライナ 27525、フランクリントン、ペリー チャペル チャーチ ロード 77  
 (73) 特許権者 500586299  
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ  
 デンマーク国、デーコー 2880 バグスバエルト、クロシェイバイ 36  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルムの防止、除去、低減又は破壊方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- アミラーゼと表面とを接触させることを含んで成る、前記表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、低減するか又は破壊するための方法において、当該 - アミラーゼが、

(a) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて、位置D183及び/又はG184の欠失を含む - アミラーゼ;

(b) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて、位置N195Fの置換並びに位置D183及び/又はG184の欠失を含む - アミラーゼ;

(c) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて、位置D183+G184の欠失を含む - アミラーゼ;

(d) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて、位置R118K、N195F、R320K及びR458Kから成る群から選択される1又は複数の置換を含みそして位置D183及びG184の欠失を有する - アミラーゼ;

から選択される、ことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有し、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184の欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184の欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184における欠失を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184における欠失を含み、R118K、N195F、R320K、R458Kの 1 又は複数の置換を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 - アミラーゼが、次の変異： (D183+G184)+R118K+N195F+R320K+R458Kを有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184における欠失を含み、更に位置N195Fの置換を有する、請求項 1 に記載の方法

20

【請求項 8】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び / 又はG184における欠失を含み、更にその N - 末端アミノ酸領域にAsn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trpを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記表面を、1 分間 ~ 2 日間接触させる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記表面を、更に界面活性剤と接触させる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 11】

前記 - アミラーゼを、0.005 ~ 500 mg酵素タンパク質/Lの濃度で使用する、請求項 1 ~ 10のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 - アミラーゼが、40 g 澱粉当たり 3mgの酸素タンパク質、pH8.0での 5 時間後、15%以上の加水分解された澱粉を有する請求項 1 ~ 11のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 13】

アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インペルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、又はキシラナーゼから成る群から選択される酵素と接触させることを更に含む、請求項 1 ~ 12のいずれか 1 項に記載の方法。

50

## 【請求項14】

分散剤、界面活性剤、抗菌剤及び殺生物剤から成る群から選択された1又は複数の剤を前記表面に接触させることを更に含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項15】

前記表面が、硬質、軟質又は多孔性表面である請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項16】

前記表面が膜である請求項15に記載の方法。

## 【請求項17】

前記バイオフィルムの除去を10～70の温度で行う、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。 10

## 【請求項18】

表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、低減するか又は破壊するための方法において、当該方法は - アミラーゼと前記表面とを接触させることを含んで成り、そして当該 - アミラーゼが、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有し、かつ、配列番号2の番号付けを用いて、位置D183及び/又はG184における欠失を含むアミノ酸配列を含んでなる、ことを特徴とする方法。

## 【請求項19】

プロテアーゼ及び - アミラーゼと表面とを接触させることを含んで成る、前記表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、低減するか又は破壊するための方法において、当該 - アミラーゼが、 20

(a) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて位置D183及び/又はG184の欠失を含む - アミラーゼ；

(b) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて位置N195Fの置換並びに位置D183及び/又はG184の欠失を含む - アミラーゼ；

(c) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて位置D183 + G184の欠失を含む - アミラーゼ； 30

(d) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号2の番号付けを用いて位置R118K、N195F、R320K及びR458Kから成る群から選択される1又は複数の置換を含みそして位置D183及びG184の欠失を有する - アミラーゼ；

から選択される、ことを特徴とする方法。

## 【請求項20】

前記表面に、第2の - アミラーゼを接触させる工程を更に含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項21】

前記第2の - アミラーゼが、バシルス・フラボサーミス (*Bacillus flavothermis*) 又はバシルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) に由来する、請求項20に記載の方法。 40

## 【請求項22】

前記 - アミラーゼが、配列番号2の番号付けを用いて、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして位置D183及び/又はG184における欠失を有する、請求項19に記載の方法。

## 【請求項23】

前記 - アミラーゼが、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号2の番号付けを用いて、位置D183及び/又はG184における欠失、及び位置N195Fの置換を含む、請求項19に記載の方法。 50

## 【請求項 2 4】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183+G184の欠失を含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成り、かつ、配列番号 2 の番号付けを用いて、位置D183及び/又はG184における欠失に加えて、R118K、N195F、R320K、R458Kの 1 又は複数の置換を更に含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

前記 - アミラーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、そして配列番号 2 の番号付けを用いて、位置R118K、N195F、R320K及びR458Kから成る群から選択される 1 又は複数の置換を含みそして位置D183及び/又はG184の欠失を有する、請求項19に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野：

本発明は、表面上でのバイオフィーム形成の防止、除去、低減又は破壊の改良された方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

関連技術の記載：

バイオフィームは、固体表面上への微生物細胞の吸着から水性環境における生物又は非生物物体の表面で成長し、そして存続する生物学的フィルムである。この吸着は、微生物に対して競争利点を提供することができる。なぜならば、それらの微生物は、再生でき、広範囲の種類の栄養物及び酸素条件に接近でき、洗浄除去されず、そして抗菌剤に対して低い感受性であるからである。

## 【0003】

バイオフィームの形成はまた、水充填された空間により分離された、分化された構造体の厚い層を細胞と一緒に形成するエキソポリマー材料（多糖、ポリウロン酸、アルギネート、糖タンパク質及びタンパク質）の生成により達成される。存在する微生物は、好気性及び嫌気性細胞、藻類、原生類及び菌類を包含する、個々の種の微生物細胞又は混合された微生物細胞群であり得る。従って、バイオフィームは、存在する微生物により分泌される 1 又は複数のマトリックスポリマーから構成される有機構造体に埋封される生存微生物の複雑なアセンブリーである。

## 【0004】

バイオフィームは、肉眼で見える構造体中に、数ミリ又は数センチの厚さで進行し、そして大きな表面積を満たす。それらの形成は、衛生工事システムにおける流れを制限するか又は完全に阻止し、熱交換体における熱トランスファーを低めるか、又は自治体の水供給、食品加工、医学装置（例えば、カテーテル、歯科矯正用装置、移植物、内視鏡）において病原問題を引起すことにおいて役割を演じることができる。さらに、バイオフィームはしばしば、埋封される微生物により介在される腐蝕作用を通して材料の寿命を低める。

## 【0005】

この生物学的付着物は、産業用水処理システム、製紙製造工程、冷却水システム、油回収のための注入壁、冷却塔、多孔性培地（砂及び土壌）、海洋環境、及び空調システム、及びいずれかの密閉された水再循環システムにおいて重大な経済問題である。バイオフィームはまた、歯のプラークを引起す医学及び産業、感染（Costertonなど., 1999, Science 284: 1318-1322）、汚染された内視鏡及びコンタクトレンズ、補綴装置のコロニー化、及び医薬用移植片上でのバイオフィーム形成において、いくつかの問題でもある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

バイオフィルムの除去又は防止は従来、分散剤、界面活性剤、洗剤、酵素配合物、抗菌剤、殺生物剤、煮沸処置、及び/又は腐蝕化学物質、例えば塩基の使用を必要とする。それらの処置を用いるための手順は当業界において良く知られている。例えば、製紙産業における抄紙機に構築されるバイオフィルムの除去は従来、沈着物調節プログラム、例えばスプラッシュされた配合生地を有さないよう表面を維持するための適切な管理、新鮮な水及び添加剤の抗菌処理、機械上での微生物増殖を低めるためへの殺生物剤の使用、及び形成する沈着物を除去するための予定された煮沸の使用を必要とする。

## 【 0 0 0 7 】

バイオフィルムにおいて増殖する細菌は、プランクトン性細胞よりも抗生物質及び殺菌剤に対して、より耐性であり、そしてその耐性はバイオフィルムの熟成と共に上昇する。細菌バイオフィルムはまた、乾燥、極端な温度又は光に対して高められた物理的耐性を示す。言及されたように、バイオフィルム形成は、産業的、環境的及び医学的問題を引起し、そして化学薬品による細菌バイオフィルムの洗浄及び消毒における困難性が多くの産業において主な関心である。さらに、それらの環境衝撃を低めるためにより軽い消毒及び洗浄組成物への傾向が、バイオフィルムにより被覆される表面の不十分な洗浄を高めることができる。

## 【 0 0 0 8 】

表面上に存在するバイオフィルムを防止するか又は除去するための改良された方法を提供することが本発明の目的である。

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 0 9 】

発明の要約：

本発明は、細菌由来の - アミラーゼと表面とを接触することを含んで成る、前記表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、低減するか又は破壊するための方法に関する。

## 【 0 0 1 0 】

用語“表面”とは、バイオフィルムにより被覆され得るか、又はバイオフィルム形成を受けやすいいずれかの表面として本明細書において定義される。表面の例は、いずれかの硬質表面、例えばペイント又はエナメルにより、任意には被覆される、金属、プラスチック、ゴム、板、ガラス、木材、紙、コンクリート、石、大理石、石膏及びセラミック材料；いずれかの硬質表面、例えばいずれかの種類の繊維（例えば、糸、布、植物繊維、ロックウール及び髪）；又はいずれかの多孔性表面；皮膚（ヒト又は動物）；ケラチン性材料（例えば、爪）；及び内部器官（例えば、肺）であり得る。硬質表面は、冷却塔、水処理プラント、水槽、酪農場、食品加工プラント、化学又は医薬製造プラント又は医薬装置（例えば、整形外科用装置、移植物）の一部として存在することができる。多孔性表面は、フィルター、例えば膜フィルターに存在することができる。

## 【 0 0 1 1 】

用語“有効量”とは、 - 1, 4 - グルコシド結合を含んで成る、微生物により生成されたバイオフィルムを分解するのに十分な1又は複数の - アミラーゼの量として、本明細書において定義される。1又は複数の - アミラーゼの有効量は、次の要因、例えば表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか又は低めるかどうかの問題の - アミラーゼ、微生物により生成されたバイオフィルムを分解するための所望する時間に依存するであろう。高い量/濃度の酵素は一般的に、より短い処理時間を必要とし、ところが低い量/濃度の酵素はより長い時間を必要とする。さらに、例えばバイオフィルム形成を受けやすい表面上のバイオフィルムの防止は一般的に、その対応する汚染された表面からのバイオフィルムの実際の除去よりも低い量/濃度の酵素を必要とするであろう。

## 【 0 0 1 2 】

しかしながら、典型的な有効量レベルは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005 ~ 500mgの - アミラーゼ、好ましくは0.01 ~ 100mgの酵素タンパク質である。用語“バイオフィ

10

20

30

40

50

「ルム対照溶液」とは、表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、低減するか又は破壊するために本発明に使用される溶液を言及する。本発明の方法は、下記例4に示される条件下で平均プレート計数に関して、 $10 \sim 10^8$ 倍、好ましくは $10^3 \sim 10^6$ 倍のバイオフィルム低減をもたらすことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

発明の特定の記載：

本発明は、有効量の下記に定義されるような - アミラーゼと表面とを接触することを含んで成る、その表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、除去するか、又は低減するための改良された方法を言及する。本発明の方法は、表面上でのバイオフィルム形成を防止するか、除去するか、低減するか、又は破壊するために使用され得る。当業者は、そのような方法がバイオフィルム形成の種々の段階で使用され得ることを理解するであろう。

10

【0014】

有効量での - アミラーゼを用いることにより、表面改良されたバイオフィルム防止及び/又は除去が、バイオフィルムに存在するいくつかの微生物が、 - 1, 4 結合されたグルコース多糖類、例えばアミロース、アミロペクチン、それらの2種の多糖類の混合物(すなわち、澱粉)、及びグリコーゲンを生成するそれらの場合に特に得られる。

第1の観点においては、本発明は、細菌由来の - アミラーゼと表面とを接触することを含んで成る、前記表面上に存在するバイオフィルムを防止するか、又は除去するための方法に関する。好ましい態様においては、細菌 - アミラーゼは、バシルスの株に由来する。

20

【0015】

- アミラーゼ：

本発明において使用される - アミラーゼは、細菌、好ましくはバシルスsp.株に由来し、特にW000/60060号において配列番号2として開示されるAA560 - アミラーゼ、アメリカ特許出願番号10/877,847号に開示されるバシルス・フラボサーマス (*Bacillus flavo thermus*)、W095/26397号に開示されるバシルスsp. - アミラーゼ、バシルスsp. NCIB 12289、NCIB 12512、NCIB 12513、DSM 9375、DSMZ番号12649、KSM AP1378 (WO 97/00324)、KSM K36又はKSM K38 (EP1,022,334)に由来する - アミラーゼ、及びTsukamoto など、Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), pp. 25-31により開示される#707 - アミラーゼから成る群から選択される。

30

【0016】

本発明の好ましい特定の態様においては、 - アミラーゼは、配列番号2で示されるAA560 - アミラーゼ、及び/又は配列番号4で示されるAMY1048 - アミラーゼ、又は配列番号2又は4で示されるいずれかの配列に対して、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有する - アミラーゼである。

【0017】

好ましい態様においては、使用される - アミラーゼは、位置D183及び/又はG184で欠失を有する配列番号2で開示される親 - アミラーゼの変異体であり、好ましくは前記 - アミラーゼ変異体はさらに、位置N195Fにおいて、又はそれに対応する置換を有し、特に前記親 - アミラーゼは、配列番号2において次の1又は複数の欠失/置換：(R81-G182); (D183-G184); (D183-G184)+N195F; R181Q+N445Q+K446N; (D183-G184)+R181Q、(D183-G184)、及び1又は複数の次の置換：R118K、N195F、R320K、R458Kを有し、特に前記親 - アミラーゼは、次の突然変異を有する。

40

【0018】

(D183+G184)+R118K+N195F+R320K+R458K (すなわち、配列番号2における)。

もう1つの好ましい態様においては、 - アミラーゼは、配列番号2で示されるAA560

50

- アミラーゼ、又は1又は複数の次の置換：M9L、M202L、V214T、M323T、M382Y又はM9L、M202L、V214T、M323T及びE345R含んで成るその変異体である。

【0019】

好ましい態様においては、-アミラーゼは、40、g澱粉当たり3mgの酸素タンパク質、pH8.0での5時間後、15%以上、好ましくは25%、特に35%の加水分解された澱粉を有する(例2及び図1を参照のこと)。

もう1つの好ましい態様においては、-アミラーゼは、そのN-末端アミノ酸領域にAsn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trpを含んで成る。そのような-アミラーゼの例は、例2において使用される-アミラーゼA及び-アミラーゼBを包含する。

【0020】

1つの態様においては、-アミラーゼは、配列番号6として示される配列を有するパシルス・リケニホルミス株に由来し、又は配列番号6で示されるいずれかの配列に対して、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、例えば95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有し、好ましくは、位置M197、好ましくはM197L、T、I、N、D、Q、E、P、W、特にM197L又はTに対応する位置に置換を有する-アミラーゼである。

【0021】

商業的に入手できる-アミラーゼ製品、又は-アミラーゼを含んで成る製品は、次の商標名で市販されている製品を包含する：STAINZYME™、DURAMYL™ (Novozymes A/S, Denmark)、BIOAMYLASE D(G)、BIOAMYLASE™ L (Biocon India Ltd.)、KEMZYM™ AT 9000 (Biozym Ges. m.b.H, Austria)、PURASTAR™ ST1 PURASTAR™ HPAmL1 PURAFECT™ OxAm, RAPIDASE™ TEX (Genencor Int. Inc, USA)、KAM (KAO, Japan)。

【0022】

好ましい態様においては、バイオフィーム形成を受けやすい表面は、いずれかのバイオフィーム形成の前、防止処置として本発明の方法にゆだねられ得、その結果、バイオフィームは形成しない。他方では、バイオフィーム形成の最初の指摘で、前記方法は、さらなる形成を防止し、そして表面上に沈着されたバイオフィームを除去するために使用され得る。さらに、表面上にバイオフィームの重度の構築が存在する状況においては、前記方法は、バイオフィームのレベルを低めるために、又はそれを部分的に又は完全に除去するために使用され得る。

【0023】

バイオフィームは、1又は複数の微生物及び優先的には、特定の微生物の統合された群を含んで成ることができる(Palmer and White, 1997, Trends in Microbiology 5: 435-440; Costerton et al., 1987, Annual Reviews of Microbiology 41: 435-464; Mueller, 1994, TAPPI Proceedings, 1994 Biological Sciences Symposium 195-201)。本発明の方法においては、1又は複数の次の微生物が、バイオフィーム形成に包含されるいずれかの微生物であり得る：好気性細菌又は嫌気性細菌(グラム陽性及びグラム陰性)、菌類(酵母又は糸状菌)、藻類、及び/又は原生動物(但し、それらだけには限定されない)。

【0024】

企画される細菌は、シュードモナス spp. (Pseudomonas spp.)、例えばシュードモナス・アエルギノサ (Pseudomonas aeruginosa)、アゾトバクター・ピネランジ (Azotobacter vinelandii)、エスシリシア・コリ (Escherichia coli)、コリネバクテリウム・ジフテリアエ (Corynebacterium diphtheriae)、クロストリジウム・ボツリニウム (Clostridium botulinum)、ストレプトコカス spp. (Streptococcus spp.)、アセトバクター (Acetobacter)、レウコノストック (Leuconostoc)、ベタバクテリウム (Betabacterium)、プネウモコシ (Pneumococci)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス (Mycobacterium tuberculosis)、アエロモナス (Aeromonas)、ブルホルデリエ (Burkholderie)、フラボバクテリウム (Flavobacterium)、サルモネラ (Salmonella)、スタフィロコカス (St

10

20

30

40

50

aphylococcus) から成る群から選択された細菌を包含する。

【 0 0 2 5 】

好ましい態様においては、微生物は、好気性細菌である。より好ましい態様においては、好気性細菌はアエロモナス (*Aeromonas*) 株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はブルホルデリエ (*Burkholderie*) 株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はフラボバクテリウム株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はマイコバクテリウム株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はシュードモナス株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はサルモネラ株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌はスタフィロコカス株である。もう1つのより好ましい態様においては、好気性細菌は、エンテロバクテリアセアエ (*Enterobacteriaceae*) 科 (例えば、*E. コリ*を包含する) からである。

10

【 0 0 2 6 】

最も好ましい態様においては、好気性細菌は、ブルホルデリエ・カパシエ (*Burkholderie capacia*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、マイコバクテリウム・インペリアレ (*Mycobacterium imperiale*) 又はマイコバクテリウム・ツベルキュロシスである。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、シュードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、シュードモナス・フルオレスセンス (*Pseudomonas fluorescens*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) である。

20

【 0 0 2 7 】

もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、サルモネラ・エンテリチジス (*Salmonella enteritidis*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、スタフィロコカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) である。もう1つの最も好ましい態様においては、好気性細菌は、スタフィロコカス・エピダーミジス (*Staphylococcus epidermidis*) である。

【 0 0 2 8 】

もう1つの好ましい態様においては、微生物は嫌気性細菌である。もう1つのより好ましい態様においては、嫌気性細菌は、デスルフォビブリオ (*Desulfovibrio*) 株である。もう1つの最も好ましい態様においては、嫌気性細菌はデスルフォビブリオ・デスルフリカンス (*Desulfovibrio desulfuricans*) である。

30

もう1つの好ましい態様においては、微生物は、カンジダ (*Candida*) 株である。もう1つの最も好ましい態様においては、酵母はカンジサ・アルピカンス (*Candida albicans*) である。

【 0 0 2 9 】

上記に言及されるように、バイオフィルムを防止するか又は除去するための処理時間は、  
 - アミラーゼの用量、及び表面上のバイオフィルムのレベル又は問題の領域に受けやすいバイオフィルムのレベルに依存するが、しかし好ましくは、抗生物質、殺生物剤、殺菌剤、殺真菌剤、漂白剤、界面活性剤、苛性アルカリ、及び/又はパイオポリマー分解剤によるバイオフィルムの従来の処理のために通常、使用される時間に適合されるべきである。結果的に、  
 - アミラーゼの用量は、従来の処理の間、使用される時間に従って調節され得る。しかしながら、  
 - アミラーゼ処理が加工において別の段階である場合、使用される  
 - アミラーゼの用量は、処理を完結するために所望される時間に依存するであろう。

40

【 0 0 3 0 】

- アミラーゼ活性に関しては、バイオフィルムを防止するか又は除去するための  
 - アミラーゼの適切な用量は、表面上のバイオフィルムの量又は問題の領域に受けるパイオ

50



フィルムの量に依存するであろう。当業者は、適切な - アミラーゼ単位用量を決定することができる。その用量は、 - アミラーゼ単位で表され得る。 - アミラーゼ単位は、下記“材料及び方法”のセクションに記載されるアッセイを用いて、“KNU”として決定され得る。バイオフィルム汚染された又は受けやすい領域は好ましくは、1分～2日、好ましくは10分～1日、好ましくは1～15時間、より好ましくは10時間以下、処理され、そして - アミラーゼ用量は、バイオフィルム対照溶液L当たり0.005～500mgの - アミラーゼタンパク質、好ましくはバイオフィルム対照溶液L当たり0.01～100mgの - アミラーゼタンパク質である。

#### 【0031】

- アミラーゼは、本発明の方法に使用される組成物の一部であり得る。組成物は、問題の使用のために適切ないずれかの形で、例えば乾燥粉末、凝集された粉末又は粒質物、特に無粉塵性粒質物、液体、特に安定化された液体、又は保護された - アミラーゼの形で存在することができる。粒質物及び凝集された粉末は従来の方法、例えば流体層粗砕機においてキャリアー上に - アミラーゼを噴霧することにより調製され得る。キャリアーは、適切な粒子サイズを有する粒状コアから成る。

10

#### 【0032】

キャリアー、例えば塩（例えば、塩化ナトリウム又は硫酸ナトリウム）、糖（例えば、スクロース又はラクトース）、糖アルコール（例えば、ソルビトール）又は澱粉は、可溶性又は不溶性であり得る。 - アミラーゼは、遅効性配合物に含まれ得る。遅効性配合物の調製方法は、当業界において良く知られている。液体 - アミラーゼ調製物は例えば、栄養的に許容できる安定剤、例えば糖、糖アルコール又は他のポリオール、及び/又は乳酸又は他の有機酸を添加することにより、確立された方法に従って安定化され得る。

20

#### 【0033】

組成物は、バイオフィルムの形成を防止するか又は除去するために1又は複数の剤により増大され得る。それらの剤は、分散剤、界面活性剤、洗剤、他の酵素、抗菌剤及び殺生物剤を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

好ましい態様においては、前記剤は界面活性剤である。界面活性剤は、非イオン性、半極性及び/又はアニオン性及び/又はカチオン性、及び/又は両性イオン界面活性剤であり得る。

#### 【0034】

企画されるアニオン性界面活性剤は、線状アルキルベンゼンスルホネート、 - オレフィンスルホネート、アルキルスルフェート（脂肪アルコールスルフェート）、アルコールエトキシスルフェート、第二アルカンスルホネート、 - スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル - 又はアルケニル琥珀酸又はソープを包含する。

30

#### 【0035】

企画される非イオン性界面活性剤は、アルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノオキシド、エトキシ化された脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド、又はグルコサミンのN - アシルN - アルキル誘導体（グルカミド）を包含する。

40

#### 【0036】

界面活性剤は、酵素バイオフィルム除去組成物の0.1～60重量%のレベルで存在することができる。

より好ましい態様においては、界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、第四アンモニウム化合物、アルキルピリジニウムヨウジド、Tween80, Tween85, Triton X-100, Brij56, 生物学的界面活性剤、ラムノ脂質、サーファクチン、ビスコンシン又はスルホネートである。

#### 【0037】

バイオフィルムの形成は一般的に、水充填された空間により分離される、分化された構造体の厚い層を、細胞と一緒に形成する、エキソポリマー材料（多糖、ポリウロン酸、ア

50

ルギネート、糖タンパク質及びタンパク質)の生成により達成される(McEldowney and Fletcher, 1986, Journal of General Microbiology 132: 513-523; Sutherland, Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell, Academic Press, New York, 1977, pp. 27-96)。本発明の方法においては、        -アミラーゼ組成物はさらに、エキソ-ポリマー材料、例えば多糖、ポリウロン酸、アルギネート、糖タンパク質及びタンパク質を分解できる、1又は複数の他の酵素を含んで成る。

【0038】

他の酵素活性:

好ましい態様においては、1又は複数の他の酵素が、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリン、グリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、        -ガラクトシダーゼ、        -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、        -グルコシダーゼ、        -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インバーターゼ、オキシダーゼ、例えば炭水化物オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ又はキシラーナーゼから成る群から選択され得る。

【0039】

他の酵素は、除去されるべき特定のバイオフィルムの性質に従って選択され得るか、又は異なった酵素活性を有するいくつかの酵素の組合せが使用され得る。

好ましい態様においては、他の酵素は、1, 2 - 1, 3 -         -D-マンナンマンノヒドロラーゼ、1, 3 -         -D-キシランキシラノヒドロラーゼ、1, 3 -         -D-グルカングルカノヒドロラーゼ、1, 3 - (1, 3; 1, 4) -         -D-グルカン3 - グルカノヒドロラーゼ、1, 3 (1, 3; 1, 4) -         -D-グルカン3 (4) - グルカノヒドロラーゼ、1, 3 - 1, 4 -         -D-グルカン4 - グルカノヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-グルカングルカンヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-グルカングルコヒドロラーゼ、1, 4 - (1, 3; 1, 4) -         -D-グルカン4 - グルカノヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-グルカングルコヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-キシランキシラノヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-マンナンマンナノヒドロラーゼ、1, 5 -         -L-アラビナン1, 5 -         -L-アラビナノヒドロラーゼ、1, 4 -         -D-グルカンマルトヒドロラーゼ、1, 6 -         -D-グルカン6 - グルカノヒドロラーゼ、2, 6 -         -D-フルクタンフルキタノヒドロラーゼ、        -D-デキストリン6 - グルカノヒドロラーゼ、        -D-ガラクトシドガラクトヒドロラーゼ、        -D-グルコシドグルコヒドロラーゼ、        -D-マンノシドマンノヒドロラーゼ、アシルネウラミニルヒドロラーゼ、アエロバクター-莢膜多糖ガラクトヒドロラーゼ、        -D-フルクトフラノシドフルクトヒドロラーゼ、        -D-フコシドフコヒドロラーゼ、        -D-フルクタンフルクトヒドロラーゼ、        -D-ガラクトシドガラクトヒドロラーゼ、        -D-グルコシドグルコヒドロラーゼ、        -D-グルクロノシドグルクロノソヒドロラーゼ、        -D-マンノシドマンノヒドロラーゼ、        -N-アセチル-D-ヘキソサミニドN-アセチルヘキソサミノヒドロラーゼ、セルロース-スルフェートスルホヒドロラーゼ、コラゲナーゼ、デキストリン6 -         -D-グルカノヒドロラーゼ、糖タンパク質-ホスファチジルイノシトールホスファチドヒドロラーゼ、ヒアルロネート4 - グルカノヒドロラーゼ、ヒアルロノグルクロニダーゼ、ペクチンペクチルヒドロラーゼ、ペプチドグリカンN-アセチルムラモイルヒドロラーゼ、ホスファチジルコリン2 - アシルヒドロラーゼ、ホスファチジルコリン1 - アシルヒドロラーゼ、ポリ(1, 4 -         -D-ガラクトツロニド)         ガラクトツロノヒドロラーゼ、ポリ(1, 4 - (N - アシル -         -D-グルコサミニド)) - グリカノヒドロラーゼ、スクロース - グルコシダーゼ、トリアシルグリセロールアシルヒドロラーゼ及びトリアシルグリセロールタンパク質 - アシルヒドロラーゼから成る群から選択される。

【0040】

タンパク質分解酵素:

他の酵素は、実際の加工条件下でタンパク質分解活性を有するいずれかの酵素であり得る。従って、酵素は、植物起源のタンパク質分解酵素、例えばパイン、プロメライン、フィシン、又は動物起源のタンパク質分解酵素、例えばトリプシン及びキモトリプシン、又は微生物、すなわち細菌、酵母又は糸状菌起源のタンパク質分解酵素であり得る。種々のタンパク質分解酵素のいずれかの混合物が、本発明の方法に適用できることは理解されている。

【0041】

もう1つの好ましい態様においては、他の酵素はタンパク質分解酵素、例えばセリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼ又はアスパラギン酸プロテアーゼである。

【0042】

セリンプロテアーゼのサブグループは、通常、スブチリシンとして命名されている。スブチリシンは、グラム陽性細菌又は菌類により生成されるセリンプロテアーゼである。多くのスブチリシン、例えばバシラス株からの少なくとも6種のスブチリシン、すなわちスブチリシン168、スブチリシンBPN、スブチリシンCarlsberg、スブチリシンDY、スブチリシンアミロサッカリチカス及びメセンテリコペプチダーゼ、アクチノマイセタルスからの1つのスブチリシン、サーモアクチノマイセス・バルガリス (*Thermoactinomyces vulgaris*) からのサーミターゼ、及び1つの菌類又はスブチリシン、トリチラキラム・アルブム (*Tritirachium album*) からのプロテイナーゼKのアミノ酸配列は決定されている。スブチリシンのさらなるサブグループ、すなわちスブチラーゼは最近認識されて来た。スブチラーゼは、高いアルカリ性スブチリシンとして記載されており、そして酵素、例えばスブチリシン PB92 (MAXACAL (商標), Gist- Brocades NV)、スブチリシン309 (SAVINASE (商標), Novozymes A/S)、及びスブチリシン147 (ESPERASE (商標), Novozymes A/S) を包含する。

【0043】

“スブチリシン変異体又は突然変異誘発されたスブチリシンプロテアーゼ”とは、起源の又は親遺伝子を有し、そして対応する親酵素を生成する親微生物由来の変異体遺伝子を発現する生物により生成されたスブチリシンとして本明細書において定義され、ここで、前記親遺伝子は、前記変異体遺伝子を生成するために突然変異誘発されており、前記遺伝子から、前記突然変異誘発されたプロテアーゼが、適切な宿主において発現される場合、生成される。それらの言及されるスブチリシン及びその変異体は、本発明の方法において有用である好ましい種類のプロテアーゼを構成する。有用なスブチリシン変異体の例は、スブチリシン309の変異体 (SAVINASE (商標)) であり、ここで位置195において、グリシンがフェニルアラニンにより置換されている (G195F、又は<sup>195</sup>Gly <sup>195</sup>Phe)。

【0044】

市販のプロテアーゼは、本発明の方法に使用され得る。そのような市販のプロテアーゼの例は、ALCALASE (商標) (バシラス・リケニホルミス株の液内発酵により生成される)、ESPERASE (商標) (バシラスの好アルカリ性種の液内発酵により生成される)、RENNILASE (商標) (ムコル・ミエヘイの非病原性株の液内発酵により生成される)、SAVINASE (商標) (バシラスの遺伝子的に修飾された株の液内発酵により生成される)、例えばW092/19729号として公開されている国際特許出願に開示される変異体、DURAZYM (商標) (SAVINASE (商標) のタンパク質構築された変異体)、POLARZYME™及びEVERLASE™である。すべての上記市販のプロテアーゼは、Novozymes A/S, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark から入手できる。

【0045】

他の好ましいセリンプロテアーゼは、アスペルギラス、バシラス、例えばバシラス・アルカロフィラス (*Bacillus alcalophilus*)、バシラス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バシラス・ブルガタス (*Bacillus vulgatus*)、バシラス・ミコイデ (*Bacillus mycoide*)、リゾパス (*Rhizopus*) からのプロテアーゼ、及びバシラスからのスブチリシン、特にノカルジオプシス (*Nocardiosis*) 種、例えばノカルジオプシス・ナットーノカルドプシス・ダソンビレイ (*Nocardiosis natto Nocardiosis dassonvillei*) からのプロテアー

10

20

30

40

50

ゼ (W088/03947号を参照のこと)、特に種ノカルジオプシスsp. (Nocardiopsis sp.) NR RL18262, 及びノカルジオプシス・ダソンビレイ (Nocardiopsis dassonvillei) NRRL18133からのプロテアーゼである。さらに他の好ましいプロテアーゼは、国際特許出願番号PCT/DK89/00002号及びW091/00345号に開示されるバシラス・スプチリシンの変異体からのセリンプロテアーゼ、及びEP415296号に開示されるプロテアーゼである。

【0046】

もう1つの好ましい種類のプロテアーゼは、微生物起源の金属プロテアーゼである。次の従来の発酵された市販の金属プロテアーゼが本発明の方法に使用され得る: Novozymes A/S, DK-2880 Bagsvaerd, Denmarkから入手できるNEUTRASE (商標) (Zn) (バシラス・スプチリスの株の液内反応により生成される); Sandoz AG, Basle, Switzerland から入手できるBACTOSOL (商標) WO 及び BACTOSOL (商標) SI; Toyo Boseki Co. Ltd., Japanから入手できる TOYOZYME (商標), ; 及びKao Corporation Ltd., Japanから入手できる PROTEINASE K (商標) (バシラスsp. KSM-K16の株の液内発酵により生成される)。

プロテアーゼは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005~500mg、好ましくは0.01~100mgの酵素タンパク質の用量で使用され得る。

【0047】

リパーゼ:

もう1つの好ましい態様においては、他の酵素は、リパーゼ、特に微生物リパーゼである。リパーゼは、酵母、例えばカンジダ (Candida); 細胞シュードモナス又はバシラス; 又は糸状菌、例えばヒューミコラ又はリゾムコルから選択される。より特定には、適切なリパーゼは、リゾムコル・エミヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼ (例えば、EP238023号に記載のようにして調製される)、サーモミセス・ラヌギノサ (Thermomyces lanuginosa) リパーゼ (例えば、EP305216号に記載のようにして調製される)、ヒューミコラ・インソレンス (Humicola insolens) リパーゼ、シュードモナス・スツゼリ (Pseudomonas stutzeri) リパーゼ、シュードモナス・セパシア (Pseudomonas cepacia) リパーゼ、カンジダ・アンタルクチア (Candida antarctica) リパーゼA又はB、又はrGPL、アブシジア・ブラケスレナ (Absidia blakesleena)、アブシジア・コリムビフェラ (Absidia corymbifera)、フサリウム・ソラニ (Fusarium solani)、フサリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)、ペニシリウム・シクロピウム (Penicillium cyclopium)、ペニシリウム・クルストサム (Penicillium crustosum)、

【0048】

ペニシリウム・エクспанサム (Penicillium expansum)、ロードトルラ・グルチニス (Rhodotorula glutinis)、チアロスポレラ・ファセオリナ (Thiarosporella phaseolina)、リゾパス・ミクロスポラス (Rhizopus microsporus)、スポロボロミセス・シバタヌス (Sporobolomyces shibatanus)、アウレオバシジウム・プルランス (Aureobasidium pullulans)、ハンセヌラ・アノマラ (Hansenula anomala)、ゲオトリカム・ペニシラタム (Geotricum penicillatum)、ラクトバシラス・クルバタス (Lactobacillus curvatus)、プロコトリクス・サーモソハテ (Brochothrix thermosohata)、コプリナス・シネリウス (Coprinus cinerius)、トリコダーマ・ハルザニウム (Trichoderma harzanium)、トリコダーマ・レセイ (Trichoderma reesei)、リゾパス・ジャポニカス (Rhizopus japonicus) 又はシュードモナス・プランタリ (Pseudomonas plantari) からのリパーゼであり得る。適切なリパーゼの他の例は、例えばW092/05249号又はW093/11254号に記載のような、上記に言及されるいずれか1つのリパーゼの変異体であり得る。

【0049】

市販のリパーゼの例は、Novozymes, Denmark からのLIPOLASE™, LIPOLASE ULTRA™, LIPOPRIME™, LIPEX™を包含する。

リパーゼは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005~500mg、好ましくは0.01~100mgの酵素タンパク質の用量で使用される。

【0050】

セルラーゼ:

10

20

30

40

50

もう1つの好ましい態様においては、他の酵素は、セルラーゼ又はセルロース分解酵素であり、前記酵素は、グルコース、セロピオース、トリオース及び他のセロオリゴ糖へのセルロースの分解を触媒する酵素である。好ましくは、セルラーゼは、エンドグルカナーゼ、より好ましくは微生物エンドグルカナーゼ、特に細菌又は菌類エンドグルカナーゼである。細菌エンドグルカナーゼの例は、シュードモナス又はバシラス・ラウタスから成る群からの細菌から得られるか、又はそれにより生成されるエンドグルカナーゼである。

【0051】

セルラーゼ又はエンドグルカナーゼは、酸性、中性又はアルカリ性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼであり、すなわち、それぞれ酸性、中性又はアルカリpH範囲で最大のセルロース分解活性を示す。従って、有用なセルロース又はエンドグルカナーゼは、酸性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼ、好ましくは菌類酸性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼ、より好ましくはトリコダーマ (*Trichoderma*)、アクチノマイセス (*Actinomyces*)、ミロセシウム (*Myrothecium*)、アスペルギラス (*Aspergillus*) 及びボトリチス (*Botrytis*) から成る群からの菌類から得られるか又は生成できる、酸性条件下で実質的なセルロース分解活性を有する菌類酸性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼ酵素である。

10

【0052】

好ましい酸性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼは、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*)、ミロセシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*)、トリコダーマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコダーマ・レイ (*Trichoderma reesei*) 及びトリコダーマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) から成る群から得られる。

20

【0053】

もう1つの有用なセルラーゼ又はエンドグルカナーゼは、中性又はアルカリ性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼ、好ましくは菌類中性又はアルカリ性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼ、より好ましくはアクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、カエトミウム (*Chaetomium*)、セファロスポリウム (*Cephalosporium*)、フサリウム (*Fusarium*)、グリオクラジウム (*Gliocladium*)、ヒューミコラ (*Humicola*)、イルベックス (*Irpex*)、ミセリオプソラ (*Myceliophthora*)、ミコゴン (*Mycogone*)、ミロセシウム (*Myrothecium*)、パプロスポラ (*Papulospora*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、スコブラリオプシス (*Scopulariopsis*)、スタキボトリス (*Stachybotrys*) 及びベルチシリウム (*Verticillium*) から成る群から選択された菌類から得られる、アルカリ性条件下で実質的なセルロース分解活性を有する菌類アルカリ性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼである。

30

【0054】

好ましいアルカリ性セルラーゼ又はエンドグルカナーゼは、セファロスポリウム sp. (*Cephalosporium* sp.)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、又はミセリオプソラ・サーモフィラス (*Myceliophthora thermophila*)、好ましくはセファロスポリウム sp., RYM-202, フサリウム・オキシスポラム, DSM2672, ヒューミコラ・インソレンス, DSM1800 又はミセリオプソラ・サーモフィラス, CBS117-65 から成る群から得られる。

40

【0055】

もう1つの好ましい態様においては、他の酵素はキシラナーゼ、例えばエンド-1,3-キシロシダーゼ (EC3.2.1.32)、キシラン1,4-キシロシダーゼ (EC3.2.1.37) 及び-L-アラビノフラノシダーゼ (EC3.2.1.55) である。好ましくは、キシラナーゼは、次のものから得られる：アスペルギラス・アキュレアタス (アスペルギラス・アキュレアタス CBS101.43 由来の精製されたキシラナーゼに対して生ぜしめられた抗体と免疫学的に反応する、キシラナーゼ活性を示す酵素；例えば W094/21785 号を参照のこと)；

【0056】

アスペルギラス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) (例えば、SU 4610007 号を参照のこと)

50

と) ; アウレオバシジウム・プルランス (*Aureobasidium pullulans*) (EP 0 373 107 A2を参照のこと) ; バシラス・サーキュランス (*Bacillus circulans*) (WO 91/18978号を参照のこと) ; バシラス・プミラス (*Bacillus pumilus*) (WO 92/03540号を参照のこと) ; バシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) (WO 91/18976号, WO 91/10724号を参照のこと) ; バシラスsp.AC13 (特にNCIBM40482株 ; 例えばWO94/01532号を参照のこと) ; ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) (WO 92/17573号を参照のこと) ; ロードサーマス (*Rhodothermus*) (WO 93/08275号を参照のこと) ; ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) (WO 93/03155号を参照のこと) ; ストレプトミセス・ピリドスポラス (*Streptomyces viridosporus*) (EP 496 677 A)を参照のこと ; バシラス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) (JP 9213868号を参照のこと) ; サーモアスカス・アウランチアカス (*Thermoascus aurantiacus*) (アメリカ特許第4,966,850号を参照のこと) ;

【 0 0 5 7 】

トリコダーマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*) 及びカイニアsp. (*Chainia* sp.) (EP 0 353 342 A1を参照のこと) ; トリコダーマ・ハルジアナム (*Trichoderma harzianum*) 及びトリコダーマ・レセイ (*Trichoderma reesei*) (アメリカ特許第4,725,544号を参照のこと) ; サーモミセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) (EP 0 456 033 A2を参照のこと) ; サーモモノスポラ・フスカ (*Thermomonospora fusca*) (EP 0 473 545 A2を参照のこと) ; トリコダーマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*) (W.J.J, van den Tweel et 等., Eds., *Stability of Enzymes, Proceedings of an International Symposium held in Maastrich, The Netherlands, 22-25 November 1992*, Fisk, R.S. and Simpson, pp.323-328を参照のこと) ; ジクチオグロマス (*Dictyoglomus*) (WO 92/18612号を参照のこと) ; ストレプトミセス (*Streptomyces*) (アメリカ特許第5,116,746号) ; 及び/又はサーモトガ (例えば, WO93/19171号を参照のこと)。適切なキシラナーゼの他の例は、キシラン分解活性を有する上記酵素のいずれか1つの変異体 (誘導体又は相同体) であり得る。

【 0 0 5 8 】

市販のセルラーゼ包含製品の例は、NOVOZYM™ 342, CELLUZYME™, CAREZYME™, RENOZYME™ (すべてNovozymes, Denmark) を包含する。

セルラーゼは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005 ~ 500mg、好ましくは0.01 ~ 100mgの酵素タンパク質の用量で使用され得る。

【 0 0 5 9 】

ペクチナーゼ :

もう1つの好ましい態様においては、他の酵素は、ペプチナーゼ、例えばポリガラクトロナーゼ (EC3.2.1.15)、ペクチンエステラーゼ (EC3.2.1.11) 又はペクチンリアーゼ (EC4.2.2.10) である。ペクチナーゼのための適切な生物源は、アスペルギラス・ニガーである。

【 0 0 6 0 】

もう1つの好ましい態様においては、 - アミラーゼ組成物中の他の酵素は、菌類アスペルギラス・アキュレアタス、好ましくはアスペルギラス・アキュレアタス、CBS101.43の株により生成される加水分解酵素組成物を含んで成る。この株は、ペクチン分解及び広範囲のヘミセルロース分解酵素活性を含んで成る酵素組成物を生成することは知られている。

【 0 0 6 1 】

市販のペクチナーゼ含有製品の例は、BioPrep™, SCOURZYME™ 及びPECTAWASH™ (Novozymes, Denmark) を包含する。

ペクチナーゼは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005 ~ 500mg、好ましくは0.01 ~ 100mgの酵素タンパク質の用量で使用され得る。

【 0 0 6 2 】

オキシドレダクターゼ :

本発明のもう1つの態様においては、 $\alpha$ -アミラーゼは、オキシドレダクターゼ、例えばオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ又はラッカーゼと共に組合される。

a) ラッカーゼは、過酸化水素(例えば、 $H_2O_2$ )のいずれの必要性も伴わないで、分子酵素に対して作用し、そして水( $H_2O$ )を生成する。

b) オキシダーゼは、分子酸素( $O_2$ )に対して作用し、そして過酸化水素( $H_2O_2$ )を生成し、そして

c) ペルオキシダーゼは、過酸化水素( $H_2O_2$ )に対して作用し、そして水( $H_2O$ )を生成する。

#### 【0063】

ラッカーゼ( EC1.10.3.2 )の例は、ポリポラスsp. ( *Polyporus* sp. ) 株、特にポリポラス・ピンシタス( *Polyporus pinsitus* ) 又はポリポラス・ベルシコロル( *Polyporus versicolor* ) の株、又はマイセリオブソラsp. ( *Myceliophthora* sp. ) 株、特にM. サーモフィラス( *M. thermophila* ) の株、シタリジウムsp. ( *Scytalidium* sp. ) 株、特にS. サーモフィリウム( *S. thermophilium* ) の株、リゾクトニアsp. ( *Rhizoctonia* sp. ) 株、特にリゾクトニア・プラチコラ( *Rhizoctonia praticola* ) 又はリゾクトニア・ソラニ( *Rhizoctonia solani* ) の株、又はラスsp. ( *Rhus* sp. ) 株、特にラス・ベルニシフェラ( *Rhus vernicifera* ) の株由来のラッカーゼを包含する。ラッカーゼはまた、菌類、例えばコリビア( *Collybia* )、フォメス( *Fomes* )、レンチナス( *Lentinus* )、プレウロタス( *Pleurotus* )、アスペルギラス( *Aspergillus* )、ニューロスボラ( *Neurospora* )、ポドスポラ( *Podospira* )、フレビア( *Phlebia* )、例えばP. ラジアタ( *P. radiata* ) ( W092/01046号 )、コリオラスsp. ( *Coriolus* sp. )、例えばC. ヒルシタス( *C. hirsutus* ) ( JP2-238885号 )、又はボトリチス( *Botrytis* ) に由来することができる。

#### 【0064】

特に企画される態様においては、ラッカーゼは、次のものから選択され得る：W096/00290号に記載されるポリポラス・ピンシタス( *Polyporus pinsitus* ) ラッカーゼ( トラメテス・ビロサ( *Trametes villosa* ) ラッカーゼとも呼ばれる )；W095/33836号に記載されるマイセリオブソラ・サーモフィラ( *Myceliophthora thermophila* ) ラッカーゼ；W095/33837号に記載されるシタリジウム・サーモフィリウム( *Scytalidium thermophilium* ) ラッカーゼ；商品名SIGMA no. L5510としてSIGMAから市販されているピリキュラリア・オリザエ( *Pyricularia oryzae* ) ラッカーゼ；W096/06930号に記載されるコプリナス・シネレウス( *Coprinus cinereus* ) ラッカーゼ；及びW095/07988号に記載されるリゾクトニア・ソラニ( *Rhizoctonia solani* ) ラッカーゼ。

#### 【0065】

ペルオキシダーゼ( 1.11.1.7 )の例は、植物(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ)又は微生物、例えば菌類及び細菌、例えばコプリナスsp. ( *Coprinus* sp. )、例えばコプリナス・シネレウス( *Coprinus cinereus* ) 又はコプリナス・マクロリズス( *Coprinus macrorhizus* )、又は細菌、例えばバシルス、例えばバシルス・プミルス( *Bacillus pumilus* ) の株に由来するペルオキシダーゼを包含する。

#### 【0066】

特に企画される態様においては、ペルオキシダーゼは、W095/10602号に記載されるコプリナス・シネレウス( *Coprinus cinereus* ) IF08371ペルオキシダーゼ又はその変異体、及びW097/04102号に記載されるクルブラリア・ベルキュロサ( *Curvularia verruculosa* ) CBS147.63の株に起因するハコペルオキシダーゼが成る群から選択され得る。

#### 【0067】

企画されるオキシダーゼは、特に、EC1.1.3としに分類される酵素である炭水化物オキシダーゼを包含する。炭水化物オキシダーゼは、グルコースオキシダーゼ( EC1.1.3.4 )、ヘキソースオキシダーゼ( EC1.1.3.5 )、キシリトールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ( EC1.1.3.9 )、ピラノースオキシダーゼ( EC1.1.3.10 ) 及びアルコールオキシダーゼ( EC1.1.3.13 ) を包含する。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

炭水化物オキシダーゼは、細菌、菌類、酵母又は哺乳類起源のものに由来することができる。

グルコースオキシダーゼの例は、アスペルギラスsp., 例えばアスペルギラス・ニガー株、又はクラドスポリウムsp. (Cladosporium sp.), 特にクラドスポリウム・オキシスポラム (Cladosporium oxysporum)、特にWO95/29996号に記載されるCl. オキシスポラム (Cl. oxysporum) CBS163の株に由来するグルコースオキシダーゼを包含する。

【0069】

ヘキソースオキシダーゼの例は、広範囲の炭水化物を酸化する紅藻コンドラス・クリスパス (Chondrus crispus) (通常、トチャカとしても知られている) (Sullivan and Ikawa, (1973), Biochim. Biophys. Acts, 309, p. 11-22; Ikawa, (1982), Meth. in Enzymol. 89, carbohydrate metabolism part D, 145-149); 及び種々の異なった単糖及び二糖類を酸化する紅藻イリドフィカス・フラクシダム (Iridophycus flaccidum) (Bean and Hassid, (1956), J. Biol. Chem, 218, p. 425; Rand et al. (1972, J. of Food Science 37, p. 698-710) により生成されるヘキソースオキシダーゼを包含する。

【0070】

オキシドレダクターゼは、Lバイオフィルム対照溶液当たり0.005~500mg、好ましくは0.01~100mgの酵素タンパク質の用量で使用され得る。

最終観点においては、本発明は、表面上でのバイオフィルム形成を防止し、除去し、低減し、又は破壊するためへのバシルス - アミラーゼの使用に関する。好ましい態様においては、 - アミラーゼは、バシラス - アミラーゼ、好ましくは “ - アミラーゼ ” セクションに言及されるものである。

【0071】

本発明は、次の例によりさらに記載されるが、それらの例は本発明の範囲の制限するものではない。

材料及び方法：

緩衝剤及び試薬として使用される化学薬品は、少なくとも試薬品種の市販の製品であった。

【0072】

酵素：

- アミラーゼAは、WO00/60060号において配列番号2として開示される親バシルスsp. - アミラーゼの変異体 - アミラーゼである。前記 - アミラーゼのアミノ配列は次の6個のアミノ酸欠失/置換を有する：

D183\*+G184\*+R118K+N195F+R320K+R458K。

前記変異体はまた、WO01/66712号にも開示される。アルカリ - アミラーゼは、バッチ03AGE014-4において生成された。

【0073】

- アミラーゼBは、バシラス・フラボサーマス (Bacillus flavothermus) 株に由来し、そして配列番号4に開示されている。

- アミラーゼCは、バシラス・リケニホルミス株に由来し、そしてW099/19467号において配列番号6として示される。

プロテアーゼEは、EP特許番号396,608-B1 (Novozymes, Denmarkから要求に応じて入手できる)により保護されているM222S置換を有するバシルス・クラウジ (Bacillus clausii) (旧名称：バシルス・レントスC360 = NCIB10309) スブチリシンである。

【0074】

リパーゼAは、次の突然変異を有するヒューミコラ・ラヌギノサ (Humicola lanuginosa) 株DSM4109に由来するリパーゼ変異体である：アメリカ特許第6,939,702-B (Novozymeから要求に応じて入手できる)に開示されるT231R, R233R。

セルラーゼAは、ヒューミコラ・インソレンス (Humicola insolens) からの多成分セルラーゼである (Novozyme, Denmarkから要求に応じて入手できる)。

【0075】

10

20

30

40

50



細菌株：

ATCC10774から入手されたバシルス・サブチリス。

E. コリATCC # 11229及びATCC # 25922。

バイオフィルム培地：トリプシン大豆ブイヨン（TSB, VWRから購入された、P/N DF037 0-70）培地を、製造業者の説明書に従って調製し、次に水により5%に希釈した。2ml/1Lの微量元素を添加した。

**【 0 0 7 6 】**

寒天：トリプシン大豆寒天（TSA, VWRから購入された、P/N DF0369-17）を、製造業者の指示に従って使用した。

微量元素溶液：1L当たり：1.5 g  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.35 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g,  $\text{NaMoO}_4$ 。

ステンレス鋼クーポン：ステンレス鋼クーポンNo.304を、Metal Samples Company (Munford, AL)から入手した。

**【 0 0 7 7 】**

BioLCイオンクロマトグラフィーシステム：次の成分から構成されるICシステム：

GP50 グラジエントポンプ (P/N 059493)

ED50A 電気化学検出器 (P/N 059499)

AS50 温度調節されたオートサンプラー (P/N 056565)

金電極及びAg/AgCl 参照電極により完結された、統合されたアンペロメトリーのための電気化学セル (P/N 060386)

Chromelion Data Control Software CHM-1-IC (P/N 060930)。

**【 0 0 7 8 】**

CDCバイオフィルム反応器：Biosurface Technologies, Inc.から購入された(P/N CBR 9 0-2)、ポリカーボネートクーポン（個々の反応器について24、P/N RD128-PC）により完結された。

洗剤洗浄剤ベース：Burnishine MEとしてWeiman Products (IL, USA)から得られた - 複数酵素洗剤。酵素は、1分間、高い設定で電子オープンにおいて加熱することにより、使用前、変性された。

**【 0 0 7 9 】**方法：

- アミラーゼ活性 (KNU)：

アミロース分解活性を、基質としてジャガイモ澱粉を用いて決定することができる。この方法は、酵素による変性されたジャガイモ澱粉の分解に基づかれ、そして澱粉/酵素溶液のサンプルとヨウ素溶液とを混合することにより反応を進めた。最初に、黒みがかかった青色が形成されるが、しかし澱粉の分解の間、青色が弱くなり、そして徐々に、赤みがかかった褐色に変わり、これを、着色されたガラス標準に比較する。

**【 0 0 8 0 】**

1キ口Novo アミラーゼ単位 (KNU) を、標準条件（すなわち、 $37 \pm 0.05$  ; 0.0003Mの $\text{Ca}^{2+}$  ; 及びpH5.6）下で、5260mgの可溶性澱粉乾燥物質Merck Amylumをデキストリン化する酵素の量として定義される。

この分析方法を、より詳細に記載するフォルダーEB-SM-0009.02/01は、Novozymes A/S, Denmarkから、必要に応じて入手できる。

**【 0 0 8 1 】**2種の配列間の同一性の程度の決定：

本発明のために、2種のアミノ酸配列間の同一性の程度を、同一性表及び次の複数の一列整列パラメーターと共に、LASERGENE™ MEGALIGN™ソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, WI)を用いて、Clustal方法 (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) により決定する：10のギャップペナルティー及び10のギャップ長ペナルティー。対様一列整列パラメーターは、次の通りであった：Ktuple = 1、ギャップペナルティー = 3、窓 = 5 及びダイアゴナル = 5。

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0082】

例1： - アミラーゼA及び - アミラーゼCを用いてのバイオフィーム除去：

バイオフィーム反応器は、400mlのビーカー、磁気攪拌器及び2つのステンレス鋼クーポンから成った。クーポンはビーカーの側面に対して垂直にテープで貼られ、その結果、クーポンの底部縁はビーカーの底上に存在する。攪拌棒が入れられ、そしてビーカーが円型のアルミニウム箔によりカバーされ、そしてオートクレーブ処理された。200mlの無菌バイオフィーム培地を個々のビーカーに添加する。接種物を調製するために、個々の細菌株（バシラス・サブチリスからの）を、プレート計数寒天上で28℃で一晩、増殖する。無菌綿棒を用いて、個々を無菌水に、0.100のOD<sub>686</sub>まで懸濁し、そして次に10<sup>-1</sup>にさらに希釈する。

10

## 【0083】

個々のアッセイは、酵素を有さない4個の対照ビーカー、溶液1L当たり50mgの酵素タンパク質を有する2個のビーカー、及び溶液1L当たり100mgの酵素タンパク質を有する2個のビーカーから成った。ビーカーを、攪拌下で37℃で一晩インキュベートし、ステンレス鋼クーポン上にバイオフィームを増殖する。このインキュベーション段階に続いて、酵素を、下記表に従って、上記で示された2種の用量で添加し、そして40℃でさらに2時間インキュベートする。その後、個々のビーカー及びステンレス鋼クーポンを無菌水により注意してすすぎ、クリスタルバイオレットにより染色し、無菌水によりすすぎ、残るバイオフィームを酢酸により溶解し、そして個々の溶液のアリコート吸光度は、ステンレス鋼クーポン上に残存するバイオフィームの量の直接的な表示を提供する。低い吸光度は、良好な酵素効果及び低い残存バイオフィームに対応し、ところが高い吸光度は不良な（又はその欠失）酵素効果及び相当の残存するバイオフィームに対応する。

20

## 【0084】

## 【表1】

表1

サンプル番号	使用される酵素	酵素タンパク質濃度
1	α-アミラーゼA	50mg/L及び100mg/L
2	α-アミラーゼC	50mg/L及び100mg/L
3	酵素なし（対照）	NA

30

## 【0085】

例2： - アミラーゼA、B及びCを用いての原澱粉溶解：

種々の - アミラーゼが水和化されていない原小麦澱粉を溶解する速度を測定した。それぞれ - アミラーゼA、B及びCを、この研究に使用した。

## 【0086】

pH8のトリス緩衝液及び15℃dHを有する1%原小麦澱粉溶液25mlを、蓋付の管中に注ぎ、そして40℃の水浴に配置した。“還元端”の出発レベルを、酵素の添加の前、測定した。この研究に使用される酵素濃度は、g原小麦澱粉当たり3mgの酵素タンパク質であった。1mlのサンプルを、異なった時間で採取した。20µlの1MのHClを添加し、その後、99℃で10分間インキュベートした。酸及び熱の組合せがアミラーゼを不活性化する。次に、20µlの1MのNaOHを添加し、サンプルがもはや酸性でないことを確めた。

40

## 【0087】

次に、サンプルを希釈し、カラー試薬（PHABH、酒石酸カリウムナトリウム、NaOH）と共に95℃で10分間インキュベートし、そして最終的に遠心分離し、その後、上清液上で410nmでODを測定した。対照（100%加水分解された澱粉）を、1MのHCl中、1%の原小麦澱粉溶液を、オープンに置いて110℃で4時間インキュベートすることにより製造した。この処理は、g原小麦澱粉当たり生成され得る最大量のグルコースを、計算するために使

50

用された。この値を、図 1 に示されるグラフにおいて100%に設定した。

【 0 0 8 8 】

- アミラーゼA及びBに関して、最初の 5 時間以内に観察される原小麦澱粉溶解の初期速度が - アミラーゼCに関する速度よりも有意に早いことが見出され得る。これは、この時間にわたって、前者の 2 種の - アミラーゼ - 対 - 後者のアミラーゼにより溶解される高い%の澱粉をもたらした。

【 0 0 8 9 】

例 3 : プロテアーゼE及び洗剤と組合して - アミラーゼA及びCを用いてのバイオフィルム除去 :

E. コリ (ATCC # 11229) の単一成分バイオフィルムを、前もって殺菌されたCDCバイオフィルム反応器におけるポリカーボネートクーポン上で増殖する。実験の開始で、E. コリの培養物を、トリプシン大豆寒天 (TSA) 上で37 °Cで一晩、増殖した。次の朝、単一のコロニーを、1 µl の無菌接種ループを用いてプレートから採取し、そして40 g のTSB/1Lの水の溶液に添加した。この溶液を、37 °Cで一晩インキュベートし、培養物を増殖した。次の日、1mlのこの培養物を、CDCバイオフィルム反応器に含まれる、400mlの最少培地 (0.30gのTSB/1Lの無菌水) に添加した。

【 0 0 9 0 】

この溶液を130rpmでゆっくり攪拌し、そして非供給バッチモードで22 °Cで2日間、増殖した。2日の増殖期間の後、クーポンホルダー棒及びクーポンを反応器から除き、無菌希釈水によりすすぎ、プランクトン性細胞を除去し、クーポンを棒から注意して除き、そして次に、次の溶液 (それぞれ30ml) において40 °Cで1時間インキュベートした :

A : 洗剤クリーナー基剤のみ、無菌水中、0.21gの洗剤、

B : 洗剤クリーナー基剤、0.21g + 0.51mgの酵素タンパク質プロテアーゼE + 0.06mgの酵素タンパク質 - アミラーゼA、

C : 洗剤クリーナー基剤、0.21g + 0.51mgの酵素タンパク質プロテアーゼE + 0.16mgの酵素タンパク質 - アミラーゼC。

【 0 0 9 1 】

インキュベーション段階に続いて、クーポンを除いた。溶液を、0.45 µmのNglon注射器フィルターを通して濾過し、そしてそれらの糖含有率をイオンクロマトグラフィーにより測定した。PA100ガード及び分析カラム (P/M 043055) を、分離のために使用した。60/40脱イオン水/100mMのNaOH、及び100%の100mMのNaOH/1Mの酢酸ナトリウム間の移動相グラジエント (指数グラジエントは10分で分離を開始し、そして85分で終結した) を用いて、分離をもたらした。図 2 は、この実験において生成された 3 種のクロマトグラムオーバーレイを示す。 - アミラーゼAが使用される場合、洗剤のみ、又は - アミラーゼCよりも、有意に高いレベルの低分子量糖 (グルコース = glu, マルトース = mal, マルトトリアース = DP3, マルトテトラオース = DP4, マルトペンタオース = DP5) を生成した。これは、E. コリ細菌により生成されるアミロペクチンエキソ多糖類の高められた分離を通しての高められたレベルのバイオフィルム除去を示した。

【 0 0 9 2 】

例 4 : プロテアーゼE、セルラーゼA、リパーゼA及び洗剤と組合して - アミラーゼA及びCを用いてのバイオフィルム除去 :

ポリカーボネートクーポンを備えた 2 つのCDCバイオフィルム反応器を、オートクレープし、そして無菌の1/10強度のトリプシン大豆ブイヨン (TSB、3g/lの強度) により充填し、そしてE. コリ (ATCC # 25922) の対数相培養物1mlにより接種した。反応器における初期細胞計数は、平均  $5 \times 10^8$  cfu/mlであった。両反応器を、37 °Cでバッチモードで24時間、操作した (流入又は流出なし)。この期間の後、1/10 TSBの連続流れを、37 °Cで、12 ml/分の流速で開始した。E. コリ/バイオフィルムを、4日間、増殖した。この後、個々の反応器 (反応器 1 又は 2 として標識された) からの 1 つの棒を引下げ、そして200mlの次のフィルター殺菌された溶液を含む無菌ガラスピーカー中に配置した :

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

- A. 洗剤クリーナー基剤のみ、無菌水中、1.4gの洗剤、  
 B. 洗剤クリーナー基剤、1.4g + 3.4mgの酵素タンパク質プロテアーゼE + 0.48mgの酵素タンパク質リパーゼA + 0.23mgの酵素タンパク質セルラーゼA + 0.40mgの酵素 - アミラーゼA、  
 C. 洗剤クリーナー基剤、1.4g + 3.4mgの酵素タンパク質プロテアーゼE + 0.48mgの酵素タンパク質リパーゼA + 0.23mgの酵素タンパク質セルラーゼA + 0.40mgの酵素 - アミラーゼC。

## 【0094】

個々のビーカーの溶液を、適度な攪拌下で30分間、40℃でインキュベートし、この後、個々の棒を無菌水により軽くすすいだ。最終的に、E. コリを、トリブシン大豆寒天 (TSA) を用いて、個々の棒からの3個のクーポンのうち2つについて計数した。この研究から得られる平均プレート計数結果は、次の通りであった：

## 【0095】

## 【表2】

表2

処理	クーポン上の平均 $\log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup>
A	$4 \times 10^7$
B	$3 \times 10^4$
C	$2 \times 10^5$

## 【0096】

本明細書に記載される発明は、本明細書に開示される特許の態様により範囲を限定されるものではない。何故ならば、それらの態様は本発明のいくつかの観点为例示するものである。いずれかの同等の態様が本発明の範囲内で意図される。実際、本明細書に示され、そして記載されるそれらの修飾の他に、本発明の種々の修飾は、前述の記載から当業者に明らかになるであろう。そのような修飾はまた本発明の範囲内にある。

種々の文献が本明細書に引用されており、それらの開示は引用により本明細書に組み込まれている。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0097】

【図1】図1は、3種の異なった - アミラーゼについての原小麦澱粉の合計加水分解率 (%) の比較を示す。

【図2】図2は、1) - アミラーゼA、2) 洗剤のみ、3) - アミラーゼCのバイオフィルム除去を比較するクロマトグラムを示す。

【 図 1 】

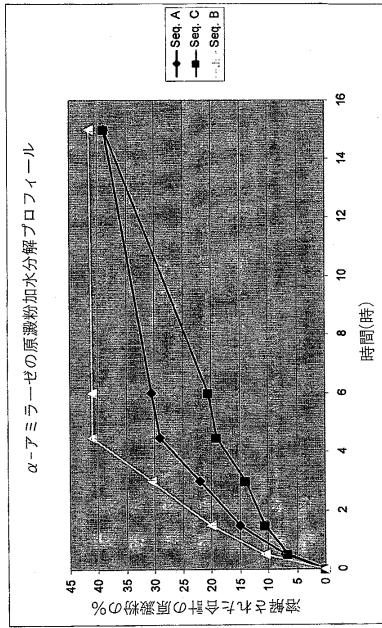


Fig. 1

【 図 2 】

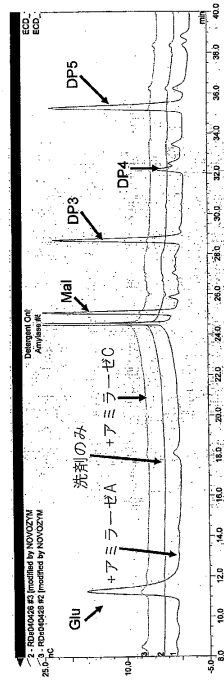


Fig. 2

【 配列表 】

0005345781000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100087871  
弁理士 福本 積
- (74)代理人 100087413  
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広
- (72)発明者 デインハンマー, ランディ  
アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27587, ウェイク フォレスト, サンディブルック レ  
ーン 8213
- (72)発明者 アンデルセン, カルステン  
デンマーク国, デーコー - 3500 ベルローセ, ホイエロフト ベンエ 162

審査官 斉藤 貴子

- (56)参考文献 特開2004-231671(JP,A)  
特表2001-508677(JP,A)  
特表平05-507441(JP,A)  
特表2001-520179(JP,A)  
特表2002-540786(JP,A)  
特表2004-505606(JP,A)  
特表2005-531397(JP,A)  
特開平03-065285(JP,A)  
特開平03-000193(JP,A)  
特表平09-510617(JP,A)  
特表2001-520006(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A01N C12N