

修正
補充
年 月 日
87.12.01

申請日期	85.5.2
案 號	85/05263
類 別	C02F 3/34 C11D 3/386

(以上各欄由本局填註)

公告本

A4
C4

發明專利說明書

474900

一、發明 名稱	中 文	聚甘露糖酶作為黏質控制劑之用途
	英 文	Use of mannanases as slime control agents
二、發明 創作人	姓 名	1. 克里斯汀凡皮 Kristine Van Pee 2. 麥可 M·P 凡史佩布羅克 Michel M.P. Van Speybroeck 3. 喬瑟夫凡皮爾里 Jozef van Poele
	國 籍	1. 比利時 2. 比利時 2. 比利時
三、申請人	住、居所	1. 比利時亞特 B-9880 羅斯汀尼德瑞夫 48 號 2. 比利時建特 B-9000 瑞波史翠特 38 號 3. 比利時波吉胡特 B-2140 海姆史翠特 141 / 2 號
	姓 名 (名稱)	培芝德朋股份有限公司 BetzDearborn Inc.
三、申請人	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國賓州 19053 崔佛斯市桑摩頓路 4636 號
三、申請人	代 表 人 姓 名	喬伊斯 L. 摩瑞森 Joyce L. Morrison

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

歐洲 國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

1995年5 月19日 95250120.3

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明()

本發明係關於用來預防及／或去除表面生物膜的組成物(抗-生物膜組成物)，包含至少一聚甘露糖酶，視需要可組合至少一種酶選自糖酶，蛋白酶，脂酶，糖蛋白酶，及使用此組成物來預防及／或去除表面生物膜的用途。

在水體系統內微生物附著在固體表面很常見。通常此現象被稱為生物污泥。生物膜積垢係為下列過程的結果，涉及：1)將物質由散裝流體(bulk fluid)運輸到表面且繼而附著，2)生物膜內微生物代謝作用，3)在膜表面的流體切應力，4)表面材料及粗糙度，5)積垢控制過程。

在不同工業製程中，伴隨形成生物膜的問題有能量損失，材質惡化及降低製程效率。能量損失意味著降低冷卻塔的熱交換能力及增加流體分配系統及運輸工業之電力耗損。材質惡化，係由緊靠固體表面的生物膜所引起，意味著侵蝕及腐爛。降低製效率可見於水處理。紙漿及造紙工業，及水質資料收集。

保健事項亦涉及生物污泥，例如牙菌斑的形成，微生物細胞附著於白血球組織而導致疾病，飲用水的品質，致病生物由生物膜釋出進入工業用水系統。工業製程或控水系統，如造紙工廠之開放或封閉式水循環系統或冷卻水系統。可以提供適當的微生物生長環境，結果使得以生物膜為人習知的粘泥，於水生系統的表面形成。特別於冷卻水系統中，這些生物膜沈積物可導致熱交換量減低，損壞管線接頭及腐蝕系統內部。據此，對於製程控制的反面效果是可能存在的，其可降低製程的效率及損害

五、發明說明 (-)

產品的品質。此外，生物膜或粘泥沈積物通常會導致較高的能消耗量。因生物膜形成量增加受影響最大的是，例如製造紙漿，紙張，木板及紡織品的工業製程。如以造紙機械為例，有相當大量的水在循環系統內循環，稱為"白水系統"(初級循環或次級循環，亦即白水 I 或 II)。包含四散紙漿液的白水成為微生物生長的理想培養液。

撇開工業化水體系統不談，生物膜亦在其他環境中生成，如在保健項目內可於超濾或透析膜上生成。在本發明的範圍內，酶組成物可用來預防粘泥且移除任何有生物膜形成的系統。

生物膜或粘泥係由細菌所形成，特別是格蘭氏陰性細菌，例如如單胞菌 (*Pseudomonas*)，不動桿菌 (*Acinetobacter*) 及氣芽孢桿菌 (*Aerobacter*) 加上黃桿菌 (*Flavobacterium*)，脫硫弧菌 (*Desulfovibrio*)，埃希氏菌 (*Escherpch*)，球衣菌 (*Sphaerotilus*)，腸桿菌 (*Enterobacter*) 及八疊球菌 (*Sarcina*)。格蘭氏陰性菌的細胞壁結構為構成粘泥形成的要素。細胞壁包含肽聚糖，其由乙醯胺基糖類及胺基酸所組成，加上包含蛋白質，脂多糖及脂蛋白的外膜，相反地，格蘭氏陽性菌，如桿菌的細胞壁多數係由肽聚糖及磷壁酸質所組成。

生物膜可進而由真菌及酵母菌所產生，如發芽黴菌 (*Pullularia pullulans*)，交鏈孢菌 (*Alternaria sp*)，革蘭菌 (*Lenzytes*)，香菇 (*Lentinus*)，多孔菌 (*Polyporus*)，層孔菌 (*Fomes*)，鞣革菌 (*Sterium*)，麴菌 (*Aspergillus*)

五、發明說明()

，梭黴菌(*Fusarium*)，青黴菌(*Penicillium*)，念珠菌(*Candida*)，釀母菌(*Saccharomyces*)及擔子菌(*Basidiomycetes*)。

一生物膜可包含多種微生物。在一生物膜內，可能同時發現有格蘭氏陰性菌，格蘭氏陽性菌，真菌及若有光線，如在冷卻水塔板上，還可發現藻類。生物膜的發展係始於有機物質，如脂質，蛋白質，糖等於接觸表面上集結而來。而後將微生物吸引到此層且繼而透過外聚物而附著。附著的微生物而後形成個別的微生物菌落。經過一般時間各個菌落彼此摻雜在一起，而形成一真實的生物膜。生物膜令逐漸增厚直至達到穩定狀態，即將微生物吸引到既存生物膜的作用與流動流體將微生物帶離生物膜的剪切力互補。

生物膜的厚度係隨受質濃度而增加。在厚生物膜內，某些區域可能因養分剝離而使得結構脆弱。這些脆弱點可在生物基質內剝離產生孔洞。水流過這些孔洞的後續作用會造成更多物質逸失而留下薄生物膜。當生物膜變厚時，在靠近表面處會生成一層無氧區。在此區域的微生物可以破壞表面。

一般生物膜內的微生物係由含量豐富的胞外生物多聚體，稱為外被多糖(*glycocalyx*)所包圍。外被多糖係被定義為"任何多醣類，包含位在格蘭氏陰性細菌外膜表面或格蘭氏陽性細菌肽聚糖層表面最外層的細菌表面結構"。外被多糖可由細胞壁上排列規則的糖蛋白，稱為

五、發明說明(4)

S 層，或細胞表面纖維狀的聚醣基質，莢膜所組成，其可部份包覆於溶媒(menstruum)下。此莢膜可為高度組織代者。有時可見到環繞微生物周圍的聚多糖莢膜並非共價依附在細胞表面。將細胞小片化(pelleting)後，可將外被多糖留在懸浮液中。

由外被多糖包覆的微生物菌落係藉細胞複製而形成，所以子細胞均被包覆在同一外被多糖內。外被多糖生物多聚體之分子間鍵結受到二價陽離子的影響。將陽離子以 EDTA 螯合可有效剝離生物膜。

多位工作者已對已知之細菌外被多糖的功能繪出一一般性結論。其具有功能

- 1) 將細胞黏著於固體表面或於其他原核或具核細胞及
- 2) 捕捉培養基內的有機養分，
- 3) 莢膜可高度組織代以驅離粒子且故而可保護微生物免受環境的傷害。故可視外被外多糖為拮抗抗生素，抗體及噬菌體之第一道防禦。

極少生物膜只包含微生物物質。通常無機物會是粘泥的一部分，如， CaCO_3 ，鋁，矽，鐵，鎂，銅。在造紙廠，膜內可包含多種物質，如纖維，填充劑，松脂，松香等。

生物性粘泥之沈積可以殺菌劑來有效控制，這些殺菌劑的效果係基於其能殺死在運作水體內的微生物且故而可預防粘泥生成。然而生成生物膜的細菌比浮游細菌更能抵抗有毒劑。所以需要極高濃度的殺菌劑才能去除生

五、發明說明(5)

物膜。這是因為生物膜細胞生長緩慢且代謝較不活躍，還因為它們受到外被多糖的保護，其不僅可作為離子交換樹脂來固定有毒劑，還可為親水性／厭水性緩衝物，防止殺菌劑達到細胞內。此外，殺菌劑，由於其具毒性，需考量對生態環境的影響，故而使用時會產生相當多問題。基於這些理由，在過去一直尋求其他方法，特別是用酶，來去除生物膜。

雖然生物膜基質可具異質組成物，其主要係由聚糖所組成。去除粘泥的研究領域故而特別集中在對聚糖酶（糖酶）的研究。於工業水體系統中使用酶，特別是糖酶，來降解外被多糖及故而移除生物膜或預防粘泥形成，已為此技術所習知。

在個別考慮工業粘泥或生物膜之組成時，基於不同的觀點而發展出多種策略。

第一種策略係使用溶解酶，並非作用於粘泥中所分泌的聚糖，而作用於細胞壁內的聚糖。故而這些酶能破壞細胞壁且殺死細胞。例如，在DE 37 41 583中，使用由聚葡萄糖酶及蛋白酶的混合物，其具有對細胞壁內1,3-葡萄糖鍵結之溶解酶活性，已被揭示。然而，保護細菌細胞的粘泥層可以防止此等酶達到細胞壁。

第二種策略視工業粘泥由單一聚糖組成，由一種細菌產生。例如，於US 3,824,184及US 3,773,623揭示使用一種可分解左聚糖的左聚糖水解酶，其由多種廣泛細菌所產生。然而，左聚糖，僅由生長於蔗糖的細菌所產生

五、發明說明(b)

。在考慮造紙廠或冷卻系統時，蔗糖並無相當含量，所以左聚糖並非其生物膜重要成份。

於CA 1,274,442及WO 90/02794中揭示使用藻酸鹽裂解酶，來降解主要由假單胞菌所產生的藻酸鹽。進一步地，工業粘泥通常係由因工業場所而異之不同微生物族群的產生。工業粘泥(生物膜)從未由單一外多糖組成，因為每一種微生物會產生其自身的典型外多糖(EPS)。

於US 4,055,467中，已揭示使用一戊聚糖酶己聚糖酶來預防冷卻塔形成生物膜。

第三種策略係始於下列事實：多種異多糖存在於工業粘泥中。於此技術中已知聚糖主要係由葡萄糖，半乳糖，甘露糖，岩藻糖，鼠李糖，核糖，葡萄胺糖，半乳糖胺糖，甘露糖醛酸，半乳糖醛酸及葡萄糖醛酸，以非常複雜的排列方式所組成(參考L.Kenne等人，於G. Aspinall (編輯)"聚多糖"，第II冊(1983)，學術出版社；I.W. Sutherland於"原核細胞之表面碳水化合物"，學術出版社，偏移，1977，27-96)。進而，多種其他的糖成份以較少量存在。

故而，可以假設若將多種不同的酶活性結合起來可以對工業粘泥有所作用。然而僅瞭解粘泥內單糖成份並不足以決定得以成功去除生物膜之酶混合物。上述單糖還可以多種型式來鍵結。例如葡萄糖可以 α -1,2, α -1,3, α -1,4, α -1,6, β -1,2, β -1,3, β -1,4或 β -1,6來鍵結。基於此，每一種鍵結方式需添加一種個別的酶

五、發明說明(7)

活性來作用。同樣的，鄰近的單糖及其順序或個別糖上的取代物對於特定糖酶的活性也很重要。

進而，可以預期地單一糖酶，具有一種可能的活性來作用一種EPS(外多糖)的主要建構糖。或即使數種糖酶的混合物，對於生物膜內異聚糖的複雜成份並無或僅有有限的功效。然而，於此技術中已發現某些複雜的混合物對於異聚糖的降解有正面的作用。US 5,071,765及EP-A-0 388 115係關於使用纖維素酶， α -澱粉酶及一蛋白酶的混合物分別破壞 β 及 α -1,4-鍵結之葡萄糖及胞外蛋白質。

在US 5,238,572中揭示一種選自半乳糖苷酶，半乳糖醛酸酶，鼠李糖苷酶，木糖苷酶，岩藻糖苷酶，阿拉伯糖苷酶及 α -葡萄糖苷酶之酶的組合物。

第四種預防生物膜形成的策略係控制粘泥形成的初始步驟，亦即細菌的吸附，於EP-A-0 425 017揭示微生物能鍵結到(物體)表面，部份係靠與第II型內糖苷酶反應而鍵結。此類型的酶(內- α -N-乙基葡萄糖胺糖苷酶，內- α -N-乙醯基半乳糖胺糖苷酶及內- β -N-乙醯基半乳糖苷酶)可以切斷於糖蛋白內特殊的(分子)間糖苷鍵結。已知這些酶中某些亦為裂解性的。

多種不同的酶方法已用於去除生物膜或預防生物膜形成的技術中，其需要組合數種酶或，目前為此，只有一種或少數酶被採用，這些僅具有有限的作用。這些策略亦無法提供一種組成物，除了去除或控制粘泥以外，亦

五、發明說明(8)

能預防細菌附著到水體系統的表面及有效地剝離附著的細菌。

基於上述問題，本發明係在提供一酶組成物或酶具有廣效的作用。較佳地本組成物應可預防細菌附著並剝離已附著於系統表面的細菌。特別是提供一種製劑，其分別只包含一種酶或為極少數酶的簡單混合物。更優越地，本組成物不包含任何殺菌劑。此酶或諸酶可以比已知技術中酶或酶混合物更少的份量來發生效用。

故而本發明的目的係在提供一種組成物或一製程以預防粘泥形成且以減少及／或去除於水體表面的生物膜，其避免傳統殺菌劑的缺點且可分別達到或超越其有效程度。

根據本發明，上述問題可由包含至少一聚甘露糖酶的組成物(拉-生物膜組成物)所解決。

在本發明範圍內，可單獨使用一聚甘露糖酶或者此聚甘露糖酶可為包含數種聚甘露糖酶的組合型式。

根據本發明，令人訝異地可發現一包含至少一聚甘露糖酶的組成物具有廣效活性且可對多型不同微生物有作用。

特別地，此酶組成物包含單一聚甘露糖酶，其最好為1,4- α -D-聚甘露糖-甘露糖水解酶，可隨機水解 β (1,4)鍵，如於聚甘露糖，半聚乳甘露糖，聚葡萄甘露糖如Novo Nordisk所供應之Gamanase[®]，

於本發明範圍內，"聚甘露糖酶"係關於甘露糖水解酶

五、發明說明(9)

，其包含聚甘露糖甘露糖水解酶(即內聚甘露糖酶)及甘露糖甘露糖水解酶(即外聚甘露糖酶)。此術語進而包含甘露糖水解酶之各種可能的特化型式式，如 α ， β ，1，2，1.3，1.4，1.6，L.D。此意味著聚甘露糖酶適於本發明的目的，其於涉及於至少一甘露糖糖基之鍵結處來切斷任何含甘露糖聚糖(參考EC3.2.1.24，EC3.2.1.25等)。實例如Gamanase[®]，聚半乳甘露糖酶，及Primalco聚甘露糖酶，其均為上市聚甘露糖酶。

根據本發明之較佳實施例，一酶組成物係包含至少一聚甘露糖酶及至少一酶選自糖酶，脂酶及糖蛋白酶。

於較佳實施例中，酶組成物可包含至少 $4 \cdot 10^2$ 聚甘露糖酶U/kg，如 $4 \cdot 10^3$ U/kg。較佳地，組合物內的甘露聚糖具有活性至少為 $4 \cdot 10^4$ U/kg，較佳為 $4 \cdot 10^5$ U/kg及更佳為 $4 \cdot 10^6$ U/kg。

根據本發明較好與聚甘露糖酶組合的糖酶為聚葡萄糖酶，內糖甘酶，纖維素酶，澱粉酶，果膠酶，岩藻糖甘酶，鼠李糖甘酶，葡萄糖澱粉酶，左聚糖酶及類同者。

根據本發明，較佳與聚甘露糖酶組合的蛋白酶為絲胺酸蛋白酶，金屬蛋白酶，半胱胺酸蛋白酶及其類同者。根據本發明，較佳與甘露聚糖酶組合的脂酶為羧酸酯水解酶，芳族酯水解酶，甘油酯水解酶及其類同者。

根據本發明，較佳與聚甘露糖酶組合的糖蛋白酶為內- β -N-乙酰葡萄糖胺糖甘酶D(endo- β -N-acetylglucosaminidase D)，內-糖甘酶S，N-糖甘酶

五、發明說明 (10)

F 及內糖甘酶 H，均可由 Boehringer Mannheim 所提供。

若一或多個聚甘露糖酶，進而係與至少一上述酶，較佳使用一蛋白酶，若使用一能水解廣泛肽鍵之鹼（金屬）蛋白酶（如 Esperase[®]，更有利。此二種酶在組合物內的比例聚甘露糖酶／鹼（金屬）蛋白酶可由 1/99 至 99/1 不等。

根據本發明實施例，該組合物進而包含至少一酶穩定劑，一生物分散劑，一殺菌劑及／或一界面活性劑，進而具有可去除生物膜性質的乙二醇成份，如揭示於德國專利申請案 44 45 070.2，特別地如二乙烯乙二醇或丙烯乙二醇，為較佳添加劑。更甚者，此等物劑可與至少一額外的酶，選自糖酶，蛋白酶，脂酶，糖蛋白酶，來組合。

一穩定劑，如丙烯乙二醇，其他多元醇，糖，糖醇或硼酸，可免於酶受微生物降解，避免酶產生不可逆變性及氧化。

生物分散劑，如十二烷基苯磺酸鈉，十二烷基二甲基氯化銨，或乙氧一丙氧基嵌段聚合物，在未殺死微生物下，藉由改變生物膜，水體及／或受納面的表面能量，以助於預防粘泥形成或除去生物膜。

殺蟲劑為可以殺死存在工業水體管線內細菌的成份。實例有異噻唑啉酮，亞甲基雙硫氰酸鹽，二甲基二硫胺甲酸鈉，烷基二甲苄基銨氣，聚〔氧乙烯（二甲亞胺基）乙烯（二甲亞胺基）乙烯二氣〕，2，2-二溴-3-氯-丙醯

五、發明說明 (11)

胺，1,3-溴-硝-2-丙二醇，二噻戊，過酸(如 HOCl ， H_2O_2 ，過氧乙酸)。

雖然本發明的目的係在提供一組成物，可在無需添加殺菌劑至系統內來預防及／或去除水體-維生系統表面的生物膜，如果系統表面已存在一層厚粘泥層則可能需要使用殺菌劑。在此情況下，聚甘露糖酶，視需要進而與至少一酶選自糖酶，蛋白酶，脂酶及糖蛋白酶，與至少一殺菌劑的組成物已證明可有效除去生物膜。然而，本發明之酶組成物最好不併用殺菌劑來使用，及其功效可與單獨使用殺菌劑相比擬，亦即其活性是可接受的，但相對於殺菌劑，本發明之組成物無毒且可生物降解。

在本發明範圍內，組成物包含至少一聚甘露糖酶(純化或粗製型均可)，視需要組合其他酶及／或添加劑(酶穩定劑，生物分散劑，殺菌劑及／或界面活性劑)，較佳地與適當的載體物質所組成。

本發明組成物可為任何形式以適於添加至水體-維生系統，亦即液體或乾燥形式。在乾燥狀態，組合物可藉冷凍乾燥製備，呈粉末或錠狀形式。

雖然本發明組成物較佳地包含純化酶，視需要與上述成份組合，酶亦可以粗製型存在。例如，使用微生物，其可表現出聚甘露糖酶及至少一種酶選自糖酶，蛋白酶，脂酶，糖蛋白酶的菌種懸浮液，係可行的。

於本發明一實施例中，包含聚甘露糖酶的組成物係以導致聚甘露糖濃度呈0.1-1000單位／升，較佳為1至

五、發明說明 (12)

50單位／升的份量來添加至水體-維生系統。一單位(V)係定義為在pH7及30℃下於30分鐘內將0.2%聚甘露糖溶液黏度減半50%所需之酶量。如果被處理的系統具有與如上定義不同之pH與溫度條件，則可能需要調整酶的份量以獲得處理生物膜的最佳結果。

聚甘露糖酶，如1,4-β-D-聚甘露糖-甘露糖水解酶，與鹼(金屬)蛋白酶的組成物係較佳，且對於去除生物膜及預防生物膜形成可產生協同作用。

本發明包含聚甘露糖酶的組成物，視需要與其它酶或物劑相組合，可於水體系統不同處，或於單一地點處來添加。也可以將含聚甘露糖酶之組成物於一處添加，且進而將其他酶及／或添加劑，如生物分散劑，殺菌劑及／或界面活性劑，於他處或其他多處來添入。根據本發明，加入如上所述之單一組成物，不論以液態或乾燥型式(比較上述)，係最佳者。

根據本發明，令人訝異地發現包含聚甘露糖酶，亦即一單一糖酶的組成物，可用來大量控制細菌附著及於水體-維生系統表面去除生物膜。完全意想不到地，單一糖酶，其對甘露糖均聚物有活性，展現出對EPS，其如上所述地係由多種不同異聚糖所組成的高度活性。

相較於他者，本發明的優點係基於下列事實，亦即由於聚甘露糖酶預防了細菌附著，而對生物活污泥發展過程的最初始來產生干擾。相對地，其他糖酶通常係在細菌附著表面後，受質(EPS)已被生成後才作用其活性。

五、發明說明(13)

此外，聚甘露糖酶還可以由水體維生系統表面移除生物膜。

聚甘露糖酶可預防細菌附著的事實係特別令人訝異的，因為EPS在微生物附著中的角色已由多位此技術領域文獻作者所質疑。據此背景，其已預期一糖酶對於附著過程本身將無作用。

根據本發明，更令人驚訝地發現將聚甘露糖酶與蛋白酶組合，可以對去除粘泥與預防生物膜形成產生協作效果。

本發明組成物係適用於任何水體-維生系統，亦即不論開放或封閉式工業處理一水系統而包含生成生物膜微生物者，來預防粘泥及移除生物膜。本發明生物膜的用途特別適用於紙廠之開放或封閉式水循環，特別是自水-維生循環，或冷卻循環。進而，用於工業冷卻塔，貯水塔，配水系統，紙漿及紙廠水以及保健項目之超濾與透析膜來去除微生物。

本發明可參考下列實施例來解釋。

實施例 1

決定Gamanase® 1.5L 聚甘露糖酶的活性

一單位(酶活性)係定義為pH7及30℃下，30分鐘內將0.2%聚甘露糖溶液黏度減半50%所需酶的份量。在溫度，pH，離子強度及鹽組成物與下列實施例條件不同的情況下，等量酶的活性，可能與前述定義之標準條件下所測得之活性有所不同。

年 月 日

修正
補充

A7

B7

五、發明說明(89.8.)10

下列為聚甘露糖可能的來源(此等實施例係在於顯示而非限制本發明)：

蒟蒻聚葡萄甘露糖

刺槐木豆膠

Guar膠

三仙膠

來自缺陷假單胞菌(*Pseudomonas diminuta*)菌株 NCTC 8545 之 LPS

來自膠質紫串狀釀母菌(*Rhodotorula glutinis*)之胞外聚甘露糖貝克酵母聚甘露糖

在刺槐木豆膠的特例中，一檢定已如下施行：

刺槐木豆膠的儲液於托立斯緩衝液(50mM, pH7)中製備。檢定中受質濃度為2000ppm。酶儲液係在穩定化緩衝液(1/100之52.5克CaCl₂及1.21克/升托立斯，pH7)中製備。將1毫升酶儲液加入9毫升受質。

每一酶儲液中，有一部份藉煮沸15分鐘來變性。此檢定係在試管內進行，於30℃下保溫30分鐘。酶水解作用以煮沸15分鐘來中止。黏度係以阿巴拉杜黏度計(Vbbelohde viscosimeter)於30℃下測量。黏度降低率加以計算，並計入水的黏度及包含失活化酶之樣本黏度。結果可見於圖1。

實施例2

以Gamanase® 1.5L 來預防細菌附著至玻片

附著試驗係如述於M.Fletcher, J.Gen.Microbiology

修正
年 月 日
89. 8. 10 補充

A7

B7

五、發明說明 (15)

94(1976), 400-404, 的方法來進行, 結果可見於表1。

25ppm的 Gamanase 1.5L, 相較於控制組, 大量地降低營光假單胞菌的附著達61%, 此菌存在於場地粘泥中。進而還可觀察到蛋白酶與聚甘露糖酶協作的效果。12.5 ppm Gamanase 與 12.5ppm Esperase的組成物幾乎完全防止細菌附著。

實施例 3

以 Gamanase® 1.5L 去除生物膜

將包含不銹鋼部份管筒之生物污泥反應器以營光假單胞菌及分離自紙廠粘泥樣本之問題生物 CDCA-5 次群 B 來接種。生物污泥反應器的操作條件可見於表2。經運作70小時後, 於不銹鋼部份形成了足量生物膜。將此等部份由系統移出, 外側以無菌PBS來清洗, 將此等部份與大型細菌培養皿相接觸, 加入含特定濃度之酶配方的無菌PBS, 對於每一酶濃度, 均有加熱失活化的控制組。培養皿於40℃及50rpm下保溫3或24小時。保溫後, 將該等部份清洗, 乾燥, 且將以活性酶處理之生物膜重量與以失活化酶處理的部份相比較。一實驗結果示於表3。其顯示僅有低濃度酶產生正反應。此現象亦可見於以玻片作附著檢定。25ppm的 Gamanase 移除25%的生物膜。

實施例 4

"斑點測試": Gamanase® 1.5L 對固體培養基 EPS 產生的影響

在此試驗中, 使用分離自紙廠粘泥之不同細菌: 肺炎

年 月 日 修正
89. 8. 10 補充 A7
B7

五、發明說明 (16)

桿菌血清型 67, *Pseudomonas paucimobilis* 及 CDC A-5 次群 B。將該等菌種接種於固體培養基上，刺激 EPS 生產。在洋菜基上穿洞以置入酶，表 4 代表已測試之不同上市售酶之結果概覽。

在一組實驗中，酶係在細菌生長前加入。圍繞著洞的透明區顯示酶擴散到洋菜基內對 EPS 形成的抑制作用。當使用 Gamanase 1.5L (酶 10) 時，所有 3 種菌株均呈此結果。結果係總結於表 5。

在第二組實驗中，酶係在容允細菌生長並產生 EPS 後再加入洞中。出現圍繞洞的透明區顯示酶將 EPS 分解。再次地，當使用 Gamanase 1.5L 時，所有 3 種菌株均呈此結果，但對 *Pseudomonas paucimobilis* 效果更好。結果係示於表 6。

上述實驗顯示聚甘露糖酶適於預防並降解 EPS，亦即預防細菌附著及由水體-維生系統表面去除生物膜。此外，聚甘露糖酶較其他酶具有更佳特性。

實施例 5

評估上市 Gamanase® 1.5L 的殺菌活性。

此試驗的目的係在研究正抑制反應及去除結果是否係基於酶配方中防腐劑或裂解酶的活性。

至於接種器，係使用 $\pm 10^7$ CFU/毫升營光假單胞菌 (CFU/毫升表示每毫升之菌落形成單位)。此接種器係將生物的隔夜培養物在 8000rpm, 4℃ 下離心 5 分鐘來製備。片狀沈澱物於磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗兩次，且

五、發明說明(17)

再懸浮及稀釋至所需細胞濃度。加入之酶配方的濃度範圍由100至12.5ppm。對於每一酶濃度，亦有一組加熱-尖活化控制組來測試。在40℃及pH7下保溫2小時(磷酸緩衝生理食鹽水)。樣本係在t=0,1及2小時採取。結果示於表7。由此結果無法結論酶具有殺菌活性。

實施例 6

對分離自現場粘泥樣本之EPS的酶水解作用及以HPLC-PAD(高性能離子交換層析; High Performance Ion-Exchange以脈衝式安培值偵測器進行Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)。

EPS係使用丙酮沈澱來自現場粘泥樣本分離。此EPS係以不同上市酶來水解。水解混合物係以HPLC-PAD分析並與酶及EPS對照組相比較。由EPS釋放的單醣濃度被計算。出現於層析圖寡醣區的高峰以區域(area)來表示。結果見於表8，相較於其他酶，1,4-β-D-聚甘露糖-甘露糖水解酶可成功地用於水解EPS。

實施例 7

1. 附著檢定：

Gamanase® (Novo Nordisk)及純聚半乳甘露糖酶(Fluka Chemicals 係採用Pseudomonas putida為實施例細菌以評估附著檢定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

一二三—四八 蘇白飯 蘇白飯 的 麵 (比 麵 表 0)。很

訂

五、發明說明 (19)

圖表目錄

表 1：Gamanase® 1.5L 及 Esperase 外營光假單胞菌對
玻片附著的影響

表 2：生物污泥測試單元的操作條件。

表 3：以 Gamanase® 1.5L 進行去除生物膜實驗。

表 4：於 "斑點測試" 中評估上市酶活性。

表 5：以上市酶對 EPS 形成的抑制作用。

表 6：上市酶對 EPS 的降解活性。

表 7：以 Gamanase® 1.5L 的致死試驗。

表 8：以 HPLC 偵測由紙廠粘泥分離之 EPS 的單糖釋出量。

表 9：Gamanase® 1.5L 的斑點測試。

表 10：兩種不同聚甘露糖酶對數種隨機選擇之細菌之透
明區效果。

圖 1：以聚半乳甘露糖酶對刺槐木豆膠的黏度降低作用。

圖 2：以聚甘露糖酶處理對生物污泥的抑制作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (20)

表 1

處 理 方 式	相 較 控 制 組 的 $\Delta \%$
控 制 組	0
25ppm ESP.	-76
25ppm GAM.	-61
12.5ppm GAM+	-93
12.5ppm ESP.	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (ㄨ)

表 2 生物污泥測試單元的操作條件

醱酵器條件：

接種器：

營光假單胞菌 LMG1794

於 PBS pH7 內隔夜菌種 + 20% 甘油 100 毫升

充氣：1 巴，25%

500 rpm

TSB：20 毫升 / 小時

稀釋水：80 毫升 / 小時

至生物污泥單元之溢流：100 毫升 / 小時

$D = 0.05 / \text{小時}$

在配備上始 (upstart) 前，先將醱酵器接種

及上始充氣 3 小時

生物污泥測試單元：

養分濃度 (ppm)：

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 240

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3

$NaHCO_3$ 36

葡萄糖 338

細菌大豆胨 20

$D = 0.86 / \text{小時}$

pH 7

30-35°C

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表 3：以 Gamnanase® 1.5L 進行去除生物膜實驗

生物膜乾重係以毫克／平方公分表示。

酶濃度係以 ppm 配方表示。

% 去除率，僅在（實驗組）與控制組的差異為顯著時（95% 信賴度），才表示。

以 48 小時齡的生物膜進行去除實驗（pH7 緩衝液，40°C，搖晃 50rpm，24 小時保溫）

	1 Gamnanase 200ppm 失活者	2 Gamnanase 200ppm 活性者	3 Gamnanase 50ppm 失活者	4 Gamnanase 50ppm 活性者	5 Gamnanase 25ppm 失活者	6 Gamnanase 25ppm 活性者
	0.50 0.55 0.55 0.52	0.50 0.55 0.43 0.42	0.56 0.42 0.40 0.60	0.50 0.42 0.38 0.54	0.57 0.62 0.54 0.54	0.36 0.46 0.45 0.46
平均值	0.53	0.47	0.49	0.46	0.57	0.43
標準差	0.02	0.05	0.09	0.06	0.04	0.04
相對標準差 % 去除率：	4	11	18	13	7	9 25

五、發明說明 ()

五、發明說明 (3)

表 4：於 "斑點測試" 中評估上市酶活性

酶	活 性	酶	活 性
酶 1	β - 澱粉酶	酶 10	半乳甘露糖苷酶
酶 3	蛋白酶	酶 11	1,3- α - 聚葡萄糖酶
酶 4	α - 澱粉酶	酶 12	蛋白酶
酶 5	β - 聚葡萄糖酶	酶 13	菊糖酶
酶 8	蛋白酶	酶 16	蛋白酶
酶 9	β - 聚葡萄糖酶		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

訂

五、發明說明 (24)

表 5：以上市酶對 EPS 形成的抑制作用

- ：無透明區
+ ：具透明區

酶	肺炎桿菌	CDC	假單胞菌 I
酶 1	-	-	-
酶 3	-	÷	÷
酶 4	-	-	-
酶 5	-	-	-
酶 8	-	-	÷
酶 9	÷	÷	-
酶 10	÷	÷	÷
酶 11	-	-	-
酶 12	-	-	-
酶 13	-	-	-
酶 16	-	-	÷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

修正
年 月 日
89. 8. 10 補充

A7
B7

五、發明說明 (25)

表 6：以上市酶對 EPS 的降解活性

- : 無透明區
- +/- : 小型透明區
- + : 明顯透明區
- ++ : 大型透明區

酶	肺炎桿菌	CDC	假單胞菌 I
酶 1	-	-	-
酶 3	-	-	÷ ÷
酶 4	-	-	-
酶 5	-	-	-
酶 8	-	-	÷ ÷
酶 9	+/-	÷	-
酶 10	÷	÷	÷ ÷
酶 11	-	-	-
酶 12	-	-	÷ ÷
酶 13	-	÷	-
酶 16	-	-	÷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

以

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

表 7: Gamnanase® 1.5L 的致死試驗

濃度	t=0 CFU/毫升	t=1小時 CFU/毫升	t=1小時 % ÷ 或 -	t=2小時 CFU/毫升	t=2小時 % ÷ 或 -
控制組 1	5.19E ÷ 07	2.61E ÷ 07	-50	3.65E ÷ 07	-30
控制組 2	5.27E ÷ 07	3.51E ÷ 07	-33	2.62E ÷ 07	-50
100 ppm 活化	6.00E ÷ 07	5.38E ÷ 07	-10	4.08E ÷ 07	-32
100 ppm 失活化	5.24E ÷ 07	4.46E ÷ 07	-15	5.16E ÷ 07	-2
50 ppm 活化	4.67E ÷ 07	5.16E ÷ 07	-10 ÷	3.92E ÷ 07	-16
50 ppm 失活化	4.51E ÷ 07	2.93E ÷ 07	-35	4.70E ÷ 07	4+
25 ppm 活化	5.38E ÷ 07	4.76E ÷ 07	-12	4.95E ÷ 07	-8
25 ppm 失活化	4.65E ÷ 07	4.43E ÷ 07	-5	4.95E ÷ 07	6+
12.5 ppm 活化	5.46E ÷ 07	2.22E ÷ 07	-59	3.32E ÷ 07	-39
12.5 ppm 失活化	4.78E ÷ 07	3.19E ÷ 07	-33	4.35E ÷ 07	-9

五、發明說明 (26)

A7
B7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表 8：以 HPLC 偵測由紙廠粘泥分離之 EPS 的單醣釋出量

條件：40°C，pH7，水解時間 = 2 小時

EPS 濃度 = 350 ppm

酶配方濃度 = 1000 ppm

樣本分析係由離子交換層析來進行

酶水解所釋出之單醣濃度 (ppm)，係扣除水解作用中酶

對照組及 EPS 對照組的濃度，來計算。

當寡醣被釋出時，僅以面積來表示

	單 醣 (ppm)					寡醣 (面積)		
	AraboH	ManoH	Fuc	Man	GlcN	Glc/Gal	7.33'	12.58'
Gamanase		0.6		0.8	1.5	35.4	1.66E÷06	
cereflo					0.3	3.4	8.44E÷04	
mutanase			0.2			10.9	4.78E÷04	6.90E÷06
novozym230						1.4	1.32E÷05	
ceramix	0.7					12.2		
								14.99'

五、發明說明 (27)

修正
補充
89.8.10

A7

B7

修正
年 月 日
89.8.16 補充

A7
B7

五、發明說明 (28)

表 9：Gamanase® 1.5 的 斑 點 測 試

樣 本 編 碼	細 菌 編 碼	生 物 鑑 定	透 明 區	備 註
3	47	不 動 桿 菌 屬	呈 暈 圈	粘 泥
11	66	無 法 鑑 定	+	微 量 粘 泥
12	69	腸 桿 菌 屬	±	無 粘 泥
25	25A	肺 炎 桿 菌	++	粘 泥
22	B	克 氏 桿 菌 屬	呈 暈 圈	微 量 粘 泥
22	D	肺 炎 桿 菌	+	微 量 粘 泥
27	B	門 多 隆 假 單 胞 菌	++	粘 泥
27	C	營 光 假 單 胞 菌	-	無 粘 泥 / 粘 泥
23	A	腸 桿 菌 屬	+ / ±	無 粘 泥
23	B	腸 桿 菌 屬	± / -	微 量 粘 泥 / 粘 泥

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (29)

表 10：兩重不同聚甘露糖酶對數種隨機選擇之細菌
之透明區效果

	菌種收集物編碼	Gamanase	聚半乳甘露糖酶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 1242	+	+
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	LMG 7040	++	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	LMG 3203	++	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> type 3	NCTC 9632	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	LMG 3055	++	+
<i>Klebsiella terrigena</i>	LMG 3222	+	-
<i>Klebsiella planticola</i>	LMG 3065	-	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	LMG 3207	++	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LMG 2095	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> type 1	NCTC 9617	-	-
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	LMG 2350	++	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	LMG 1459	++	-
<i>Bacillus subtilis</i>		+	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> type 2	NCTC 7242	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LMG 1794	++	+

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要(發明之名稱：聚甘露糖酶作為黏質控制劑之用途)

本發明係關於一用來預防或去除表面生物膜的組成物，其包含至少一聚甘露糖酶，視需要組合。至少一酶選自糖酶，蛋白酶，脂酶，糖蛋白酶，及使用此組成物來由表面預防及／或移除生物膜的用途。

英文發明摘要(發明之名稱：Use of mannanases as slime control agents)

The present invention relates to a composition for the prevention and/or removal of biofilm on surfaces comprising at least one mannanase, optionally in combination with at least one enzyme from the group consisting of carbohydrases, proteases, lipases, glycoproteases, and the use of the composition for the prevention and/or the removal of biofilm from surfaces.

A8
B8
C8
D8

修正
年 月 日
89. 8. 13
補充

六、申請專利範圍

第 85105263 號「聚甘露糖酶作為黏質控制劑之用途」專利
案

公告本

(89 年 8 月修正)

六 申請專利範圍

1. 一種用來預防及／或去除表面生物膜的組成物，特徵在於包含至少一聚甘露糖酶，更進一步之特徵在於該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 0.1～1000 單位／升的份量來加入水體。
2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物包含 1,4-β-D-聚甘露糖-甘露糖水解酶。
3. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物進而包含至少一酶選自糖酶，蛋白酶，脂酶及糖蛋白酶。
4. 如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該組成物包含至少一蛋白酶。
5. 如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該蛋白酶為一鹼性蛋白酶。
6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之組成物，其中該組成物包含至少一酶穩定劑，生物分散劑，殺菌劑及／或界面活性劑。
7. 如申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之組成物，其中該組成物為液態型式。
8. 如申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之組成物，其中該組成物為乾燥型式。
9. 如申請專利範圍第 1 至 5 項任一項之組成物，其中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

後

六、申請專利範圍

該組成物用於預防及／或去除水體-維生系統表面之生物膜。

10. 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中該水體-維生系統為一開放或封閉式工業水處理系統。
11. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該工業水處理系統為一紙廠內開放或封閉式水循環。
12. 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中表面係為超濾或透析膜。
13. 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 0.1-1000 單位／升的份量來加水體。
14. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 0.1-1000 單位／升的份量來加入水體。
15. 如申請專利範圍第 11 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 0.1-1000 單位／升的份量來加入水體。
16. 如申請專利範圍第 12 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 0.1-1000 單位／升的份量來加入水體。
17. 如申請專利範圍第 13 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 1-200 單位／升的份量來加入水體。

六、申請專利範圍

18. 如申請專利範圍第 14 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 1-200 單位／升的份量來加入水體。
19. 如申請專利範圍第 15 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 1-200 單位／升的份量來加入水體。
20. 如申請專利範圍第 16 項之組成物，其中該組成物係以導致聚甘露糖酶濃度呈 1-200 單位／升的份量來加入水體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

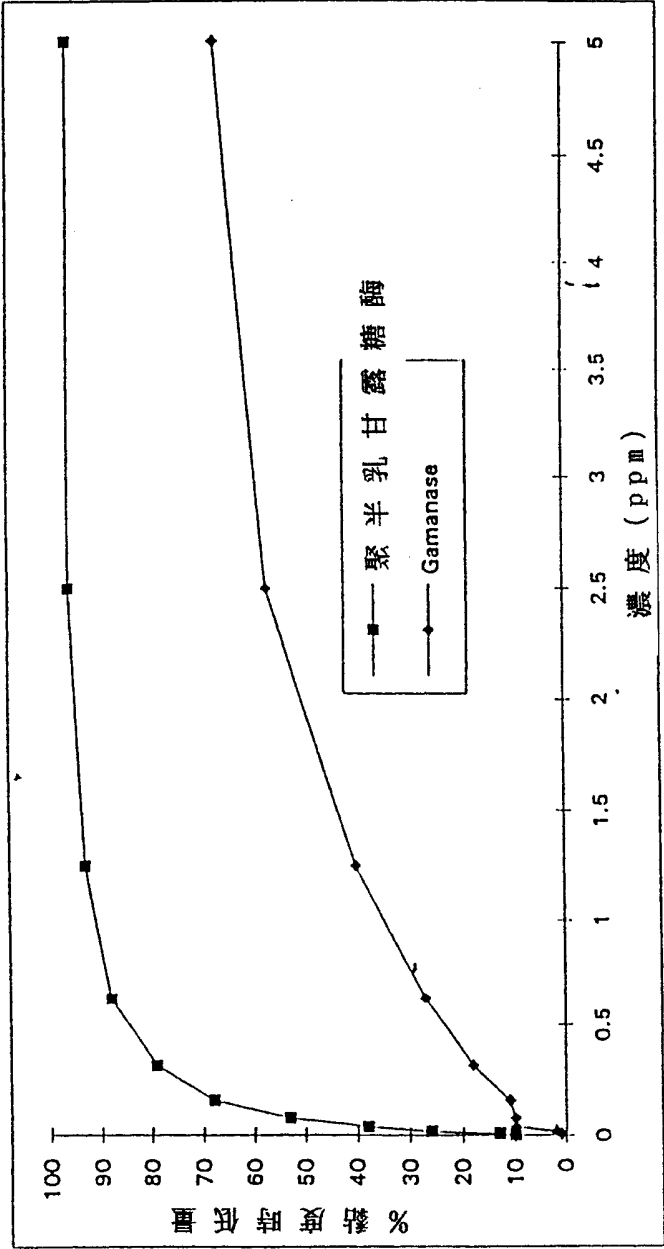
裝

訂

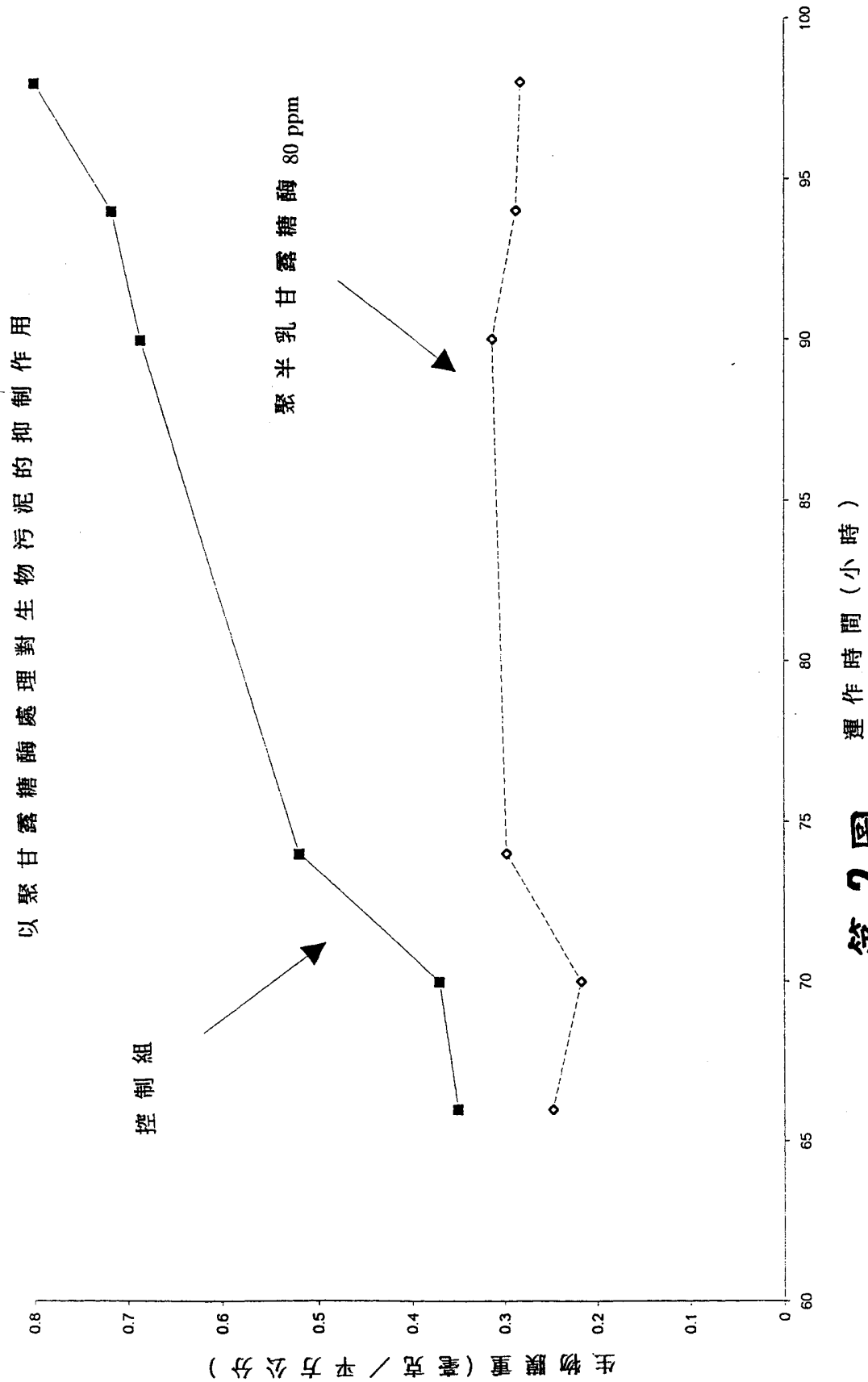
線

85 10 5 2 63

1/2



第1圖



運作時間 (小時)

第2圖