



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년08월20일
 (11) 등록번호 10-0853257
 (24) 등록일자 2008년08월13일

(51) Int. Cl.

C11D 7/32 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7003182

(22) 출원일자 2003년03월03일

심사청구일자 2006년08월30일

번역문제출일자 2003년03월03일

(65) 공개번호 10-2003-0031176

(43) 공개일자 2003년04월18일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2001/001094

국제출원일자 2001년08월30일

(87) 국제공개번호 WO 2002/18530

국제공개일자 2002년03월07일

(30) 우선권주장

PQ9844 2000년09월01일 오스트레일리아(AU)

(56) 선행기술조사문헌

US05093031 A1

WO1999064548 A1*

EP0647706A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

노바팜 리서치(오스트레일리아)퍼티와이리미티드

오스트레일리아, 엔에스더블유 2018, 로즈버리,
프림로즈 애비뉴3-11

(72) 발명자

크리츠렐스티븐

오스트레일리아2230뉴사우스웨일즈크로놀라레드검
애버뉴9

사바알렉스

오스트레일리아2021뉴사우스웨일즈패딩턴패딩턴스
트리트3/124

(74) 대리인

조의제

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 류은경

(54) 계면활성제계

(57) 요약

본 발명은 C8 - C18의 선형 알킬피롤리돈과 같은 알킬피롤리돈 및 알킬글루코시드와 같은 알킬다당류의 조합을 함유하는 수용성조성물 및 알킬피롤리돈 및 알킬다당류의 상기 조성물을 포함하는 단계를 포함하는 것으로 의료 기구들을 세척하는데 사용하기 위한 조성물을 포함하여 효소의 효능을 증진시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법들 및 조성물들은 프로테아제들, 리파아제들, 아밀라아제들 및 셀룰라아제들과 같은 적어도 하나의 효소를 더 포함할 수도 있다.

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 콜롬비아, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에쿠아도르, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 감비아, 가나, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 필리핀, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 적도 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

의료기구들에 사용하기 위한 효소함유조성물의 효능을 증가시키는 방법으로, 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 상기 효소함유조성물 내에 포함하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 제 1항에 기재된 조합이 효소함유조성물에 첨가되는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 알킬피롤리돈 및 알킬다당류가 효소함유조성물에 개별적으로 첨가되는 방법.

청구항 11

제 9항 또는 제 10항에 있어서, 효소함유조성물은 농축액이며, 작업강도로의 희석 전에 알킬피롤리돈 및 알킬다당류가 농축액에 첨가되는 방법.

청구항 12

제 8항에 있어서, 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 하나 이상의 효소들과 각각 조합하여 제제화하여 희석에 적합한 농축액을 생성하여 효소세척용액을 제공하는 방법.

청구항 13

적어도 하나의 효소, 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 포함하는 조성물로 기구를 처리하는 단계를 포함하는 의료기구를 세척하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 알킬피롤리돈은 C8 - C18의 선형 알킬피롤리돈인 방법.

청구항 15

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 알킬다당류는 알킬폴리글루코시드("APG")인 방법.

청구항 16

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 알킬피롤리돈은 n-도데실피롤리돈("n-DP")인 방법.

청구항 17

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 알킬피롤리돈 대 알킬다당류의 비율은 1중량부의 알킬피롤리돈 대 3중량부의 알킬폴리글루코시드 및 3중량부의 알킬피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드의 사이 비율인 방법.

청구항 18

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 알킬피롤리돈 대 알킬다당류의 비율은 1중량부의 알킬피롤리돈 대 3중량부의 알킬폴리글루코시드 및 1중량부의 알킬피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드의 사이 비율인 방법.

청구항 19

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 1중량부의 n-도데실피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드를 함유하는 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 수용성조성물들에 사용하기 위한 계면활성제계에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용성효소계의 세척제에 사용하거나 첨가하기 위한 계면활성제계에 관한 것이다. 본 발명은 의료기구들을 세척하는데 사용하기 위한 효소계세척제에 사용되는 경우에 특별한 이점을 가진다.

배경기술

<2> 명세서 전체에 걸친 종래기술의 어떠한 논의도 그러한 종래기술이 이 분야에서 널리 알려지거나 일반적인 지식의 일부분을 형성하는 것으로 고려되어서는 안된다.

<3> 본 발명은 이하에서 의료기구들을 세척하기 위한 조성물들로 특히 참조하여 설명되지만, 그러한 용도에 한정되는 것은 아니다. 이하에서 사용되어지는 바와 같이, "의료기구들"이란 용어는 광범위하게 외과용메스들, 생체검사용기구들, 겸자들 등과 같은 수술용기구들; 내시경, 결장내시경, 복강경 및 수술조사 또는 개입을 위해 사용되는 다른 기구들; 및 세척, 소독 또는 멸균을 요하는 약품, 수술 및 치과술의 분야에서 사용되는 다른 기구들을 포함하는 것이다. 그 용어는 또한 인간/동물의 피지 및/또는 체분비물의 제거가 요구되어지는 다른 응용분야들 뿐만 아니라, 미용, 화장용치료, 문신술, 바디피어싱 등에 사용되는 것과 같은 유사한 세척필요성들을 가지는 기구들을 포함하는 것이다. 많은 의료기구들은 다양한 구성재료들로 구성되거나 통합되어 있으며, 세척용조성물들은 그러한 어떤 재료들도 공격해서는 안된다.

<4> 한 명의 환자에게 사용한 후 다른 환자의 치료 전, 혈액, 조직, 유리된 단백질조직(loose proteinatious) 및 다른 오염물들을 제거하기 위하여, 문질러 씻은 후 기구표면상에 남아있는 어떤 단백질성의 물질들을 더 소화시키거나 유리시키기 위하여 도입된 효소조제품에 소정 시간동안 담금으로써 의료기구들을 세척하는 것이 일반적인 일이다. 그런 다음, 기구들은 깨끗이 행워지고 소독 또는 멸균과정들이 더 행하여진다. 교차감염의 가능성을 최소화하기 위하여, 한 명의 환자에게 사용된 기구들은, 바람직하게는 다른 환자에게 사용된 것과 분리하여 세척된다.

<5> 의료기구들의 세척에 사용하기 위한 조제품들은 일반적으로 하나이상의 단백질가수분해효소들과 결합한 하나이상의 계면활성제들을 함유한 농축액으로 구성된다. 농축액은 사용 전에 작업강도(일반적으로 백배 희석)로 희석된다. 그러한 제제는 노보노르디스크(NOVONORDISK, "노보-제제")로 설명되었다. 이 목적으로 국제적으로 통용되는 세 종류의 조제품들은 3M의 제품인 EPIZYME[®], MEDIZYME[®](오스트레일리아 시드니의 Whiteley Industries Pty Ltd의 제품) 및 ENDOZYME[®](미국 뉴욕의 Ruholf Corporation의 제품)이다. 그러한 제품들은 일반적으로 효과적이고 널리 사용되지만, 보다 효과적인 제품들, 특히 현재 사용되는 것들보다 단시간에 소정 수준의 효과를 달성할 수 있는 조제품들에 대한 필요성이 여전히 남아있다.

<6> 농축액은 상업적인 요구를 충족시키도록 사용되기 전의, 수송 및 저장시에 충분히 안정하여야 한다. 실제로 농축된 수용액으로 제제화될 수 있는 계면활성제들의 선택에는 한계가 있다. 계면활성제들의 어느 것이나 농축물의 저장안정성에 한계가 있어 희석 중에 거품을 일으키는 문제점들을 초래하거나, 표면장력의 불충분한 감소를 제공하거나, 효소들과 같은 계의 다른 성분들을 불안정하게 하거나 또는 다른 불리한 점들로부터 해를 입는다. 대부분, 제제자들은 그러한 용도들에 충족된 것으로 발견된 몇몇의 기존의 널리 알려진 비이온성계면활성제들로부터 선택된 계면활성제들을 이용하지만, 개선된 효율의 제제화를 위한 불만족한 요구는 여전히 남아있다.

<7> 본 발명의 목적은 개선된 계면활성제계를 제공하는 것이고, 본 발명의 바람직한 실시예의 목적은 종래기술의 문제점들을 극복하는 것 및/또는 개선된 성능을 제공하는 효소계세척조성물을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

<8> 본 발명은 제1측면에 따라 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 조합하여 함유하는 수용성조성물을 제공한다.

<9> 바람직하게는, 알킬피롤리돈은 C8 - C18의 선형 알킬피롤리돈이다. N-도데실피롤리돈("N-DP")은 더욱 바람직하다. 바람직하게는, 알킬다당류는 알킬폴리글루코시드("APG")이다.

<10> 본 발명은 제2측면에 따라 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 포함하는 단계를 포함하여, 의료기구들을 세척하는데 사용하기 위한 효소함유조성물의 효능을 증가시키는 방법을 제공한다.

<11> 바람직하게는 조성물은 그것의 제제의 일부로서 제1측면에 따른 계면활성제를 함유하는 농축액이지만, 계면활성

계에는 농축액 또는 작업용액 중 어느 하나가 연속적으로 첨가될 수 있다.

- <12> 본 발명은 제3측면에 따라 적어도 하나의 효소, 알킬피롤리돈 및 알킬다당류를 포함하는 조성물로 기구를 처리하는 단계들을 포함하는 의리기구의 세척방법을 제공한다.
- <13> 상세한 설명 및 청구항들 전체에 걸쳐, '함유한다', '함유하는' 등의 단어들은 배타적인 의미에 상반되는 의미로서, 포함하는 의미; 다시 말하면, "한정되지 않는 포함하는"의 의미로 해석된다.
- <14> 알킬피롤리돈은 물에서 농도를 증가시킴에 따라 표면장력을 점진적으로 감소시키는 것으로 알려진 것으로, 도데실피롤리돈의 경우 약 0.1%의 농도 및 옥틸피롤리돈의 경우 약 0.002%농도에서 최소표면장력(최고 효율성)이 달성되며, 이 농도들은 물에서 각 피롤리돈들의 최고용해도에 상응하는 것이다. 이것이 어떤 상당한 정도로 희석될 때의 수용성계에서의 최고농도는 계면활성제로서 완전히 효과적인 경우 보다 불가피하게 감소하게 되므로, 과거에는 농축액으로서의 그것들의 사용이 억제되었었다.

실시예

<15> n-도데실피롤리돈("n-DP")을 알킬다당류("APG")와 조합하여 구성된 본 발명에 따른 첨가물이 세 개의 시판되는 효소세척조제농축액들로부터 각각 제조된 용액들에 첨가되었다. 이것들은 MEDIZYME[®], ENDOZYME[®] 및 EPIZYME[®]이었다. NOVO INDUSTRIES에 의해 NOVO Nordisk 간행물의 응용시트 B-613의, "내시경세척을 위한 세제들에서의 효소들의 응용"에 기재된 제품인 제4농축액 "노보제제"가 또한 제조되고 시험되었다. 표 1에 기재된 시험들에서, 첨가물들은 농축액의 중량에 대하여 0.2중량%의 n-도데실피롤리돈("n-DP") 및 0.1중량%의 알킬폴리글루코시드("APG")로 구성되었다.

<16> 노보제제(농축액)는 다음과 같다:

<17> 성분	%w/w
<18> 비이온성계면활성제(Teric BL9)	12
<19> 프로필렌글리콜	22
<20> 트리에탄올아민	7
<21> 붕산	4
<22> 염화칼슘	0.1
<23> 사비나아제 16.0L(프로테아제)	13
<24> 테르미아밀(아밀라아제)	7
<25> 물	잔량
<26> pH	7

<27> Epizyme조성물(농축액)은 다음과 같다:

<28> 성분	%w/w
<29> 수돗물	19.0
<30> Teric BL9(비이온성계면활성제)	10.0
<31> 방부제	0.15
<32> 효소안정제	6.0
<33> 50% 가성소다	2.5
<34> 프로필렌글리콜	6.0
<35> 프로테아제	10.0

- <36> 리파아제 0.2
- <37> 아밀라아제 1.5
- <38> 셀룰라아제 0.5
- <39> 방향제 0.15
- <40> 물 잔량

<41> 예로서, 프로테아제는 서브틸리신(subtilisin), 아밀라아제는 알파-아밀라아제가 될 수 있고, 셀룰라아제는 엔도-1,4-베타-글루카나아제가 될 수 있으며, 리파아제는 트리아실글리세롤이 될 수 있다. 그러나, 다른 효소들 또는 효소들의 조합들이 이것들에 대응될 수도 있다.

<42> 표준경수(증류수 1L당 염화칼슘 0.304g 및 염화마그네슘 0.065g, Therapeutic Goods Order 54 & Guideline, 1996, p.17) 100부에 1부의 농도비율로 각 세척조성물농축액들이 희석된다. 그 다음, 유리슬라이드들 상의 표준 오염물조제물들에 대하여, 본 발명에 따른 첨가제의 (1)무첨가 (2)첨가로 각 생성물의 효과가 시험된다. 다양한 온도들에서 조제물의 효율이 측정된다. 결과들은 본 발명에 따른 첨가제를 포함한 조성물들의 결과와 비교하여 표 1에서 보여진다.

<43> 축진에이징시험들은 표 2에 요약된다. 표준오염물들의 조제물의 항목들은 표 3 및 "Methods for Ascertaining the Cleansing Performance of Dishwasher Detergents"(SOFW-Journal, 126. Jahrgang 3-2000)에 주어진다.

<44> 표 1

<45> 오염물담체: 유리현미경슬라이드

<46> 탄 잘게 썬 고기. 8점이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분).

	노보-제제		EPIZYME		MEDIZYME		ENDOZYME	
	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가
25℃	95	68	67	47	120	93	>480	241
40℃	60	46	52	37	87	71	212	157
50℃	42	33	30	19	65	53	170	140

<48> 마이크로파에서의 우유. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분).

	노보-제제		EPIZYME		MEDIZYME		ENDOZYME	
	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가
25℃	53	38	35	25	39	30	69	51
40℃	39	31	24	19	29	23	50	35
50℃	27	22	12	10	19	16	31	28

<50> 에딘버러(Edinburgh)오염물. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

	노보-제제		EPIZYME		MEDIZYME		ENDOZYME	
	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가
25℃	28	25	21	19	26	23	32	28
40℃	21	20	11	10	17	11.5	25	35
50℃	18	15	9	9	11	10	18	16

- <52> N-DP : N-도데실피롤리돈(International Speciality Products의 Surfadone LP 300)
- <53> APG : 알킬폴리글루코시드(오스트레일리아 Huntsman Corporation의 ALKADET 15)
- <54> 첨가비율 : 농축액에 대하여 N-DP 0.2w/w% 및 APG 0.1w/w%
- <55> 희석비율 : 표준경수 100부에 대하여 농축액 1부
- <56> 표 1로부터 분명하듯이, 첨가제의 첨가는 주어진 점수를 획득하기 위해 조성물에 요구되는 시간을 감소시킨다. 첨가제는 저온에서 특히 효과적이다.
- <57> 표 1에서 보인 결과들은 농축액에 대하여 0.2w/w% N-DP 및 0.1w/w% APG를 사용하였지만, N-DP 및 APG의 비율은 변화될 수 있다. 1중량부의 알킬피롤리돈 대 3중량부의 알킬폴리글루코시드 및 3중량부의 알킬피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드 사이가 되는 비율이 바람직하고, 보다 바람직하게는 이 비율은 3중량부의 알킬피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드 및 1중량부의 알킬피롤리돈 대 1중량부의 알킬폴리글루코시드 사이이다.
- <58> N-DP 및 APG의 농축액은 바람직하게는 7.5%w/w미만(농축액 1부:물 100부의 희석에서 농축액의 약 0.0075%미만)의 농축액이 바람직하고, 보다 바람직하게는 3%w/w미만이다. 사용되어지는 실제 농도들은 요구되는 표면장력특성들, 알킬폴리글루코시드들의 친수성 및 각 제제들에 대하여 발생할 수 있는 다른 요인들뿐만 아니라 알킬폴리글루코시드의 제제에서 다른 첨가제들에 의해 제공되는 굴수도에 의존할 것이다.
- <59> 표 2는 축진에이징시험들에서 첨가제의 효과를 보여준다. 이 결과들은 첨가제가 저장안정성을 약간 향상시키거나 또는 적어도 그것에 역으로는 영향을 미치지 않는다는 것을 증명한다.
- <60> 표 2
- <61> 21일 저장 후 농축된 제제들에 대한 잔류프로테아제활성%(0일일 때 100%)

<62>

	노보-제제		EPIZYME		MEDIZYME		ENDOZYME	
	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가	무첨가	APG + n-DP 첨가
25℃	95	95	96	98	95	95	93	93
40℃	89	89	91	91	85	85	80	83
47℃	77	84	85	87	69	74	73	78

- <63> 노보노르디스크(부록 1에 첨부됨)에 의한 B 863b시험방법을 사용하여 평가됨. 본 발명에 따른 첨가제 및 희석은 표 1과 같다.
- <64> 표 3은 알킬피롤리돈 및 알킬폴리글루코시드의 농도 및 비율을 변화시킴에 따른 효과들을 보여준다. 조성물은 광범위한 알킬피롤리돈 대 알킬폴리글루코시드 비율들에 걸쳐 세척을 위한 접촉시간을 감소시키는데 효과적이라는 것을 알 수 있다.
- <65> 표 3
- <66> 오염물담체 : 유리현미경슬라이드
- <67> 탄 잘게 썬 고기. 8점이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분).

<68>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	95	66	67	48
40℃	60	49	52	39
50℃	42	32	30	22

<69> 마이크로파 내의 우유. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<70>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	53	34	35	21
40℃	39	29	24	17
50℃	27	20	12	8

<71> 에딘버르오염물(Edinburgh Soil). 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분).

<72>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	28	22	21	19
40℃	21	16	11	9
50℃	18	19	9	8

<73> SURF : n-도데실피롤리돈(International Speciality Products의 Surfadone LP300)

<74> APG : 알킬폴리글루코시드(오스트레일리아 Huntsman Corporation의 ALKADET 15)

<75> 첨가비율 : 농축액에 대하여 0.2w/w%의 SURF 및 1%의 APG

<76> 희석비율 : 100부의 표준경수에 대하여 1부의 농축액

<77> 실험결과.

<78> 오염물담체 : 유리현미경슬라이드

<79> 탄 잘게 썬 고기. 8점이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<80>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	95	64	67	44
40℃	60	47	52	37
50℃	42	31	30	22

<81> 마이크로파 내의 우유. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<82>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	53	34	35	21
40℃	39	28	24	16
50℃	27	20	12	7

<83> 에딘버르오염물. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<84>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	28	21	21	19
40℃	21	15	11	9
50℃	18	14	9	7

<85> SURF : n-도데실피롤리돈(International Speciality Products의 Surfadone LP300)

<86> APG : 알킬폴리글루코시드(오스트레일리아 Huntsman Corporation의 ALKADET 15)

<87> 첨가비율 : 농축액에 대하여 0.2w/w%의 SURF 및 7.5%의 APG

<88> 희석비율 : 100부의 표준경수에 대하여 1부의 농축액

<89> 실험결과들.

<90> 오염물담체 : 유리현미경슬라이드

<91> 탄 잘게 썬 고기. 8점이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	95	67	67	44
40℃	60	44	52	41
50℃	42	30	30	20

<93> 마이크로파 내의 우유. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	53	37	35	24
40℃	39	26	24	15
50℃	27	18	12	12

<95> 에던버그오염물. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	28	18	21	19
40℃	21	15	11	12
50℃	18	12	9	7

<97> SURF : n-도데실피롤리돈(International Speciality Products의 Surfadone LP300)

<98> APG : 알킬폴리글루코시드(오스트레일리아 Huntsman Corporation의 ALKADET 15)

<99> 첨가비율 : 농축액에 대하여 1w/w%의 SURF 및 0.1%의 APG

<100> 희석비율 : 표준경수 100부에 대하여 농축액 1부

<101> 실험결과들.

<102> 오염물담체 : 유리현미경슬라이드

<103> 탄 잘게 썬 고기. 8점이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	95	63	67	49

40℃	60	52	52	37
50℃	42	35	30	23

<105> 마이크로파에서의 우유. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<106>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	53	35	35	24
40℃	39	27	24	16
50℃	27	24	12	9

<107> 에딘버그오염물. 10점(완전제거)이 되기 위해 요구되는 접촉시간(분)

<108>

	노보-제제		Epizyme	
	무첨가	APG + SURF 첨가	무첨가	APG + SURF 첨가
25℃	28	23	21	20
40℃	21	17	11	9
50℃	18	12	9	7

<109> SURF : n-도데실피롤리돈(International Speciality Products의 Surfadone LP300)

<110> APG : 알킬폴리글루코시드(오스트레일리아 Huntsman Corporation의 ALKADET 15)

<111> 첨가비율 : 농축액에 대하여 7.5w/w%의 SURF 및 0.1%의 APG

<112> 희석비율 : 표준경수 100부에 대하여 농축액 1부

<113> 노보노르디스크에 의한 B 863B시험방법을 사용하여 평가됨(첨부)

<114> 표 4

<115> 오염물조성 및 세제성효소의 활성시험

<116> 마이크로파에서의 우유 : - 60ml의 우유

<117> - 6개 비커들

<118> - 마이크로파는 450W로 설정

<119> - 오븐가열기는 80℃로 설정

<120> 유리회전판상의 원안에 6개의 물이 담긴 비커들을 놓고 10분간 "고"(900W)로 유지하여 마이크로파를 예열한다. 그 다음, 물이 담긴 비커들을 10ml의 우유가 담긴 비커들로 교체한다. 우유들을 450W로 10분간 가열한 후, 냉각하여 피막이 형성되면 2시간동안 80℃의 오븐에 넣어두었다.

<121> 잘게 썬 고기 : - 잘게 썬 쇠고기 20그램

<122> - 달걀노른자 및 흰자 7.5그램

<123> - 물 8.0그램

<124> - 30x30mm의 극판(세라믹타일)

<125> 수동믹서를 이용하여 잘게 썬 고기를 달걀노른자 및 물과 혼합하였다. 균일혼합물 1g을 3x3cm 세라믹타일들상의 매끄러운 면 위에 떠놓는다. 그 다음, 타일들을 10분간 오븐에 넣어두었다.

<126> 에딘버그오염물 : - 달걀노른자 20g

<127> - 물 20g

- <128> - 콜레스테롤 0.5g
- <129> - 쇠고기젤라틴 3g
- <130> - 돼지뮤신 0.45g
- <131> 쇠고기젤라틴 및 물을 함께 혼합하여 균일한 농도의 혼합물이 얻어질 때까지 가열하였다. 젤라틴을 30℃로 냉각한 후에 콜레스테롤, 돼지뮤신 및 달걀노른자를 혼합하였다. 현미경슬라이드의 표면 위에 오염물 0.1g이 퇴적되었다. 각 세트의 슬라이드들에 균일한 두께로 얼룩들이 생겼고; 그 두께는 오염된 기구의 각 가장자리를 따라 접착테이프를 땀으로써 조절되었다. 내시경세척의 조건들을 모의실험하기 위하여, 슬라이드들을 20℃에서 20분간 외기 또는 옥외에 건조를 위해 방치한다.
- <132> 다당류는 피롤리돈을 안정하게 하고, 그 조합물은 농축액에 더 잘 용해되어 작업희석액에서 실질적으로 개선된 표면장력의 저하의 결과가 된다.
- <133> 시험결과들에서는 n-도데실피롤리돈을 사용하였지만, 다른 알킬피롤리돈들, 특히 C8 내지 C18의 알킬피롤리돈들이 대용될 수 있다. 첨가되는 양은 간단한 실험으로 결정될 수 있으나, 일반적으로 여기서 사용된 수준들을 초과하여 현저하게 농도를 증가시키는 경우에는 감소된 이점을 주기 쉽다. 마찬가지로, 다른 알킬다당류들도 APG에 대용할 수 있다. 예컨대, 글루코즈단위들은 다른 당단위들 및 당단위들의 유도체들로 대체될 수 있다. 농도를 증가시키는 것이 비교적 적은 이익이라는 것을 넘어서는 최적인 농도가 있다. n-알킬피롤리돈과 APG의 조합이 매우 바람직한 반면, 일부 오염물들에 대하여는 그것을 분리해서 첨가함으로써 유리한 효과들이 얻어질 수도 있다. n-DP 대 APG의 최적비율은 주어진 농축액에 대해 간단한 실험들로 결정될 수 있다.
- <134> 본 발명의 조합은 많은 최종용도들에 적용되는 것이 기대되는 개선된 계면활성제계를 제공한다. 의료기구들에 대한 세척제분야에서, 본 발명의 계면활성제계는, 시판되는 효소세제제품들에 사용 전의 작업용액에 대한 농축액 또는 적당한 희석액으로 간단히 첨가될 수 있다. 그러나 바람직하게는 첨가제는 농축액의 제조시에 농축액에 혼합되어 사용전에 단지 희석된다.
- <135> 본 발명에 따른 첨가제들은 식기세척, 손세정 및 다른 표면세척조성물들에 첨가될 수 있다.
- <136> 본 발명의 실시예들은 여기에 개시된 발명의 개념에서 벗어나지 않는 범위내에서, 그것으로부터 당업자에게 명백한 범위내에서 변경될 수 있고 다른 화학물질들이 첨가되거나 대용될 수 있다.
- <137> **부록 1.**
- <138> **노보노르디스크 B 863b-GB**
- <139> **효소조제품들 및 세제들(아조카세인 기질)의 단백질가수분해활성의 측정을 위한 실험과정**
- <140> 이 방법의 개략적인 표현은 도 1에서 보여준다.
- <141> **원리**
- <142> 프로테아제는 40℃에서 30분간 아조카세인을 가수분해하는데 이용된다. 소화되지 않은 단백질은 트리클로로아세트산으로 침전되고, 소화된 생성물의 양은 분광광도계에 의해 측정된다.
- <143> **효소단위 정의**
- <144> 별도의 단위는 정의되지 않는다. 활성은 알려진 활성의 표준 및 그 표준에서 사용된 것과 동일한 단위로 주어진 결과에 관련하여 결정된다.
- <145> **검정조건들**
- <146> pH : 8.5(0.2M 트리스-SO₄ 완충용액)
- <147> 온도 : 40℃
- <148> 기질 : 0.5% 아조카세인(반응혼합물 내)
- <149> 반응시간 : 30분
- <150> **장치**

- <151> 390nm에서 흡광도를 읽기 위한 분광광도계
- <152> pH측정기
- <153> 40℃ · 0.5℃의 수조
- <154> 초침타이머
- <155> 와류식혼합기
- <156> 16 · 125mm 시험관들
- <157> 5ml용량의 반복디스펜서
- <158> 소형칼때기 및 여과지, 와트만 no.3 또는 균등물
- <159> **시약**
- <160> 1. 2.0M의 트리스완충원액
- <161> 700-800ml의 탈염수에 242g의 트리스히드록시메틸아미노메탄(시그마 "Trizma Base" T-1503 또는 균등물)을 용해시킨다.
- <162> 10N H₂SO₄로써 pH를 8.5로 조절한다.
- <163> 부피를 1리터로 조절한다.
- <164> 이 농축액은 0.2M 트리스완충용액을 사용하는 모든 최종희석들에서 10ml/100ml 부피로 사용된다.
- <165> 2. 50%의 요소용액
- <166> 50ml의 탈염수에 50g의 요소(분석용시약)를 용해시킨다.
- <167> 부피를 1리터로 맞춘다.
- <168> 3. 10%의 트리클로로아세트산용액(정지액)
- <169> 200ml의 탈염수에 100g의 트리클로로아세트산(TCA)을 용해시킨다.
- <170> 부피를 1리터로 맞춘다.
- <171> 4. 아조카세인(기질용액)
- <172> 매일 신선하게 한다 - 사용되지 않은 기질은 버린다.
- <173> 250ml 비커에서,
- <174> 아조카세인(시그마 A-2765)이 0.6g이 되게 계량한다.
- <175> 50% 요소용액 10ml를 첨가하고 용해될 때까지 혼합한다.
- <176> 2.0M 트리스완충원액 10ml를 첨가한다.
- <177> 30-50ml의 탈염수를 첨가하고 입자들이 투명해질 때까지 계속 저어준다.
- <178> 희석제 H₂SO₄를 사용하여 pH를 8.5로 맞춘다. 100ml로 부피를 조절하고 완전히 혼합한다.
- <179> 결정개시 직전까지 차게 유지한다.
- <180> 5. 효소샘플들 및 표준들
- <181> 첨부자료 I의 Alcalase[®], 첨부자료 II의 Esperase[®] 및 Savinase[®], 및 첨부자료 III의 Durazym[®]을 참조한다.
- <182> 프로테아제 검정에 세제샘플을 용해시킨 후, 이 용액의 pH를 체크할 것을 권하며, 필요하다면 0.1단위씩 8.5로 조절한다.
- <183> 세제내에서 프로테아제의 정확한 활성수준을 알기를 원한다면, 사용되어지는 특정한 제제가 프로테아제활성에 영향이 없는 것으로 이미 알려진 경우 외에는, 세제염기들이 표준용액들에 포함되어야만 한다. 염기성세제들의

농도는 프로테아제를 함유한 세제의 샘플용액에 사용된 것과 동일하여야만 한다.

<184> NTA 또는 EDTA와 같은 강한 킬레이트제들이 용액내에 존재하면 검정을 위한 다양한 물질들의 준비에 요구되는 기간동안 프로테아제의 불활성화를 초래할 수도 있다. 이러한 불활성화의 원인은 샘플용액에 칼슘을 과잉으로 첨가함으로써 극복될 수 있다.

<185> **절차**

<186> 1. 수조를 40°C ± 0.5°C로 예열한다(대략 1시간).

<187> 2. 검정을 개시하기 전에 약 10분간, 평형을 유지하게 위하여 기질용액을 40°C의 수조에 놓아둔다.

<188> 3. 알맞은 라벨이 붙은 시험관들에, 대략 1ml의 샘플 또는 표준효소를 피펫으로 옮겨 수조내에서 40°C로 평형을 유지한다(대략 1시간).

<189> 4. 반응개시 :

<190> 정확히 1분 간격으로, 샘플 또는 표준효소를 포함한 각 시험관에 기질용액 5ml를 첨가하여 회전시키고 30분간 수조에 다시 넣어둔다.

<191> 바탕시료 :

<192> 바탕시료에 10% TCAM를 5ml를 가하고 회전시킨다; 그 다음 기질용액 5ml를 가하여 회전시키고 여과장치가 준비될 때까지 실온에서 방치한다.

<193> 5. 정지반응 :

<194> 정확히 30분 후에, 이전과 같은 시간간격들로, 각 시료 또는 표준시험관에 10%TCA 5ml를 가하고 회전시킨 후 실온에서 방치한다.

<195> 6. 15-20분 후, 종이필터들을 통한 중력여과법에 의하여 모든 시험관들을 깨끗하게 여과하고 건조하여 시험관들에 적절하게 라벨을 붙인다.

<196> 7. 390nm 대 바탕탈염수의 흡광도들을 읽는다.

<197> **계산법**

<198> 1. 표준곡선 :

<199> a) 바탕표준(A₀, E₀ 또는 S₀)>0.16이라면, 검정은 새로운 기질로 재연하여야 한다.

<200> b) 바탕표준<0.16이라면, 흡광도를 얻기 위해 표준들로부터 A₃₉₀기록들을 뺀다.

<201> c) 흡광도 대 단백질가수분해의 활성곡선을 작성한다(AU 또는 KNPU/시험관 = AU 또는 KNPU/최종희석물의 ml)

<202> 2. 시료관들 :

<203>
$$\text{흡광도} = A_{\text{시료}} - A_{\text{바탕}}$$

<204> 표준곡선을 사용하여, 시료/시험관의 활성을 결정한다.

<205>
$$\text{활성/그램} = \frac{(\text{활성/시험관}) \cdot (\text{희석인자})}{\text{시료(그램)}}$$

<206> **첨부자료 I**

<207> Alcalase[®]

<208> 단위정의: Anson Unit(AU)

<209> 1 Anson단위 = 1밀리당량의 타이로신(tyrosine)과 같은 페놀시약과 동일한 색을 주는 TCA-용해생성물의 양이 분당 유리되는 초기속도로 헤모글로빈 A를 소화시키는 효소*의 양.

<210> * NNAS법 AF4/5-GB에서 주어진 반응조건들하에서: 단백질가수분해활성의 측정을 위한 변형된 안손헤모글로빈법

(Modified Anson-Hemoglobin Method).

- <211> 표준곡선은 안손단위들의 활성이 알려진 효소를 사용하여 작성한다.
- <212> 완충용액 : 0.2M 트리스, pH 8.5
- <213> 시료활성범위 : $5 \times 10^{-5} \sim 15 \times 10^{-5}$ AU/ml
- <214> 바탕표준 : 0.2M 트리스완충용액 1ml, pH 8.5=A₀
- <215> 기질 : 아조카세인용액, 0.5%, pH 8.5
- <216> 시료조제 :
- <217> 정확히 알려진 부피의 0.2M 트리스완충용액에 정확히 무게를 잰 시료를 용해시켜 용액이 5×10^{-5} 및 15×10^{-5} AU/ml 사이를 포함하고, 8.5의 pH를 가진다.
- <218> 각각의 미지시료에 대하여, 바탕시료 및 하나이상의 복제(필요하다면)를 준비한다.
- <219> 검정준비까지 용액들을 얼음에 넣어둔다.
- <220> 표준곡선
- <221> 효소표준원액 : 0.2M 트리스완충용액(pH 8.5) 100ml에 정확히 무게를 잰 표준 알칼라아제(Alcalase standard)를 용해시켜 2.6×10^{-3} 으로 한다.
- <222> 원액을 다음과 같이 용해시킨다:

시험관라벨	원액	2M 트리스 완충용액	최종부피	활성
A ₀	0ml	10ml	100ml	0.0×10^{-5} AU/ml
A ₁	1ml	10ml	100ml	2.6×10^{-5} AU/ml
A ₂	2ml	10ml	100ml	5.2×10^{-5} AU/ml
A ₃	3ml	10ml	100ml	7.8×10^{-5} AU/ml
A ₄	4ml	10ml	100ml	10.4×10^{-5} AU/ml
A ₅	5ml	10ml	100ml	13.0×10^{-5} AU/ml
A ₆	6ml	10ml	100ml	15.6×10^{-5} AU/ml

- <224>
- <225> **첨부자료 II**
- <226> Savinase[®]/Esperase[®]
- <227> 단위정의 : 킬로노보프로테아제단위(KNPU)
- <228> 1KNPU = 1000NIPU
- <229> 1노보프로테아제단위(NPU) = 분당 펩티드의 초기제제속도가 분당 1마이크로몰의 글리신에 상응하는 속도로 카세인을 가수분해시키는 효소*의 양
- <230> *NNAS법 162/3-GB에서 주어진 표준조건들 : 단백질가수분해활성의 측정을 위한 실험DMC법
- <231> 표준곡선은 KNPU로 알려진 효소활성을 사용하여 조제된다.
- <232> 완충용액 : 0.2M 트리스, pH 8.5
- <233> 시료활성영역 : $2 \times 10^{-4} \sim 6 \times 10^{-4}$ KNPU/ml

- <234> 바탕표준 : 0.2M 트리스완충용액 1ml, pH 8.5=E₀ 또는 S₀
- <235> 기질 : 아조카세인용액, 0.5%, pH 8.5
- <236> 시료조제 :
- <237> 정확히 알려진 부피의 0.2M 트리스완충용액에 정확히 무게를 잰 시료를 용해시켜 용액이 2x10⁻⁴ 및 6x10⁻⁴ KNPU/ml 사이를 포함하고, 8.5의 pH를 가진다.
- <238> 각각의 미지시료에 대하여, 바탕시료 및 하나이상의 복제(필요하다면)를 준비한다.
- <239> 검정준비까지 용액들을 얼음에 넣어둔다.
- <240> 표준곡선
- <241> 효소표준원액 : 0.2M 트리스완충용액(pH 8.5) 100ml에 정확히 무게를 잰 사비나아제 또는 에스페라아제를 용해시켜 1x10⁻² KNPU/ml으로 한다.
- <242> 원액을 다음과 같이 용해시킨다:

시험관	원액	2M 트리스완충원액	최종부피	활성
E ₀ 또는 S ₀	0ml	10ml	100ml	0.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₁ 또는 S ₁	1ml	10ml	100ml	1.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₂ 또는 S ₂	2ml	10ml	100ml	2.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₃ 또는 S ₃	3ml	10ml	100ml	3.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₄ 또는 S ₄	4ml	10ml	100ml	4.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₅ 또는 S ₅	5ml	10ml	100ml	5.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml
E ₆ 또는 S ₆	6ml	10ml	100ml	6.0x10 ⁻⁴ KNPU/ml

- <244> E = 에스페라아제, S = 사비나아제
- <245> **첨부자료 III**
- <246> Durazym[®]
- <247> 단위정의 : Durazym Protease Unit(DPU)
- <248> 활성은 시료와 동일한 단위들, 즉 DPU로 표준듀라짐에 관련하여 측정된다.
- <249> 표준곡선은 DPU로 알려진 효소활성을 사용하여 조제된다.
- <250> 미지시료들을 이 곡선들과 비교한다.
- <251> 완충용액 : 0.2M 트리스, pH 8.5
- <252> 시료활성영역 : 6x10⁻⁴ ~ 18x10⁻⁴ DPU/ml
- <253> 바탕표준 : 0.2M 트리스완충용액 1ml, pH 8.5=D₀
- <254> 기질 : 아조카세인용액, 0.5%, pH 8.5
- <255> 시료조제 :
- <256> 정확히 알려진 부피의 0.2M 트리스완충용액에 정확히 무게를 잰 시료를 용해시켜 용액이 6x10⁻⁴ 및 18x10⁻⁴ DPU/ml 사이를 포함하고, 8.5의 pH를 가진다.
- <257> 각각의 미지시료에 대하여, 바탕시료 및 하나이상의 복제(필요하다면)를 준비한다.

<258> 검정준비까지 용액들을 얼음에 넣어둔다.

<259> 표준곡선

<260> 효소표준원액 : 0.2M 트리스완충용액(pH 8.5) 100ml에 정확히 무게를 잰 표준듀라짐을 용해시켜 1×10^{-2} DPU/ml으
로 한다.

<261> 원액을 다음과 같이 용해시킨다:

<262>

시험관라벨	원액	2M 트리스 완충원액	최종부피	활성
D ₀	0ml	10ml	100ml	0.0×10^{-4} DPU/ml
D ₁	3ml	10ml	100ml	3.0×10^{-4} DPU/ml
D ₂	6ml	10ml	100ml	6.0×10^{-4} DPU/ml
D ₃	9ml	10ml	100ml	9.0×10^{-4} DPU/ml
D ₄	12ml	10ml	100ml	12.0×10^{-4} DPU/ml
D ₅	15ml	10ml	100ml	15.0×10^{-4} DPU/ml
D ₆	18ml	10ml	100ml	18.0×10^{-4} DPU/ml

도면

도면1

