

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6243473号  
(P6243473)

(45) 発行日 平成29年12月6日(2017.12.6)

(24) 登録日 平成29年11月17日(2017.11.17)

(51) Int. Cl.	F I
AO1N 63/00 (2006.01)	AO1N 63/00 F
AO1P 13/00 (2006.01)	AO1P 13/00
AO1P 15/00 (2006.01)	AO1P 15/00
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 D
	C12N 1/20 A

請求項の数 6 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-95875 (P2016-95875)	(73) 特許権者	507121116
(22) 出願日	平成28年5月12日 (2016.5.12)		ノボザイムス バイオリジカルズ, インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願2013-247623 (P2013-247623) の分割		アメリカ合衆国, バージニア 24153, サーレム, コーポレイト サークル 5400
原出願日	平成20年3月20日 (2008.3.20)	(74) 代理人	100099759
(65) 公開番号	特開2016-147904 (P2016-147904A)		弁理士 青木 篤
(43) 公開日	平成28年8月18日 (2016.8.18)	(74) 代理人	100077517
審査請求日	平成28年6月13日 (2016.6.13)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	60/896, 693	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成19年3月23日 (2007.3.23)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087413
微生物の受託番号	NRRL B-50017		弁理士 古賀 哲次
微生物の受託番号	ATCC PTA-7541		
微生物の受託番号	ATCC PTA-7542		
微生物の受託番号	ATCC PTA-7543		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルム形成及びプランクトン様増殖の予防及び低減

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物のプランクトン様増殖の防止及び/又は低減のための方法であって、当該微生物を水溶液中で、

受託番号NRRL B-50017を有する菌株、

受託番号PTA-7541を有する菌株、

受託番号PTA-7542を有する菌株、

受託番号PTA-7543を有する菌株、

受託番号PTA-7545を有する菌株、

受託番号PTA-7546を有する菌株、

受託番号PTA-7791を有する菌株、

又は2以上の当該菌株の混合物、からなる群から選択される1又は複数の細菌株に晒すことを含んでなり、

ここでプランクトン様増殖とは、水性環境中における不所望微生物増殖を意味する、方法。

【請求項2】

前記菌株が、前記寄託菌株のうち1つ、又は、前記寄託菌株のうち2以上の混合物と同一の特性を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記プランクトン様増殖が、1又は複数の不所望微生物により引き起こされる、請求項

1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が周期的に反復される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

酵素、分散剤、界面活性剤、抗微生物剤、及び殺生物剤からなる群から選択される 1 又は複数の剤がさらに存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細菌性細胞数が、 $1 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面上のバイオフィルム及び/又は水性環境、特に家庭 (domestic/household) 及び工業環境におけるプランクトン様増殖の予防及び/又は低減のための方法及び組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

不所望微生物によるバイオフィルム形成及びプランクトン様増殖は、家庭及び工業環境において周知の現象である。例えば、便器には、表面上の及び溶液中の不所望細菌がひそんでおり、その便器の著しく不潔な外観の原因となり得る。さらに、便器中の不所望微生物の存在は、洗浄の際におけるエアロゾルの分散を引き起こすこともある。水系、例えば配管、ポンプ及び容器における、大量のバイオフィルム形成及びプランクトン様増殖は、健康管理リスク、腐食、及び審美的問題を引き起こすことが知られている。

20

【0003】

不所望微生物によるバイオフィルム形成及び/又はプランクトン様増殖の予防又は低減は、従来から、分散剤、界面活性剤、酵素、微小管、抗微生物剤、殺生物剤、煮沸処理、及び/又は化学物質の使用を必要としてきた。

【0004】

米国特許第 5, 171, 591 号 (特許文献 1) は、ブデロピブリオ属の寄生虫細菌を用いる、特定の食物又は食物接触表面の中又は上の不所望細菌の制御又は除去に関する。

30

【0005】

米国特許第 5, 242, 593 号 (特許文献 2) は、単一形態で非固着微小管を循環水へ添加することにより水循環系における粘液及び/又はフィルム積層を低減させるための方法に関する。

【0006】

米国特許第 5, 360, 517 号 (特許文献 3) は、スタフィロコッカス・カルノサス (Staphylococcus carnosus) 種の細菌を有効な殺菌量を導入することを含んでなる、水性の製紙回路/過程の流れの中で、微生物/細胞叢の増殖を調節する過程を開示する。

【0007】

米国特許第 5, 863, 882 号 (特許文献 4) は、4 つの病原性微生物を低減させることができる、殺菌組成物、生きたバチルス孢子、及び界面活性剤を含んでなる、液体の洗浄及び殺菌製剤に関する。

40

【0008】

豪州特許第 7 195 44 号 (特許文献 5) は、非病原性グラム陽性細菌による、水中の病原性細菌の数を制御する方法に関する。

【0009】

国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 1 5 5 4 号 (特許文献 6) は、表面を細菌由来のアルファ - アミラーゼと接触させることにより、表面上のバイオフィルムを予防、除去、低減又は崩壊させる方法を開示する。

【先行技術文献】

50

## 【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第5,171,591号

【特許文献2】米国特許第5,242,593号

【特許文献3】米国特許第5,360,517号

【特許文献4】米国特許第5,863,882号

【特許文献5】豪州特許第719544号

【特許文献6】国際公開第2006/031554号

## 【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

不所望微生物のバイオフィルム形成及びプランクトン増殖を、低減及び予防する方法は当業界で既知であるが、なおそのための方法及び組成物の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、水性環境におけるバイオフィルム形成及び/又はプランクトン様増殖の低減及び/又は予防のための、方法及び組成物に関する。

【0013】

本発明者等は、水性環境におけるバイオフィルム形成及び/又はプランクトン様増殖の低減能について、非常に多数の細菌株を単離及び試験した。彼らは、試験された少数のバチルス属は、不所望微生物、例えばシュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・モンテリ (*Pseudomonas montelli*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、ビブリオ・ハルベイ (*Vibrio harveyi*)、ビブリオ・アルギノリテिकास (*Vibrio alginolyticus*)、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischerii*)、及び/又は *E. coli* (*Escherichia coli*) と共培養する場合、バイオフィルム形成及び/又はプランクトン様増殖の低減及び/又は予防ができることを発見した。これは実施例において詳細に記載する。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、異なるバチルス：シュードモナス比率での、バチルス混合物 (*Bacillus* blend (6BB)) 存在下のシュードモナス群のプランクトン増殖の減少を示す。

30

【図2】図2は、異なるバチルス：シュードモナス比率での、バチルス混合物(6BB)存在下のシュードモナスバイオフィルム増殖の減少を示す。

【図3】図3は、異なるバチルス：シュードモナス比率での、バチルス混合物(6BB)存在下のプランクトン様シュードモナス増殖の減少を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

バイオフィルム形成の予防及び/又は低減のための方法

第一の態様によれば、本発明は、表面上のバイオフィルム形成の防止及び/又は低減のための方法であって、当該表面を以下の、

40

受託番号NRRL B-50014を有する菌株、

受託番号NRRL B-50015を有する菌株、

受託番号NRRL B-50016を有する菌株、

受託番号NRRL B-50017を有する菌株、

受託番号NRRL B-50018を有する菌株、

受託番号PTA-7541を有する菌株、

受託番号PTA-7542を有する菌株、

受託番号PTA-7543を有する菌株、

受託番号PTA-7544を有する菌株、

受託番号PTA-7545を有する菌株、

50

受託番号 P T A - 7 5 4 6 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 5 4 7 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 5 4 9 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 7 9 0 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 7 9 1 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 7 9 2 を有する菌株、  
 受託番号 P T A - 7 7 9 3 を有する菌株、又は 2 以上の当該菌株の混合物、  
 からなる群から選択される 1 又は複数の細菌株に晒すことを含んでなる方法に関する。

【 0 0 1 6 】

ある実施態様によれば、受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 4 を有する菌株に、当該表面  
 を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法  
 に関する。ある実施態様によれば、受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 5 を有する菌株に  
 、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減  
 のための方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 6 を有  
 する菌株に、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び  
 / 又は低減のための方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 N R R L B - 5 0  
 0 1 7 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成  
 の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 N R R L  
 B - 5 0 0 1 8 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフ  
 ィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある実施態様によれば、受託番  
 号 N R R L B - 5 0 0 1 9 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上  
 のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある実施態様によれ  
 ば、受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 9 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んでな  
 る、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある実施  
 態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 1 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んで  
 なる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある実  
 施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 2 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含ん  
 でなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。ある  
 実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 3 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含  
 んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。あ  
 る実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 4 を有する菌株に、当該表面を晒すことを  
 含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する。  
 ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 5 を有する菌株に、当該表面を晒すこと  
 を含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関する  
 。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 6 を有する菌株に、当該表面を晒すこ  
 とを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関す  
 る。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 7 を有する菌株に、当該表面を晒す  
 ことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に関  
 する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 4 9 を有する菌株に、当該表面を晒  
 すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法に  
 関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 5 5 0 を有する菌株に、当該表面を  
 晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方法  
 に関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 7 8 9 を有する菌株に、当該表面  
 を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のための方  
 法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 7 9 0 を有する菌株に、当該表  
 面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のため  
 の方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 7 9 1 を有する菌株に、当該  
 表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のため  
 の方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 7 9 2 を有する菌株に、当  
 該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び / 又は低減のた

10

20

30

40

50

めの方法に関する。ある実施態様によれば、受託番号 P T A - 7 7 9 3 を有する菌株に、当該表面を晒すことを含んでなる、表面上のバイオフィルム形成の予防及び/又は低減のための方法に関する。

【 0 0 1 7 】

ある実施態様によれば、細菌の混合物を本発明の方法により使用してもよい。混合物の例としては、以下の「細胞菌株及び細胞菌株の混合物」の節に示すものが挙げられる。

【 0 0 1 8 】

「バイオフィルム形成」なる用語は、不所望微生物による表面上への粘液層又はフィルムの形成を意味する。バイオフィルム形成は、個々に又はコロニーで、表面に結合する不所望微生物の増殖の結果である。

10

【 0 0 1 9 】

「表面」なる用語は、バイオフィルム形成及び微生物接着の傾向を有する可能性がある、任意の表面、好ましくは硬表面のことを言う。考慮される表面の例としては、1又は複数の以下の物質、金属、可塑物、ゴム、板、ガラス、木材、紙、コンクリート、岩、大理石、石膏、及びセラミック物質、例えばポーセレンから作製される硬表面があり、これは例えば塗料又はエナメルで任意に塗装される。軟表面の例としては、任意の種類繊維（例えば、毛糸、織物、植物繊維、岩綿、及び髪）から作製される表面、又は任意の多孔質表面、皮膚（ヒト又は動物）、角質物質（例えば、爪）、及び内臓組織（例えば、肺）がある。

【 0 0 2 0 】

20

硬表面は、例えばバスルームにおいて、例えば、取付品、流し台、バスタブ、便器、及びゆすぎ水貯蔵容器があり、冷却塔、水処理施設、貯水槽、乳製品食品加工施設等、化学もしくは製剤工程施設、又は医薬装置（例えば、カテーテル、矯正装置、及び移植片）において見られる。バイオフィルム傾向のある表面はまた、多孔質表面であってもよい。例えば多孔質表面は、フィルター、例えば薄膜フィルターに存在する。

【 0 0 2 1 】

プランクトン様増殖の予防及び/又は低減のための方法

第一の態様によれば、本発明は、（1又は複数の）微生物のプランクトン様増殖の防止及び/又は低減のための方法であって、当該（1又は複数の）微生物を水溶液中で以下の

30

受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 4 を有する菌株、

受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 5 を有する菌株、

受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 6 を有する菌株、

受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 7 を有する菌株、

受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 8 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 1 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 2 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 3 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 4 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 5 を有する菌株、

40

受託番号 P T A - 7 5 4 6 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 7 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 5 4 9 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 7 9 0 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 7 9 1 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 7 9 2 を有する菌株、

受託番号 P T A - 7 7 9 3 を有する菌株、又は2以上の当該菌株の混合物、

からなる群から選択される1又は複数の細菌株に晒すことを含んでなる方法に関する。

【 0 0 2 2 】

ある実施態様によれば、受託番号 N R R L B - 5 0 0 1 4 を有する菌株に、当該（1

50



93を有する菌株に、当該（1又は複数の）微生物を水溶液中で晒すことを含んでなる、（1又は複数の）微生物のプランクトン様増殖の予防及び/又は低減のための方法に関する。

【0023】

ある実施態様によれば、細菌の混合物を本発明の方法により使用してもよい。混合物の例としては、以下の「細胞菌株及び細胞菌株の混合物」の節により明らかにできる。

【0024】

「プランクトン様増殖」なる用語は、水性環境中、例えば水中における、不所望微生物、好ましくは不所望細菌の増殖を意味する。当該不所望微生物は典型的には、水性環境中に自由に発生する。考慮される水性環境の例としては、便器のすすぎ水及び施設における循環冷却水がある。

10

【0025】

細胞菌株及び細胞菌株の混合物

本発明の方法に従って使用される細菌株は、上記寄託菌株の1つの培養物であってもよいが、上記の単離された寄託菌株と実質的に同一の特性を有する菌株の培養物であってもよいことは理解されるべきである。好ましい実施態様によれば、前記菌株は寄託菌株又はその子孫の1つである。

【0026】

（1又は複数の）細菌株は、活性及び/又は不活性な他の成分も含んでなる組成物における、（1又は複数の）有効成分であってもよい。

20

【0027】

本明細書中で「有効量」、「有効濃度」又は「有効用量」なる用語は、表面上の不所望微生物により引き起こされるバイオフィーム形成を低減及び/又は予防できる、及び/又は、水性環境中の不所望微生物のプランクトン様増殖を低減及び/又は予防できる、1又は複数の細菌株の、量、濃度又は用量として定義される。絶対数における実際の有効用量は、以下の要因、例えば問題の（1又は複数の）不所望微生物、予防又は低減の目的の有無、（1又は複数の）菌株間の接触時間又は（1又は複数の）菌株を含んでなる組成物、他の成分の存在、及び問題の当該表面又は水性環境等に依存する。ある実施態様によれば、細菌の、例えば以下に記載の6菌株のパチルス混合物の有効用量は、 $1 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL、好ましくは $50 \sim 1 \times 10^7$  cfu/mLの範囲である。さらに、ある実施態様によれば、本明細書に関する細菌又は混合物と、問題の（1又は複数の）不所望微生物との間の比率は、 $1 : 100,000$ と $100,000 : 1$ の間（菌株/混合物：不所望微生物）、好ましくは $1 : 10,000 \sim 10,000 : 1$ 、より好ましくは $1 : 1,000 \sim 1,000 : 1$ 、より好ましくは $1 : 100 \sim 100 : 1$ 、さらにより好ましくは $1 : 10 \sim 10 : 1$ である。

30

【0028】

一般的に、不所望微生物及び栄養物の高負荷を受ける環境は、高用量の軽減する細菌株を必要とし、一方不所望生物が低負荷である環境は、低用量の軽減する細菌株を必要とする。さらに、例えば表面上のバイオフィーム形成の予防、又は水性環境中のプランクトン様形成の予防は、対応する表面上のバイオフィーム形成の低減、又は対応する水性環境中に既に存在する（1又は複数の）不所望微生物の数の低減よりも、関与する（1又は複数の）細菌株は、一般的により低用量を必要とする。

40

【0029】

結果的に、本発明の方法は、表面上に既存の又は水性環境中に既存の、1又は複数の不所望微生物、好ましくは細菌の増殖を阻害する（すなわち、バイオフィーム形成の低減を導く）ために使用できる。別の実施態様によれば、本発明は、本来清浄な表面（すなわち、本来不所望微生物のない表面）上のバイオフィーム形成、及び/又は本来清浄な水（すなわち、本来不所望微生物を含有しない水性環境）中のプランクトン様増殖の、予防及び/又は遅延に関する。言い換えれば、関与する（1又は複数の）細菌株は、（1又は複数の）不所望微生物のさらなる増殖に対し、当該表面及び/又は水性環境を保護する。本発明の方法は、既存の不所望微生物の低減又は排除/除去をもたらす。

50

## 【0030】

好ましい実施態様によれば、関与する（1又は複数の）細菌株は、周期的に、問題の表面に塗布され、及び/又は問題の水性環境中に添加されてもよい。「周期的」とは、本発明の方法が、ある時間周期にわたって、例えば、毎分、毎時間、毎日、毎週、毎月等で、繰り返され、又は反復されてもよいことを意味する。上記の通り、効果は長期間継続しなくてもよい。それは細菌株の再投与を必要としてもよい。例えば、表面及び水性環境が、それぞれ便器上及び便器中のすすぎ水である場合、再投与は（周期的に）洗浄ごとに行ってもよい。例えば関与する（1又は複数の）細菌株は、リムブロック（rim block）中に組み込んでよい。

## 【0031】

本発明の方法はまた、（1又は複数の）細菌株、又は1又は複数の細菌株を含んでなる組成物（すなわち混合物）を、問題の表面に、手動式及び/又は機械式で晒すことにより実施してもよい。

## 【0032】

好ましい実施態様によれば、単独でも他の細菌との組み合わせで使用してもよい細菌は、NRRL B - 50014である。好ましい実施態様によれば、単独でも他の細菌との組み合わせで使用してもよい細菌は、NRRL B - 50015である。好ましい実施態様によれば、単独でも他の細菌との組み合わせで使用してもよい細菌は、NRRL B - 50016である。好ましい実施態様によれば、単独でも他の細菌との組み合わせで使用してもよい細菌は、NRRL B - 50017である。好ましい実施態様によれば、単独でも他の細菌との組み合わせで使用してもよい細菌は、NRRL B - 50018である。

## 【0033】

好ましい実施態様によれば、細菌株は、2007年3月14日に寄託された、2、3、4、5又は6つの以下の寄託菌株の混合物である。NRRL B - 50014、NRRL B - 50015、NRRL B - 50016、NRRL B - 50017、NRRL B - 50018及びNRRL B - 50019。本発明の混合物は、本発明に関連する寄託されたもの以外の、他の菌株を含んでも含まなくてもよいことは理解されるべきである。本発明の混合物は、本発明に関連する寄託された菌株以外にも、他の菌株を含んでもよいことは理解されるべきである。米国特許公報第2005/0036990号中に開示されたバチルス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）SB - 3112（ATCC寄託番号PTA - 3142）は1つの例である。ある実施態様によれば、当該混合物は、NRRL B - 50014、NRRL B - 50015、NRRL B - 50016、NRRL B - 50017、NRRL B - 50018及びPTA - 3142を含んでなる。

## 【0034】

不所望生物

本発明の文脈において、「不所望微生物」なる用語は、問題の表面上及び/又は問題の水性環境中、特に家庭又は工業環境中で、負と考えられる効果をもたらす得る微生物を意味する。当該負の効果の例としては、物質の臭気、腐食、孔食、又はその他の分解、感染、汚染又はその他の表面を審美的に不快な外観にすることが挙げられる。不所望微生物にはまた、病原性微生物、特に病原性細菌がある。

## 【0035】

本明細書に関する単離された細菌株の1又は複数を有効量で使用することにより、表面上のバイオフィーム及び/又は水性環境中のプランクトン様増殖を低減及び/又は予防することができる。

## 【0036】

好ましい実施態様によれば、バイオフィーム形成傾向のある問題の表面は、任意のバイオフィーム形成/積層の前に、予防措置として1又は複数の菌株に晒してもよい。これはバイオフィーム形成の顕著な低減をもたらす。あるいは、バイオフィームが既に形成されている、又はバイオフィーム積層の最初の兆候がある場合、本発明の方法を、さらなる

10

20

30

40

50

バイオフィルム形成の低減のために使用してもよい。本発明の方法は、部分的又は完全なバイオフィルムの除去をもたらすことも可能である。

【0037】

不所望微生物の例としては、以下に開示のものがある。

【0038】

不所望微生物には、限定するものではないが、好気性細菌もしくは嫌気性細菌、グラム陽性及びグラム陰性、菌類（酵母又は糸状菌）、藻類、及びノ又は原生動物がある。考慮される細菌には、シュードモナス属、例えばシュードモナス・シュードモナス・エルギノーサ、アゾトバクター・ピネランジー（*Azotobacter vinelandii*）、*E. 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・ボツリヌム（*Clostridium botulinum*）、ストレプトコッカス属、アセトバクター（*Acetobacter*）、ロイコノストック（*Leuconostoc*）、ベタバクテリウム（*Betabacterium*）、肺炎球菌（*Pneumococcus*）、マイコバクテリウム・ツベルクロ（登録商標）ーシス（*Mycobacterium tuberculosis*）、エロモナス（*Aeromonas*）、パークホルデリア（*Burkholderia*）、フラボバクテリウム（*Flavobacterium*）、サルモネラ（*Salmonella*）、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）、ピプリオ属、リステリア属、及びレジオネラ属がある。

10

【0039】

好ましい実施態様によれば、不所望微生物は好気性細菌である。より好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はエロモナス菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はパークホルデリア菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はフラボバクテリウム菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はマイクロバクテリウム（*Microbacterium*）菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はシュードモナス菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はサルモネラ菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はスタフィロコッカス菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌は腸内細菌（例えば *E. coli* 等）である。

20

【0040】

最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はパークホルデリア・セパシア（*Burkholderia cepacia*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はマイクロバクテリウム・インペリアレ（*Microbacterium imperiale*）又はマイクロバクテリウム・結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はシュードモナス・エルギノーサである。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はシュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescens*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記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。別の最も好ましい実施態様によれば、前記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。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はサルモネラ・エンテリティディス（*Salmonella enteritidis*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はスタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記好気性細菌はスタフィロコッカス・エピデルミデス（*Staphylococcus epidermidis*）である。

30

40

【0041】

別の最も好ましい実施態様によれば、前記細菌はリステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）である。

【0042】

別の最も好ましい実施態様によれば、前記細菌はレジオネラ・アデライデンシス（*Legionella adelaidensis*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記細菌はレジオネラ・ニューモフィラ（*Legionella pneumophila*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記細菌はレジオネラ・フィーレイ（*Legionella feeleyi*）である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記細菌はレジオネラ・モラビカ（*Legionella moravica*）

50

である。

【0043】

別の実施態様によれば、前記細菌は、ビブリオ・ハルベイ、ビブリオ・フィシェリ及び／又はビブリオ・アルギノリティカスである。

【0044】

別の好ましい実施態様によれば、前記微生物は嫌気性細菌である。

別のより好ましい実施態様によれば、前記嫌気性細菌はデスルホビブリオ菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記嫌気性細菌はデスルホビブリオ・デスルフリカンス(Desulfovibrio desulfuricans)である。

【0045】

別の好ましい実施態様によれば、前記不所望部生物は菌類、例えば、酵母又は糸状菌である。別のより好ましい実施態様によれば、前記酵母はカンジダ(Candida)菌である。別の最も好ましい実施態様によれば、前記酵母はカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)である。

【0046】

本発明の組成物

本発明はまた、1又は複数の本明細書に記載の寄託細菌株を含んでなる組成物に関する。本発明の組成物は単一の菌株として、又は2以上の菌株の混合物として、本明細書に關与する1又は複数の細菌株を含んでもよいが、他の細菌株及び／又は有効成分を含んでもよい。ある実施態様によれば、当該組成物は、以下に記載の界面活性剤又は1又は複数の他の成分をさらに含む。

【0047】

界面活性剤

界面活性剤は、非イオン性であってもよく、例えば準極性及び／又はアニオン性及び／又はカチオン性及び／又は双性イオン性でもよい。(1又は複数の)界面活性剤は、当該細菌培養物の活性に対して可能な限り低害性である。

界面活性剤は、組成物中に0.01~60質量%のレベルで存在してよい。

【0048】

含まれる場合、組成物は通常約0~約40%で、アニオン性界面活性剤、例えば直鎖アルキルベンゼンスルホネート、アルファ-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、2級アルカンスルホネート、アルファ-スルフォ脂肪酸メチルエステル、アルキルもしくはアルケニルコハク酸又はセッケンを含有する。

【0049】

含まれる場合、組成物は通常約0~約40%で、非イオン性界面活性剤、例えば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、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミン、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、又はグルコサミドのN-アシルN-アルキル誘導体(「グルカミド」)を含有する。

【0050】

他の成分

組成物は1又は複数の酵素を含んでもよい。考慮される酵素の例は、「酵素」の節に記載する。

他の成分には、限定するものではないが、分散剤、安定化剤、抗微生物剤、香料、色素、及び殺生物剤がある。

【0051】

酵素

本発明の組成物中には、1又は複数の酵素が存在してよい。特に、考慮される酵素には、プロテアーゼ、アルファ-アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、及びマンナーゼ、又はその混合物がある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

## プロテアーゼ

好適なプロテアーゼには、動物、植物又は微生物由来のものがある。微生物由来が好ましい。化学修飾又はタンパク質改変された変異体が含まれる。プロテアーゼはセリンプロテアーゼ又はメタロプロテアーゼ、好ましくはアルカリ微生物プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼでもよい。アルカリプロテアーゼの例としては、特にバチルス由来のもの、例えばサブチリシン・ノボ (subtilisin Novo)、サブチリシン・カールスバーグ (subtilisin Carlsberg)、サブチリシン309、サブチリシン147及びサブチリシン168 (国際公開第 8 9 / 0 6 2 7 9 号に記載) がある。トリプシン様プロテアーゼの例としては、国際公開第 8 9 / 0 6 2 7 0 号及び国際公開第 9 4 / 2 5 5 8 3 号に記載の、トリプシン及びフサリウムプロテアーゼがある。

10

## 【 0 0 5 3 】

有用なプロテアーゼの例は、国際公開第92/19729号、国際公開第98/20115号、国際公開第98/20116号及び国際公開第98/34946号に記載の変異体、特に 1 又は複数の以下の点、27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235及び274における置換を有する変異体がある。好ましい市販のプロテアーゼ酵素には、ALCALASE (商標)、SAVINASE (商標)、PRIMASE (商標)、DURALASE (商標)、DYRAZYM (商標)、DYRAZYM (商標)、EVERLASE (商標)、POLARZYME (商標) 及び KANNASE (商標)、LIQUANASE (商標) (ノボザイム社 (Novozyme A/S))、MAXATASE (商標)、MAXACAL (商標)、MAXAPEM (商標)、PROPERASE (商標)、PURAFECT (商標)、PURAFECT O x P (商標)、FN2 (商標)、及び FN3 (商標) (ジェネンコア・インターナショナル社 (Genencor International Inc.)) がある。

20

## 【 0 0 5 4 】

## リパーゼ

好適なリパーゼには細菌又は真菌由来のものがある。化学修飾又はタンパク質改変された変異体が含まれる。有用なリパーゼの例には、フミコラ (Humicola) (サーモマイシス (Thermomyce) の異名) 由来のリパーゼ、例えば欧州特許第258 068号及び欧州特許第305 216号に記載の H. ラヌギノサ (lanuginosa) (T. ラヌギノサ) 由来、又は国際公開第96 /13580号に記載の H. インソレンス (insolens) 由来、シュードモナスリパーゼ、例えば P. アルカリゲネス (alcaligenes) 又は P. シュードアルカリゲネス (pseudoalcaligenes) (欧州特許第218 272号)、P. セピシア (cepacia) (欧州特許第331 376号)、P. スツトゼリ (stutzeri) (英国特許第1,372,034号)、P. フルオレッセンス (fluorescens)、シュードモナス属株 S D 7 0 5 (国際公開第95/06720号及び国際公開第96/27002号)、P. ウィスコンシネンシス (wisconsinensis) (国際公開第96/12012号) 由来のもの、バチルスリパーゼ、例えば B. サブチリス (subtilis) (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta 1131: 253-360)、B. ステアロサーモフィルス (stearothermophilus) (特開昭64/744992号) 又は B. プミルス (pumilus) (国際公開第91/16422号) 由来のものがある。

30

40

## 【 0 0 5 5 】

他の例は、リパーゼ変異体、例えば国際公開第92/05249号、国際公開第94/01541号、欧州特許第407 225号、欧州特許第260 105号、国際公開第95/35381号、国際公開第96/00292号、国際公開第95/30744号、国際公開第94/25578号、国際公開第95/14783号、国際公開第95/22615号、国際公開第97/04079号及び国際公開第97/07202号である。

好ましい市販のリパーゼ酵素には、LIPOLEASE (商標) 及び LIPOLEASE ULTRA (商標)、LIPOZYME (商標)、並びに LIPEX (商標) (ノボザイム社) がある。

## 【 0 0 5 6 】

## クチナーゼ

50

本発明の方法は、EC 3.1.1.74に分類されるクチナーゼの存在下で実施してもよい。本発明により使用されたクチナーゼは、任意の由来のものでよい。好ましいクチナーゼは微生物由来、特に細菌、真菌又は酵母由来のものである。

【0057】

クチナーゼは、クチンを消化できる酵素である。好ましい実施態様によれば、クチナーゼは、アスペルギルスの菌株由来、特にアスペルギルス・オリザエ (*oryzae*)、アルテルナリアの菌株、特にアルテルナリア・ブラシシオラ (*brassiciola*)、フサリウムの菌株、特にフサリウム・ソラニ・ピシ (*solani pisi*)、フサリウム・ロセウム・クルモルム (*roseum culmorum*)、又はフサリウム・ロセウム・サンブシウム (*sambucium*)、ヘルミントスポリウムの菌株、特にヘルミントスポリウム・サチバム (*sativum*)、フミコラの菌株、特にフミコラ・インソレンス、シュードモナスの菌株、特にシュードモナス・メンドシナ (*mendocina*)、又はシュードモナス・プチダ (*putida*)、リゾクトニアの菌株、特にリゾクトニア・ソラニ (*solani*)、ストレプトマイセスの菌株、特にストレプトマイセス・スカピース (*scabies*)、又はウロクラジウムの菌株、特にウロクラジウム・コンソルトアレ (*consortiale*) である。最も好ましい実施態様によれば、クチナーゼは、フミコラ・インソレンス菌株、特にフミコラ・インソレンス D S M 1800 由来である。フミコラ・インソレンスクチナーゼは、国際公開第96/13580号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。クチナーゼは変異体であってもよく、例えば国際公開第00/34450号及び国際公開第01/92502号に記載された変異体があり、これは本明細書に参照により組み込まれる。好ましいクチナーゼ変異体には、国際公開第01/92502号の実施例2に

10

20

列挙された変異体があり、これは参照により本明細書に具体的に組み込まれる。好ましい市販のクチナーゼには、NOVOZYME (商標)51032 (ノボザイム社、デンマークから入手可能)がある。

【0058】

本発明の方法は、EC 3.1.1.4及び/又はEC 3.1.1.32に分類される、ホスホリパーゼの存在下で実施してもよい。本明細書で使用される、ホスホリパーゼの用語は、リン脂質に対して活性を有する酵素である。リン脂質、例えばレクチン又はホスファチジルコリンは、外側 ( $s_n - 1$ ) 及び中間 ( $s_n - 2$ ) 位置が2つの脂肪酸でエステル化され、並びに第三の位置がリン酸でエステル化されている、グリセロールからなり、リン酸は順にアミノアルコールにエステル化されてもよい。リン脂質はリン脂質の加水分解に關与する酵素である。ホスホリパーゼ活性の複数の種類は識別可能であり、例えば脂肪酸アシル基を ( $s_n - 1$  及び  $s_n - 2$  それぞれの位置で)、リゾリン脂質、及びリゾリン脂質において維持する脂肪酸アシル基を加水分解できるリゾリン脂質 (又はホスホリパーゼ B) 形態に加水分解する、ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 及び A<sub>2</sub> がある。ホスホリパーゼ C 及びホスホリパーゼ D (ホスホジエステラーゼ) は、それぞれジアシルグリセロール又はホスファチジン酸を放出する。

30

【0059】

ホスホリパーゼなる用語は、ホスホリパーゼ活性、例えばホスホリパーゼ A (A<sub>1</sub> 又は A<sub>2</sub>)、ホスホリパーゼ B 活性、ホスホリパーゼ C 活性又はホスホリパーゼ D 活性を有する酵素を含む。本発明の酵素に関して本明細書で使用される「ホスホリパーゼ A」なる用語は、ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 及び/又はホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性を有する酵素を網羅する意図がある。ホスホリパーゼ活性は、他の活性を有する酵素により提供されてもよく、例えばホスホリパーゼ活性を有するリパーゼがある。ホスホリパーゼ活性は、例えばホスホリパーゼ副活性を有するリパーゼ由来であってもよい。本発明の他の実施態様によれば、ホスホリパーゼ酵素活性は本質的にホスホリパーゼ活性のみを有する酵素により提供され、且つここでホスホリパーゼ酵素活性は副活性ではない。

40

【0060】

ホスホリパーゼは任意の由来のものであってよく、例えば動物由来 (例えば、哺乳類)、例えば膵臓 (例えばウシ又はブタの膵臓)、又はヘビ毒もしくはハチ毒からのものがある。好ましくはホスホリパーゼは微生物由来のものであってよく、例えば糸状菌類、酵母又

50

は細菌、例えば以下の属又は種、アスペルギルス、例えば、*A. ニゲル* (*A. niger*) ; ディクチオステリウム (*Dictyostelium*)、例えば *D. ジスコイデュウム* (*D. discoideum*) ; ムコール (*Mucor*)、例えば *M. ジャバニカス* (*M. javanicus*)、*M. ムセド* (*M. mucedo*)、*M. サブチリシムス* (*M. subtilissimus*) ; ニューロスポラ (*Neurospora*)、例えば *N. クラッサ* (*N. crassa*) ; リゾムコール (*Rhizomucor*)、例えば *R. パシルス* (*R. pusillus*) ; リゾプス (*Rhizopus*)、例えば *R. アルヒズス* (*R. arrhizus*)、*R. ジャポニクス* (*R. japonicus*)、*R. ストロニフェル* (*R. stolonifer*) ; スクレロティニア (*Sclerotinia*)、例えば *S. リベルチアナ* (*S. libertiana*) ; トリコフィトン、例えば *T. ラブラム* (*T. rubrum*) ; フェトゼリニア、例えば *W. スクレロチオウラム* (*W. sclerotiorum*) ; パチルス、例えば *B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. サブチリス* ; シトロバクター (*Citrobacter*)、例えば *C. フロインデイ* (*C. freundii*) ; エンテロバクター (*Enterobacter*)、例えば *E. エアロゲネス*、*E. クロアカエ* (*E. cloacae*) ; エドワードジェラ、*E. タルダ* (*E. tarda*) ; エルウィニア (*Erwinia*)、例えば *E. ヘルピコラ* (*E. herbicola*) ; エシェリキア (*Escherichia*)、例えば *E. coli* ; クレブシエラ、例えば *K. ニューモニエ* (*K. pneumoniae*) ; プロテウス (*Proteus*)、例えば *P. ブルガリス* (*P. vulgaris*) ; プロビデンシア、例えば *P. スツアルティイ* (*P. stuartii*) ; サルモネラ、例えば *S. チフィリウム* (*S. typhimurium*) ; セラチア、例えば *S. リクファシエンシス* (*S. liquefaciens*)、*S. マルセセンス* (*S. marcescens*) ; シゲラ (*Shigella*)、例えば *S. フレックスネリ* (*S. flexneri*) ; ストレプトマイセス、例えば *S. ヴィオレセオルバー* (*S. violaceoruber*) ; エルシニア、例えば *Y. エンテロコリチカ* (*Y. enterocolitica*) である。すなわち、ホスホリパーゼは、真菌、例えば *ピレノマイセテス* (*Pyrenomycetes*)、例えば、*フサリウム* 属、例えば *F. クルモラム* (*F. culmorum*)、*F. ヘテロスポラム* (*F. heterosporum*)、*F. ソラニ* (*F. solani*) の菌株、又は *F. オキシスポラム* (*F. oxysporum*) の菌株でもよい。ホスホリパーゼはまた、アスペルギルスに含まれる糸状真菌類、例えば *アスペルギルス・アワモリ* (*awamori*)、*アスペルギルス・ホエチダス* (*foetidus*)、*アスペルギルス・ジャポニカス* (*japonicus*)、*アスペルギルス・ニゲル* 又は *アスペルギルス・オリザエ* (*oryzae*) でもよい。

#### 【 0 0 6 1 】

好ましいホスホリパーゼはフミコラの菌株、特にフミコラ・ラヌギノサ由来のものである。ホスホリパーゼは変異体であってもよく、例えば国際公開第00/32758号に開示のものがあ  
り、これは参照により本明細書に組み込まれる。好ましいホスホリパーゼ変異体には、国際公開第00/32758号の実施例5に列挙された変異体があり、これは参照により本明細書に具体的に組み込まれる。別の好ましい実施態様によれば、ホスホリパーゼは国際公開第04/111216号に記載されているものであり、特に実施例1の表に列挙された変異体である。

#### 【 0 0 6 2 】

別の好ましい実施態様によれば、ホスホリパーゼはフサリウムの菌株、特にフサリウム・オキシスポラム由来である。ホスホリパーゼは、フサリウム・オキシスポラム D S M 26 72、又はその変異体由来の、国際公開第98/026057号に關与するもので配列番号2に示すものでもよい。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明の好ましい実施態様によれば、ホスホリパーゼはホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (EC. 3.1.1.32) である。本発明の別の好ましい実施態様によれば、ホスホリパーゼはホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (EC.3.1.1.4.) である。

#### 【 0 0 6 4 】

市販のホスホリパーゼの例には、L E C I T A S E (商標) 及び L E C I T A S E (商標) U L T R A、Y I E L S M A X、又は L I P O P A N F (ノボザイム社、デンマークから入手可能) がある。

#### 【 0 0 6 5 】

アミラーゼ

好適なアミラーゼ（アルファ及び／又はベータ）には、細菌又は真菌由来のものがある。化学修飾又はタンパク質改変された変異体が含まれる。アミラーゼには、例えば、バチルス、例えば英国特許第1,296,839号により詳細に記載されるB.リケニフォルミスの特別種、又は国際公開第95/026397号もしくは国際公開第00/060060号に開示のバチルス種から得られるアルファ-アミラーゼがある。

【0066】

有用なアミラーゼの例は、国際公開第94/02597号、国際公開第94/18314号、国際公開第96/23873号、国際公開第97/43424号、国際公開第01/066712号、国際公開第02/010355号、国際公開第02/031124号及び国際公開第2006/002643号（これらは全て参照により組み込まれる）に記載の変異体がある。

10

【0067】

市販のアミラーゼは、DURAMYL（商標）、TERMAMYL（商標）、TERMAMYL ULTRA（商標）、NATALASE（商標）、STAINZAYME（商標）、STAINZAYME ULTRA（商標）、FUNGAMYL（商標）及びBAN（商標）（ノボザイム社）、RAPIDASE（商標）及びPURASTAR（商標）（ジェネンコア・インターナショナル社から）である。

【0068】

セルラーゼ

好適なセルラーゼには、細菌又は真菌由来のものがある。化学修飾又はタンパク質改変された変異体が含まれる。好適なセルラーゼには、バチルス属、シュードモナス属、フミコラ属、フサリウム属、チエラピア（*Thielavia*）属、アクレモニウム（*Acremonium*）属由来のセルラーゼ、例えば、米国特許第4,435,307号、米国特許第5,648,263号、米国特許第5,691,178号、米国特許第5,776,757号、国際公開第89/09259号、国際公開第96/029397号、及び国際公開第98/012307号に開示の、フミコラ・インソレンス、チエラピア・テレストリス（*terrestris*）、ミセリオフトラ・サーモフィラ（*Myceliophthora thermophila*）、及びフサリウム・オキシスポラムから産生された真菌セルラーゼがある。

20

【0069】

特に好適なセルラーゼは、色素保護の点で有益である、アルカリ性又は中性セルラーゼである。当該セルラーゼの例は、欧州特許第0495257号、欧州特許第0531372号、国際公開第96/11262号、国際公開第96/29397号、国際公開第98/08940号に記載のセルラーゼである。他の例は、国際公開第94/07998号、欧州特許第0531315号、米国特許第5,457,046号、米国特許第5,686,593号、米国特許第5,763,254号、国際公開第95/24471号、国際公開第98/12307号及び国際公開第1999/001544号に記載のセルラーゼ変異体である。

30

【0070】

市販のセルラーゼには、CELLUZyme（商標）、CELLCLAST（商標）、XAREZyme（商標）、ENDOLASE（商標）、RENOZyme（商標）（ノボザイム社）、CLAZINASE（商標）及びPURADAX HA（商標）、ACC ELE RASE（商標）1000（ジェネンコア・インターナショナル社）、及びKAC-500（B）（商標）（花王社）がある。

40

【0071】

ペルオキシダーゼ／オキシダーゼ

好適なペルオキシダーゼ／オキシダーゼには、植物、細菌又は真菌由来のものがある。化学修飾又はタンパク質改変された変異体が含まれる。有用なペルオキシダーゼの例には、コプリナス（*Coprinus*）由来の、例えばC.シネレウス（*C. cinereus*）、及び国際公開第93/24618号、国際公開第95/10602号、及び国際公開第98/15257号に記載のその変異体由来のペルオキシダーゼがある。

50

## 【 0 0 7 2 】

市販のペルオキシダーゼには、Guardzyme (商標) 及びNovozym (商標) 51004 (ノボザイム社) がある。

## 【 0 0 7 3 】

ペクチン酸リアーゼ (ポリガラクトツロ酸リアーゼとも呼ばれる)

ペクチン酸リアーゼの例には、異なる細菌種、例えばエルウィニア (Erwinia)、シュードモナス、クレブシエラ (Klebsiella) 及びキサントモナス (Xanthomonas)、並びにパチルス Y A - 1 4 (Kim et al., 1994, Biosci. Biotech. Biochem. 58: 947-949) からクローン化されたペクチン酸リアーゼがある。p H 8 ~ 10 の範囲で最大活性を有する、パチルス・ブミルス (Dave and Vaughn, 1971, J. Bacteriol. 108: 166-174)、B. ポリミキサ (B. polymyxa) (Nagel and Vaughn, 1961, Arch. Biochem. Biophys. 93: 344-352)、B. ステアロセーモフィルス (B. stearothermophilus) (Karbassi and Vaughn, 1980, Can. J. Microbiol. 26: 377-384)、パチルス種 (Hasegawa and Nagel, 1966, J. Food Sci. 31: 838-845) 及びパチルス種 R K 9 (Kelly and Fogarty, 1978, Can. J. Microbiol. 24: 1164-1172) から産生されたペクチン酸リアーゼの精製も報告されている。任意の上記、及び二価のカチオン誘導性及び / 又は熱安定性のペクチン酸リアーゼは、本発明の実施に使用してもよい。好ましい実施態様によれば、ペクチン酸リアーゼは、Heffron et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 331-334 及び Henrissat et al., 1995, Plant Physiol. 107: 963-976 に開示のペクチン酸リアーゼのアミノ酸配列を含んでなる。具体的に考慮されるペクチン酸リアーゼは、国際公開第 99/27083 号及び国際公開第 99/27084 号に開示される。他の具体的に考慮される、パチルス・リケニフォルミスに由来するペクチン酸リアーゼは、米国特許第 6,284,524 号中の配列番号 2 (この書類は参照により本明細書に組み込まれる) で開示されている。具体的に考慮されるペクチン酸リアーゼの変異体は、国際公開第 02/006442 号に開示され、特に国際公開第 02/006442 号の実施例 (この書類は参照により本明細書に組み込まれる) 中に開示の変異体である。市販のアルカリ性ペクチン酸リアーゼの例は、ノボザイム社 (デンマーク) 製の B I O P R E P (商標) 及び S C O U R Z Y M E (商標) L である。

## 【 0 0 7 4 】

マンナーゼ

マンナーゼ (EC 3.2.1.78) の例には、細菌及び真菌由来のマンナーゼがある。具体的な実施態様によれば、マンナーゼはアスペルギルス属の糸状真菌類、好ましくはアスペルギルス・ニゲル又はアスペルギルス・アクレアタス (aculeatus) (国際公開第 94/25576 号) 由来のものである。国際公開第 93/24622 号は、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) から単離されたマンナーゼを開示している。マンナーゼはまた、複数の細菌、例えばパチルス生物から単離される。例えば、Talbot et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56(11): 3505-3510 は、パチルス・ステレオサーフィルス (stearothermophilus) 由来のベータ - マンナーゼを報告している。Mendoza et al., 1994, World J. Microbiol. Biotech. 10(5): 551-555 はパチルス・サブチリス由来のベータ - マンナーゼを報告している。特開 2 0 0 3 - 0 4 7 0 7 6 号公報では、パチルス種由来のベータ - マンナーゼを開示している。特開昭 6 3 - 0 5 6 2 8 9 号公報は、アルカリ性の熱安定なベータ - マンナーゼの作製について報告している。特開昭 6 3 - 0 3 6 7 7 5 号公報は、ベータ - マンナーゼ及びベータ - マンノシダーゼを産生する、パチルス微生物 F E R M P - 8 8 5 6 に関する。特開平 0 8 - 0 5 1 9 7 5 号公報は好アルカリ性のパチルス種 A M - 0 0 1 由来のアルカリベータ - マンナーゼを開示している。パチルス・アミロリケファシエンス (amyloliquefaciens) からのマンナーゼの精製は、国際公開第 9 7 / 1 1 1 6 4 号に開示されている。国際公開第 9 1 / 1 8 9 7 4 号は、ヘミセルラーゼ、例えばグルカナナーゼ、キシラナーゼ又はマンナーゼの活性について報告している。国際公開第 9 9 / 6 4 6 1 9 号に開示の、パチルス・アガラドハエレンス (agarad haerens)、パチルス・リケニフォルミス、パチルス・ハロデュランス (halodurans)、パチルス・クラウジイ、パチルス種及びフミコラ・インソレンス由来の、アルカリファミ

10

20

30

40

50

リー 5 及び 2 6 マンナナーゼが考慮される。特に、国際公開第99/64619号の実施例（この書類は参照により本明細書に組み込まれる）中に関するパチルス種マンナナーゼが考慮される。

【 0 0 7 5 】

市販のマンナナーゼの例には、ノボザイム社（デンマーク）から入手可能な M A N N A W A Y（商標）がある。

【 0 0 7 6 】

原料と方法

バッファ及び試薬として使用される化学物質は、少なくとも試薬級（reagent grade）の製品であった。

プレートカウント培地（Plate Count Broth）（Difco 275120）

MacConkey寒天（Smith River Biologicals, Ferrum, VA カタログ番号11-00380）

Luria培地（Luria Broth (Difco 241420)

標準法寒天プレート（Standard Methods agar plates (SMA plates)）（Smith River Biologicals, Ferrum, VA カタログ番号 11-00450）

【 0 0 7 7 】

細菌株

パチルス混合物（6 B B）：

以下の寄託菌株からなる、6 のパチルス種菌株の混合物：N R R L 番号 B - 5 0 0 1 4（30%）、B - 5 0 0 1 5（30%）、B - 5 0 0 1 6（10%）、B - 5 0 0 1 7（10%）、B - 5 0 0 1 8（10%）、B - 5 0 0 1 9（10%）。6 B B 混合物における菌株間の実際の比率は、括弧中に示す（x %）。

シュードモナス・エルギノーサ：

緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを備える全ての実施例において使用されるシュードモナス・エルギノーサ菌株は、Nivens et al., 2001, J. Bacteriol. 183: 1047-1057の記載の通りに構造的に構築された。

シュードモナス・モンテリ（A T C C 7 0 0 4 1 2）

シュードモナス・プチダ（A T C C 4 9 4 5 1）

ビブリオ・ハルベイ（A T C C 2 5 9 1 9）

ビブリオ・アルギノリティカス（A T C C 1 7 7 4 9）

ビブリオ・フィシェリ（M J - 1）：野生型菌株

【 0 0 7 8 】

生物物質の寄託

生物物質は、ブダペスト条約の条項に従い、

米国培養細胞系統保存機関（A T C C）（10801 University Blvd., Manassas, VA 20108, USA.）及び

Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit（N R R L）（National Center for Agricultural Utilization Research 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, USA）

に寄託された。

【 0 0 7 9 】

細菌株は以下の受託番号を与えられた。

10

20

30

40

【表1】

微生物名	受託番号	寄託日
バチルス・アミロリケファシエンス ( <i>Bacillus amyuloliquefaciens</i> )	PTA-7541	2006年4月20日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7542	2006年4月20日
バチルス・アトロファエウス ( <i>Bacillus atrophaeus</i> )	PTA-7543	2006年4月20日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7544	2006年4月20日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7545	2006年4月20日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7546	2006年4月20日
バチルス・サブチリス・亜種・サブチリス ( <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> )	PTA-7547	2006年4月20日
バチルス・ベレゼンシス ( <i>Bacillus velezensis</i> )	PTA-7548	2006年4月20日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7549	2006年4月20日
バチルス・シンプレックス ( <i>Bacillus simplex</i> )	PTA-7550	2006年4月20日
バチルス・シンプレックス	PTA-7789	2006年8月18日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7790	2006年8月18日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7791	2006年8月18日
バチルス・アトロファエウス	PTA-7792	2006年8月18日
バチルス・アミロリケファシエンス	PTA-7793	2006年8月18日
バチルス・アミロリケファシエンス ( <i>Bacillus amyuloliquifaciens</i> )	NRRT B-50017	2007年3月14日
バチルス・メガテリウム ( <i>Bacillus megaterium</i> )	NRRT B-50019	2007年3月14日
バチルス・アミロリケファシエンス	NRRT B-50018	2007年3月14日
バチルス・リケニフォルミス ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	NRRT B-50014	2007年3月14日
バチルス・リケニフォルミス	NRRT B-50015	2007年3月14日
バチルス・プミルス ( <i>Bacillus pumilus</i> )	NRRT B-50016	2007年3月14日

## 【0080】

菌株は、米国特許法施行規則第1.14項及び米国特許法第122項の下で、資格を有する特許局長により決定が成されるまで、本特許出願の係属中に培養物が利用可能であることを保証する条件の下で寄託された。寄託物は純粋培養物を表す。寄託物は、対象出願の対応出願又はその継続出願が提出される国において、外国法による要求にしたがって利用可能である。ただし、寄託物の利用可能性は、政府通知により付与された特許権を逸脱した、対象発明の実施許諾を構成しないことを理解すべきである。

## 【0081】

A T T C に寄託された細菌株は、単離された天然の細菌株由来である。全ての菌株は、2005年に米国で採取した。

## 【0082】

N R R L に寄託された細菌株のうち、2つは米国内の土壌から採取した(N R R L B - 5 0 0 1 7 及び N R R L B - 5 0 0 1 8 として寄託される)及び4つは培養細胞系統保存機関由来であった。我々の信じる限りでは、N R R L B - 5 0 0 1 4 は A T C C 番号 2 3 8 4 2 と同じであり、N R R L B - 5 0 0 1 5 は A T C C 番号 2 1 4 1 5 と同じ

10

20

30

40

50

であり、NRRL B - 50016はNRRL B - 4064と同じであり、NRRL B - 50019 = NRRL B 3254である。

菌株は、休眠細菌孢子及び/又は生細菌からなるものでもよい。

【0083】

装置：

蛍光動学的マイクロタイタープレートリーダー (Fluorescent kinetic microtiter plate reader) (BioTek Synergy HT-1)

ポリカーボネートホルダー (Polycarbonate holder) (Biosurfaces Technology, USA)

ポーセリンクーポン (Porcelain coupons) (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta, Canada)

10

広口試験管 (Fisher カタログ番号NC9421998, Pittsburg, PA, USA)

【実施例1】

【0084】

バチルス混合物 (6BB) - 蛍光マイクロタイタープレート (FMP) 存在下でのシュードモナスのプランクトン様増殖

96マイクロタイタープレートのウェルを200マイクロLのプレートカウント培地 (Difco DF0751-17-2) で満たし、構造的に緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを備えるシュードモナス・エルギノーサ菌株を植菌した。6のバチルス種の混合物 (6BB) をウェルに添加した。シュードモナスの初回用量は、 $2.4 \times 10^8$  cfu/mLか $4.8 \times 10^8$  cfu/mLのいずれかであり、一方バチルス種は $6.8 \times 10^8$  cfu/mL ~  $1.0 \times 10^7$  cfu/mLであり、シュードモナス : バチルス比率は24 : 1及び70 : 1となった。マイクロタイタープレートは、21 でのインキュベーション及び485/20 nm励起、580/20 nm発光で、20分毎に43時間の蛍光測定 (fluorescent reads) の条件で、蛍光動学的マイクロタイタープレートリーダー (BioTek Synergy HT-1) で追跡する。得られた蛍光動学的曲線はバチルス用量依存的な g f p 蛍光の抑制が観察された (すなわちシュードモナス群の抑制) (図1)。

20

【実施例2】

【0085】

バチルス混合物 - 試験管 + クーポンバイオコントロール (Coupon Biocontrol) (TTCBC) の存在下でのバイオフィーム形成及びプランクトン様増殖の低減

3つのポーセリンクーポン (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) を有するポリカーボネートホルダー (Biosurfaces Technology) を広口試験管 (Fisher カタログ番号NC9421998) に挿入し、表示の指示書に従って作製した50 mLのプレートカウント培地 (Difco DF0751-17-2) を添加しオートクレーブした。管にバチルス孢子の混合物を植菌し、穏やかに攪拌させながら28 で一晩インキュベートし、発芽させた。バチルス孢子の初回用量は、 $2.6 \times 10^2$  ~  $7.8 \times 10^5$  cfu/mLの範囲であった。

30

【0086】

翌日、g f p 発現のあるシュードモナス・エルギノーサ菌株を70 cfu/mLの濃度で管に添加した結果、シュードモナス : バチルス初回植菌比率が1 : 3.5 ~ 1 : 10,000の範囲となった。24及び48時間インキュベーション後、各クーポン (バイオフィーム細胞) を擦過することにより、リン酸緩衝化生理食塩水中に破壊的にサンプル採取し、懸濁物を均質化し、その後希釈し、MacConkey寒天 (Difco DF0075-17-1) にプレーティングし、シュードモナス細胞のみを数えた。その管 (プランクトン様細胞) 内の培地もサンプル採取し、希釈し、プレーティングした。バチルス種の存在下でのシュードモナス数を、バチルス種非存在下でのネガティブコントロールと比較し、バチルス種処理が、バイオフィームにおけるシュードモナス群 (図2) 及びプランクトン様 (図3) 状態の低減に、顕著且つ大まかに依存をすることが明らかになった。

40

【実施例3】

【0087】

バチルス単離物 - 試験管 + クーポンバイオコントロール (TTCBC) の存在下での、シュードモナスのバイオフィーム形成及びプランクトン様増殖の低減

50

3つのポーセリナークーポン(Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta)を有するポリカーボネートホルダー(Biosurfaces Technology)を広口試験管(Fisherカタログ番号NC9421998)に挿入し、表示の指示書に従って作製した50 mLのプレートカウント培地(Difco DF0751-17-2)を添加しオートクレーブした。各管に、個々の対象パチルス栄養細胞一晚培養物、及びg f pプラスミドを備えるシュードモナス・エルギノースの一晚培養物を植菌した。管を、穏やかに攪拌させながら28℃で一晩インキュベートした。パチルス細胞の初回用量は、 $1 \times 10^3 \sim 8.2 \times 10^5$  cfu/mLの範囲であり、シュードモナスの初回用量はおよそ $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ であった。パチルスに対するシュードモナスの比率は1:2 ~ 1:147の範囲であった。

【0088】

インキュベーションから24及び48時間の時点で、その管を、各クーポン(バイオフィルム細胞)を擦過することにより、リン酸緩衝化生理食塩水中に破壊的にサンプル採取し、懸濁物を均質化し、その後希釈し、MacConkey寒天(Difco DF0075-17-1)にプレATINGし、シュードモナス細胞のみを数えた。その管(プランクトン様細胞)内の培地もサンプル採取し、希釈し、プレATINGした。パチルス種の存在下でのシュードモナス数を、パチルス種非存在下でのネガティブコントロールと比較し、24及び48時間の時点で、プランクトン様の接着細胞について、各対象パチルスに対するシュードモナスの対数的制御を計算した。

【0089】

【表2】

菌株	P:B 比率 1:xB	対数的制御	対数的制御	対数的制御	対数的制御
		24時間 プランクトン	24時間 結合	48時間 プランクトン	48時間 結合
PTA-7544	9.5	3.4	2.2	5.4	4.1
PTA-7790	22.8	3.0	1.9	5.1	4.4
PTA-7791	85	4.8	2.7	4.5	4.8
PTA-7792	4.2	3.2	3.0	5.4	4.0
PTA-7549	147.1	4.5	3.7	6.0	4.3
PTA-7542	2.8	2.9	2.8	5.8	4.5
PTA-7545	3.7	3.6	3.2	7.1	5.3
NRRL B-50017	2.3	3.1	2.4	5.8	4.4
NRRL B-50016	4.8	0.9	1.4	0.6	0.5

【実施例4】

【0090】

パチルス単離物 - 試験管 + クーポンバイオコントロール(TTCBC)の存在下での、E.coliのバイオフィルム形成及びプランクトン様増殖の低減

3つのポーセリナークーポン(Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta)を有するポリカーボネートホルダー(Biosurfaces Technology)を広口試験管(Fisherカタログ番号NC9421998)に挿入し、表示の指示書に従って作製した50 mLのプレートカウント培地(Difco DF0751-17-2)を添加しオートクレーブした。各管に、個々の対象パチルス一晚培養物、及びE.coliの一晚培養物を植菌した。管を、穏やかに攪拌させながら28℃で一晩インキュベートした。パチルス細胞の初回用量は、 $1 \times 10^3 \sim 8.2 \times 10^5$  cfu/mLの範囲であり、E.coliの初回用量はおよそ $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ であった。パチルスに対するE.coliの比率は1:0.6 ~ 1:32の範囲であった。

【0091】

インキュベーションから24及び48時間の時点で、その管を、各クーポン(バイオフィルム細胞)を擦過することにより、リン酸緩衝化生理食塩水中に破壊的にサンプル採取し、

懸濁物を均質化し、その後希釈し、MacConkey寒天 (Difco DF0075-17-1) にプレーティングし、E.coli細胞のみを数えた。その管(プランクトン様細胞)内の培地もサンプル採取し、希釈し、プレーティングした。バチルス種の存在下でのE.coli数を、バチルス種非存在下でのネガティブコントロールと比較し、24及び48時間の時点で、プランクトン様の接着細胞について、各対象バチルスに対するE.coliの対数的制御を計算した。

【0092】

【表3】

菌株	P:B 比率	対数的制御	対数的制御	対数的制御	対数的制御
		24時間 プランクトン	24時間 結合	48時間 プランクトン	48時間 結合
PTA-7544	2.7	4.4	5.2	>9	>9
PTA-7790	21.0	5.2	6.3	>9	>9
PTA-7791	2.8	2.5	2.1	7.3	4.2
PTA-7792	2.3	0.0	0.6	0.0	0.0
PTA-7549	0.8	5.2	6.8	9.7	6.5
PTA-7542	5.7	5.1	4.7	>9	5.4
PTA-7545	17.0	5.1	4.9	>9	>9
NRRL B-50017	0.6	3.7	4.1	8.7	7.4
PTA-7546	32.4	4.0	3.9	9.7	7.2

10

20

【実施例5】

【0093】

ペトリ皿E.coli阻害域

対象バチルスを18~24時間プレートカウント培地中で増殖させ、およそ $10^7 \sim 10^8$  cfu/mL培養物にした。18~24時間増殖させたE.coli(およそ $10^8 \sim 10^{10}$  cfu/mL)を標準法寒天プレート(SMAプレート)(Smith River Biologicals, Ferrum, VA)表面に菌叢を形成させるよう画線し、4つの5 mmの孔を滅菌ステンレス鋼管で寒天に対して穿孔した。50マイクロLの各バチルス培養液をその孔に移し(孔当たり1菌株)、プレートを18~48時間、35℃で、寒天側を下にしてインキュベートした。孔に近接するインキュベートしたE.coli菌叢を、対象バチルスに対するポジティブコントロールとして点数化した。阻害域をミリメートル(mm)で測定し、コントロールの準定量的評価とした。1 mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

30

【0094】

【表 4】

菌株	E. coli 阻害
NRRL B-50016	-
NRRL B-50017	-
PTA-7541	+
PTA-7792	+
PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	-
PTA-7549	+
PTA-7791	+
PTA-7790	+

10

## 【実施例 6】

【0095】

20

ペトリ皿シュードモナス・エルギノーサ阻害域

対象パチルス<sup>1</sup>を18~24時間プレートカウント培地中で増殖させ、およそ $10^7 \sim 10^8$  cfu/mL培養物にした。18~24時間増殖させたシュードモナス・エルギノーサ（およそ $10^8 \sim 10^{10}$  cfu/mL）を標準法寒天プレート（Smith River Biologicals, Ferrum, VA）表面に菌叢を形成させるよう画線し、4つの5 mmの孔を滅菌ステンレス鋼管で寒天に対して穿孔した。50マイクロLの各パチルス培養液をその孔に移し（孔当たり1菌株）、プレートを18~48時間、35℃で、寒天側を下にしてインキュベートした。孔に近接するインキュベートしたシュードモナス・エルギノーサ菌叢を、対象パチルスに対するポジティブコントロールとして点数化した。阻害域をミリメートル（mm）で測定し、コントロールの準定量的評価とした。0.5mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

30

【0096】

【表 5】

菌株	シュードモナス・エルギノーサ ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) 阻害
NRRL B-50016	-
NRRL B-50017	+
PTA-7542	+
PTA-7545	+
PTA-7791	+

40

## 【実施例 7】

【0097】

ペトリ皿シュードモナス・モンテリ及びプチダ阻害域

対象パチルスNRRL B-50014を18~24時間プレートカウント培地中で増殖させ、およそ $10^7 \sim 10^8$  cfu/mL培養物にした。18~24時間増殖させた（およそ $10^8 \sim 10^{10}$  cfu/mL）シュードモナス・モンテリ（ATCC 700412）及び*P. s.* プチダ（ATCC 49451）を標準法寒天プレート（Smith River Biologicals, Ferrum, VA）表面に菌叢を形成さ

50

せるよう画線し、4つの5 mmの孔を滅菌ステンレス鋼管で寒天に対して穿孔した。50マイクロLのパチルス培養液をその孔に移し(孔当たり1菌株)、プレートを18~48時間、35℃で、寒天側を下にしてインキュベートした。阻害された孔に近接するインキュベートしたシュードモナス菌叢を、対象パチルスに対するポジティブバイオコントロールとして点数化した。阻害域をミリメートル(mm)で測定し、コントロールの準定量的評価とした。1 mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

【0098】

【表6】

菌株	シュードモナス・モンテリイ ( <i>Pseudomonas monteilli</i> ) 阻害	シュードモナス・プチダ ( <i>Pseudomonas putida</i> ) 阻害
NRRL B-50014	+	+

10

【実施例8】

【0099】

クオラムセンシング阻害

セラチア・ルビダエア(ATCC 27593)は、その色素沈着が無処置のクオラムセンシング経路に依存する細菌指標として使用した。クオラムセンシング化合物は、細菌を「情報交換」させ、表現型、例えば色素沈着、遊走性、病原性及びバイオフィーム形成に作用する。すなわちクオラムセンシング阻害はバイオフィーム制御の作用状態である。対象パチルスを18~24時間、35℃で、プレートカウント培地中で増殖させ、およそ $10^7$  cfu/mLの密度にした。パチルスで標準法寒天プレート(SMAプレート)(Smith River Biologicals, Ferrum, VA)に染みをつけ(10マイクロL)、18~24時間、26℃でインキュベートし、当該時間後に、コロニーが可視化した。セラチア培養物(5マイクロL)(Luria培地、18~24時間、26℃で、およそ $10^7$  cfu/mL)を、5 mLの0.5%溶融LB寒天(Luria培地、30.5 g/L及び0.5%不活性寒天(noble agar)に添加し、よく混合し、成熟対象パチルスコロニーを有するプレート上に注いだ。寒天準備の後、プレートを18~24時間、26℃でインキュベートした。阻害された色素沈着域は、それ自体が阻害されたセラチア増殖ではないが、QSIに対するポジティブとして点数化し、準定量的結果のためにその全直径にわたって測定した。

20

30

【0100】

【表 7】

菌株	抑制した色素沈着の直径 (mm)
NRRL B-50014	27
NRRL B-50015	27
NRRL B-50016	45
NRRL B-50017	42
NRRL B-50018	36
PTA-7541	39
PTA-7792	43
PTA-7542	31
PTA-7543	24
PTA-7544	49
PTA-7545	-
PTA-7546	43
PTA-7547	28
PTA-7548	-
PTA-7549	50
PTA-7793	-
PTA-7790	-
PTA-7791	40

10

20

## 【実施例 9】

## 【0101】

CDC バイオフィルムリアクター中での対象バチルス存在下での、シュードモナスのバイオフィルム及びプランクトン様細胞増殖の制御

ポーセリンクーポン (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) を有する CDC バイオフィルムリアクター (Biosurfaces Technologies, Bozeman, MT, カタログ番号 CBR90-2) に 400 mL のプレートカウント培地を満たし、オートクレーブした。PTA-7546 胞子を 2 つのリアクターの冷却した媒体に添加し、シュードモナス傷害の前に、攪拌棒を 60rpm に設定し、室温で 24 時間の色素沈着時間インキュベーションした (リアクター中の初回用量 =  $4.5 \times 10^5$  cfu/mL)。2 つの追加のリアクターをバチルス植菌なしのコントロールとして処理した。シュードモナス・エルギノーサをプレートカウント培地中で一晩増殖させ、その後 20 mL の 1 : 100 希釈シュードモナス培養物を全 4 つのリアクターに添加し、得られた共培養比率は 1 シュードモナス : 127 バチルスであった。24 時間の増殖後、媒体再投与を、速度 3 mL/分 で、希釈プレートカウント培地 (1 g/L 濃度) で開始した。攪拌を 60rpm に設定した。

30

## 【0102】

1 日後 (共培養開始から 2 日後)、液サンプルを各リアクターから採取し、希釈し、MacConkey agar 上にプレートし、およそ 18 時間 35 °C でインキュベートし、グラム陰性 (= シュードモナス = 不所望生物) カウントを得る。同様に、coupon を滅菌木製塗布棒で擦過し、擦過物を滅菌リン酸化バッファに懸濁させ、均一化し、希釈し、MacConkey 寒天上にプレーティングし、これを 18 時間 35 °C でインキュベートする。処理対未処理のリアクター中で、シュードモナスカウントの比較により、「バチルスリアクター中の対数的制御」の計算ができる。

40

## 【0103】

【表 8】

状態	処理 リアクター A†	処理 リアクター B†	平均 処理 リアクター †	未処理 リアクター A†	未処理 リアクター B†	平均 未処理 リアクター †	平均 対数的 制御†
バイオフィルム (クーボンから 擦過)	$2.6 \pm 10^2$	$5.7 \pm 10^2$	$4.2 \pm 10^2$	$6.7 \pm 10^6$	$1.4 \pm 10^6$	$4.1 \pm 10^6$	3.9
プランクトン (液体) サンプル	$1.4 \pm 10^4$	$1.1 \pm 10^4$	$1.3 \pm 10^4$	$2.1 \pm 10^7$	$6.4 \pm 10^7$	$4.3 \pm 10^7$	3.5

† カウント cfu/mL又はcfu/クーボン

10

## 【実施例 10】

## 【0104】

バチルス孢子再投与を伴うCDCバイオフィルムリアクター中での対象バチルス存在下での、シュードモナスのバイオフィルム及びプランクトン様細胞増殖の制御

ポーセリクーボン(Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta)を有するCDCバイオフィルムリアクター(Biosurfaces Technologies, Bozeman, MT, カタログ番号CBR90-2)に400 mLのプレートカウント培地(完全強度)を満たし、オートクレーブした。PTA-7546(試行1)及びNRRL B-50017(試行2)の孢子を2つのリアクターの冷却した媒体に添加し、シュードモナス傷害の前に、攪拌棒を60rpmに設定し、室温で24時間の色素沈着時間インキュベーションした(リアクター中の初回バチルス用量=試行1で $1.3 \times 10^5$  cfu/ml、試行2で1012 cfu/ml)。2つの追加のリアクターをバチルス植菌なしのコントロールとして処理した。シュードモナス・エルギノーサをプレートカウント培地中で一晚増殖させ、その後20マイクロLの1:100希釈シュードモナス培養物を全4つのリアクターに添加し(試行1が127 cfu/ml、試行2が $1 \times 10^5$  cfu/ml)、得られた共培養比率は、試行1が1シュードモナス:104バチルス、試行2が1:0.1であった。24時間の増殖後、媒体再投与を、速度90 mL/15分で1時間に15分間、希釈プレート

20

30

## 【0105】

1日後(共培養開始から2日後)、液サンプルを各リアクターから採取し、希釈し、MacConkey agar上にプレートし、およそ18時間35分でインキュベートし、グラム陰性(=不所望生物)カウントを得る。同様に、couponを滅菌木製塗布棒で擦過し、擦過物を滅菌リン酸化バッファに懸濁させ、均一化し、希釈し、MacConkey寒天上にプレーティングし、これを18時間35分でインキュベートする。処理対未処理のリアクター中で、シュードモナスカウントの比較により、「バチルスリアクター中の対数的制御」の計算ができる。

40

## 【0106】

## 【表 9】

状態	PTA-7545 平均対数的制御	NRRL B-50017 平均対数的制御
バイオフィルム(クーボンから擦過)	4.5	2.9
プランクトン(液体)サンプル	4.4	3.5

50

## 【実施例 1 1】

## 【0 1 0 7】

## ペトリ皿ビブリオ・ハルベイ阻害域

対象パチルスを栄養培地（3 g/Lビーフ抽出物、5 g/Lペプトン）中、35℃で18～24時間増殖させた。V.ハルベイ ATCC 25919を1.5% NaCl添加の栄養培地中、28℃で18～24時間で増殖させた。1.5% NaCl添加の栄養寒天（1.5% 寒天）を25 mL分割量でオートクレーブした。250マイクロLのビブリオ一晚培養物を、溶融寒天の各分割量に添加し、寒天中およそ $1 \times 10^6$  cfu/mLビブリオとなった。寒天を固化させた後、4つの孔を、滅菌ステンレス鋼管を用いて各プレートに穿孔した。50マイクロLの各パチルス一晚培養液を各ウェルに移した。プレートを28℃で18～24時間、寒天側を下にしてインキュベートした。阻害ビブリオ菌叢域を測定した。0.5 mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

10

## 【0 1 0 8】

## 【表 1 0】

菌株	ビブリオ・ハルベイ ( <i>Vibrio harveyi</i> )
NRRL B-50015	+
NRRL B-50016	+
NRRL B-50017	+
PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	+
PTA-7548	+
PTA-7749	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

20

30

## 【実施例 1 2】

## 【0 1 0 9】

## ペトリ皿ビブリオ・アルギノリティカス阻害域

対象パチルスを栄養培地（3 g/Lビーフ抽出物、5 g/Lペプトン）中、35℃で18～24時間増殖させた。V.アルギノリティカス ATCC 17749を1.5% NaCl添加の栄養培地中、28℃で18～24時間で増殖させた。1.5% NaCl添加の栄養寒天（1.5% 寒天）を25 mL分割量でオートクレーブした。250マイクロLのビブリオ一晚培養物を、溶融寒天の各分割量に添加し、寒天中およそ $1 \times 10^6$  cfu/mLビブリオとなった。寒天を固化させた後、4つの孔を、滅菌ステンレス鋼管を用いて各プレートに穿孔した。50マイクロLの各パチルス一晚培養液を各ウェルに移した。プレートを28℃で18～24時間、寒天側を下にしてインキュベートした。阻害ビブリオ菌叢域を測定した。0.5 mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

40

## 【0 1 1 0】

【表 1 1】

菌株	ビブリオ・アルギノリティカス ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )
NRRL B-50015	+
NRRL B-50016	+
NRRL B-50017	+
PTA-7541	+
PTA-7592	+
PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7747	+
PTA-7748	+
PTA-7749	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

10

20

## 【実施例 1 3】

## 【0 1 1 1】

## ペトリ皿ビブリオ・フィシェリ阻害域

対象バチルスを栄養培地（3 g/Lビーフ抽出物、5 g/Lペプトン）中、35 ℃で18～24時間増殖させた。V. フィシェリを1.5% NaCl添加の栄養培地中、28 ℃で18～24時間で増殖させた。1.5% NaCl添加の栄養寒天（1.5% 寒天）を25 mL分割量でオートクレーブした。250マイクロLのビブリオ一晩培養物を、溶融寒天の各分割量に添加し、寒天中およそ  $1 \times 10^6$  cfu/mLビブリオとなった。寒天を固化させた後、4つの孔を、滅菌ステンレス鋼管を用いて各プレートに穿孔した。50マイクロLの各バチルス一晩培養液を各ウェルに移した。プレートを28 ℃で18～24時間、寒天側を下にしてインキュベートした。阻害ビブリオ菌叢域を測定した。0.5 mmより大の識別可能な阻害をポジティブとして点数化した。

30

## 【0 1 1 2】

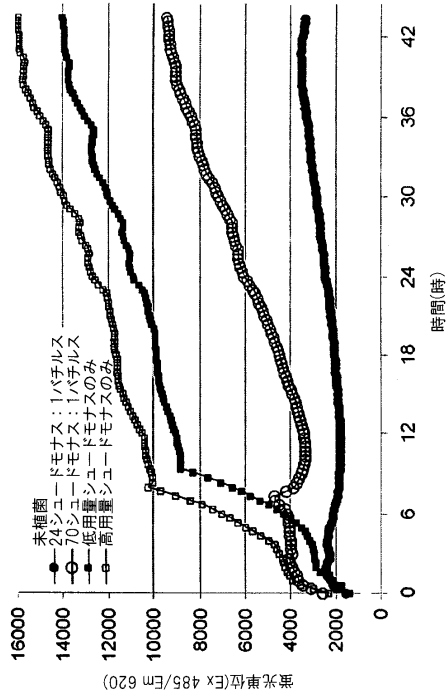
## 【表 1 2】

菌株	ビブリオ・フィッシェリイ ( <i>Vibrio fischerii</i> )
PTA-7543	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	+
PTA-7548	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

40

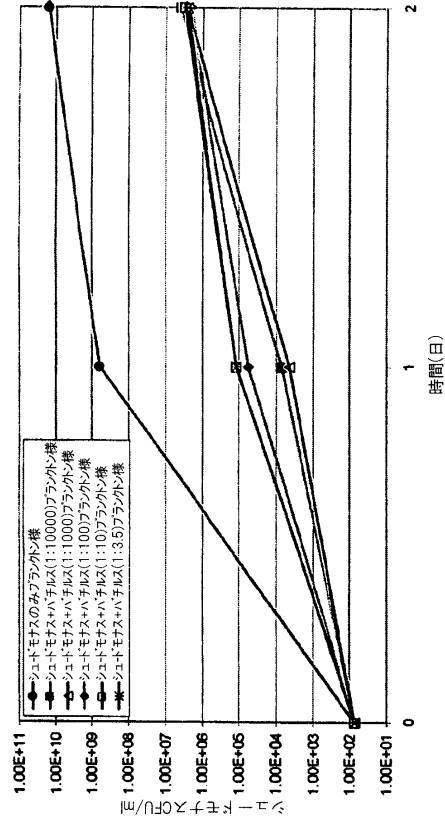
【 図 1 】

図1



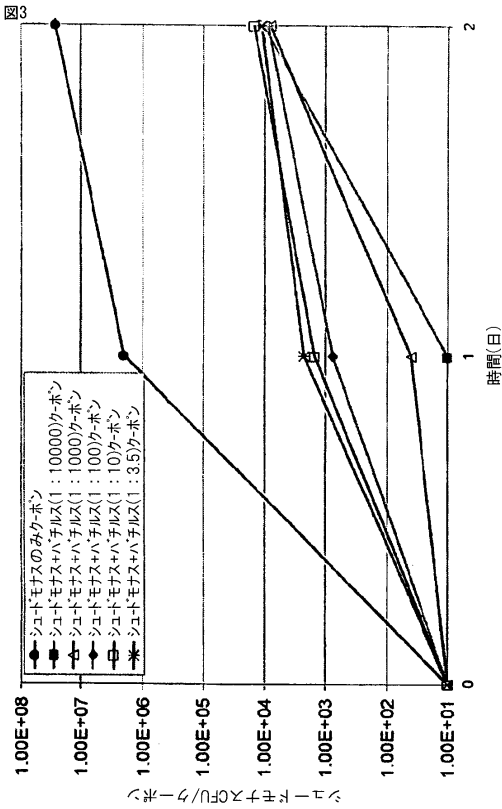
【 図 2 】

図2



【 図 3 】

図3



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 1/20 Z

微生物の受託番号 ATCC PTA-7545

微生物の受託番号 ATCC PTA-7546

微生物の受託番号 ATCC PTA-7791

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 マチャットン, サラ

アメリカ合衆国, バージニア 2 4 1 5 3, サーレム, ウォリアー ドライブ 4 8 4 4

(72)発明者 ウィリアムズ, イレーヌ ミシェル

アメリカ合衆国, バージニア 2 4 0 1 2, ロアノーク, ハンティントン ブールバード ノース  
イースト 2 0 8

(72)発明者 ドラホス, デイビッド

アメリカ合衆国, バージニア 2 4 0 1 8, ロアノーク, スコットフォード コート 6 0 1 4

審査官 鈴木 雅雄

(56)参考文献 特開平10-249388(JP,A)

特開2005-272434(JP,A)

特開2007-055982(JP,A)

特表2001-526529(JP,A)

国際公開第99/011756(WO,A1)

特開2002-121593(JP,A)

特表2000-503320(JP,A)

特開2005-232920(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 0 1 N 6 3 / 0 0

A 0 1 P 1 3 / 0 0

A 0 1 P 1 5 / 0 0

C 1 2 N 1 / 2 0