

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/31
C12N 1/20 C07K 14/305
A23B 4/22 A61K 7/16
A61K 7/02
//C12N1/20,C12R1:265

[21] 申请号 96112157.2

[43]公开日 1997年5月28日

[11] 公开号 CN 1150601A

[22]申请日 96.8.6

[30]优先权

[32]95.8.7 [33]EP[31]95810497.8

[71]申请人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72]发明人 B·莫列特 J·皮尔 D·普里莫尔

N·列基夫 B·苏里

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 38 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 细菌素

[57]摘要

本发明涉及易变微球菌细菌素、产生所述细菌素的菌株，尤其是菌株 CNCM I-1586 和 CNCM I-1587 以及制备该细菌素的方法和该细菌素在制备食品和化妆品中作为抗病原菌活性剂的应用。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求

1. 得自易变微球菌的细菌素, 其特征在于它具有氨基酸序列SEQ ID NO :1
2. 根据权利要求1的细菌素, 其特征在于因1-4个氨基酸的一次取代、一次缺失和/或一次插入而不同于序列SEQ ID NO:1。
3. 编码权利要求1之易变微球菌细菌素的核苷酸片段。
4. 根据权利要求3的片段, 其特征在于它含有序列SEQ ID NO:2的核苷酸88-228。
5. 根据权利要求3或4的核苷酸片段, 其特征在于它含有序列SEQ ID NO :2的核苷酸154-228。
6. 根据权利要求3或4的核苷酸片段, 其特征在于它含有序列SEQ ID NO :2的核苷酸88-153。
7. 由权利要求6之核苷酸序列编码的易变微球菌信号肽。
8. 产生权利要求1或2之细菌素的易变微球菌菌株, 特别是菌株CNCM I -1586和CNCM I-1587。
9. 制备权利要求1或2之细菌素的方法, 其特征在于在培养基中和适于菌株生长的条件下培养产生所述细菌素的易变微球菌, 以得到 10^7 - 10^{11} 菌体/ml的培养基, 在此之后将所得培养物离心, 制备含所述细菌素的上清液提取物。
10. 根据权利要求9的方法, 其特征在于所述易变微球菌菌株是菌株CNCM I-1586或CNCM I-1587。
11. 根据权利要求1或2的细菌素, 尤其是根据权利要求9所得的提取物形式的细菌素和/或产生所述细菌素的易变微球菌在制备食品、化妆品和药品中的应用, 尤其是在皮肤学和口腔-牙齿用品中的应用。

说明书

细菌素

本发明涉及一种细菌素、产生所述细菌素的菌株、制备所述细菌素的方法以及所述细菌素和/或产生所述细菌素之菌株在生产食品和化妆品中的应用。

细菌素已从许多革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中分离出。细菌素是一类其本质为蛋白质而且具有杀菌作用的分子，正因为此，它能够在其产生菌与一种或多种不同的细菌之间引起拮抗反应。而且，细菌素的抑菌谱通常局限于与产生细菌素菌种非常相关的菌种。

确切地说，细菌素已在乳酸菌中得以证实。例如，EP 0643136 (Societe des produits Nestle) 描述了从嗜热链球菌中鉴定的两种细菌素。类似地，从乳酸乳球菌中也已分离到一种细菌素(App. and Env. Microbio. 58, 279-284, 1992; J. of Bio. Chem. 268, 16361-16368, 1993)。

然而，至今尚不了解得自易变微球菌中的细菌素。易变微球菌目前被大量地用于食品领域。尤其是用于鲜肉的发酵以制备如意大利香肠和腊肠的熟食制品。因此，易变微球菌将在获得可抵抗致病因子的产细菌素菌株方面非常有用。本发明的目的就是针对这一需要而提出的。

为此，本发明的细菌素即为易变微球菌细菌素，其具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列，或者是通过1-4个氨基酸的一次取代，缺失和/或插入而不同于序列 SEQ ID NO:1的任何氨基酸序列。

而且，任何编码该细菌素的核苷酸片段，尤其是具有序列 SEQ ID NO: 2的核苷酸片段也在本发明的范围内。

类似地，本发明的菌株为产生该细菌素的易变微球菌，尤其是易变微球菌菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587。

在制备本发明细菌素的方法中，在适于菌株生长的培养基和生长条件下培养产所述细菌素的易变微球菌菌株，特别是菌株CNCM I-1586或菌株CNCM I-1587，以得到含 10^7 - 10^{11} 生物体/ml的培养物培养基，然后将所得培养物离心，制备含细菌素的上清液提取物。

最后，本发明易变微球菌细菌素的用途包括将其核苷酸序列及其信号序

列、含细菌素的上清液提取物和产所述细菌素的易变微球菌菌株用于制备食品和化妆品。

本发明的细菌素在下文中将被称为“易变素”(Variacin)。

在本发明中，任意单位(arbitrary Unit au)被定义为样品在技术人员已知的“琼脂孔试验”中仍然表现出杀菌作用时的最大稀释值的反比。

在本发明中，术语“片段”或“DNA片段”应理解为作为部分或完整编码并能被合成，通过例如已知的聚合酶链反应方法在体外进行复制或例如在E. coli中进行体内复制的单链或双链DNA片段。

在本发明中，“同源片段”被理解为通过少量碱基的取代、缺失或插入而仅仅不同于本发明片段的任何片段。在说明书中，两个由于遗传密码简并性而编码一个和相同多肽的DNA片段尤其应该被认为是同源的。与本发明的片段有80%以上同源性的片段也将认为是同源片段。在后一种情况下，同源性由同源片段中的碱基数与本发明片段中的碱基数之比确定。

最后，本发明含义中的“杂交片段”应理解为能够与本发明的片段经Southern印迹法杂交(Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989, Chapter 9.31-9.58)的任何片段。优选地，在苛刻或严格条件下进行杂交，以避免非特异性杂交或相对不稳定的杂交。

我们已从菌株CNCM-I-1586和CNCM I-1587分离出一种蛋白质性因子，即具有强力杀菌作用的细菌素。该细菌素得自易变微球菌，并显示为下文所描述的氨基酸序列SEQ ID NO:1，它已被命名为易变素。

根据易变素所提供的意义，本发明还涉及具有不同于SEQ ID NO:1之氨基酸序列的任何细菌素，所述的差别是由于1-4个氨基酸的一次取代，缺失和/或插入造成的。因此，上述具有因1-4个氨基酸的一次取代，缺失和/或插入而不同于序列SEQ ID NO:1之氨基酸序列的细菌素可以比例如所述易变素有更广的细菌属或细菌种的抑菌谱。

还有可能选择编码得自两个菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587之本发明易变素的染色体核苷酸片段。所述片段显示为下文所给出的序列SEQ ID NO:2。

根据本发明所提供的意义，本发明还涉及编码本发明易变素的任何核苷酸片段，尤其是与序列SEQ ID NO:2同源或与之杂交的核苷酸片段。

更确切地说，本发明涉及编码所述易变素信号肽的序列SEQ ID NO:2之核苷酸88-153、编码本发明被分泌易变素的序列SEQ ID NO:2之核苷酸154-228和/或编码与其信号肽融合之所述细菌素的序列SEQ ID NO:2之核苷酸88-228。

编码所述被分泌易变素的片段可以有利地用于在植物或在除了易变微球菌之外的微生物中表达发明的易变素。为此，将序列SEQ ID NO:2之核苷酸154-228克隆到表达载体启动子或信号序列的下游，终止子的上游，对阅读框给予应有的注意时，再将所述载体导入植物、细菌或酵母中，以便拓宽其针对例如某些细菌的抑菌谱。

对本发明的信号序列加以应用是通过将序列SEQ ID NO:2之核苷酸88-153与目的基因融合，对阅读框给予应有的注意时，再通过将整个融合体克隆到易变微球菌表达载体，以使由所述目的基因编码的蛋白质在例如易变微球菌中表达和分泌。

序列SEQ ID NO:2之核苷酸88-228能够被克隆到易变微球菌表达载体，并再导入另外的易变微球菌菌株，以使后者产生本发明的易变素。

此外，通过整合入其基因组或借助表达载体而含有编码本发明易变素之DNA片段的易变微球菌也是本发明主题的一部分。更确切地说，根据布达佩斯条约的规定，已于1995年6月7日在国立微生物培养物保藏中心保藏（INSTITUT PASTEUR, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 1. 5 France）、保藏号为CNCM I-1586和CNCM I-1587的易变微球菌菌株是本发明主题的一部分。

易变微球菌为G⁺、过氧化氢酶阳性的永久静止性需氧菌。其形态为球状，以无规则排列的四分体形式存在。

易变微球菌菌落在BHI培养基上呈黄色，其最适生长温度为25-37°C。

作为本发明之主题部分的菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587可以代谢葡萄糖和果糖，CNCM I-1587菌另外还代谢蔗糖和呋喃糖。

此外，菌株CNCM I-1586携带4kb和12kb的两个质粒，而菌株CNCM I-1587仅携带一个7kb质粒。

菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587的培养物上清液相对其它细菌的生长显示出了较广的抑制谱。下列细菌是举例说明对上述上清液敏感之细菌：乳酸乳球菌、瑞士乳芽胞杆菌、德彼利代乳芽胞杆菌保加利亚亚种、德彼利氏乳

芽胞杆菌乳酸亚种、德彼利氏乳芽胞杆菌德彼利氏亚种、嗜酸乳芽胞杆菌、约翰逊氏乳芽胞杆菌、植物乳芽胞杆菌、清酒乳芽胞杆菌、弯曲乳芽胞杆菌、*Leuconostoc carnosum*、肠系膜状明串珠菌肠系膜状亚种、嗜热链球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、粪肠球菌粪亚种、枯草芽胞杆菌的孢子和无性细胞、蜡状芽胞杆菌、多粘芽胞杆菌、环状芽胞杆菌、短小芽胞杆菌和液化形芽胞杆菌以及梭状芽胞杆菌属。

优选地，在制备所述易变素的方法中，将产所述细菌素的易变微球菌置于培养基中，在适于其生长的条件下培养，以得到含 10^7 - 10^{11} 生物体/ml培养基的培养物培养基，然后将所得的培养物离心，制得含所述细菌素的上清液。

为了制备所述提取物，在适于易变微球菌生长的培养基和条件下培养产所述易变素的易变微球菌，尤其是菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587，为此，更确切地说是可在BHI培养基中，于25-37°C在需氧条件下振荡培养，直到例如达到 10^7 - 10^{11} 生物体/ml培养基浓度。将如此所得的标准培养物于4000-6000g离心，收集含所述细菌素的上清液提取物。

本发明还涉及易变素(尤其是提取物形式)或者是产所述细菌素之易变微球菌在制备食品和化妆品中的应用。

更确切地说，本发明易变微球菌菌株之一的培养物在制备意大利香肠时可用于肉类的发酵，以防止例如梭状芽胞杆菌属的污染。

在制备奶酪，尤其是mozzarella型奶酪过程中，粗制提取物或纯化形式的易变素可以使用，当其被加入利用对所述易变素有抗性的细菌获得的发酵剂中时，可避免由于多粘芽胞杆菌的芽胞幸存于发酵物中所产生的孔眼；在制备vacherin型奶酪时，上述易变素的利用用来对抗例如单核细胞增生李斯特氏菌的污染。

易变素(特别是粗提物或纯化形式)或所述两菌株之一可以在制甜点奶油冻(如经巴斯德法消毒的牛奶蛋冻)中用作添加剂或能有效对抗病原菌的成分，以抵抗例如梭状芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌的芽胞或李斯特氏菌属的菌株生长。

此外，易变素的粗提物或纯化形式或所述两菌株之一可在制备化妆品(如保湿乳或除臭剂)中用作添加剂或抗病原菌的活性剂，以对抗例如皮肤病原菌的生长。

本发明易变素的特征借助下文说明其特性的微生物学、生物化学和遗传

学结果得以更详细的说明。所给出的百分数为重量百分比。

抗菌活性单位—“琼脂孔试验”

在本发明书的叙述中，抗菌活性是根据任意单位定义的。

本发明例如在实施例所述条件下制备的本发明易变微球菌标准培养物的上清液一般的是显示640 au/ml活性。类似地，例如在实施例2所述条件下制备的所述上清液浓缩物一般显示大约24000 au/ml活性。

所述琼脂孔试验是用于确定某一样品在一特定稀释度时是否仍然显示杀菌活性。

为此，将含有浓度为 10^5 - 10^6 CFU/ml的指示菌的15ml MRS 琼脂培养基接种到平皿中。对易变素敏感的菌株用作指示菌，在上述情况下，例如可用保加利亚乳芽胞杆菌(YL 5)或瑞士乳芽胞杆菌(N2)。

在培养基中打出直径5mm的孔。待测上清或上清浓缩物样品以50 μ l/孔的比例注入。该平皿在4°C预培养2小时，然后于30°C或37°C(取决于所用指示菌过夜培养。经过上述培养之后，指示菌生长，并可看见受抑制的孔。样品不再表现出杀菌活性的稀释值就是从此开始不再能辨认出抑制孔的稀释值。

酶所致的失活

所述琼脂孔试验用于确定根据本发明分离的易变素是否在蛋白酶或过氧化氢酶存在下失活。

为此，将5mg/ml酶加入实施例2所述培养物上清浓缩物中。在样品被置于琼脂孔试验孔中之前，使酶在保温温度下作用60分钟。

利用相同浓缩物(pH7)而不加入酶平行制备对照物。该对照样品在其被置于琼脂孔试验孔中之后在37°C先保温60分钟，以比较在酶存在时所得的抑制孔和对照的抑制孔。对照抑制孔的直径为27mm。

表I所示结果是在酶存在条件下用指示菌瑞士乳芽胞杆菌(N2)进行试验得到的。在该表及表II中，所述酶是用其类型、供应商的名称及供应商之目录号命名的。数字0表示不再存在任何孔，换句话说，易变素的杀菌活性因后者与所述酶一起保温而丧失。数字27表示仍然存在27mm孔，相应于易变素全部的杀菌活性。

表I

酶	培养温度 (°C)	失活 (mm)
过氧化氢酶 (SIGMA C-10)	30	27
链霉蛋白酶E (SIGMA P-8038)	37	0
蛋白酶K (MERCK 1000 144)	37	0
无花果蛋白酶 (SIGMA F-3266)	37	0

下表II 所示结果是在所述酶存在条件下用指示菌保加利亚乳芽胞杆菌 (YL 5) 进行试验得到的。

表II

酶	培养温度 (°C)	失活 (mm)
过氧化氢酶 (SIGMA C-10)	30	27
链霉蛋白酶E (SIGMA P-8038)	37	0
蛋白酶K (MERCK 1000 144)	37	0
无花果蛋白酶 (SIGMA F-3266)	37	0

表I和表II所示结果表明,所有蛋白质水解性酶类都抑制所述易变素的杀菌活性。这些结果证明了这样一个事实,所述易变素的本质是蛋白质,而该蛋白质部分与杀菌活性有关。

未发现过氧化氢酶对所述易变素的杀菌活性产生任何影响的事实还说明,虽然已知 H_2O_2 与细菌素有类似的活性,但两指示菌生长受抑制并非是 H_2O_2 的抗菌活性,因为 H_2O_2 将被过氧化氢酶降解。

含所述易变素培养物上清液的抑菌谱

本琼脂孔试验用于确定含有本发明易变素培养物上清液的杀菌活性是否表现为对于不同芽胞和细菌的菌株生长的抑制活性。由此确定所述上清液的抑菌谱。

为了进行上述测定,将15ml标准培养基注入平皿中以得到 10^5 - 10^6 /ml标准培养基的菌浓度。其中,标准培养基是用15 μ l头一夜制备的待测菌株培养物接种的,该培养基适于待测菌的生长。

而且,当待测菌由芽胞生长时,覆盖培养基中以 10^5 - 10^6 芽胞/ml接种。

在每个平皿中打一个直径5mm的孔。将如实施例1所述的50 μ l培养物上清液样品置于其中。平皿于4 $^{\circ}$ C预培养2小时,然后在所述菌适宜生长的温度下培养直至出现肉眼可见的菌苔覆盖平皿。

抑制作用的效果或程度的特征是所观察到的抑制孔直径。如果孔的直径为18-28mm,抑制作用被认为非常强(+++);如果孔的直径为10-17mm,抑制作用强(++);如果直径为5-9mm,抑制作用一般(++);如果直径为1-4mm,抑制作用弱;如果观察不到孔存在,则抑制作用为0(-)。

用上述方法测试了不同种和亚种的32株乳酸菌,值得注意的是,它们之中无一对上清液有抗性。这些试验的详细结果示于下表III中。表III象下列各表一样,菌株命名或所示菌株号是Nestle保藏中心所给的号(地址:NESTEC S. A., Centre de Recherche, Vers-Chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne26, Switzerland)。所示温度为试验过程中的培养温度。所示培养基是适于待测菌生长的标准培养基。

表III

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
乳酸乳芽胞杆菌	SL2	37	MRS	+++
瑞士乳芽胞杆菌	N 2	37	MRS	+++
	N 258	37	MRS	+++
	N 262	37	MRS	+++
	N 271	37	MRS	+++
	LBL 4	37	MRS	++++
德彼利氏乳芽胞 杆菌乳酸亚种	N 9	37	MRS	++++
	N 62	37	MRS	++
德彼利氏乳芽胞 杆菌德彼利氏亚种	LFi 1	37	MRS	+++
	LFi 5	37	MRS	+++
	YL 5 YL 18	37 37	MRS MRS	+++ +++
德彼利氏乳芽胞 杆菌德彼利氏亚种	N 8	37	MRS	+++
	N 187	37	MRS	+++
嗜酸乳芽胞杆菌	La 3	37	MRS	+++
	La 10	37	MRS	++
	La 27	37	MRS	++
	La 28	37	MRS	++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
约翰逊氏乳芽胞杆菌	LA 1	30	MRS	++
植物乳芽胞杆菌	60	30	MRS	+
	3.4 RP	30	MRS	+
清酒乳芽胞杆菌	LSK	30	MRS	+
弯曲乳芽胞杆菌	18	37	MRS	++
Leuconostoc carnosum	LCA 3	37	M 17	++++
肠系膜状明串珠菌 肠系膜状亚种	A 74	30	MRS	+
	B 50	30	MRS	+
嗜热链球菌	SFi 13	37	Elliber	++
	SFi 16	37	Elliber	++
	SFi 21	37	Elliber	++
	SFi 25	37	Elliber	++
	ST 11	37	Elliber	++
	ST 1	37	Elliber	++

从表III中注意到，上清液的抑菌谱很广是从抑制程度对于所测试的不同菌种差不多在同一水平这一意义上讲。

产生本发明易变素的培养物上清液之抑菌谱还被认为很广是从它不限于乳酸菌菌种而且还扩展到G⁺菌的其它种这一意义上而言，尤其是：例如人们不欢迎或病原性菌无害李斯特氏菌，*Listeria Welhia*、单核细胞增生李斯特氏菌，以及芽胞杆菌的芽胞，这一点正如由下表IV所示结果所证实的。

表 IV

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
粪肠球菌粪亚种	J	37	Elliber	++
粪肠球菌	D 325	37	Elliber	++
	MB 26	37	Elliber	++
无害李斯特氏菌	7	30	BHI	+++
单核细胞增生 李斯特氏菌	FSM122	30	BHI	++++
<i>Listeria welhia</i>	2	30	BHI	++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
枯草芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	A 1	30	BHI	+++
	A 2	30	BHI	++
	A 3	30	BHI	++
	A 4	30	BHI	++
	A 13	30	BHI	+++
	A 15	30	BHI	++
	24	30	BHI	++
	152	30	BHI	-
蜡状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	C 1	30	BHI	++
	C 2	30	BHI	++
	C 5	30	BHI	++
	C 6	30	BHI	++
	79	30	BHI	++++
	C 15	30	BHI	+
解淀粉芽胞杆菌	226	30	BHI	++++
多粘芽胞杆菌	252	30	BHI	++++
液化形芽胞杆菌	64	30	BHI	++++
嗜热脂肪芽胞杆菌	10	30	BHI	-
环状芽胞杆菌	215	30	BHI	++++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
短小芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	B 1	30	BHI	++
	B 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++
肉毒梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	100003	45	DRMC	++
	100006	45	DRMC	++
	100019	45	DRMC	++
	100023	45	DRMC	++
丁酸梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	102001	45	DRMC	++
酪丁酸梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	107002	45	DRMC	+
产气荚膜梭状芽胞杆菌 (芽胞)	103001	45	DRMC	+
产芽胞梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	104001	45	DRMC	+
Clostridium acetobutilycum (芽胞和无性细胞)	106001	45	DRMC	+
嗜热解糖梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	105001	45	DRMC	+

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
金黄色葡萄球菌	3	30	BHI	+
	15	30	BHI	+
	44	30	BHI	+
	60	30	BHI	++
staphylococcus xylosus	1	30	BHI	+
staphylococcus simulans	1	30	BHI	+
Staphylococcus carnosus	1	30	BHI	++
	14	30	BHI	++
腐生葡萄球菌	1	30	BHI	++
	15	30	BHI	+
staphylococcus warneri	1	30	BHI	+
Staphylococcus cohnii	3	30	BHI	+

表IV 所示结果使得可以预测所述上清液或纯化的易变素作为添加剂在制备食品中有吸引力的应用前景，其作用是抗病原菌的活性剂，尤其是抗肉制品中的梭状芽胞杆菌，抗奶酪中的单核细胞增生李斯特氏菌、抗甜点奶油冻中的蜡状芽胞杆菌和李斯特氏菌，或者抗鲜油面或做鲜油面之酱汁中的芽胞杆菌。

最后，如从下表V所示结果所能注意到的，易变素对G⁻菌的生长不产生任何抑制作用。

表V

菌种	No.	T(°C)	培养基	抑制作用
大肠杆菌	1	30	BHI	-
Enterobacter Chloacae	72	30	BHI	-
鸭沙门氏菌	XIV/20	30	BHI	-
鼠伤寒沙门氏菌	XIV/274	30	BHI	-
荧光假单胞菌	3	30	BHI	-

含易变素之上清液浓缩物的抑菌谱

本方法如上所述，除了所确定的对不同芽胞和细菌的菌株生长产生的抑制作用是利用实施例2所述得到的上清液浓缩物。

与前文一样测试相同的菌种和亚种。其结果示于下表VI、VII和VIII。菌株的命名或所示菌号是在Nestte保藏中心给出的(地址: NESTEC S. A., Centre de Recherche, Vers-Chez-Les-Blanc, CH- 1000 Lausanne 26,

Switzerland) 所示温度为试验过程中的培养温度。 所示培养基是适于待测菌生长的标准培养基。

表VI

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
乳酸乳芽胞杆菌	SL2	37	MRS	+++
瑞士乳芽胞杆菌	N 2	37	MRS	++++
	N 258	37	MRS	++++
	N 262	37	MRS	++++
	N 271	37	MRS	++++
	LBL 4	37	MRS	++++
德彼利氏乳芽胞 杆菌保加利亚亚种	LFi 1	37	MRS	++++
	LFi 5	37	MRS	++++
	YL 5	37	MRS	++++
	YL 18	37	MRS	++++
德彼利氏乳芽胞 杆菌乳酸亚种	N 9	37	MRS	+++
	N 62	37	MRS	+++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
德彼利氏乳芽胞 杆菌德彼利氏亚种	N 8	37	MRS	++++
	N 187	37	MRS	++++
嗜酸乳芽胞 杆菌	La 3	37	MRS	++++
	La 10	37	MRS	++++
	La 27	37	MRS	+++
	La 28	37	MRS	+++
约翰逊氏乳芽胞杆菌	LA 1	30	MRS	+++
植物乳芽胞杆菌	60	30	MRS	++
	3.4RP	30	MRS	++
清酒乳芽胞杆菌	LSK	30	MRS	+++
弯曲乳芽胞杆菌	18	30	MRS	+++
Leuconostoc carnosus	LCA 3	37	M17	++++
肠系膜状明串珠菌肠 系膜状亚种	A 74	30	MRS	++
	B 50	30	MRS	++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
嗜热链球菌	SFi 13	37	Elliber	+++
	SFi 16	37	Elliber	+++
	SFi 21	37	Elliber	+++
	SFi 25	37	Elliber	+++
	ST 1	37	Elliber	+++
	ST 11	37	Elliber	+++

表VII

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
粪肠球菌粪亚种	J	37	Elliber	+++
粪肠球菌	D 325	37	Elliber	+++
	MB 26	37	Elliber	+++
无害李斯特氏菌	7	30	BHI	++++
单核细胞增生 李斯特氏菌	FSM 122	30	BHI	++++
Listeria welhia	2	30	BHI	++++
枯草芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	A 1	30	BHI	+++
	A 2	30	BHI	++
	A 3	30	BHI	++
	A 4	30	BHI	++
	A 13	30	BHI	+++
	A 15	30	BHI	++
	24	30	BHI	++
	152	30	BHI	-

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
蜡状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	C 1	30	BHI	++
	C 2	30	BHI	++
	C 5	30	BHI	++
	C 6	30	BHI	++
	79	30	BHI	++++
	C 15	30	BHI	+
解淀粉芽胞杆菌	226	30	BHI	++++
多粘芽胞杆菌	252	30	BHI	++++
液化形芽胞杆菌	64	30	BHI	++++
嗜热脂肪芽胞杆菌	10	30	BHI	-
环状芽胞杆菌	215	30	BHI	++++
短小芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	B 1	30	BHI	++
	B 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++
丁酸梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	102001	45	DRMC	+++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
产气荚膜梭状芽胞杆菌 (芽胞)	103001	45	DRMC	++
酪丁酸梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	107002	45	DRMC	++
产芽胞梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	104001	45	DRMC	++
Clostridium acetobutilycum (芽胞和无性细胞)	106001	45	DRMC	++
嗜热解糖梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	105001	45	DRMC	++
肉毒梭状芽胞杆菌 (芽胞和无性细胞)	100003	45	DRMC	+++
	100006	45	DRMC	+++
	100019	45	DRMC	+++
	100023	45	DRMC	+++
金黄色葡萄球菌	3	30	BHI	++
	15	30	BHI	++
	44	30	BHI	+
	60	30	BHI	+++

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
Staphylococcus xylosus	1	30	BHI	+
Staphylococcus simulans	1	30	BHI	+
Staphylococcus carnosus	1	30	BHI	+++
	14	30	BHI	+++
腐生葡萄球菌	1	30	BHI	++
	15	30	BHI	++
Staphylococcus warneri	1	30	BHI	++
Staphylococcus cohnii	3	30	BHI	++

表VIII

菌种	No.	T (°C)	培养基	抑制作用
大肠杆菌	1	30	BHI	-
Enterobacter chloacae	72	30	BHI	-
鸭沙门氏菌	XIV/20	30	BHI	-
鼠伤寒沙门氏菌	XIV/274	30	BHI	-
荧光假单胞菌	3	30	BHI	-

表VI、VII和VIII所示结果证明，与上清液相比，上清液浓缩物在抑制许多待测菌生长方面的有效性增强了。观察到了对相同菌种和亚种的抑制谱，但都是在更高的抑制水平上。

上文表明了如实施例2所述的易变素上清液浓缩物的制备及其在制备例如食品和化妆品中对抗病原菌的应用。

pH耐受性

本琼脂孔试验用于确定根据本发明分离出的易变素是否为pH依赖性。

为此，如前文“琼脂孔试验”中所述，用一指示菌接种琼脂。瑞士乳芽胞杆菌(N2)被用作指示菌。

用2N NaOH和/或2N HCL将实施例2所述培养物上清液浓缩物提取物的pH值调节为2-10，该提取物在37°C保温60分钟，然后在将提取物样品置于琼脂孔试验孔之前，将pH值再调至6-7。

利用pH7的相同上清液浓缩物平行地建立对照，在对照样品置于琼脂孔试验孔之前先于37°C保温60分钟，以比较试验样品的抑制孔和对照的抑制孔。对照的抑制孔直径为27mm。

象表X和XI中一样，表IX中的数字27表示仍然存在27mm孔，相应于易变素的全部杀菌活性。

表 IX

pH	抑制作用孔
2	27
4	27
6	27
8	27
10	27

上表所示结果表明易变素的杀菌活性并未受损。由此可以得出结论，易变素的杀菌活性不是pH依赖性的。

对热的耐受性

本琼脂孔试验用于确定根据本发明分离出的易变素是否为热依赖性。

为此，如前文琼脂孔试验中所述，用一指示菌接种琼脂。用瑞士乳芽胞杆菌(N2)作为指示菌。

将实施例2中所述的培养物上清液之浓缩提取物的pH值调节为7，在其被置入琼脂孔试验孔之前，先于100°C保温15-60分钟。

利用所得的上清液浓缩物(pH7)平行地建立对照，并于37°C保温60分钟。这样使得将该温度下的试验样品抑制作用孔与对照的抑制作用孔相比较。对照的抑制作用孔直径为27mm。

表X

温度 (°C)	抑制时间 (分)	抑制孔 (mm)
100	15	27
100	15	27
100	15	27

所得结果证明易变素不是热依赖性的。因此，甚至在100°C保温60分钟之后易变素的杀菌活性也未受到损失。

易变素对热的耐受性是其用于制备食品和化妆品时的一个非常重要的生化特征。因此，可以将易变素(尤其是其粗提物或纯化形式)用于制备经巴斯德法消毒的食品，以便对抗例如有耐热性的芽胞杆菌的芽胞生长。

对热和对pH的耐受性

除上述之外，还测试了易变素对pH和热两种因素相结合时的稳定性。

为此，用一指示菌接种琼脂(如前文“琼脂孔试验”所示)。瑞士乳芽胞杆菌(N2)被用作指示菌。

用2N HCl和/或2N NaOH将实验例2所述培养物上清液浓缩提取物之pH调至4-7，并于115°C保温20分钟。在其样品被置入琼脂孔试验孔中之前，再将提取物的pH调至6-7。

用在pH7所得的提取物平行地建立对照，在将对照样品置入琼脂孔试验孔之前先于37°C保温20分钟，以便将试验样品的抑制孔与对照的抑制孔进行比较。对照抑制孔的直径为27mm。

表XI

pH	保温时间(分)	保温温度(°C)	抑制孔 (mm)
4	20	115	27
7	20	115	27

上表所示结果表明，易变素的杀菌活性在pH4或7 并在伴随温度升高的条件下并不受损。

易变素的纯化

用能够产生本发明易变素的易变微球菌培养物接种4L BHI培养基。该标准培养物在需氧条件下于30°C摇育过夜，在此之后以5000g离心，以在加入了729 XAD-7树脂(Amberlite (R))的收集管中收集所得上清液。

将混合物在25°C搅拌30分钟，以便易变素分子易于粘附至树脂上，然后将其整个转移至多孔玻璃上，上清液在此以真空过滤。

用含20mM柠檬酸钠(pH4)和异丙醇的3种缓冲液相继洗涤树脂。第一种缓冲液含10%异丙醇；第二种缓冲液含15%异丙醇，第三种缓冲液含20%异丙醇。

将树脂转移至柱中，并用700ml含20mM柠檬酸钠(pH4)和25%异丙醇的缓冲液洗脱。用前述琼脂孔试验监测易变素的杀菌活性。

将活性级分混合，异丙醇蒸发。通过以20mM 柠檬酸钠缓冲液平衡来制备进行FPLC的5ml S-Resource 柱(Pharmacia)。将被蒸发的活性级分混合物上样至柱上，用100-400mM梯度的NaCl缓冲液洗脱柱成分。

收集级分，用琼脂孔试验核查已被如此纯化的易变素的杀菌活性。

易变素的测序

利用 Applied Biosystem 4774 自动测序仪对自菌株CNCM I-1586 和 CNCM I-1587纯化的易变素之N端部分测序。

结果显示了与如下所示序列SEQ ID NO:1之N端相同的5个氨基酸肽序列。测序过程中不可能证明多于5个氨基酸的肽存在。

此外，将自菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587中纯化的易变素用6N HCl 水解10分钟。得到了用常规方法经HPLC分离的三肽。测定已分离出的三肽之一是唯一的可能，因为其它的两个很可能有肽修饰。

以上述方法分离的所述肽序列与下文所示序列SEQ ID NO:1 之氨基酸19-22相同。

最后，将含有自菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587 分离的易变素之级分进行质谱分析，发现所述易变素分子量为2659道尔顿。

同源性

已证实了乳酸乳球菌乳酸素(Lacticin) 481 的序列与本发明易变素序列之间的同源性。该同源性具体地涉及到两种细菌素的N端部分之序列。因此，易变素N端序列的氨基酸1-5等同于下文所示乳酸素481之序列SEQ ID NO:8 的氨基酸3-7。不过，这仅仅是部分同源而非完全相同。

此外，被分泌的乳酸素481经质谱分析显示出分子量为2900道尔顿，而如我们前文所见，被分泌的易变素分子量为2659道尔顿。

当产生乳酸素481的乳酸乳球菌菌株在如上文抑菌谱试验中所述的易变素提取物存在条件下进行接种时，可见所述菌株的生长受抑。产生乳酸素481的乳酸乳球菌菌株对其自身的细菌素乳酸素481有免疫力，但对由本发明的任一种易变微球菌菌株产生的易变素都没有免疫力。以上述抑制谱试验所得的这些结果证实了两种细菌素是不同的。

上述的遗传学结果表明了乳酸素481与易变素显示出序列同源性，但其序列是不同的。生物化学以及微生物学结果也证明了乳酸素481和易变素是两种不同的细菌素。

易变素基因测序

用常规方法构建简并的核苷酸序列SEQ ID NO:4, 该序列如下文所列序列所示, 并且相应于前文已测序易变素肽的C端部分。然后通过T4多核苷酸激酶向SEQ ID NO:4序列的混合物提供放射活性。

以常规方法从菌株CNCM I-1586和CNCM I-1587制备染色体DNA。根据所用酶供应商的说明, 用Sal I、Sac I、SphI和BamHI消化所述DNA制备物。然后将2 μ g消化产物跑电泳。用250mM HCl洗电泳凝胶上的DNA, 然后在碱性介质中将迁移产物从胶上转移至“Zetaprobe”(Biorad)膜上。接下来将Zetaprobe膜于55 $^{\circ}$ C预杂交, 其温度每2小时降5 $^{\circ}$ C直至40 $^{\circ}$ C, 所用介质含6XSSC 1% SDS和0.25% 脱脂奶粉。该膜在前述杂交液中与显示序列SEQ ID NO:4的变性放射性探针于相同温度条件下杂交。然后置于40 $^{\circ}$ C保温4小时, 之后用6XSSC于40 $^{\circ}$ C漂洗膜。最后, 将其于-80 $^{\circ}$ C暴露于放射自显影膜16小时。

杂交结果显示了不同的迁移带: 7kb的SalI带, 1.4kb Sac I带; 1.8kb BamHI带和大于15kb的SphI带。

用BamHI消化菌株CNCM I-1586的5 μ g基因组DNA, 经琼脂糖凝胶层析并洗脱含所述片段的凝胶部分分离出1.6-2kb的片段。被洗脱的DNA片段与载体pK19(Gene, 56 (1987) 309-312)连接, 所述载体在进行连接之前已用BamHI消化, 然后用牛小肠磷酸酶处理(Boehringer Mannheim, part No. 713023)。

然后用连接反应介质以常规方法转化已呈感受态的E. coli BZ 234 (Biozentrum Collection-University of Basle, Switzerland)。在加入了50 μ g/ml 卡那霉素 60ng/ml IPTG (Boehringer Mannheim, part NO. 724815) 和300ng/ml X-gal (Boehringer Mannheim part NO. 651745) 并于37 $^{\circ}$ C培养16小时的琼脂培养基上鉴定含有插入片段的克隆。

白色菌落通常含有插入片段。将其挑出置入96孔微量滴定板中。每个白色菌落对应一个所述孔, 每个孔含150 μ l补充了50 μ g/ml卡那霉素的LB培养基, 在37 $^{\circ}$ C保温20小时, 以产生微量培养物。

制备两个方向相反的引物, 因为载体PK19中基因的方向是未知的。为此, 所述引物的构建是通过由显示部分编码乳酸素481的序列SEQ ID NO: 5的核苷酸片段将其组装, 该序列与PUC载体的通用探针中的两者之一相连, 所述探针具有序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:7。

每孔取1 μ l与100Pmol所述引物之一, ZmM dNTP各6 μ l和2.5 μ l Taq 缓冲液(P. H. Stehelin & Cie AG, Cat. No. TP05b) 混和, 再用一滴Dyna-Wax (Finnzymes Oy, 62201 Espoo, Finland)将整个封住, 加热至98 $^{\circ}$ C持续10分钟以裂解细菌, 然后进行PCR。

阳性克隆在电泳凝胶上产生一条800bp带。

以这种方法挑选阳性克隆, 并提取这些克隆的质粒DNA。利用测序试剂盒(Pharmacia Biotech, part NO. 27-1682-01)和通用引物, 继而再用以所得序列为基础的特异性引物经双脱氧核苷酸法测定克隆到载体pK19中的DNA片段。

这样就得到了下文所示的核苷酸序列SEQ ID NO:2。所述核苷酸序列编码序列SEQ ID NO:1, 后者相当于成熟之前的易变素氨基酸序列。

下面的实施例通过说明本发明细菌素的生产方法及其应用来进行描述。实施例中除非另外指明, 所给出的百分比都是重量百分比。

实施例1

BHI培养基被接种, 含易变微球菌菌株的培养物被加至其中。将其于30 $^{\circ}$ C在需氧条件下摇育过夜, 之后, 培养基达到10 8 菌体/ml。将如此所得的标准培养物离心。收集标准上清液。

实施例2

从如实施例1所述的750ml上清液中得到上清液浓缩物, 向其中加入15g XAD-7树脂(Am-berlite (R))。混合物于4 $^{\circ}$ C振摇60分钟, 然后通过No. 604 Schleicher & Schuell (Germany) 滤器过滤。用1%柠檬酸钠冲洗滤器, 以便洗脱所有非吸附蛋白。分离树脂, 并转移至含柠檬酸钠的收集管中, 摇动2分钟。树脂与柠檬酸钠一起转移至柱中, 以50%乙腈和0.1%TFA洗脱柠檬酸钠。将洗脱液蒸发, 残余物重悬于50mM磷酸盐缓冲液中(pH6.8)。

实施例3

在BHI培养基中, 于30 $^{\circ}$ C在需氧条件下摇育过夜, 产生10升易变微球菌培养物。然后将200g XAD-7树脂(Amberlite) 直接加入培养物中, 两者一起于4 $^{\circ}$ C缓和振摇1小时。然后将混合物通过No. 604 Schleicher & Schuell

(Germany) 滤器过滤。滞留于滤器上的树脂用10升50mM乙酸 (pH5.2) 溶液冲洗以除菌。之后, 将含100%乙醇和20mM乙酸铵的450ml溶液加到树脂上; 滤液被冻干以得到含本发明易变素的粉末, 它可用于食品工业。

利用上文描述的琼脂孔试验确定先经水稀释的易变素粉末的杀菌活性。该粉末具有至少 10^5 au/g粉末。

最后, 将上述粉末以0.5g/kg加入按传统方法正在制备的肉泡沫中。这样使得每克肉泡沫含50au细菌素, 这足以完全抑制病原菌的发育, 尤其是梭状芽胞杆菌。

实施例4

本实施例涉及用于护肤的保湿霜的制备, 它含有0.05g/kg的实施例3所述粉末, 这就是说所含能够抑制皮肤上不希望有的细菌发育, 尤其是金黄色葡萄球菌和化脓链球菌的易变素比例为5au/g。

为了制备所述乳剂, 将脂相A的成分混合, 并加热至75°C。制备水相B, 也加热至75°C; 在缓慢混合的同时再加入脂相A, 之后在缓慢混合的同时将其冷却至室温, 即大约25°C。在该温度下缓慢加入C成分完成配制。

脂相A

Peg-6硬脂酸酯, 甘油酸酯和peg-20-Cethyl 醚 (peg: 聚乙二醇)	15
液体石蜡	5
用0.1%苯基二氯化苄(抗氧化剂)和1%大豆磷脂 稳定化的麦胚油 (见EP94109355.1)	3
甜杏仁油	2
鲸蜡醇	1
异硬脂酸异硬脂基酯	2
肉豆蔻酸2-辛基十二烷基酯	1
羊毛脂蜡	1

水相B

甲基异噻唑啉	0.1
脱矿水	59.6
人胎盘蛋白	2

添加剂C

丙二醇和金盏花提取物	2
在脱矿水中50%可溶的骨胶原	5.8
香料	0.3
在脱矿水中2.5%相对于实施例3的细菌素粉末	0.2

实施例5

将实施例3所述细菌素粉末以0.5g/kg的比例加入漱口药中。该漱口药继而能够抑制病原菌，尤其是Streptococcus sobrinus、血链球菌、变异链球菌和粘性放线菌在颊腔中生长。

实施例6

将含有用水稀释为1%的实施例3细菌素粉末喷雾至意欲消毒的食品上，以防止包装过程中的后续污染。

序列表

(1) 一般信息

- (i) 申请人:
 - (A) 姓名: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
 - (B) 街道: AVENUE NESTLE 55
 - (C) 城市: VEVEY
 - (D) 州或省: CANTON DE VAUD
 - (E) 国家: SWITZERLAND
 - (F) 邮编: 1800
 - (G) 电话: (041) 21 924 34 20
 - (H) 电传: (041) 21 924 28 80
- (ii) 发明名称: 细菌素
- (iii) 序列数: 8
- (iv) 计算机的可读形式:
 - (A) 介质类型: 软盘
 - (B) 计算机: IBM PC 兼容
 - (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) 软件: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 25个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (vi) 来源:
 - (A) 生物体: 易变微球菌
 - (C) 个体分离物: 两个克隆, CNCM I-1586 和CNCM I-1587
- (xi) SEQ ID NO:1的序列描述

GCCACACCCA CTGAGAGGAC TAGAACA ATG ACG AAC GCA TTT CAG GCA CTG 111
 Met Thr Asn Ala Phe Gln Ala Leu
 -22 -20 -15

GAC GAA GTC ACG GAC GCC GAG CTC GAC GCC ATC CTT GGC GGG GGC AGT
 159
 Asp Glu Val Thr Asp Ala Glu Leu Asp Ala Ile Leu Gly Gly Gly Ser
 -10 -5 1

GGT GTT ATT CCC ACG ATC AGC CAC GAG TGC CAC ATG AAC TCC TTC CAG
 207
 Gly Val Ile Pro Thr Ile Ser His Glu Cys His Met Asn Ser Phe Gln
 5 10 15

TTC GTG TTC ACC TGC TGC TCC TGAGAACTC CTCCGATGCT CAGAGGGCCG 258
 Phe Val Phe Thr Cys Cys Ser
 20 25

CGCTAGGAAA ATCTAGTAAG 278

(2) SEQ ID NO: 3的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 47个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

Met Thr Asn Ala Phe Gln Ala Leu Asp Glu Val Thr Asp Ala Glu Leu
 -22 -20 -15 -10

Asp Ala Ile Leu Gly Gly Gly Ser Gly Val Ile Pro Thr Ile Ser His
-5 1 5 10

Glu Cys His Met Asn Ser Phe Gln Phe Val Phe Thr Cys Cys Ser
15 20 25

(2) SEQ ID NO: 4的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= "寡核苷酸"

(iii) 假设序列: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

TGGCARTTYG TMTTYACNTG YTG

23

(2) SEQ ID NO: 5的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 44bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= "寡核苷酸"

(iii) 假设序列: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

(2) SEQ ID NO: 6的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设序列: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

ATAACAATTT CACACAGG

18

(2) SEQ ID NO: 7的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设序列: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

GGTTTTCCCA GTCACGAC

18

(2) SEQ ID NO: 8的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7个氨基酸

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

Lys Gly Gly Ser Gly Val Ile

1

5