

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963093 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **963093**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 14/305
C07K 14/30 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.08.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.08.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **08.02.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

07.08.1995 EP 95810497

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Société des Produits Nestlé S.A., 1800 Vevey, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Mollet, Beat, Mollie-Margot, SVEITSI, (CH)
2 • Peel, John, Switzerland, SVEITSI, (CH)
3 • Pridmore, David, Switzerland, SVEITSI, (CH)
4 • Rekhif, Nadji, Switzerland, SVEITSI, (CH)
5 • Suri, Bruno, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarekatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Bakteriosiini

Bacteriocin

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

1586 CNCM

1587 CNCM

Bakteriosiini. - Bacteriocin.

Esillä olevan keksinnön kohteena on bakteriosiini, tätä bakteriosiinia tuottava kanta, tämän bakteriosiinin valmistusmenetelmä ja tämän bakteriosiinin ja/tai tätä bakteriosiinia tuottavan kannan käyttö elintarvikkeiden ja kosmeettisten aineiden valmistuksessa.

10 Bakteriosiineja on eristetty lukuisista gram-positiivisista ja gram-negatiivisista bakteereista. Bakteriosiinit ovat molekyylejä, jotka ovat luonteeltaan oleellisesti proteiineja ja joilla on bakterisidinen vaikutus. Bakteriosiini saa tästä syystä aikaan antagonistisen reaktion sitä tuottavan bakteerin ja yhden tai useamman eri bakteerilajin välillä.

15 Bakteriosiinin inhibitiospektri on lisäksi usein rajoittunut lajeihin, jotka ovat läheistä sukua sitä tuottaville bakteerilajeille.

Bakteriosiineja on erityisesti osoitettu maitohappobakteereista. Esimerkiksi patenttijulkaisussa EP 0643136 (Société des Produits Nestlé) on kuvattu kahden bakteriosiinin tunnistaminen Streptococcus thermophilus-bakteerista. Eräs bakteriosiini on samoin eristetty Lactococcus lactis-bakteerista (App. and Env. Microbio. 58, 279-284, 1992; J. of Bio. Chem. 268, 16361-16368, 1993).

Tähän mennessä ei kuitenkaan tunneta mitään Micrococcus varians-bakteerista peräisin olevaa bakteriosiinia. Micrococcus variansia käytetään nykyään paljon elintarvikkealalla, erityisesti esimerkiksi salamin ja makkaroiden tapaisten herkkutuotteiden valmistusta varten. Sen vuoksi olisi erittäin hyödyllistä, jos käytettävissä olisi bakteriosiinia tuottava kanta, jolla voitaisiin torjua patogeenisia aineita.

35 Esillä olevan keksinnön tavoitteena on täyttää tämä tarve.

Esillä olevan keksinnön mukainen bakteriosiini on siten Micrococcus variansista saatu bakteriosiini, jolla on SEQ ID NO:1:ssa annettu aminohapposekvenssi tai mikä tahansa aminohapposekvenssi, joka eroaa SEQ ID NO:1:n sekvenssistä 1 - 4 aminohapon suuruisen substituution, deleetion ja/tai inser-

5 tion verran.

Esillä oleva keksintö käsittää myös minkä tahansa bakteriosiinia koodaavan nukleotidifragmentin, erityisesti nuk-

10 leotidifragmentin, jolla on sekvenssi SEQ ID NO:2.

Esillä olevan keksinnön mukainen kanta on samoin Micrococcus varians-kanta, joka tuottaa tätä bakteriosiinia, erityisesti Micrococcus varians-kannat CNCM I-1586 ja CNCM

15 I-1587.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa bakteriosiinin valmistusmenetelmässä viljellään Micrococcus varians-kantaa, joka tuottaa bakteriosiinia, erityisesti kantaa CNCM I-1586 tai

20 kantaa CNCM I-1587, alustassa ja olosuhteissa, jotka suosivat kasvua niin, että saatu viljelyalusta sisältää 10^7 - 10^{11} tämän kannan organismia ml:ssa, minkä jälkeen saatu viljelämä sentrifugoidaan ja valmistetaan bakteriosiinia sisältävä supernatanttiuute.

Keksinnön mukaisessa Micrococcus varians-bakteriosiinin käytössä elintarvikkeiden ja kosmeettisten aineiden valmistamiseen käytetään sen nukleotidisekvenssiä, sekä sen signaalisekvenssiä, ja bakteriosiinin sisältävää supernatantti-

25 uutetta sekä bakteriosiinia tuottavaa Micrococcus varians-kantaa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesta bakteriosiinista käytetään seuraavassa nimitystä "variasiini".

35

Esillä olevan keksinnön puitteissa määrittelemämme yksikkö (au) on käänteisarvo suurimmasta laimennuksesta, jossa

näytteellä yhä on bakterisidinen vaikutus testissä, jonka alan ammattimiehet tuntevat "agarkaivotestinä".

Esillä olevan keksinnön puitteissa nimityksellä "fragmentti" tai "DNA-fragmentti" tarkoitetaan yksisäikeistä tai kaksisäikeistä DNA-fragmenttia, joka osittain tai kokonaan koodaa ja joka voidaan syntetisoida, replikoida in vitro esimerkiksi tunnetulla polymeraasiketjureaktiolla tai replikoida in vivo esimerkiksi Escherichia coli-tyyppisessä bakteerissa.

Esillä olevan keksinnön puitteissa "homologisella fragmentilla" tarkoitetaan mitä tahansa fragmenttia, joka eroaa keksinnön mukaisista fragmenteista vain pienen emäsmäärän suuruisella substituutiolla, deleetiolla tai insertiolla. Tässä yhteydessä homologisena pidetään erityisesti kahta DNA-fragmenttia, jotka geneettisen koodin degeneratiivisuuden vuoksi koodaavat yhtä ja samaa polypeptidiä. Tätä fragmenttia pidetään myös homologisena fragmenttina, kun sillä on yli 80-prosenttinen homologia keksinnön mukaisen fragmentin kanssa. Tässä jälkimmäisessä tapauksessa homologia määritellään homologisen fragmentin emästen lukumäärän ja esillä olevan keksinnön mukaisen fragmentin emästen lukumäärän väliseksi suhteeksi.

Esillä olevan keksinnön puitteissa "hybridisoituvalle fragmentilla" tarkoitetaan mitä tahansa fragmenttia, joka kykenee hybridisoitumaan esillä olevan keksinnön mukaisten fragmenttien kanssa Southern blot-menetelmässä (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989, kappale 9.31 - 9.58). Hybridisointi suoritetaan mieluummin tarkkaan määritellyissä tai stringenteissa olosuhteissa niin, että vältetään epäspesifisiltä hybridisoitumisilta tai hybridisoitumisilta, jotka ovat suhteellisen epästabiileja.

Proteiinitekijä, tässä tapauksessa bakteriosiini, jolla on

voimakas bakterisidinen vaikutus, on eristetty kannosita CNCM I-1586 ja CNCM I-1587. Tälle bakteriosiinille, joka on saatu Micrococcus variansista ja jolla siten on aminohap-
posekvenssi SEQ ID NO:1, joka on kuvattu jäljempänä annetussa
5 sa sekvenssilistauksessa, on annettu nimeksi variasiini.

Variasiiniin kohdistuvan mielenkiinnon vuoksi keksinnön kohteena on myös mikä tahansa bakteriosiini, jolla on aminohap-
posekvenssi, joka eroaa sekvenssistä SEQ ID NO:1 1 - 4
10 aminohapon suuruisen substituution, deleetion ja/tai inser-
tion verran. Tällä bakteriosiinilla, jonka aminohapposek-
venssi eroaa sekvenssistä SEQ ID NO:1 1 - 4 aminohapon
suuruisen yhden substituution, deleetion ja/tai inser-
tion verran, voi olla jonkin bakteerisuvun tai bakteerilajien
15 suhteen laajempi inhibitiospektri kuin esimerkiksi tällä
variasiinilla.

Lisäksi on ollut mahdollista valita näistä kahdesta kannasta CNCM I-1586 ja CNCM I-1587 kromosomaalinen nukleotidifrag-
20 mentti, joka koodaa keksinnön mukaista varianssia. Tällä
fragmentilla on jäljempänä annetussa sekvenssilistauksessa
esitetty sekvenssi SEQ ID NO:2.

Esillä olevaan keksintöön kohdistuvan mielenkiinnon vuoksi
25 keksinnön kohteena on myös mikä tahansa nukleotidifragmen-
ti, joka koodaa esillä olevan keksinnön mukaista variasiini-
nia, erityisesti nukleotidifragmentit, jotka ovat homologi-
sia sekvenssin SEQ ID NO:2 kanssa tai hybridisoituvat sen
kanssa.

30 Keksinnön kohteena ovat erityisesti sekvenssin SEQ ID NO:2
nukleotidit 88 - 153, jotka koodaavat variasiinin signaali-
peptidiä, sekvenssin SEQ ID NO:2 nukleotidit 154 - 228,
jotka koodaavat esillä olevan keksinnön mukaista eritettyä
35 variasiinia, ja/tai sekvenssin SEQ ID NO:2 nukleotidit 88 -
228, jotka koodaavat signaali-peptidiinsä fuusioitua bakte-
riosiinia.

Erittyynyttä variasiinia koodaavaa fragmenttia voidaan edullisesti käyttää ekspressoimaan esillä olevan keksinnön mukainen variasiini jossakin muussa kasvissa tai mikro-organismissa kuin Micrococcus varians. Tätä tarkoitusta varten voidaan sekvenssin SEQ ID NO:2 nukleotidit 154 – 228 kloonata ekspressoointivektoriin myötävirtaan promoottorista tai signaalisekvenssistä ja ylävirtaan terminaattorista ottamalla asianmukaisesti lukukehys huomioon. Vektori voidaan sen jälkeen viedä kasviin, bakteeriin tai hiivaan ja lisätä näin niiden inhibitiospektriä esimerkiksi tiettyjä bakteereita vastaan.

Keksinnön mukaista signaalisekvenssiä voidaan käyttää hyödyksi fuusioimalla sekvenssin ID NO:2 nukleotidit 88 – 153 mielenkiinnon kohteena olevaan geeniin samalla ottamalla asianmukaisesti huomioon lukukehys. Sen jälkeen tämä voidaan kokonaisuudessaan kloonata Micrococcus variansin ekspressoointivektoriin niin, että mielenkiinnon kohteena olevan geenin koodaama proteiini voidaan ekspressoida ja erittää esimerkiksi Micrococcus variansissa.

Sekvenssin SEQ ID NO:2 nukleotidit 88 – 228 voidaan kloonata Micrococcus variansin ekspressoointivektoriin ja viedä toiseen Micrococcus varians-kantaan niin, että tämä jälkimmäinen kanta tuottaa esillä olevan keksinnön mukaista variasiinia.

Esillä olevan keksinnön kohteena on lisäksi Micrococcus varians-kanta, joka sisältää genomiinsa integroituna tai ekspressoointivektorin kautta keksinnön mukaista variasiinia koodaavan DNA-fragmentin. Esillä olevan keksinnön kohteena ovat erityisesti Micrococcus varians-kannat, jotka on tallennettu Budapestin sopimuksen mukaisesti 7.6.1995 Collection National de Cultures de Microorganismes-kokoelmaan, [National collection of microorganism cultures], INSTITUT PASTEUR, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Ranska, tallennusnumeroilla CNCM I-1586 ja CNCM I-1587.

Micrococcus varians-bakteerit ovat gram-positiivisia, kata-laasi-positiivisia, aerobisia bakteereita, jotka ovat pysyvästi liikuntakyvyttömiä. Ne ovat muodoltaan pallomaisia, ja ne esiintyvät epäsäännöllisesti järjestäytyneinä neljän

5 ryhminä.

Micrococcus varians-pesäkkeet ovat väriltään keltaisia BHI-alustalla. Näiden kantojen optimaalinen kasvulämpötila on 25 - 37°C. Esillä olevan keksinnön kohteena olevat kannat CNCM I-1586 ja CNCM I-1587 metaboloivat sekä glukoosia että

10 fruktoosia. CNCM I-1587-kanta metaboloii lisäksi sakkaroosia ja furanoosia.

Kannassa CNCM I-1586 on lisäksi kaksi plasmidia, joiden koot ovat 4 ja 12 kb, kun taas kannassa CNCM I-1587 on vain yksi ainoa, 7 kb suuruinen plasmidi.

15

Kantojen CNCM I-1586 ja CNCM I-1587 viljelysuperenatanteilla on suhteellisen laaja inhibitiospektri muiden bakteereiden kasvun suhteen. Seuraavassa on esimerkkejä niistä bakteereista, jotka ovat herkkiä näille supernatanteille:

20 Lactococcus lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis, Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake, Lactobacillus

25 curvatus, Leuconostoc carnosum, Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides, Streptococcus thermophilus, Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis subsp. faecalis ja seuraavien bakteereiden itiöt ja vegetatiiviset solut: Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus polymyxa,

30 Bacillus circulans, Bacillus pumilus ja Bacillus liqueniformis, ja Clostridia.

Menetelmässä, jolla variasiinia valmistetaan, tätä bakteriosiinia tuottavaa Micrococcus varians-kantaa viljellään

35 mieluummin alustassa ja olosuhteissa, jotka ovat kasvulle suotuisia niin, että saadaan kasvatusliuos, joka sisältää tätä kantaa 10^7 - 10^{11} organismia ml:ssa, minkä jälkeen saatu

viljelmä sentrifugoidaan ja valmistetaan tätä bakteriosiinia sisältävä supernatanttiuute.

Tämän uutteen valmistamista varten voidaan esillä olevan
 5 keksinnön mukaista Micrococcus varians-kantaa, joka tuottaa variasiinia, erityisesti kantaa CNCM I-1586 tai kantaa CNCM I-1587, viljellä alustassa ja olosuhteissa, jotka ovat suotuisia Micrococcus variansin kasvuille. Tätä tarkoitusta varten viljely voi tapahtua erityisesti BHI-alustassa 25 -
 10 37°C:ssa aerobisissa olosuhteissa ravistellen, kunnes organismin konsentraatioksi saadaan esimerkiksi 10^7 - 10^{11} organismia liuoksen ml kohti. Näin saatua standardiviljelmää sentrifugoidaan 4000 - 6000 g:ssa ja otetaan talteen tätä bakteriosiinia sisältävä supernatanttiuute.

15 Esillä olevan keksinnön kohteena on myös variasiinin, erityisesti uutemuodossa olevan variasiinin, käyttö tai tätä bakteriosiinia tuottavan Micrococcus varians-kannan käyttö elintarvikkeiden ja kosmeettisten aineiden valmistamiseen.

20 Jonkin edellä olevan keksinnön mukaisen Micrococcus varians-kannan viljelmää voidaan erityisesti käyttää lihan fermentoimiseen salamin valmistamiseksi niin, että voidaan esimerkiksi torjua Clostridian aiheuttama kontaminaatio.

25 Variasiinia, joko raakauutteena tai puhdistetussa muodossa, kun sitä lisätään siirrosteeseen, joka saadaan käyttämällä variasiinille resistenttejä bakteereja, voidaan käyttää juustojen valmistuksessa, erityisesti mozzarella-tyyppisten
 30 juustojen valmistuksessa estämään Bacillus polymixan, jonka itiöt kestävät fermentaation, tuottamia reikiä, ja vacherin-tyyppisten juustojen valmistuksessa torjumaan Listeria monocytogenesien aiheuttama kontaminaatio.

35 Variasiinia, erityisesti puhdistamattomana uutteenä tai puhdistetussa muodossa, tai jompaa kumpaa kantaa voidaan käyttää lisäaineena tai aineena, joka on aktiivinen pato-

geenisia bakteereita vastaan mousse-jälkiruokien, kuten pastöroitujen vanukkaiden valmistuksessa torjumaan sellais-
ten bakteerikantojen kuin Clostridia ja Bacillus cereuksen
itiöitä tai sellaisia bakteerikantoja kuin Listeria.

5

Variasiinia, joko puhdistamattomana uutteenä tai puhdiste-
tussa muodossa, tai jompaa kumpaa kantaa voidaan lisäksi
käyttää lisäaineena tai aineena, joka on aktiivinen pato-
geenisia bakteereita vastaan kosmeettisten aineiden, kuten
10 kosteusvoiteiden tai deodoranttien valmistuksessa torjumaan
ihon patogeenisia bakteereita.

Esillä olevan keksinnön mukainen variasiini on jäljempänä
karakterisoitu yksityiskohtaisemmin erilaisten mikrobiolo-
15 gisten, biokemiallisten ja geneettisten tunnusmerkkien
avulla, jotka kuvaavat sen ominaisuuksia. Annetut prosentti-
määrät on laskettu painosta.

Antibakteriaalisen aktiivisuuden yksikkö - "agarakaivotesti"
20

Esillä olevan keksinnön puitteissa bakterisidinen aktiivi-
suus on annettu itse määriteltynä yksikköinä.

Esillä olevan keksinnön mukaisen Micrococcus varians-stan-
25 dardiviljelmän supernatantin, joka valmistetaan esimerkiksi
esimerkissä 1 kuvatuissa olosuhteissa, aktiivisuus on tyy-
pillisesti 640 au/ml. Tämän supernatantin konsentraatin,
joka valmistetaan esimerkiksi esimerkissä 2 kuvatuissa
olosuhteissa, aktiivisuus on samoin tyypillisesti noin
30 24000 au/ml.

Mainitun agarkaivotestin avulla määritetään, onko näytteellä
yhä bakterisidinen aktiivisuus tietyssä laimennuksessa.

35 Tämä tehdään niin, että 15 ml MRS-agaralustaa, joka sisältää
indikaattorikantaa 10^{-5} - 10^6 CFU/ml konsentraatiossa, siir-
rostetaan petrimaljaa. Indikaattorikantana käytetään kantaa,

joka on herkkä variasiinille, tässä tapauksessa Lactobacillus bulgaricus (YL 5)-kantaa tai Lactobacillus helveticus (N2)-kantaa.

- 5 Kasvatusalustaan porataan halkaisijaltaan 5 mm reikiä. Näihin kaadetaan 50 µl reikää kohti näytteitä testattavista supernatantista tai supernatantin konsentraatista. Maljaa inkuboidaan 2 tuntia 4°C:ssa ja sen jälkeen yön yli 30°C:ssa tai 37°C:ssa riippuen käytetystä indikaattorikannasta.
- 10 Inkuboinnin jälkeen indikaattorikanta on kasvanut ja estorenkaat ovat tulleet näkyviin. Laimennus, jossa näytteellä ei ole enää bakterisidistä aktiivisuutta, on se laimennusarvo, josta lähtien estorengasta ei enää voi havaita.

15 Entsyymien aiheuttama inaktivaatio

- Tätä agarkaivotestiä käytetään määrittämään, onko variasiini, joka on eristetty esillä olevan keksinnön mukaisesti, inaktivoitunut proteolyyttisen entsyymin tai katalaasin läsnäollessa.
- 20

- Tämä tehdään niin, että esimerkissä 2 kuvatun viljelysupernatantin konsentraattiin lisätään entsyymiä 5 mg/ml. Entsyymien annetaan vaikuttaa inkubointilämpötilassa 60 minuuttia, ennen kuin näyte laitetaan agarkaivotestin kaivoon.
- 25

- Rinnalla valmistetaan kontrolli käyttämällä samaa konsentraattia pH-arvossa 7 ja entsyymiä lisäämättä. Tätä kontrollinäytettä inkuboidaan 37°C:ssa 60 minuuttia, ennen kuin se laitetaan agarkaivotestin kaivoon. Tämän tarkoituksena on verrata entsyymin läsnäollessa saatuja estorenkaita kontrollin estorenkaiden kanssa. Kontrollin inhibitiorenkaiden halkaisija on 27 mm.
- 30

- Seuraavassa taulukossa I on annettu tulokset, jotka on saatu entsyymeillä, jotka testattiin käyttämällä indikaattorikantana Lactobacillus helveticusta (N 2). Tässä tapauksessa,
- 35

kuten myös taulukossa II, entsyymille on annettu sen tyyppi, tuottajan nimi ja tuottajan kataloginnumero. Numero 0 osoittaa, että rengasta ei ole enää lainkaan, so. variasiinin bakterisidinen aktiivisuus on tuhoutunut inkuboitessa sitä entsyymin kanssa. Numero 27 osoittaa, että renkaan koko on yhä 27 mm, mikä vastaa variasiinin täydellistä bakterisidista aktiivisuutta.

Taulukko I

10

Entsyymit	Inkubointilämpötila (°C)	Inaktivaatio (mm)
Katalaasi (SIGMA C-10)	30	27
15 Pronaasi E (SIGMA P-8038)	37	0
Proteinaasi K (MERCK 1000 144)	37	0
Fisiini (SIGMA F-3266)	37	0

20 Seuraavassa taulukossa II on annettu tulokset, jotka saatiin entsyymeillä, jotka testattiin käyttämällä indikaattorikantaa Lactobacillus bulgaricus (YL 5).

Taulukko II

25

Entsyymit	Inkubointilämpötila (°C)	Inaktivaatio (mm)
Katalaasi (SIGMA C-10)	30	27
Pronaasi E (SIGMA P-8038)	37	0
30 Proteinaasi K (MERCK 1000 144)	37	0
Fisiini (SIGMA F-3266)	37	0

35 Taulukoissa I ja II annetut tulokset osoittavat, että kaikki proteolyyttiset entsyymit estivät variasiinin bakterisidisen aktiivisuuden. Nämä tulokset kertovat, että variasiini on luonteeltaan proteiini, että tämä proteiiniosa ottaa osaa bakterisidiseen aktiivisuuteen.

Se, että katalaasin ei havaittu lainkaan vaikuttavan variasiinin bakterisidiseen aktiivisuuteen, osoittaa myös sen, että näiden kahden indikaattorikannan kasvun estyminen ei johdu vetyperoksidin, jolla tiedetään olevan samanlainen
 5 aktiivisuus kuin bakteriosiineilla, antibakteerisesta aktiivisuudesta, koska katalaasi olisi hajottanut H_2O_2 :n.

Variasiinia sisältävän viljelysupernatantin inhibitiospektri

10 Agarkaivotestin avulla määritetään, onko esillä olevan keksinnön mukaista variasiinia sisältävän viljelysupernatantin bakterisidisessä aktiivisuudessa aktiivisuutta, joka estää eri kantojen itiöiden ja bakteereiden kasvua. Supernatantin inhibitiospektri voidaan määrittää tällä tavalla.

15 Nämä määritykset tehdään siten, että 15 ml standardialustaa, joka on siirrostettu 15 μ l:lla testattavan kannan viljelmää, joka oli valmistettu edellisen yön aikana, kaadetaan petri-
 maljoille niin, että bakteereiden konsentraatioksi saadaan
 20 $10^5 - 10^6$ standardialustan ml kohti. Standardialusta on alusta, joka on suotuista testattavan kannan kasvulle.

Kun testattava kanta on kasvatettava itiöistä, siirrostetaan lisäksi $10^5 - 10^6$ itiötä alusta-ml kohti.

25 Jokaiseen petrimaljaan porataan halkaisijaan 5 mm reikä. Tähän laitetaan esimerkissä 1 kuvatus viljelysupernatantista 50 μ l suuruinen näyte. Maljoja esi-inkuboidaan 2 tuntia $4^\circ C$:ssa ja sen jälkeen niitä inkuboidaan lämpötilassa, joka suosii testattavan kannan kasvua, aika, joka tarvitaan siihen, että kanta peittää maljan näkyvällä bakteerimattolla.

35 Inhibitiovaikutus tai sen suuruus karakterisoidaan havaitun estorenkään halkaisijan avulla. Inhibitiota pidetään erittäin voimakkaan (++++) , jos renkaan halkaisija on 18 - 28 mm, voimakkaana (+++), jos halkaisija on 10 - 17 mm,

keskimääräisenä (++) , jos halkaisija on 5 - 9 mm, heikkona (+), jos halkaisija on 1 - 4 mm, ja nollana (-), jos mitään rengasta ei havaita.

- 5 Tällä tavoin testataan 32 eri lajien ja alalajien maitohappobakteerikantaa. Minkään näistä ei havaittu olevan resistentti supernatantille. Näiden kokeiden yksityiskohtaiset tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa III. Tässä taulukossa III, kuten seuraavissakin taulukoissa, annettu kannan nimi tai numero on se numero, joka on sille annettu Nestlé'n kokoelmassa (osoite: NESTEC S.A., Centre de Recherche, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Sveitsi). Annettu lämpötila tarkoittaa inkubointilämpötilaa testin aikana. Annettu alusta on standardialusta, joka on suotuisa testattavan kannan kasvuille.

Taulukko III

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Lactococcus lactis</i>	SL2	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus helveticus</i>	N 2	37	MRS	+++
	N 258	37	MRS	+++
	N 262	37	MRS	+++
	N 271	37	MRS	+++
	LBL 4	37	MRS	++++
<i>Lactobacillus debrueckii</i> <i>subsp. lactis</i>	N 9	37	MRS	++
	N 62	37	MRS	++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	LFi 1	37	MRS	+++
	LFi 5	37	MRS	+++
	YL 5	37	MRS	+++
	YL 18	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. delbrueckii</i>	N 8	37	MRS	+++
	N 187	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La 3	37	MRS	+++
	La 10	37	MRS	++
	La 27	37	MRS	++
	La 28	37	MRS	--

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	LA 1	30	MRS	++
<i>Lactobacillus plantarum</i>	60	30	MRS	+
	3.4 RP	30	MRS	+
<i>Lactobacillus sake</i>	LSK	30	MRS	+
<i>Lactobacillus curvatus</i>	18	30	MRS	++
<i>Leuconostoc carnosum</i>	LCA 3	37	M 17	++++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>	A 74	30	MRS	+
	B 50	30	MRS	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SFi 13	37	Elliber	++
	SFi 16	37	Elliber	++
	SFi 21	37	Elliber	++
	SFi 25	37	Elliber	++
	ST 11	37	Elliber	++
	ST 1	37	Elliber	++

20 Tästä taulukosta III voidaan nähdä, että supernatantin inhibitiospektri on siinä mielessä leveä, että inhibitioaste on suurin piirtein samalla tasolla testatuilla eri lajeilla.

25 Keksinnön mukaista variasiinia tuottavan viljelmän supernatantin inhibitiospektriä pidetään leveänä myös siinä mielessä, että se ei rajoitu maitohappobakteerilajeihin, vaan ulottuu myös muihin gram-positiivisiin bakteerilajeihin, erityisesti Listeria innocuaan, Listeria welhiaan, Listeria monocytogenekseen, jotka ovat ei-toivottuja tai patogeenisia bakteereita, sekä basillien itiöihin, esimerkiksi kuten käy 30 ilmi seuraavassa taulukossa IV esitetyistä tuloksista.

Taulukko IV

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>subsp. faecalis</i>	J	37	Elliber	++
<i>Enterococcus faecium</i>	D 325	37	Elliber	++
	MB 26	37	Elliber	++
<i>Listeria innocua</i>	7	30	BHI	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	FSM 122	30	BHI	++++
<i>Listeria welhia</i>	2	30	BHI	++
<i>Bacillus subtilis</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	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	-
<i>Bacillus cereus</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	C 1	30	BHI	++
	C 2	30	BHI	++
	C 5	30	BHI	++
	C 6	30	BHI	++
	79	30	BHI	++++
	C 15	30	BHI	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	226	30	BHI	++++
<i>Bacillus polymyxa</i>	252	30	BHI	++++
<i>Bacillus liqueniformis</i>	64	30	BHI	++++
<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	10	30	BHI	-
<i>Bacillus circulans</i>	215	30	BHI	++++
<i>Bacillus pumilus</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	B 1	30	BHI	++
	B 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Clostridium botulinum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	100003	45	DRMC	++
	100006	45	DRMC	++
	100019	45	DRMC	++
	100023	45	DRMC	++
<i>Clostridium butyricum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	102001	45	DRMC	++
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	107002	45	DRMC	+
	103001	45	DRMC	+
<i>Clostridium sporogenes</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	104001	45	DRMC	+
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	106001	45	DRMC	+
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	105001	45	DRMC	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	30	BHI	+
	15	30	BHI	+
	44	30	BHI	+
	60	30	BHI	++
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	30	BHI	+
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	30	BHI	+
<i>Staphylococcus carnosus</i>	1	30	BHI	++
	14	30	BHI	++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	30	BHI	+
	15	30	BHI	+
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	30	BHI	+
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3	30	BHI	+

Tässä taulukossa IV esitettyjen tulosten perusteella on mm. mahdollista ennustaa, että tällä supernatantilla tai puhdistetulla variasiinilla on houkuttelevia käyttötapoja lisäaineena elintarvikkeiden valmistuksessa aineena, joka on aktiivinen patogeenisia bakteereita vastaan, erityisesti Clostridioita vastaan lihatuotteissa, Listeria monocytogenesta vastaan juustoissa, Bacillus cereusta ja Listeriaa vastaan mousse-jälkiruoissa tai basilleja vastaan tuoreissa pastoissa tai kastikkeissa, joista edellä mainitut kannat ovat esimerkiksi nimenomaan peräisin.

Variasiinilla ei ole mitään inhiboivaa vaikutusta gram-negatiivisten bakteereiden kasvuun, kuten voidaan havaita seuraavassa taulukossa V annetuista tuloksista.

Taulukko V

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>E. coli</i>	1	30	BHI	-
<i>Enterobacter chloacae</i>	72	30	BHI	-
<i>Salmonella anatum</i>	XIV/20	30	BHI	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	XIV/274	30	BHI	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	30	BHI	-

25. Variasiinia sisältävän supernatantin konsentraatin inhibi-tiospektri

Toimintatapa on sama kuin edellä kuvattu paitsi, että eri kantojen itiöiden ja bakteereiden kasvuun kohdistuva inhibi-tiovaikutus määritetään supernatantin konsentraatilla, joka on saatu esimerkissä 2 kuvatulla tavalla.

Testatut lajit ja alalajit ovat samoja kuin aikaisemmin. Näiden testien tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa VI, VII ja VIII. Annettu kannan nimi tai kannan numero on se numero, joka sille on annettu Nestlé'n kokoelmassa (osoite: NESTEC S.A., Centre de Recherche, Vers-chez-les-Blanc,

CH-1000 Lausanne 26, Sveitsi). Annettu lämpötila on inkubointilämpötila testin aikana. Annettu alusta on standardialusta, joka on suotuista testattavan kannan kasvulle.

5 Taulukko VI

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Lactococcus lactis</i>	SL2	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus helveticus</i>	N 2	37	MRS	++++
	N 258	37	MRS	++++
	N 262	37	MRS	++++
	N 271	37	MRS	++++
	LBL 4	37	MRS	++++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LFi 1	37	MRS	++++
	LFi 5	37	MRS	++++
	YL 5	37	MRS	++++
	YL 18	37	MRS	++++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	N 9	37	MRS	+++
	N 62	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	N 8	37	MRS	++++
	N 187	37	MRS	++++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La 3	37	MRS	++++
	La 10	37	MRS	++++
	La 27	37	MRS	+++
	La 28	37	MRS	+++
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	LA 1	30	MRS	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i>	60	30	MRS	++
	3.4 RP	30	MRS	++
<i>Lactobacillus sake</i>	LSK	30	MRS	+++
<i>Lactobacillus curvatus</i>	18	30	MRS	+++
<i>Leuconostoc carnosus</i>	LCA 3	37	M 17	++++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	A 74	30	MRS	++
	B 50	30	MRS	++

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SFi 13	37	Elliber	+++
	SFi 16	37	Elliber	+++
	SFi 21	37	Elliber	+++
	SFi 25	37	Elliber	+++
	ST 1	37	Elliber	+++
	ST 11	37	Elliber	+++

Taulukko VII

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	J	37	Elliber	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	D 325	37	Elliber	+++
	MB 26	37	Elliber	+++
<i>Listeria inaequalis</i>	7	30	BHI	++++
<i>Listeria monocytogenes</i>	FSM 122	30	BHI	++++
<i>Listeria welshii</i>	2	30	BHI	++++
<i>Bacillus subtilis</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	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	-
<i>Bacillus cereus</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	C 1	30	BHI	++
	C 2	30	BHI	++
	C 5	30	BHI	++
	C 6	30	BHI	++
	79	30	BHI	++++
	C 15	30	BHI	+

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	226	30	BHI	++++
<i>Bacillus polymyxa</i>	252	30	BHI	++++
<i>Bacillus liqueniformis</i>	64	30	BHI	++++
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	10	30	BHI	-
<i>Bacillus circulans</i>	215	30	BHI	++++
<i>Bacillus pumilus</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	B 1	30	BHI	++
	B 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++
<i>Clostridium butyricum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	102001	45	DRMC	+++
<i>Clostridium perfringens</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	103001	45	DRMC	++
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	107002	45	DRMC	++
<i>Clostridium sporogenes</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	104001	45	DRMC	++
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	106001	45	DRMC	++
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	105001	45	DRMC	++
<i>Clostridia botulinum</i> (itiöt ja vegetatiiviset solut)	100003	45	DRMC	+++
	100006	45	DRMC	+++
	100019	45	DRMC	+++
	100023	45	DRMC	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	30	BHI	++
	15	30	BHI	++
	44	30	BHI	+
	60	30	BHI	+++
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	30	BHI	+
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	30	BHI	+
<i>Staphylococcus carnosus</i>	1	30	BHI	+++
	14	30	BHI	+++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	30	BHI	++
	15	30	BHI	++
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	30	BHI	++
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3	30	BHI	++

Taulukko VIII

Laji	No.	T (°C)	Alusta	Inhibitio
<i>E. coli</i>	1	30	BHI	-
<i>Enterobacter chloacae</i>	72	30	BHI	-
<i>Salmonella anatum</i>	XIV/20	30	BHI	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	XIV/274	30	BHI	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	30	BHI	-

10

Taulukoissa VI, VII ja VIII annetut tulokset osoittavat, että supernatanttiin verrattuna supernatantin konsentraatti estää tehokkaammin monien testattujen kantojen kasvua. Inhibitiospektrit ovat samoille lajeille ja alalajeille, mutta inhibition taso on korkeampi.

15

Tämä viittaa siihen, että variasiini voidaan valmistaa esimerkissä 2 kuvatulla tavalla ja että sitä voidaan käyttää patogeenisten bakteereiden torjumiseen valmistettaessa esimerkiksi elintarvikkeita ja kosmeettisia aineita.

20

pH:n kestokyky

Agarkaivotestillä määritetään, riippuuko esillä olevan keksinnön mukaisesti eristetyn variasiinin teho pH-arvosta.

25

Tätä tarkoitusta varten agar siirrostetaan indikaattorikanalla aikaisemmin kohdassa "agarkaivotesti" kuvatulla tavalla. Käytetty indikaattorikanta on Lactobacillus helveticus (N 2).

30

Esimerkissä 2 kuvatun viljelysupernatantin konsentraatin pH säädetään pH-arvoon 2 - 10 2N NaOH:lla ja/tai 2N HCl:lla, uutetta inkuboidaan 37°C:ssa 60 minuuttia ja sen jälkeen pH säädetään uudelleen arvoon 6 - 7, ennen kuin uutenaäyte laitetaan agarkaivotestin kaivoon.

35

Rinnalla tehdään kontrolli käyttämällä samaa supernatantin konsentraattia pH-arvossa 7 ja tätä inkuboidaan 37°C:ssa 60 minuuttia, ennen kuin kontrollinäyte laitetaan agarkaivotes-
 5 tinn kaivoon. Tämän tarkoituksena on verrata testinäytteiden estorenkaita kontrollin estorenkaseen. Kontrollin estorenk-
 aan halkaisija on 27 mm.

Taulukossa IX, kuten myös taulukoissa X ja XI, numero 27
 tarkoittaa, että renkaan koko on yhä 27 mm, joka vastaa
 10 variasiinin täyttä bakterisidista aktiivisuutta.

Taulukko IX

15	pH	Estorenkaat
	2	27
	4	27
	6	27
	8	27
20	10	27

Edellä olevassa taulukossa annetut tulokset osoittavat, että
 variasiinin bakterisidinen aktiivisuus ei muutu. Sen vuoksi
 on mahdollista päätellä, että variasiinin bakterisidinen
 25 aktiivisuus ei riipu pH-arvosta.

Lämmönkestokyky

Agarkaivotestillä määritetään, riippuuko esillä olevan
 30 keksinnön mukaisesti eristetyn variasiinin aktiivisuus
 lämmöstä.

Tätä tarkoitusta varten agar siirrostetaan indikaattorikan-
 nalla aikaisemmin agarkaivotestissä kuvatulla tavalla.
 35 Käytetty indikaattorikanta on Lactobacillus helveeticus
 (N 2).

Esimerkissä 2 kuvattua viljelysupernatantin konsentraattia, joka on säädetty pH-arvoon 7, inkuboidaan 100°C:ssa 15 – 60 minuuttia, ennen kuin siitä laitetaan näyte agarkaivotestin kaivoon.

5

Rinnalla tehdään kontrolli käyttämällä samaa supernatantin konsentraattia pH-arvossa 7 ja tätä inkuboidaan 37°C:ssa 60 minuuttia. Tällä tavoin voidaan lämpötilatestin näytteiden estorenkaita verrata kontrollin estorenkäseen. Kontrollin estorenkään halkaisija on 27 mm.

10

Taulukko X

15

Lämpötila (°C)	Inkubaatioaika (min.)	Estorenkäat (mm)
100	15	27
100	30	27
100	60	27

20

Nämä tulokset osoittavat, että variasiinin aktiivisuus ei riipu lämmöstä. Variasiinin bakterisidinen aktiivisuus ei muutu edes 60 minuutin inkuboinnin jälkeen 100°C:ssa.

25

Variasiinin lämmönkestokyky on biokemiallinen ominaisuus, joka on hyvin tärkeä, kun variasiinia käytetään elintarvikkeiden ja kosmeettisten aineiden valmistuksessa. Variasiinia voidaan siten käyttää erityisesti puhdistamattomana uutteenä tai puhdistetussa muodossa pastöroitujen elintarvikkeiden valmistuksessa torjumaan itiöiden, kuten esimerkiksi Bacil-
lien kasvua, jotka ovat lämmönkestäviä.

30

Lämmön ja pH-arvon kestävyys

35

Lisäksi variasiinin stabiilisuus testataan yhdistämällä pH ja lämpö.

Tätä tarkoitusta varten agar siirrostetaan indikaattorikan-

nalla kohdassa "agarkaivotesti" kuvatulla tavalla. Käytetty indikaattorikanta on Lactobacillus helveticus (N 2).

Esimerkissä 2 kuvattu viljelysupernatantin konsentraatti säädetään pH-arvoon 4 tai 7 2N HCl:lla ja/tai 2N NaOH:lla ja inkuboidaan 20 minuuttia 115°C:ssa; sen jälkeen uutteen pH säädetään uudelleen arvoon 6 - 7, ennen kuin siitä laitetaan näyte agarkaivotestin kaivoon.

10 Rinnalla valmistetaan pH-arvossa 7 saatu kontrolli, jota inkuboidaan 20 minuuttia 37°C:ssa, ennen kuin kontrollinäyte laitetaan agarkaivotestin kaivoon. Tällä tavoin voidaan testinäytteiden estorenkaita verrata kontrollin estorenkäseen. Kontrollin estorenkään halkaisija on 27 mm.

15

Taulukko XI

20	pH	Inkubointiaika (min.)	Inkubointiläm- pötila (°C)	Estorengas (mm)
	4	20	115	27
	7	20	115	27

Edellä olevan taulukon tulokset osoittavat, että variasiinin bakterisidinen aktiivisuus ei muutu pH-arvossa 4 tai 7 korotetun lämpötilan yhteydessä.

25

Variasiinin puhdistaminen

30 4 l BHI-alustaa siirrostetaan Micrococcus varians-kannan viljelmällä, joka tuottaa esillä olevan keksinnön mukaista variasiinia. Tätä standardiviljelmää inkuboidaan 30°C:ssa yön yli aerobisissa olosuhteissa samalla ravistellen, minkä jälkeen se sentrifugoidaan 5000 g:ssa. Saatu supernatantti
35 otetaan astiaan, johon lisätään 72 g XAD-7-hartsia (Amberlite (R)).

Variasiinimolekyylien kiinnittymistä hartsiin helpotetaan sekoittamalla seosta 30 minuuttia 25°C:ssa ja sen jälkeen koko seos siirretään sintratus lasin päälle ja supernatantti suodatetaan tyhjössä.

5

Hartsi pestään peräkkäin kolmella puskurilla, jotka sisältävät 20 mM natriumsitraattia, pH 4, ja isopropanolia. Ensimmäinen puskuri sisältää isopropanolia 10 %, toinen puskuri sisältää isopropanolia 15 % ja kolmas puskuri sisältää

10 isopropanolia 20 %.

Hartsi siirretään kolonniin ja variasiini eluoidaan 700 ml:lla puskuria, joka sisältää 20 mM natriumsitraattia, pH 4, ja 25 % isopropanolia. Variasiinin bakterisidista

15 aktiivisuutta seurataan käyttämällä edellä kuvattua agar-kaivotestiä.

Aktiiviset jakeet sekoitetaan ja isopropanoli haihdutetaan. FPLC-kromatografiaa varten valmistetaan 5 ml S-Resource-

20 kolonni (Pharmacia) tasapainoittamalla se 20 mM natriumsitraattipuskurilla. Aktiivisten jakeiden haihdutettu seos laitetaan tähän kolonniin ja kolonnin sisältö eluoidaan sen jälkeen NaCl-puskurilla, jonka gradientti on välillä 100 - 400 mM.

25

Jakeet otetaan talttaen ja näin puhdistetun variasiinin bakterisidinen aktiivisuus tarkistetaan agarkaivotestin avulla.

30 **Variasiinin sekvensointi**

Kannoista CNCM I-1586 ja CNCM I-1587 puhdistetun variasiinin N-terminaalinen osa sekvensoidaan käyttämällä automaattista Applied Biosystems 4774-sekvensointilaitetta. Sekvensointi

35

paljastaa 5 aminohapon pitoisuuden peptidisekvenssin, jonka sekvenssi on identtinen jäljempänä annetussa sekvenssilistassa kuvattun sekvenssin SEQ ID NO:1 N-terminaalisen osan

kanssa.

Sekvensoinnin aikana ei ollut mahdollista osoittaa yli 5 aminohapon peptidin mukanaoloa.

- 5 Variasiini, joka on puhdistettu kannosita CNCM I-1586 ja CNCM I-1587, hydrolysoidaan lisäksi 10 minuutin ajan 6N suolahapolla. Saadaan 3 peptidiä, jotka eristetään tavalliseen tapaan HPLC:lla. Vain yksi näistä kolmesta eristetyistä peptidistä oli mahdollista sekvensoida, koska nämä kaksi
10 muuta sisältävät kaikkein todennäköisimmin peptidimuunnelmia.

- Tällä tavoin eristetyn peptidin sekvenssi on identtinen jäljempänä olevassa sekvenssilistauksessa kuvatus sekvenssin
15 SEQ ID NO:1 aminohappojen 19 - 22 kanssa.

- Kannosita CNCM I-1586 ja CNCM I-1587 puhdistettua variasiinia sisältävä jae analysoidaan lopuksi massaspektrometrisesti, jolloin varianssin molekyylipainoksi saadaan 2659 daltonia.
20

Homologia

- 25 Lactococcus lactis-bakteerista saadun laktisiinin 481 sekvenssin ja esillä olevan keksinnön mukaisen variasiinin välillä osoitettiin esiintyvän homologiaa. Erityisesti tämä homologia koskee näiden kahden bakteriosiinin N-terminaalisen osan sekvenssejä. Variasiinin N-terminaalisen sekvenssin aminohapot 1 - 7 ovat siten identtisiä jäljempänä annetussa
30 sekvenssilistauksessa kuvatus laktisiinin 481 sekvenssien SEQ ID NO:8 aminohappojen 3 - 7 kanssa. Tästä huolimatta kysymys on vain osittaisesta homologiaasta eikä identtisyydestä.

- 35 Eritetyn laktisiinin 481 molekyylipainon on lisäksi osoitettu olevan massaspektrometrian avulla 2900 daltonia, kun taas eritetyn variasiinin molekyylipaino on 2659 daltonia, kuten

olemme aikaisemmin todenneet.

Kun laktisiinia 481 tuottava Lactococcus lactis-kanta siirrostetaan variasiiniuutteen läsnäollessa inhibitiospektrin testauksen yhteydessä kuvatulla tavalla, tämän kannan kasvun havaitaan inhiboituvan. Laktisiinia 481 tuottava Lactococcus lactis-kanta on immuuni omalle bakteriosiinilleen, so. laktisiinille 481, mutta se ei ole immuuni kummankaan oheisen keksinnön mukaisen Micrococcus varians-kannan tuottamalle variasiinille. Nämä tulokset, jotka saatiin aikaisemmin kuvatussa inhibitiospektrin testausmenetelmässä, vahvistavat, että nämä kaksi bakteriosiinia ovat erilaisia.

Edellä annetut geneettiset havainnot osoittavat, että vaikkakin laktisiinilla 481 ja variasiinilla on sekvenssihomologiaa, niiden sekvenssit eivät ole identtisiä. Biokemialliset havainnot sekä mikrobiologiset havainnot vahvistavat, että laktisiini 481 ja variasiini ovat kaksi erilaista bakteriosiinia.

20

Variasiinigeenin sekvensointi

Johdettu nukleotidisekvenssi SEQ ID NO:4, joka on kuvattu jäljempänä annetussa sekvenssilistauksessa ja joka vastaa aikaisemmin sekvensoidun variasiinin peptidin C-terminaalista osaa, rakennetaan tavalliseen tapaan. Sen jälkeen SEQ ID NO:4-sekvenssien seos tehdään radioaktiiviseksi T4 polynukleotidikinaasin avulla.

Kromosomaalisesta DNA:sta tehdään tavalliseen tapaan preparaatti kannoista CNCM I-1586 ja CNCM I-1587. Tämä DNA-preparaatti pilkotaan SalI:lla, SacI:lla, SphI:lla ja BamHI:lla entsyymien tuottajien suositusten mukaisesti. Sen jälkeen agarosigeelillä ajetaan 2 µg pilkkomistuotetta. DNA-geelillä pestään 250 mM HCl:lla ja kulkeutumistuote siirretään sen jälkeen alkalisisessa mediumissa geelistä "Zetaprobe" (Biorad)-membraanin päälle. Sen jälkeen Zetaprobe-membraani

esihybridisoidaan 55°C lämpötilassa, jota lämpötilaa laske-
 taan 5°C joka 2. tunti 40°C:een asti, alustassa, jonka koos-
 tumus on 6x SSC, 1 % SDS ja 0,25 % kuorittu maito. Tämä
 membraani hybridisoidaan johdetun radioaktiivisen koettimen,
 5 jolla on sekvenssi SEQ ID NO:4, kanssa samassa hybridisoin-
 timediumissa ja samoissa lämpötilaoloissa. Sen jälkeen sen
 annetaan inkuboitua 4 tuntia 40°C:ssa, minkä jälkeen mem-
 braani pestään 40°C:ssa 6x SSC:lla. Lopuksi sitä valotetaan
 16 tuntia autoradiografiafilmillä -80°C:ssa. Hybridisointi
 10 antaa monia erilaisia kulkeutumisyöhykkeitä: 7 kb SalI-
 yöhyke, 1,4 kb SacI-yöhyke, 1,8 kb BamHI-yöhyke ja yli 15
 kb. suuruinen SphI-yöhyke.

Sen jälkeen restriktioentsyymillä BamHI pilkotaan 5 µg
 15 genomi-DNA:a kannssta CNCM I-1586 ja 1,6 - 2 kb fragmentti
 erotetaan agarosigeelikromatografiolla ja sen jälkeen
 fragmentin sisältävä geelin osa eluoidaan. Eluoitu DNA-
 fragmentti ligatoidaan vektoriin pK 19 (Gene, 56 (1987) 309-
 312), joka on aikaisemmin pilkottu BamHI:lla ja sen jälkeen
 20 käsitellään vasikansuolifosfataasilla (Boehringer Mannheim,
 part NO. 713023).

Escherichia coli-kanta BZ 234 (Bozentrum-kokoelma - Univer-
 sity of Basle, Sveitsi), joka on aikaisemmin tehty kompeten-
 25 tiksi, transformoidaan sen jälkeen tavalliseen tapaan liga-
 tointimediumin kanssa. Insertin sisältävät kloonit tunnistee-
 taan agaralustalla, jota on täydennetty 50 µg/ml kana-
 mysiinillä, 60 ng/ml IPTG:lla (Boehringer, Mannheim, part
 No. 724815) ja 300 ng/ml X-gal:lla (Boehringer Mannheim,
 30 part No. 651745), ja inkuboidaan 37°C:ssa 16 tuntia.

Valkoiset pesäkkeet, jotka normaalisti sisältävät insertin,
 poimitaan 96-kaivoisille mikrotiitterimaljoille. Jokainen
 valkoinen pesäke poimitaan yhteen tällaiseen kaivoon. Jokai-
 35 nen kaivo sisältää 150 µl LB-alustaa, jota on täydennetty
 50 µg/ml kanamysiinillä. Miniviljelmät saadaan inkuboimalla
 kaivoja 37°C:ssa 20 tuntia.

Koska geenin orientaatiota vektorissa pK 19 ei tunneta, valmistetaan kaksi aluketta, joilla on vastakkainen orientaatio. Tätä tarkoitusta varten nämä alukkeet rakennetaan kokoamalla ne osittain laktisiinia 481 koodaavasta nukleotidifragmentista, jolla on sekvenssi SEQ ID NO:5 ja joka on kytkeetty pUC-vektoreiden jompaan kumpaan yleiskoettiin, joilla on sekvenssi SEQ ID NO:6 tai sekvenssi SEQ ID NO:7.

Sekoitetaan keskenään 1 µl kustakin kaivosta, 100 pikomoolia yhtä näistä alukkeista, 6 µl 2 mM dNTP-lajeja ja 2,5 µl Taq-puskuria (P.H. Stehelin & Cie AG, cat. no. TP05b) ja koko seos peitetään Dyna-wax-pisaralla (Finnzymes Oy, 02201 Espoo, Suomi) ja kuumennetaan 10 minuuttia 98°C:ssa bakteerien lyysaamiseksi; sen jälkeen tehdään PCR.

Positiiviset kloonit antavat sen jälkeen elektroforeesigeilillä 800 bp vyöhykkeen.

Tällä tavoin valitaan positiiviset kloonit ja näiden kloonien plasmidi-DNA eristetään; sen jälkeen DNA-fragmentti, joka on kloonattu pK 19-vektoriin, sekvensoidaan dideoksinukleotidimenetelmällä käyttämällä sekvensointikittiä (Pharmacia Biotech, part No. 27-1682-01) ja yleisalukkeita, ja tämän jälkeen spesifisiä alukkeita, jotka perustuvat näin saatuun sekvenssiin.

Tämän tuloksena saadaan nukleotidisekvenssei SEQ ID NO:2, joka on kuvattu jäljempänä annetussa sekvenssiluettelossa. Tämä nukleotidisekvenssi koodaa sekvenssiä SEQ ID NO:1, joka vastaa variasiinin aminohapposekvenssiä ennen kypsymistä.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on havainnollistaa esillä olevan keksinnön mukaisen bakteriosiinin valmistusmenetelmää ja sen käyttötapoja. Esimerkeissä anneetut prosenttimäärät on laskettu painosta, ellei toisin ole mainittu.

Esimerkki 1

BHI-viljelyalusta siirrostetaan ja tähän lisätään viljelmää, joka sisältää Micrococcus varians-kannan organismeja. Koko seosta inkuboidaan yön yli 30°C:ssa ravistellen ja aerobisissa olosuhteissa, minkä jälkeen liuos sisältää 10^8 kannan organismia ml:ssa. Näin saatu standardiviljelelmä sentrifugoidaan. Talteenotetaan standardisupernatantti.

10 Esimerkki 2

Supernatantin konsentraatti saadaan 750 ml:sta tätä supernatanttia, joka on saatu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla ja johon on lisätty 15 g XAD-7-hartsia (Amberlite (R)). Seosta ravistellaan 60 minuuttia 4°C:ssa ja sen jälkeen se suodataan No. 604 Schleicher & Schuell (Saksa)-suodattimen läpi. Suodattimesta eluoidaan sen jälkeen adsorboimattomat proteiinit pesemällä se 1-prosenttisellä natriumsitraatilla. Hartsi eristetään ja siirretään natriumsitraattia sisältävään astiaan ja koko seosta ravistellaan 2 minuuttia. Hartsi yhdessä natriumsitraatin kanssa siirretään pylvääseen ja natriumsitraatti eluoidaan 50-prosenttisellä asetonitridillä ja 0,1 % TFA:lla. Eluaatti haihdutetaan ja jäännös suspendoidaan uudelleen 50 mM fosfaattipuskuriin pH-arvossa 6,8.

25

Esimerkki 3

BHI-alustassa valmistetaan 10 litraa Micrococcus varians-kannan viljelmää yön aikana 30°C:ssa ravistellen ja aerobisissa olosuhteissa. Sen jälkeen viljelmään lisätään suoraan 200 g XAD-7-hartsia (Amberlite) ja koko seostas ravistellaan varovasti 1 tunti 4°C:ssa. Tämän jälkeen seos suodatetaan No. 604 Schleicher & Schuell (Saksa)-suodattimen läpi ja suodattimeen jäänyt hartsi pestään bakteereiden poistamiseksi 10 litralla 50 mM etikkahappoliuoksella, pH 5,2. Tämän jälkeen hartsiin lisätään 450 ml liuosta, joka sisältää 100 % etanolia ja 20 mM ammoniumasetaattia ja koko seos

35

suodatetaan hartsin poistamiseksi; tämän jälkeen suodos lyofilisoidaan. Saatu jauhe sisältää keksinnön mukaista variasiinia, jota voidaan käyttää elintarviketeollisuudessa.

5 Tämän jauheen, joka etukäteen on laimennettu vedellä, bakte-
risidinen aktiivisuus määritetään tämän jälkeen edellä
kuvatulla agarkaivotestillä. Tämän jauheen aktiivisuus on
vähintään 10^5 au/g jauhetta.

10 Lopuksi edellä saatua jauhetta lisätään 0,5 g/kg lihavaah-
toon samalla, kun tätä valmistetaan tavalliseen tapaan. Näin
saadaan lihavaahtoa, jonka jokainen g sisältää 50 au bakte-
riosiineja, jotka kykenevät kokonaan estämään patogeenisten
bakteereiden, erityisesti Clostridioiden kehittymisen.

15

Esimerkki 4

Tämän esimerkin kohteena on ihonhoitoon tarkoitettun kosteus-
voiteen valmistaminen. Tämä voide sisältää esimerkissä 3
20 kuvattua jauhetta 0,05 g/kg, so. variasiinia, joka kykenee
estämään ei-toivottujen bakteereiden kehittymistä iholla,
erityisesti Staphylococcus aureuksen ja Streptococcus
pyrogeneksen kehittymistä. Aktiivisuus on 5 au/g.

25 Tämän emulsion valmistamista varten lipidifaasin A komponent-
tit sekoitetaan ja niitä kuumennetaan 75°C :ssa. Valmistetaan
vesifaasi B ja myös sitä kuumennetaan 75°C :ssa; sen jälkeen
lisätään lipidifaasi A samalla hitaasti sekoittaen ja tämän
jälkeen koko seos jäähdytetään hitaasti sekoittaen ympäris-
30 tön lämpötilaan, so. noin 25°C :een. Komponentit lisätään
tässä lämpötilassa hitaasti formulaation järjestyksessä.

35

Lipidifaasi A

%

5	Peg-6 stearaatti, glyseraatti ja peg-20-	15
	setyylietteri (peg: polyetyleeniglykoli)	
10	Nestemäinen parafiini	5
	Vehnänydinöljy stabiloituna 0,1 %:lla	3
	fennyli-indaania (antioksidantti) ja 1 %:lla	
	soijapapufosfolipidiä (Kts. EP94109355.1)	
	Manteliöljy	2
	Setyylialkoholi	1
	Isostearyyli-isostearaatti	2
15	2-oktyylidodekyylimyristaatti	1
	Lanoliinivaha	1

Vesifaasi B

%

20	Metyyli-isotiatsoliini	0,1
	Demineralisoitu vesi	59,6
	Ihmisen istukkaproteiini	2

C Lisäaineet

%

25	Propyleeniglykoli ja calendula-uute	2
	50 % liukoinen kollageeni demineralisoidussa vedessä	5,8
	Hajuste	0,3
30	Esimerkin 3 mukainen 2,5 % bakteriosiini-jauhe demineralisoidussa vedessä	0,2

Esimerkki 5

- 35 Esimerkissä 3 kuvattua bakteriosiinijauhetta lisätään 0,5 g/kg suuveteen. Tämä suuvesi kykenee siten estämään patogeenisten bakteereiden, erityisesti Streptococcus sob-

rinuksen, Streptococcus sanguisen, Streptococcus mutansin ja Actinomyces viskosuksen, kehittymisen suuontelossa.

Esimerkki 6

5

Esimerkin 3 bakteriosiinijauhetta sisältävää liuosta, joka on laimennettu veteen 1-prosenttiseksi, suihkutetaan steriloitavaksi tarkoitetun elintarvikkeen päälle pakkaamisen aikana tapahtuvan jälkikontaminaation estämiseksi.

10



SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISTIEDOT:

- (i) HAKIJA:
- 5 (A): NIMI: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
(B): KATU: AVENUE NESTLE 55
(C): KAUPUNKI: VEVEY
(D): OSAVALTIO TAI PROVINSSI: CANTON DE VAUD
(E): MAA: SVEITSI
10 (F): POSTINUMERO: 1800
(G): PUHELIN: (041) 21 924 34 20
(H): TELEFAX: (041) 21 924 28 80
- (ii) KEKSINNÖN NIMI: BAKTERIOSIINI MICROCOCCUS
VARIANSIKSESTA
- 15 (iii) SEKVENSSIEN MÄÄRÄ: 8
- (iv) TALLENNUS TIETOKONEELLE:
- (A) TALLENTAMISTAPA: lerppu
(B) TIETOKONE: IBM PC compatible
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
20 (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0,
Version #1.30 (EPO)

(2) SEKVENSSITIEDOT, SEQ ID NO:1:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
- 25 (A) PITUUS: 25 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) SÄIKEISYYS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: proteiini
- 30 (vi) ALKULÄHDE:
- (A) ORGANISMI: MICROCOCCUS VARIANS
(C) YKSITTÄINEN ISOLAATTI: KAKSI KLOONIA,
CNCM I-1586 ja CNCM I-1587
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:1:
- 35

Gly Ser Gly Val Ile Pro Thr Ile Ser His Glu Cys His Met Asn Ser
 1 5 10 15

5 Phe Gln Phe Val Phe Thr Cys Cys Ser
 20 25

(2) SEKVENSITIEDOT, SEQ ID NO:2:

(i) SEKVENSIN OMINAISUUDET:

- 10 (A) PITUUS: 278 emäsparia
 (B) TYYPPI: nukleotidi
 (C) SÄIKEISYYS: kaksois
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: DNA (genomi)

(vi) ALKULÄHDE:

- 15 (A) ORGANISMI: MICROCOCCUS VARIANS
 (C) YKSILÖLLINEN/ISOLAATTI: KAKSI KLOONIA,
 CNCM I-1586 ja CNCM I-1587

(ix) TUNNUSMERKKI:

- 20 (A) NIMI/AVAIN: CDS
 (B) SIJAINTI: 88..228

(ix) TUNNUSMERKKI:

- (A) NIMI/AVAIN: sig-peptidi
 (B) SIJAINTI: 88..153

(ix) TUNNUSMERKKI:

- 25 (A) NIMI/AVAIN: mat-peptidi
 (B) SIJAINTI: 154..228

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEQ ID NO:2:

30 GTTGAAAATC ATCCGGAAGG ATGATTCGT GTTCATGCGA GGCCACCCCG AATCGCGGCA 60
 GCCACACCCA CTGAGAGGAC TAGAACA ATG ACG AAC GCA TTT CAG GCA CTG 111
 Met Thr Asn Ala Phe Gln Ala Leu
 -22 -20 -15
 35 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
 40 GGT GTT 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

(2) SEKVENSSTIETEDOT, SEO ID NO:3:

```

10      (A)    PITUUS: 47 aminohappoa
      (B)    TYYPPI: aminohappo
      (D)    TOPOLOGIA: lineaarinen

```

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEQ ID NO:3:

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

(2) SEKVENSSTIETDOT, SEQ ID NO:4:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(A) KUVVAUS: /desc = 2oligonukleotidi"

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:4:

(2) SEKVENSSTIETDOT, SEQ ID NO:5:

(C) SÄIKEISYYS: yksi

- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: muu nukleiinihappo
 - (A) KUVAUS: /desc = "oligonukleotidi"
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:5:

5

GGNTCNGGNG TNATHCAYAC NATHTCNCA Y GARTGYAAYA TGAA 44

(2) SEKVENSSITIEDOT, SEQ ID NO:6:

10

- (i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
 - (A) PITUUS: 18 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleotidi
 - (C) SÄIKEISYYS: yksi
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: muu nukleiinihappo
 - (A) KUVAUS: /desc = "oligonukleotidi"
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:6:

ATAACAATTT CACACAGG

18

20

(2) SEKVENSSITIEDOT, SEQ ID NO:7:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
 - (A) PITUUS: 18 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleotidi
 - (C) SÄIKEISYYS: yksi
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: muu nukleiinihappo
 - (A) KUVAUS: /desc = "oligonukleotidi"
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:7:

25

30

GGTTTTCCCA GTCACGAC

18

(2) SEKVENSSITIEDOT, SEQ ID NO:8:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
 - (A) PITUUS: 7 aminohappoa
 - (B) TYYPPI: aminohappo
 - (C) SÄIKEISYYS: yksi
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

35

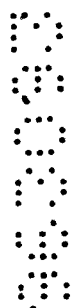
(ii) MOLEKYYLIN TYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS, SEQ ID NO:8:

Lys Gly Gly Ser Gly Val Ile

1

5



Patenttivaatimukset

1. Bakteriosiini Micrococcus varians-bakteerista, t u n -
n e t t u siitä, että sillä on aminohapposekvenssi SEQ ID
5 NO:1.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen bakteriosiini, t u n -
n e t t u siitä, että se eroaa sekvenssistä SEQ ID NO:1
1 - 4 aminohapon suuruisella yhdellä substituutiolla, delee-
10 tiolla ja/tai insertiolla.
3. Nukleotidifragmentti, joka koodaa jonkin patenttivaatimuksen
1 - 2 mukaista bakteriosiinia Micrococcus varians-bakteerista.
- 15 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen fragmentti, t u n n e t t u
siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:2 nukleotidit 88 -
228.
5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen nukleotidifragmentti,
20 t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:2
nukleotidit 154 - 228.
6. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen nukleotidifragmentti,
t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:2
25 nukleotidit 88 - 153.
7. Signaalipeptidi Micrococcus varians-bakteerista, jota pepti-
diä koodaa patenttivaatimuksen 6 mukainen nukleotidisekvenssi.
- 30 8. Micrococcus varians-kanta, joka tuottaa patenttivaatimuksen
1 tai 2 mukaista bakteriosiinia, erityisesti kannata CNCM
I-1586 ja CNCM I-1587.
9. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen bakteriosii-
35 nin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tätä bakte-
riosiinia tuottavaa Micrococcus varians-kantaa viljellään
alustassa ja olosuhteissa, jotka ovat kasvulle suotuisia mm.

että saadaan viljelyliuos, joka sisältää $10^7 - 10^{11}$ tämän kannan organismia ml:ssa, minkä jälkeen saatu viljelmä sentrifugoidaan ja valmistetaan bakteriosiinia sisältävä supernatanttiuute.

5 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Micrococcus varians-kanta on kanta CNCM I-1586 tai kanta CNCM-1587.

10 11. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen bakteriosiinin käyttö, erityisesti patenttivaatimuksen 9 mukaisesti saatuna uutteenä, ja/tai tätä bakteriosiinia tuottavan Micrococcus varians-kannan käyttö elintarvikkeiden, kosmeettisten aineiden ja farmaseuttisten aineiden valmistuksessa, erityisesti dermatologiassa ja bucco-dentaalisissa sovellutuksissa.

15

