



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0044664
(43) 공개일자 2019년04월30일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23C 19/032 (2017.01)
A23C 9/123 (2017.01) C07K 14/315 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23C 19/0323 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7009408</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년08월24일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년04월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/071352</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/041717
국제공개일자 2018년03월08일</p> <p>(30) 우선권주장
PCT/DK2016/000031 2016년09월01일 덴마크(DK)</p> | <p>(71) 출원인
시에이치알. 한센 에이/에스
덴마크 디케이-2970 호르솔름 보게 알레 10-12</p> <p>(72) 발명자
더크스, 패트릭
덴마크 3080 티코엠프 쇠가르드스베이 1
얀젠, 토마스
덴마크 2700 브로엔쇼에이 비반겐 4
쇠렌센, 킴 입
덴마크 3520 파룸 히빌레베크뱅크 66</p> <p>(74) 대리인
박장원</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 새로운 세균

(57) 요약

본 발명은 텍스처화 특성을 갖는 세균, 상기 세균을 포함하는 스타터 컬처, 및 상기 세균 세포를 이용하여 제조된 유제품에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A23C 9/1238 (2013.01)

C07K 14/315 (2013.01)

A23Y 2240/75 (2013.01)

C12R 1/46 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

철 이온 (예컨대 Fe^{2+})을 10 ppm (백만 분의 1, mg/Kg 건조 중량) 미만, 예컨대 9 ppm 미만, 8 ppm 미만, 6 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 유산균(LAB).

청구항 2

망간 이온 (예컨대 Mn^{2+})을 6 ppm (백만 분의 1, mg/Kg 건조 중량) 미만, 예컨대 5.5 ppm 미만, 5.2 ppm 미만, 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 2 ppm 미만으로 함유하는 LAB.

청구항 3

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe^{2+} 및 Mn^{2+} 의 총합을 16 ppm 미만, 예컨대 15 ppm 미만, 14 ppm 미만, 13 ppm 미만, 10 ppm 미만 또는 7 ppm 미만으로 함유하는 LAB.

청구항 4

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM)를 갖는 유산균(LAB).

청구항 5

교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM)를 갖는 유산균(LAB).

청구항 6

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 감소된 DMIM인 것인 LAB.

청구항 7

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *fur* 유전자의 변화된(예컨대 감소된) 발현, 예를 들어 상기 유전자의 (부분적 또는 완전한) 불활성화, 상기 유전자 또는 그의 일부의 결실 및/또는 상기 유전자로 의 부가적인 DNA의 삽입에 의해 일어나는 것인 LAB.

청구항 8

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 녹-아웃 돌연변이와 같이, 2가 금속 이온의 흡수와 관련된 유전자에서의 돌연변이에 의해 일어나는 것인 LAB.

청구항 9

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *mntH* 유전자의 감소된 발현, 예컨대 상기 유전자의 (부분적 또는 완전한) 불활성화, 상기 유전자 또는 그의 일부의 결실 및/또는 상기 유전자로 의 부가적인 DNA의 삽입에 의해 일어나는 것인 LAB.

청구항 10

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *fatC* 유전자 또는 철 흡수와 관련된 임의의 다른 유전자의 감소된 발현, 예컨대 상기 유전자의 (부분적 또는 완전한) 불활성화, 상기 유전자 또는 그의 일부의 결실 및/또는 상기 유전자로 의 부가적인 DNA의 삽입에 의해 일어나는 것인 LAB.

청구항 11

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 상기 세균이 텔루라이트에 대해 내성임으로 해서 일어나는 것인 LAB.

청구항 12

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Fe²⁺, Mg²⁺, 및 Mn²⁺로 이루어진 군, 종기로는 group Fe²⁺, 및 Mg²⁺로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 LAB.

청구항 13

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Fe²⁺인 것인 LAB.

청구항 14

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Mn²⁺인 것인 LAB.

청구항 15

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 돌연변이 유발 및/또는 유전자 조작에 의해 수득된 것인 LAB.

청구항 16

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe²⁺ 및 Mn²⁺로 이루어진 군으로부터 선택된 2가 금속 이온의 농도가 0.25 마이크로그램/그램 미만, 예컨대 0.2 µg/g 미만인 배지에서 성장시킴으로써 수득된 것인 LAB.

청구항 17

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 종에 속하는 것인 LAB.

청구항 18

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 종에 속하는 LAB.

청구항 19

스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 균주 CHCC15712 (DSM25955), 또는 이 균주의 돌연변이주 또는 변이주, 예컨대 EPS 생산능이 개선된 이 균주의 돌연변이주 또는 변이주.

청구항 20

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 텔루라이트에 내성인 LAB.

청구항 21

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 스킵 밀크 1 ml 당 10E8 CFU로 접종시, 37°C에서 9.5% 재조성된 스킵 밀크에서 세균을 16시간 배양한 후 전단 응력으로서 측정할 경우 밀크 내 점도가 약 50 Pa.s를 초과하는 (예컨대 60 또는 70 Pa.s 초과) 것인 LAB.

청구항 22

선행하는 항들 중 어느 하나의 항의 LAB(유산균)를 포함하는 조성물.

청구항 23

선행하는 항에 있어서, 스타터 컬처인 조성물.

청구항 24

LAB를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 금속 이온 킬레이터, (예컨대 EDTA)를 종기로는 1 ppm 이상의 농도로 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 1 mg 당 LAB를 적어도 10E9 CFU (세포 형성 단위) 포함하는 조성물.

청구항 26

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 1 mg 당 LAB를 적어도 $10E11$ CFU 포함하는 조성물.

청구항 27

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 1 mg 당 LAB를 적어도 $10E10$ CFU 내지 $10E14$ CFU 포함하는 조성물.

청구항 28

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 동결 형태 또는 건조 형태 예컨대 동결-건조 형태인 조성물.

청구항 29

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe^{2+} 를 10 ppm 미만, 예컨대 9.5 ppm 미만, 9 ppm 미만, 8 ppm 미만, 6 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 포함하는 조성물.

청구항 30

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, Mn^{2+} 를 6 ppm 미만, 예컨대 5.5 ppm 미만, 5.2 ppm 미만, 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 2 ppm 미만으로 포함하는 조성물.

청구항 31

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe^{2+} 및 Mn^{2+} 의 총합을 16 ppm 미만, 예컨대 15 ppm 미만, 14 ppm 미만, 13 ppm 미만, 10 ppm 미만 또는 7 ppm 미만으로 포함하는 조성물.

청구항 32

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 적어도 2 가지, 예컨대 적어도 3 가지, 적어도 5 가지 또는 적어도 10 가지의 상이한 LAB 균주를 함유하는 조성물.

청구항 33

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 상이한 종에 속하는 적어도 2 가지의 상이한 LAB 균주를 포함하는 조성물.

청구항 34

밀크 기질을 선행하는 항들 중 어느 하나의 항의 LAB, 선행하는 항들 중 어느 하나의 항의 균주 또는 선행하는 항들 중 어느 하나의 항의 조성물과 함께 발효시키는 것을 포함하는, 유제품(예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법.

청구항 35

Fe^{2+} 농도가 $0.25 \mu g/g$ 미만 (예컨대 $0.20 \mu g/g$ 미만 또는 $0.15 \mu g/g$ 미만)인 밀크 기질을 LAB, 예컨대 선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 따른 LAB에 의해 발효시키는 것을 포함하는, 유제품(예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법.

청구항 36

Mn^{2+} 농도가 $0.025 \mu g/g$ 미만(예컨대 $0.020 \mu g/g$ 미만 또는 $0.015 \mu g/g$ 미만)인 밀크 기질을 LAB, 예컨대 선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 따른 LAB에 의해 발효시키는 것을 포함하는, 유제품 (예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈)의 제조 방법.

청구항 37

활성 fur 단백질을 함유하지 않는 LAB에 의해 밀크 기질을 발효시키는 것을 포함하는, 유제품(예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법.

청구항 38

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, LAB은 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 균주인 것인 방법.

청구항 39

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, LAB은 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 균주인 것인 방법.

청구항 40

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 기재된 방법에 의해 수득가능한, 발효유 제품 (예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)와 같은 유제품.

청구항 41

선행하는 항에 있어서, 선택적으로: 과일 농축물, 시럽, 프로바이오틱 세균 배양제, 색소, 농후제, 풍미제, 및 보존제로 이루어진 균으로부터 선택된 성분들을 포함하거나; 및/또는 선택적으로 교반형 제품, 세트형 제품 또는 음용가능한 제품의 형태로 존재하는 것인 유제품.

청구항 42

- 유전자 조작 또는 돌연변이 유발에 의해 LAB 균주(모 균주)의 fur 유전자 내로 돌연변이를 도입하는 단계, 및
- 모 균주에 비해 증가된 텍스처화 특성을 갖는 돌연변이주들을 스크리닝하는 단계
를 포함하는, 밀크 기질 내로 접종될 경우 텍스처를 제공하는 (또는 모 균주에 비해 증가된 텍스처를 제공하는) LAB 균주를 생산하는 방법.

청구항 43

LAB 균주 (EPS를 생산할 수 있는 균주임)의 EPS 생산을 개선시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은: 상기 균주의 접종 전, 접종 동안 또는 접종 후에, 배지(예컨대 생산 배지 또는 밀크 기질)로부터 Fe²⁺ 이온을 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

선행하는 항에 있어서, 결과적인 배지는 Fe²⁺ 이온의 농도가 0.25 µg/g 미만 (예컨대 0.20 µg/g 미만 또는 0.15 µg/g 미만)인 것인 방법.

청구항 45

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은: 균주의 접종 전, 접종 동안 또는 접종 후, 배지로부터 Mn²⁺ 이온을 제거하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 46

선행하는 방법에 있어서, 결과적인 배지의 Mn²⁺ 농도는 0.025 µg/g 미만(예컨대 0.020 µg/g 미만 또는 0.015 µg/g 미만)인 것인 방법.

청구항 47

선행하는 항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 성장은 적어도 2 시간 또는 적어도 4 시간 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 48

LAB 균주(EPS를 생산할 수 있는 것임)의 생산 방법으로서, 상기 방법은: fur 유전자를 (부분적으로 또는 완전히) 불활성화시키는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 텍스처화 특성을 갖는 세균 세포, 상기 세포를 포함하는 스타터 킬처, 및 이러한 세포를 이용하여 제조된 유제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품 산업에서는 식품의 맛과 텍스처 향상 뿐만 아니라 이러한 식품의 유통기간을 늘리기 위해 수많은 세균, 특히 유산균(LAB: lactic acid bacteria)가 사용된다. 유제품 산업의 경우, LAB은, 밀크의 산성화(발효에 의해)를 일으키기 위해서 뿐만 아니라 이들이 혼입되는 제품의 텍스처화를 위해서 집중적으로 사용되고 있다.

[0003] 식품 산업에서 사용되는 LAB으로는 특히 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 페디오코커스(*Pediococcus*) 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속에 속하는 것들을 들 수 있다.

[0004] LAB은 식품, 특히 발효 제품의 제조를 위해 단독으로 또는 다른 세균과 조합하여 집중적으로 사용된다. 이들은 특히 요구르트와 같은 발효유 제품에 사용되는 스타터 킬처 형성에 사용된다. 이들 중 어떤 것들은 발효 제품의 텍스처 발달에 가장 큰 역할을 한다. 이 특징은 다당류 생산과 밀접하게 관련되어 있다. 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 균주 중에서도 텍스처화 균주와 비-텍스처화 균주를 구별하는 것이 가능하다.

[0005] 산업계의 요구 사항을 충족시키기 위해, LAB, 특히 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종의 새로운 텍스처화 균주를 제안하는 것이 필요하게 되었다. 예컨대 유제품의 단백질 또는 펙틴 (두 가지 모두 텍스처를 향상시킴)의 양을 줄이는데 특별히 초점을 맞출 수 있는데, 이는 이들 두 가지 성분 모두가 고가이기 때문이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 식품, 특히 유산균 (예컨대 스트렙토코커스 써모필러스)의 텍스처화 균주가 락토바실러스 종과 함께 사용되는 식품을 텍스처화하는데 우수한 특성을 갖는 유산균 균주를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 발명자들은 놀랍게도, 유산균 또는 스타터 킬처가 발효유 생산에 사용되는 경우, 유산균 세포, 또는 유산균 세포를 함유하는 스타터 킬처 중의 금속 이온 농도가 텍스처 형성에 큰 영향을 미친다는 것을 발견하게 되었다.

[0009] 이러한 놀라운 발견에 따라, 본 발명은 향상된 텍스처화 특성을 갖는 신규한 LAB 균주 및 이러한 균주를 생산하는 방법 및 이러한 균주를 사용하여 제조된 발효유 제품에 관한 것이다.

[0010] 따라서, 본 발명의 일 측면은 밀크 기질을 텍스처화할 수 유산균의 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 금속 이온의 세포내 농도가 감소된 유산균을 포함하거나 및/또는 상기 조성물은 금속 이온을 감소된 양으로 포함하는 것이다.

[0011] 이러한 세포는 다음과 같은 상이한 방법으로 수득 될 수 있다:

[0012] ● 대안 A): 세포가 금속 이온을 흡수하지 못하도록 또는 저속으로만 금속 이온을 흡수할 수 있도록, 또는 세포가 완전한 기능성 이온 결합 단백질을 합성하지 못하도록 세포를 유전자 변형시키는 것,

[0013] ● 대안 B): 예컨대 배지에 금속 이온 킬레이트화제를 첨가함으로써 금속 이온을 저농도로 갖거나 금속 이온이 없는 성장 배지에서 세포를 성장시키는 것 또는

[0014] ● 대안 C): 예컨대 모 세포의 돌연변이 유발 처리 (화학적 돌연변이 유발 물질 또는 자외선 처리 포함)에 의해 수득된 돌연변이 세포의 분리.

[0015] 대안 A)와 관련하여, 본 발명자들은 이온 대사가 교란된 (예를 들어 감소, 억제된) 텍스처화 LAB의 돌연변이주

들이 발효유 제품에서 더 우수한 질감을 제공한다는 발견을 설명한다

[0016] 두 번째 측면에서, 본 발명은 밀크 기질을 감소된 함량의 철 (특히 Fe^{2+}) 및/또는 망간 (특히 Mn^{2+})에 의해 발효시키거나, 또는 밀크 기질을 상기 금속 이온 중 적어도 한 가지가 LAB에 부분적으로 또는 전적으로 접근불가능하게 된 밀크 기질을 발효시키는 단계를 포함하는, LAB로 발효된 유제품의 점도를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0017] 상세한 설명

[0018] 본 발명은 *S. 써모필러스* (*S. thermophilus*) 균주 CHCC15712 - *S. 써모필러스* (*S. thermophilus*) 균주 CHCC9844를 생산하는 엑소다당류의 돌연변이주로서 분리된 - 로 발효된 밀크가, 요구르트 및 요구르트 타입 제품에 있어 텍스처화 특성과 관련되는 것으로 믿어지는 두 가지 중요한 레올로지 파라미터인 증가된 전단 응력 뿐만 아니라 증가된 젤 강성도를 나타내었다는 놀라운 발견에 기초한다. 점도 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 모니터링함으로써 측정되는 점도 역시도 증가하였다 (실시예 1 참조).

[0019] CHCC9844 및 CHCC15712로부터의 EPS의 단리 및 특징화 결과, CHCC15712에 대한 EPS 생산이 9%까지 증가하였다는 것을 보여주었는데, 이는 점도 증가와도 연관된다 (실시예 2).

[0020] 돌연변이주 CHCC15712를 분석한 결과, 본 발명자들은 놀랍게도 세포가 CHCC9844와 비교하여 Fe^{2+} 및 다른 금속 이온을 비정상적으로 낮은 농도로 함유하고 있음을 밝혀냈다.

[0021] 본 발명자들은 이러한 놀라운 발견의 기초가 되는 가능한 메카니즘을 조사하였으며, CHCC9844의 계놈 서열에서, 본 발명자들은 CHCC9844eps 오페론의 일부인 EpsA 유전자의 상류 영역에서, Fur(ferric uptake regulator: 제2 철 흡수 조절자) 박스에 고도로 상동적인 서열을 동정하였는데, 이는 Fur가 CHCC9844의 EPS 발현 조절에 관여함을 나타내는 것이다 (도 1A 및 1B).

[0022] EpsA 발현이 Fur의 조절하에 있고 EpsA의 억제-해제(de-repression)가 EPS 생성 증가 및 텍스처 증가로 이어진다고 믿어지지만, 특정 이론이나 가설에 구애되는 것은 아니다. 2가 금속 흡수가 손상된 돌연변이주는 따라서 정상적인 흡수를 하는 모 균주에 비해 증가된 텍스처를 나타낼 것이다.

[0023] CHCC15712의 DNA 어레이 (발현 마이크로어레이)를 CHCC9844와 비교하여 분석한 결과, 특정 철 흡수 유전자 카세트 (Fat operon)가 하향 조절된 것으로 나타났다. fatABC 유전자는 CHCC15712에서 약 4 배 더 낮게 발현되었고 fatD는 CHCC9844에 비해 2 배 낮게 발현되었다.

[0024] 상기 대안 A)와 관련한 연구 조사

[0025] 본 발명자들은 철 운반자의 이러한 하향 조절이 세포내 Fe^{2+} 또는 Fe^{3+} 농도의 감소를 초래할 것이고, 이는 다시 Fur 조절기가 Fur 박스에 덜 결합하게 할 것이라고 추측했다. Fur가 억제자로 작용하기 때문에 Fur의 통제 하에 있는 유전자들은 감소된 $Fe^{2+/3+}$ 농도에 의해 억제된다.

[0026] 예컨대 2가 금속 이온 철 ABC 흡수 시스템(NRAMP)와 같은, 철 흡수와 관련된 다른 모든 유전자들의 하향 조절 역시 보다 낮은 세포내 철 농도를 유도하고, Fur 조절을 통해 증가된 텍스처를 유도하게 될 것이다.

[0027] 이 가설은 fur 유전자가 불활성화된 CHCC9844의 유전적으로 조작된 돌연변이주를 제조합으로써 시험되었다. 텍스처에 미치는 영향은 피펫 배출 테스트를 사용하여 측정하였다. wt 균주 CHCC9844는 24 ± 1 초의 피펫 값을 갖는 반면, fur 돌연변이주 KA509는 38 ± 0 초를 기록하였는데 이는 58% 증가에 해당한다 (실시예 3).

[0028] 유전자 발현에 대한 fur 불활성화의 효과 또한 DNA 마이크로어레이를 사용하여 평가하였다. 철 흡수와 관련된 fatABDC 유전자는 Fur에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. KA509에서 이들 유전자는 CHCC9844 wt 균주에 비해 4 배 하향 조절되었다. KA509를 10 mM Fe^{2+} 의 존재하에 성장시킨 경우, fat 유전자 클러스터의 발현에는 실질적인 변화가 없었다. 반대로, 모 균주 CHCC9844를 철 존재하에 배양하자, fatC 및 fatD 유전자가 4배 유도되었다.

[0029] 상기 대안 B)와 관련한 연구 조사:

[0030] 이 가설은 금속 킬레이터인 EDTA의 존재 하에서 밀크 산성화 실험을 수행함으로써 추가로 시험되었다. EDTA를 첨가하면 이용가능한 철의 양이 줄어들어 EpsA가 억제-해제되어 텍스처가 향상된다. 실제로 밀크에 1mM EDTA를 첨가하면 CHCC15712로 발효된 우유의 텍스처가 25 % 증가되었다 (실시예 5).

[0031] 상기 대안 C)와 관련한 연구 조사:

- [0032] CHCC9844의 돌연변이주에서 철 흡수와 관련된 유전자 발현이 감소되었다는 발견에 기초하여, 텔루라이트 내성 돌연변이주를 CHCC9844로부터 단리하였다.
- [0033] 피펫 시험을 이용한 유출 시간과 이에 의해 점도는 텔루라이트 내성 돌연변이주에서 증가하였다. 최고 증가는 돌연변이주 9844-K2에서 47%로 측정되었다 (실시예 4).
- [0034] 이러한 실험 결과에 의해 *eps* 양성 *S. 쉼모필러스* 균주의 텍스처화 특성을, 텔루라이트 내성 돌연변이주를 단리함으로써 더욱 증가시키는 것이 가능하다는 것이 입증되었다. 본 발명은 또한 이 구체예도 포함한다.
- [0035] 전술한 놀라운 발견들에 기초하여, 본 발명의 제 1 측면은 세포내의 모든 2가 금속 이온의 총합이 4200 ppm (백만 분의 1, mg/Kg 건조 중량) 미만, 예컨대 4100 ppm 미만, 4000 ppm 미만, 3000 ppm 미만 또는 2000 ppm 미만 인, 유산균(LAB)과 같은 세균 세포에 관한 것이다. 이러한 세균 세포의 흥미로운 구체예로는 다음을 들 수 있다:
- [0036] - Fe²⁺, Mg²⁺ 및 Mn²⁺의 총합이 4200 ppm 미만, 예컨대 4100 미만, 4000 미만, 3000 미만, 2000 또는 1000 ppm 미만인 LAB.
- [0037] - Mg²⁺를 4200 ppm 미만, 예컨대 4100 ppm 미만, 4000 ppm 미만, 3000 ppm 미만, 2000 ppm 미만 또는 1000 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0038] - Fe²⁺를 10 ppm 미만, 예컨대 9 ppm 미만, 8 ppm 미만, 6 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0039] - Mn²⁺를 6 ppm 미만, 예컨대 5.5 ppm 미만, 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0040] - Fe²⁺ 및 Mn²⁺의 총합을 16 ppm 미만, 예컨대 15 ppm 미만, 14 ppm 미만, 10 ppm 또는 7 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0041] - 임의의 2가 금속 이온, 특히 Mg를 2000 ppm 미만으로 함유하는 동결건조된 형태의 LAB.
- [0042] - 2가 금속 이온을 4000 ppm (w/w) 미만으로 함유하는 동결건조된 형태의 LAB.
- [0043] - 철을 10 ppm (w/w) 미만, 예컨대 9 ppm 미만 또는 8 ppm 미만으로 함유하는 건조된 형태의 LAB.
- [0044] - 철을 8 ppm (w/w) 미만으로 함유하는 동결건조된 형태의 LAB.
- [0045] 본 발명의 제 1 측면의 세균 세포는 밀크 기질을 발효시킬 때 밀크 기질을 텍스처화할 수 있다. 따라서, 또 다른 흥미로운 구체예는 스킴 밀크 1 ml 당 본 발명 세균을 10E8 CFU (집락 형성 단위)로 접종시, 37°C에서 9.5% 제조성된 스킴 밀크에서 상기 세균을 16시간 배양한 후 전단 응력 측정시 밀크 내 점도가 약 50 Pa.s를 초과하는 (예컨대 60 또는 70 Pa.s 초과) 점도를 생성하는 본 발명의 균주에 관한 것이다.
- [0046] 또 다른 흥미로운 구체예는 다음과 같다:
- [0047] - 교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM: divalent metal ion metabolism)를 갖는 유산균 (LAB).
- [0048] - 교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM)를 갖는 LAB.
- [0049] - 교란된 DMIM은 DMIM의 감소인 것인 LAB.
- [0050] - 교란된 DMIM은 *fur* 유전자의 변화된 발현에 의해 일어나는 것인 LAB.
- [0051] - 교란된 DMIM은 2가 금속 이온의 흡수와 관련된 유전자의 돌연변이에 의해 일어나는 것인 LAB.
- [0052] - 교란된 DMIM은 *mntH* 유전자의 감소된 발현에 의해 일어나는 것인 LAB.
- [0053] - 교란된 DMIM은 *fatC* 유전자 또는 철 흡수와 관련된 그 밖의 임의의 유전자의 감소된 발현에 의해 일어나는 것인 LAB.
- [0054] - 교란된 DMIM은 텔루라이트에 내성인 세균에 의해 일어나는 것인 LAB.
- [0055] - 2가 금속 이온은 Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Te²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ 및 Cu²⁺로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 LAB.
- [0056] - 2가 금속 이온은 Fe²⁺, Mg²⁺, 및 Mn²⁺로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 LAB.
- [0057] - 2가 금속 이온은 Fe²⁺인 LAB.

- [0058] - 2가 금속 이온은 Mn^{2+} 인 LAB.
- [0059] - 돌연변이 유발, 유전자 조작, 및/또는 2가 금속 이온, (예컨대 Fe)의 농도가 0.1 % (w/v) 미만인 배지에서의 성장에 의해 얻어진 LAB.
- [0060] - 스트렙토코커스 써모필러스 및 락토바실러스 불가리쿠스로 이루어진 군으로부터 선택된 종에 속하는 LAB
- [0061] - 스트렙토코커스 써모필러스 종에 속하는 LAB.
- [0062] - 텔루라이트에 내성인 LAB.
- [0063] - 균주 스트렙토코커스 써모필러스 CHCC15712 (DSM25955), 또는 이 균주의 돌연변이주 또는 변이주.
- [0064] 두 번째 측면에서, 본 발명은 제1 측면의 LAB를 포함하는 조성물에 관한다.
- [0065] 세 번째 측면에서, 본 발명은 LAB를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 금속 이온 킬레이터 (예컨대 EDTA 또는 시데로포어 또는 이오노포어)를 총기로는 1 ppm 이상의 농도로 포함한다.
- [0066] 제2 및 제3 측면의 흥미로운 구체예들은 다음과 같다:
- [0067] - 스타터 컬처인 조성물.
- [0068] - 본 발명의 LAB를 적어도 $10E9$ CFU 포함하는 조성물.
- [0069] - 본 발명의 LAB를 적어도 $10E11$ (10^{exp11}) CFU 포함하는 조성물.
- [0070] - 본 발명의 LAB를 $10E10$ CFU 내지 $10E14$ CFU 포함하는 조성물.
- [0071] - 스타터 컬처로 사용가능하거나, 및/또는 동결되거나 건조된 형태, 예컨대 동결-건조된 형태인 조성물.
- [0072] - 모든 2가 금속 이온의 총합이 4200 ppm 미만, 예컨대 4100 미만, 4000 미만, 3000 미만, 2000 또는 1000 ppm 미만인 조성물.
- [0073] - Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 의 총합이 4200 ppm 미만, 예컨대 4100 미만, 4000 미만, 3000 미만, 2000 또는 1000 ppm 미만인 조성물.
- [0074] - Mg^{2+} 를 4200 ppm 미만, 예컨대 4100 ppm 미만, 4000 ppm 미만, 3000 ppm 미만, 2000 ppm 미만 또는 1000 ppm 미만으로 함유하는 조성물.
- [0075] - Fe^{2+} 를 10 ppm 미만, 예컨대 8 ppm 미만, 6 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 조성물.
- [0076] - Mn^{2+} 를 6 ppm 미만, 예컨대 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 2 ppm 미만으로 함유하는 조성물.
- [0077] - Fe^{2+} 및 Mn^{2+} 의 총합을 16 ppm 미만, 예컨대 15 ppm 미만, 14 ppm 미만, 10 ppm 또는 7 ppm 미만으로 함유하는 조성물.
- [0078] - 2 가지 상이한 LAB 균주를 포함하는 조성물.
- [0079] - 2 가지 상이한 LAB 균주가 상이한 종에 속하는 것인 조성물.
- [0080] 네 번째 측면에서, 본 발명은 밀크 기질을 본 발명의 LAB, 본 발명의 균주/세포 또는 본 발명의 조성물과 함께 발효시키는 것을 포함하는, 발효유 제품/유제품의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0081] 여섯 번째 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 유제품, 예컨대 발효유 제품 (예컨대 요구르트 또는 버터밀크) 또는 치즈 (예컨대 프레쉬 치즈 또는 파스타 필라타)에 관한 것이다. 유제품은 선택적으로: 과일 농축물, 시럽, 프로바이오틱 세균 배양체, 색소, 농후제, 풍미제, 및 보존제 이루어진 군으로부터 선택되는 성분을 포함하고; 및/또는 선택적으로 교반형 제품, 세트형(set type) 제품 또는 음용가능한 제품의 형태이다.
- [0082] 또 다른 측면에서, 본 발명은 밀크 기질 내로 접종될 경우, 텍스처를 제공하는 LAB 균주를 제공하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은: i) LAB 균주 (모 균주)를 제공하는 단계, ii) 모 균주의 fur 유전자에 유전자 조작 또는 돌연변이 유발에 의해 돌연변이를 도입하는 단계, 및 iii) 모 균주에 비해 개선된 텍스처화 특성을 갖는 돌연변이주들을 스크리닝하는 단계를 포함한다.
- [0083] 본 발명의 그 밖의 흥미로운 측면들(청구범위 측면)을 이하에 정리하였다:

- [0084] 1. 철 이온 (예컨대 Fe²⁺)을 10 ppm (백만 분의 1, mg/Kg 건조 중량) 미만, 예컨대 9 ppm 미만, 8 ppm 미만, 6 ppm 미만 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 유산균 (LAB).
- [0085] 2. 망간 이온 (예컨대 Mn²⁺)을 6 ppm (백만 분의 1, mg/Kg 건조 중량) 미만, 예컨대 5.5 ppm 미만, 5.2 ppm, 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 2 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0086] 3. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe²⁺ 및 Mn²⁺의 총합을 15 ppm 미만, 14 ppm 미만, 13 ppm 미만, 10 ppm 또는 7 ppm 미만으로 함유하는 LAB.
- [0087] 4. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM)를 갖는 유산균 (LAB).
- [0088] 5. 교란된 2가 금속 이온 대사 (DMIM)를 갖는 유산균 (LAB).
- [0089] 6. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 감소된 DMIM인 것인 LAB
- [0090] 7. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *fur* 유전자의 변화된 발현, 예컨대 이 유전자의 (부분적 또는 완전한) 불활성화, 이 유전자 또는 그의 이부의 결실, 및/또는 부가적인 DNA의 이 유전자 내로의 삽입에 의해 야기되는 것인 LAB.
- [0091] 8. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 2가 금속 이온의 흡수와 관련된 유전자에서의 돌연변이, 예컨대 녹-아웃 돌연변이에 의해 야기되는 것인 LAB.
- [0092] 9. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *mntH* 유전자의 감소된 발현에 의해 야기되는 것인 LAB.
- [0093] 10. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 *fatc* 유전자 또는 철의 흡수에 관련된 임의의 다른 유전자의 감소된 발현에 의해 야기되는 것인 LAB.
- [0094] 11. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 교란된 DMIM은 텔루라이트에 대해 내성인 세균에 의해 야기되는 것인 LAB.
- [0095] 12. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Fe²⁺, Mg²⁺, 및 Mn²⁺로 이루어진 군, 중 기로는 Fe²⁺, 및 Mg²⁺로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 LAB.
- [0096] 13. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Fe²⁺인 것인 LAB.
- [0097] 14. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 2가 금속 이온은 Mn²⁺인 것인 LAB.
- [0098] 15. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 돌연변이 유발, 및/또는 유전자 조작에 의해 획득된 것인 LAB.
- [0099] 16. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe²⁺ 및 Mn²⁺로 이루어진 군으로부터 선택된 2가 금속 이온을 0.25 마이크로그램/그램 미만, 예컨대 0.2 µg/g 미만의 농도로 갖는 배지에서 성장시킴으로써 획득된 것인 LAB.
- [0100] 17. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 종에 속하는 것인 LAB.
- [0101] 18. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 종에 속하는 것인 LAB.
- [0102] 19. 군주 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)CHCC15712 (DSM25955), 또는 이 군주의 돌연변이주 또는 변이주, 예컨대 개선된 EPS 생성을 나타내는 돌연변이주 또는 변이주.
- [0103] 20. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 텔루라이트에 내성인 LAB.
- [0104] 21. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 스킵 밀크 1 ml 당 10E8 CFU로 접종시, 37°C에서 9.5% 재조성된 스킵 밀크에서 세균을 16시간 배양한 후 전단 응력으로서 측정시 밀크 내 점도가 약 50 Pa.s를 초과하는 (예컨대 60 또는 70 Pa.s 초과) 것인 LAB.
- [0105] 22. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 따른 LAB (유산균)을 포함하는 조성물.
- [0106] 23. 전술한 청구항 측면에 있어서, 스타터 겔체인 것인 조성물.

- [0107] 24. LAB을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 금속 이온 킬레이터, (예컨대 EDTA)를 종기로는 1 ppm 이상의 농도로 더 포함하는 것인 조성물.
- [0108] 25. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, mg 당 LAB를 적어도 $10E9$ CFU (세포 형성 단위)를 포함하는 것인 조성물.
- [0109] 26. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, mg 당 LAB를 적어도 $10E11$ CFU (세포 형성 단위)를 포함하는 것인 조성물.
- [0110] 27. 전술한 청구항 측면에 있어서, mg 당 LAB를 $10E10$ CFU 내지 $10E14$ CFU 포함하는 것인 조성물.
- [0111] 28. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 동결된 형태 또는 건조된 형태, 예컨대 동결-건조된 형태인 것인 조성물.
- [0112] 29. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe^{2+} 를 10 ppm 미만, 예컨대 9.5 ppm 미만, 9 ppm 미만, 8 ppm 미만, 6 ppm 미만, 또는 3 ppm 미만으로 함유하는 것인 조성물.
- [0113] 30. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, Mn^{2+} 를 6 ppm 미만, 예컨대 5.5 ppm 미만, 5.2 ppm 미만, 5 ppm 미만, 4 ppm 미만 또는 2 ppm 미만으로 함유하는 것인 조성물.
- [0114] 31. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, Fe^{2+} 및 Mn^{2+} 의 총합을 16 ppm 미만, 예컨대 15 ppm 미만, 14ppm 미만, 13ppm 미만, 10ppm 미만, 또는 7 ppm 미만으로 함유하는 것인 조성물.
- [0115] 32. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 상이한 적어도 2가지, 3가지, 적어도 5가지 또는 적어도 10가지의 LAB 균주를 함유하는 것인 조성물.
- [0116] 33. 전술한 청구항 측면에 있어서, 적어도 2가지 상이한 LAB 균주가 상이한 종에 속하는 것인 조성물.
- [0117] 34. 밀크 기질을 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 기재된 LAB, 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 기재된 균주, 또는 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 기재된 조성물에 의해 발효시키는 것을 포함하는, 유제품(예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법.
- [0118] 35. 유제품(예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법으로서, 상기 방법은 Fe^{2+} 농도가 $0.25 \mu g/g$ 미만(예컨대 $0.20 \mu g/g$ 미만 또는 $0.15 \mu g/g$ 미만)인 밀크 기질을 LAB, 예를 들어 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 기재된 LAB로 발효시키는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0119] 36. 유제품 (예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈)의 제조 방법으로서, 상기 방법은 Mn^{2+} 농도가 $0.025 \mu g/g$ 미만. $0.020 \mu g/g$ 미만 또는 $0.015 \mu g/g$ 미만)인 밀크 기질을 LAB, 예를 들어 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 기재된 LAB로 발효시키는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0120] 37. 유제품 (예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈)의 제조 방법으로서, 상기 방법은 활성 fur 단백질을 함유하지 않는 LAB로 밀크 기질을 발효시키는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0121] 38. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, LAB은 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 균주인 것인 방법.
- [0122] 39. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, LAB은 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 균주인 것인 방법.
- [0123] 40. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 수득가능한, 유제품, 예컨대 발효유 제품 (예컨대 발효유(예컨대 요구르트) 또는 치즈 예컨대 파스타 필라타 또는 프레쉬 치즈).
- [0124] 41. 전술한 청구항 측면에 있어서, 선택적으로: 과일 농축물, 시럽, 프로바이오틱 세균 배양체, 색소, 농후제, 풍미제, 및 보존제로 이루어진 군으로부터 선택된 성분들을 포함하거나; 및/또는 선택적으로 교반형 제품, 세트형 제품 또는 음용가능한 제품의 형태로 존재하는 것인 유제품.
- [0125] 45. 밀크 기질 내로 접종될 경우 텍스처를 제공하는 (또는 모 균주에 비해 증가된 텍스처를 제공하는) LAB 균주를 생산하는 방법으로서:
- [0126] - 유전자 조작 또는 돌연변이 유발에 의해 LAB 균주(모 균주)의 fur 유전자 내로 돌연변이를 도입하는 단계, 및

- [0127] - 모 균주에 비해 증가된 텍스처화 특성을 갖는 돌연변이주들을 스크리닝하는 단계
- [0128] 를 포함하는 것인 LAB 균주의 생산 방법.
- [0129] 46. LAB 균주 (EPS를 생산할 수 있는 균주임)의 EPS 생산을 개선시키기 위한 방법으로서, 상기 방법은: 상기 균주의 접종 전, 접종 동안 또는 접종 후에, 배지(예컨대 생산 배지 또는 밀크 기질)로부터 Fe^{2+} 이온을, 예컨대 금속 킬레이터의 첨가에 의해 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0130] 47. 전술한 청구항 측면에 있어서, 결과적인 배지는 Fe^{2+} 이온의 농도가 $0.25 \mu\text{g/g}$ 미만 (예컨대 $0.20 \mu\text{g/g}$ 미만 또는 $0.15 \mu\text{g/g}$ 미만)인 것인 방법.
- [0131] 48. LAB 균주의 EPS 생산을 향상시키기 위한 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은: 균주의 접종 전, 접종 동안 또는 접종 후, 배지로부터 Mn^{2+} 이온을 제거하는 것을 더 포함하는 방법.
- [0132] 49. LAB 균주의 EPS 생산을 향상시키기 위한 전술한 청구항 측면에 있어서, 결과적인 배지의 Mn^{2+} 농도는 $0.025 \mu\text{g/g}$ 미만(예컨대 $0.020 \mu\text{g/g}$ 미만 또는 $0.015 \mu\text{g/g}$ 미만)인 것인 방법.
- [0133] 50. 전술한 청구항 측면 중 어느 하나의 항에 있어서, 성장은 적어도 5 시간 동안 수행되는 것인 방법.
- [0134] 51. LAB 균주 (EPS를 생산할 수 있는 것임)의 생산 방법으로서, 상기 방법은: fur 유전자를 (부분적으로 또는 완전히) 불활성화시키는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0135] **정의**
- [0136] 본원에서, 용어 "유산균"(약칭: LAB)은 유산을 주로 생산되는 산으로 하여, 아세트산 및 프로피온산을 비롯한 산을 생성하면서 당을 발효시키는 그람-양성, 미세호기성(microaerophilic) 또는 혐기성(anaerobic) 세균을 가리킨다. 산업적으로 가장 유용한 유산균은 락토코커스 spp., 스트렙토코커스 spp., 락토바실러스 spp., 류코노스톡 spp., 슈도류코노스톡 spp., 페디오코커스 spp., 브레비박테리움 spp., 엔테로코커스 spp. 및 프로피오니박테리움 spp.를 포함하는 "락토바실라레스(Lactobacillales)"목에서 발견된다. 또한, 엄격한 혐기성 세균인 비피도박테리아, 즉 비피도박테리움 spp. rmfnqpd 속하는, 젖산을 생산하는 세균은 일반적으로 유산균 그룹에 포함된다. 이들은 종종 단독으로 또는 다른 유산균과 조합하여 식품 발효 배양물로서 사용된다. 락토바실러스 종 및 스트렙토코커스 써모필러스 종의 세균을 포함하는 유산균은 보통 유제품 산업에서 발효유 제품과 같은 유제품 생산을 위한 발효용기 또는 발효통(vat) 내로의 직접 접종을 위하여, 소위 "Direct Vat Set (DVS)" 컬처로서 또는 벌크 스타터 증식을 위해 냉동된 컬처 또는 동결건조된 컬처로서 공급된다. 이러한 컬처는 일반적으로 "스타터 컬처(starter cultures)" 또는 "스타터"로서 칭해진다. 어떤 유제품들은 또한 "벌크 스타터"도 사용하는데 여기서 컬처는 예를 들어 밀크에 접종되기 전에 온사이트(onsite) 증식된다.
- [0137] 본 발명의 문맥 상, "밀크 기질(milk substrate)"이라는 용어는 본 발명의 방법에 따라 발효될 수 있는 모든 원유 밀크 및/또는 가공된 밀크 재료일 수 있다. 따라서, 유용한 밀크 기질의 비제한적인 예로는 호울 밀크, 또는 저지방 밀크, 스킴밀크, 버터밀크, 재조성된 분유, 농축유, 건조유, 유청, 퍼미에이트(permeate), 락토스, 락토스를 결정화시켜 얻은 모액, 유청단백질 농축물, 또는 크림을 포함한 모든 밀크 또는 밀크 유사 제품의 용액/현탁액을 들 수 있다. 밀크 기질은 예컨대 실질적으로 순수한 포유동물 밀크로부터 유래한 것일 수도 있고, 또는 재조성된 분유로부터 유래한 것일 수도 있다. 종기로는, 밀크 기질 중 단백질의 적어도 일부는 카제인 또는 유청 단백질과 같이 밀크 중에서 자연발생하는 단백질인 것이 바람직하다. 그러나, 단백질의 일부는 밀크에서 자연발생하지 않는 단백질일 수도 있다. 발효에 앞서서, 본 발명이 속한 기술 분야에 알려진 방법에 따라 밀크 기질을 균질화시킨 다음 파스퇴르처리할 수 있다.
- [0138] "밀크(milk)"라는 용어는 소, 양, 염소, 버팔로 또는 낙타와 같은 여하한 모든 포유동물을 착유하여 수득되는 젖의 분비물로서 이해하여야 한다. 바람직한 구체예에서, 밀크는 우유이다. 밀크라는 용어는 또한 예컨대 두유와 같이, 식물성 물질로 만들어진 밀크도 포함한다. 밀크는 선택적으로 예컨대 산(예컨대 시트르산, 아세트산 또는 젖산)의 첨가에 의해 산성화되거나 엘르 들어 물과 혼합된다. 밀크는 원유일수도 있고 또는 예컨대 여과, 멸균, 파스퇴르화, 균질화 등에 의해 가공된 것일 수 있으며 또는 재조성된 건조 밀크일 수도 있다. 본 발명에 따른 "우유/소젖(bovine milk)"의 중요한 한 가지 예는 파스퇴르 처리된 우유이다. 밀크는 세균 접종 전, 접종 도중 및/또는 접종 후에 산성화, 혼합 또는 가공될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0139] 우유는 100 g 당 철을 약 0.03 mg의 농도 = $0.3 \mu\text{g/g}$ = 0.3 ppm의 농도로 함유한다.
- [0140] 우유는 100 g 당 망간을 약 $0.03 \mu\text{g/g}$ = 0.03 ppm의 농도로 함유한다.

- [0141] 본 발명의 문맥 상, "돌연변이주(mutant)"라는 용어는 예컨대 유전자 조작, 방사선 및/또는 화학물질 처리 수단, 및/또는 선택, 적응, 스크리닝 등에 의하여 본 발명의 균주로부터 유도된 균주인 것으로 이해되어야 한다. 이 용어는 또한 예컨대 파지 경화된 돌연변이주와 같이, 개선되거나 변경된 파지 내성을 갖는 돌연변이주도 포함한다. 돌연변이주는 기능적으로 동등한 돌연변이주, 예컨대, 모균주와 동등하거나 개선된 특성(예컨대, 수율, 점도, 겔 강성, 마우스 코팅, 풍미, 포스트 산성화, 산성화 속도 및/또는 파지 로버스트성)을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명의 문맥 상 본 발명의 돌연변이주는 종기로는 밀크 기질이 발효될 경우 점도 생성 및/또는 EPS 생산성 측면에서 동일 또는 개선된 특성을 갖는 돌연변이주인 것이 바람직하다. 이러한 돌연변이주 역시 본 발명의 일부이다. 특히, "돌연변이주"라는 용어는 본 발명의 균주를 에탄 메탄 설포네이트(EMS) 또는 N-메틸-N'-니트로N-니트로구아니딘(NTG)와 같은 화학적 돌연변이원, UV 광선을 이용한 처리와 같은 돌연변이 처리하여 얻어진 균주 또는 자연발생적인 돌연변이주를 가리킨다. 돌연변이주라는 용어는 또한 텔루라이트 내성 돌연변이주도 포함한다. 텔루라이트 내성 돌연변이주라는 용어는 0.1 mM K₂TeO₃을 함유하는 M17 한천 배지에서 성장(집락 형성)할 수 있는 돌연변이주로서 이해된다.
- [0142] 돌연변이주는 수회에 걸쳐 돌연변이 처리될 수 있으나 (일회 처리는 스크리닝/선택 단계를 수반하는 한번의 돌연변이 유발 단계이다), 종기로는 이러한 처리를 1000회 이하, 100회 이하, 20회 이하, 10회 이하 또는 5회 이하로 수행하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 바람직한 돌연변이주에서는 모균주에 비하여 세균 계능 중의 뉴클레오타이드 변경(예컨대 치환, 삽입 또는 이의 조합)은 % 미만, 1% 미만, 또는 0.1% 미만인 것이 좋다.
- [0143] 본 명세서에서, "변이주(variant)"라는 용어는 본 발명의 균주와 기능적으로 동등한 균주로서, 예컨대, 점도, 겔 강성, 마우스 코팅, 풍미, 포스트 산성화, 산성화 속도, 및/또는 파지 로버스트성의 측면에서 본 발명의 균주와 실질적으로 동등하거나 더욱 개선된 특성을 갖는 균주인 것으로 이해되어야 한다. 적절한 스크리닝 기술을 이용하여 동정될 수 있는 이러한 변이체는 본 발명의 일부이다.
- [0144] 유전자를 불활성화시킨다는 것은 그 유전자(프로코너 및 다른 조절 영역을 포함한다) 또는 그의 산물이 그의 활성을 (부분적으로 또는 완전히) 상실하는 방식으로 그 유전자를 변형시킨다는 의미이다. 예를 들어 불활성화는 유전자의 결실 (부분적 또는 완전히), 유전자의 돌연변이(예컨대 유전자 조작 또는 돌연변이 유발에 의한), 녹-아웃 돌연변이주의 제공, 프레임 쉬프트 도입, 예컨대 스톱 코돈의 삽입 등일 수 있다.
- [0145] 본 발명의 문맥상 (특히 첨부된 특허청구범위에서) "a" 및 "an" 및 "the" 및 유사한 용어는 달리 언급되거나, 문맥상 명백히 반대의 뜻을 가리키는 것이 아닌 한 단수와 복수를 모두 포괄하는 것이다. "포함하는", "갖는", "비롯하여", 및 "함유하는" 등의 용어는 달리 언급하지 않는 한 확장가능한(open-ended) 용어로서 이해되어야 한다 (즉, "...을 포함하나 이에 한정되지 않는"의 의미). 본 발명에서 어떤 값을 범위로 나타낼 경우, 달리 언급하지 않는 한 그 범위 내에 속하는 각각의 개별적인 값들도 모두 칭하여 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 이러한 각각의 분리된 개별적인 값들은 명세서에서 개별적으로 명시된 것처럼 이해되어야 한다. 본 발명에 설명된 모든 방법은 달리 언급하거나, 명백히 반대되는 문맥으로 이해되지 않는 한 여하한 적절한 순서로 수행되어도 무방하다. 모든 예시, 예시적인 언어 (예컨대 "...와 같은") 등의 용어는 단지 본 발명을 보다 잘 설명하기 위하여 사용된 용어일 뿐, 달리 주장되지 않는 한, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서에 사용된 어떠한 표현도 필수구성이 아닌 구성요소를 본 발명에 있어서 필수적인 것으로 이해되도록 해석되어서는 아니된다.

도면의 간단한 설명

- [0146] 도 1a는 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스 고르도니이(*Streptococcus gordonii*) 및 CHCC9844로부터의 Fur 박스의 정렬을 나타낸 도면이다. 세 가지 모든 균주에서 발견된 뉴클레오타이드는 적색으로, 바실러스(*Bacillus*)와 CHCC9844의 공유 부분은 녹색으로, CHCC9844와 *S. 고르도니이*(*S. gordonii*)의 공유 부분은 청색으로 나타냈다.
- 도 1b는 *S. 썬도필러스* CHCC9844의 *epsA* 유전자의 첫 번째 부분과 프로모터 영역을 나타낸 도면이다. 추정된 fur 박스는 청색으로 나타냈다. 프로모터 영역의 다른 특징을 도면에 나타냈다.
- 도 2는 텍스처화 돌연변이주 CHCC15712의 점도 시험을 나타낸 도면이다. 점도는 25 ml 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 계산함으로써 측정하였다. 그래프는 3회 측정 결과의 평균치를 나타낸다.
- 도 3은 M17 브로쓰에서 분비된 엑소다당류의 당당류 조성을 나타낸다. 단일 당당류의 농도를 ppm으로 표시하였다.

도 4는 돌연변이주 KA 509의 점도 시험을 나타낸다. 점도는 25 ml 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 계산함으로써 측정하였다. 그래프는 3회 측정 결과의 평균치를 나타낸다.

도 5는 CHCC9844로부터의 4 가지 텔루라이트 내성 돌연변이주의 점도 시험 결과를 나타낸 도면이다. 점도는 25 ml 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 초로 계산함으로써 측정하였다. 그래프는 3회 측정 결과의 평균치를 나타낸다.

도 6은 1 mM EDTA의 존재 또는 부재 하에서의 밀크에서의 점도 시험 결과를 나타낸다. 점도는 25 ml 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 초로 계산함으로써 측정하였다. 그래프는 3회 측정 결과의 평균치를 나타낸다.

도 7a, 7b 및 7c는 Fe, Mg, 및 Mn의 세포내 농도를 각각 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실험

실시예 1: 통상적인 돌연변이 유발에 의해 철 대사가 교란된 스트렙토코커스 써모필러스 돌연변이주의 단리

S. 써모필러스(*S. thermophilus*) CHCC15712를 엑소다당류 생산 균주 *S. 써모필러스*(*S. thermophilus*) CHCC9844의 돌연변이주로서 단리하였다. CHCC15712로 발효된 밀크는 요구르트 타입 제품의 텍스처화 특성과 관련된 것으로 믿어지는 두 가지 중요한 레올로지 파라미터인 겔 강성과 전단 응력 모두가 증가된 것으로 나타났다. 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 모니터링함으로써 측정되는 점도 역시도 증가하였다.

점도는 밀크를 1 ml 당 10E8 CFU로 접종시, 37℃에서 9.5% 재조성된 스킵 밀크에서 16 시간의 세균 성장에 의해 제조된 발효유 25 ml가 충전된 볼륨 피펫 25 ml로부터의 유출 시간을 모니터링함으로써 측정된다.

샘플의 레올로지 특성을 C25 동축 측정 시스템이 장착된 레오미터 (StressTech, Reologica Instruments, Sweden)에서 평가하였다. 점도 시험은 0.27 내지 300 1/s로 변화하는 전단 속도 하에 21 단계로 수행하였다. 전단 속도는 증가된 후 감소되었고 전단 응력 및 겔보기 점도의 상향 및 하향 곡선도 기록하였다. 지연 시간 및 통합 시간은 각각 5초 및 10초였다. 추가 분석을 위해 300 s⁻¹에서의 전단 응력을 선택하였다.

레오미터 결과는 CHCC15712의 전단 응력과 겔 강성도가 CHCC9844에 비해 20% 증가되었음을 보여주었다.

점도는 또한 25 ml 볼륨 피펫으로부터의 유출 시간을 계산하는 것에 의해서도 측정되었다. CHCC15712의 경우 야생형 균주 CHCC9844에 비해 9%의 점도 증가가 관찰되었다 (도 2 참조). 유출 시간은 35초에서 38초로 증가하였는데 이것은 9% 점도 증가에 관련된 것이다.

실시예 2: M17 브로쓰에서의 엑소다당류 생산

2 가지 균주 CHCC9844 및 CHCC15712를 1% 락토스를 함유하는 M17 브로쓰에서 37℃에서 16 시간 성장시켰다. 세포들을 원심분리에 의해 제거하고, 96% 트리클로로아세트산 용액(TCA)를 이용한 침전에 의해 단백질을 침전시키고 그 후 EPS를 96% 에탄올로 침전시킴으로써 EPS를 상등액으로부터 추출하였다. 이어서 4℃에서 적어도 24 시간 동안 Milli Q-water에 대해 EPS 샘플을 투석시켰다 (Slide-A-lyzer 투석 카세트, 0.5-3 ml, MWCO 10000, Thermo scientific). 이어서 4M TFA (트리플루오로아세트산)를 이용하여 EPS를 가수분해하고 조성물 및 단당류의 양을 HPLC로 분석하였다.

HPLC 분석 결과 CHCC9844 및 CHCC15712의 EPS에서 람노스, 갈락토사민, 갈락토스, 글루코스 및 만노스가 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 3 참조). 탄수화물 람노스, 갈락토사민, 갈락토스, 및 글루코스의 농도는 증가한 것으로 나타났다. 전체적으로 EPS 탄수화물은 13% (1868 ppm에서 2114 ppm으로) 증가하였다. 이 수치는 CHCC15712에 대해 측정된 점도 증가와 잘 관련되는 것이다 (실시예 1)

	람노스	갈락토사민	글루코사민	갈락토스	글루코스	만노스	총계
CHCC9844	174	238	28.7	421.4	511.35	495	1868
CHCC15712	210	305	17	482	597	502	2114

실시예 3: 텍스처 형성이 증가된 *GMO fur* 불활성화 돌연변이주

균주 KA509는 *fur* 유전자가 유전학적으로 불활성화된 CHCC9844의 돌연변이주이다. 이것은 CHCC9844 *fur* 유전자의 염기 2-385를 함유하는 내부 단편을 산생하는 플라스미드 벡터의 단회 크로스오버에 의해 수행된다. 얻어진 돌연변이주는 첫 번째 뉴클레오타이드 후에 485 bp 길이의 *fur* CDS (코돈 서열)이 삽입된 벡터를 갖는다. 이것

은 유전자의 파괴를 결과시켜 불활성화시킨다. 올바른 삽입 여부는 벡터에 위치하는 하나의 프라이머와 내부 단편의 *fur* 유전자 하류에 위치하는 하나의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 체크한다.

- [0160] 텍스처에 미치는 효과를 피펫 유출 시험을 이용하여 체크하였다. 야생형 균주 CHCC9844는 피펫 값이 24 ± 1 초인 반면 *fur* 돌연변이주는 38 ± 0 초였는데, 이는 58% 증가에 상응한다 (도 4).
- [0161] 유전자 발현에 미치는 *fur* 불활성화의 효과도 DNA 마이크로어레이를 이용하여 평가하였다. KA509에서 유전자 *fatABDC*는 CHCC9844 야생형 균주에 비해 4배 하향 조절되었다. KA509를 10 mM Fe²⁺ 존재하에 성장시킨 경우 *fat* 유전자 클러스터의 발현에는 실질적인 변화가 없었다. 이와반대로, 모균주 CHCC9844를 철 존재 하에 성장시킨 경우, *fatC* 및 *fatD* 유전자는 4배로 유도되었다.
- [0162] 실시예 4: 증가된 점도 파라미터와 함께 *S. 썬모필러스* CHCC9844로부터의 텔루라이트 내성 돌연변이주의 단리.
- [0163] CHCC9844로부터의 돌연변이주가 철 흡수와 관련된 유전자 발현 감소를 나타내었다는 본 발명자들의 발견에 기초하여, CHCC9844로부터 텔루라이트 내성 돌연변이주를 단리하였다.
- [0164] 이들 돌연변이주들을 0.1 mM K₂TeO₃을 함유하는 M17 한천 플레이트에서 직접 스크리닝하였다. 4 가지 돌연변이주가 정제되었는데 이는 안정한 텔루라이트 내성 표현형을 입증한다. 4 가지 CHCC9844 돌연변이주들을, 밀크 중 0.1 mM K₂TeO₃ 1%를 함유하는 M17 철야 배양체로부터 접종하고 37°C에서 24 시간 인큐베이션하였다. 이어서 25 ml 피펫으로부터의 유출 시간을 측정함으로써 발효유의 점도를 결정하였다. 유출 시간이 길수록 시험 배지의 점도는 더 높다: 각 균주에서 유출 시간은 3회 측정의 평균치를 나타낸다 (도 5 참조).
- [0165] 유출 시간 및 이에 의해 점도는 4 가지 텔루라이트 내성 돌연변이주에서 증가하였다. 돌연변이주 9844-K2에서 가장 높은 증가인 47% 증가가 측정되었다.
- [0166] 이러한 실험결과로부터, 텔루라이트 내성 돌연변이주의 단리에 의해, *eps* 양성 *S. 썬모필러스* 균주의 텍스처화 특성을 증가시키는 것이 가능하다는 것이 입증되었다.
- [0167] 실시예 5: 텍스처에 미치는 금속 킬레이터 (EDTA)의 첨가 효과
- [0168] 감소된 철 농도가 점도를 조절한다는 가설을 금속 킬레이터인 EDTA의 존재 하에 밀크를 산성화시킴으로써 시험하였다. EDTA의 첨가는 이용가능한 철의 양을 감소시킬 것이므로 증가된 텍스처를 결과시키는 EpsA의 억제-해제를 야기한다. 실제로 밀크에 1mM EDTA를 첨가하자 CHCC15712의 텍스처가 25% 증가한 것으로 관찰되었다 (도 6).
- [0169] 실시예 6: 2가 금속 이온의 함량을 측정하는 방법.
- [0170] Strains of 스트렙토코커스 썬모필러스 without a 교란된 2가 이온 대사의 교란이 없는 스트렙토코커스 썬모필러스 균주들을 세포내 2가 이온 농도의 함량에 대해 분석하였다.
- [0171] 세포내 이온 농도를 결정하기 위해 세포들을 M17-2% 락토스에서 밤새 성장시켰다.
- [0172] 5000 rpm에서 10분간 50 ml를 원심분리한 후, 세포들을 50 ml M17-2% 락토스 배지로 세척하였다. 모든 튜브를 5000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상등액을 폐기한 다음 세포들을 5 ml PBS 완충액 (Chelex로 밤새 처리, 1 리터 완충액 중 10 g)으로 세척하였다. 모든 튜브들을 5000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 5ml PBS 완충액으로 세척하고, 5000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 세척하고/1 ml PBS 완충액에 재현탁하여 2 ml 에펜도르프 튜브에 옮겼다. 이어서 튜브를 15,000 x g에서 15분간 원심분리하고 상등액을 가능한 많이 폐기하였다.
- [0173] 튜브를 RT(실온)에서 밤새 스피드백(speedvac)에서 건조하였다. 모든 펠렛들을 칭량하였다.
- [0174] 칭량 후, 펠렛들을 200 µL의 진한 (65%) 질산과 함께 0.1% Triton X-100을 첨가함으로써 가용화시키고, 95°C에서 튜브를 10분간 진탕시킨 다음 각 튜브를 20초간 보텍싱하였다.
- [0175] 보텍싱 후, 튜브를 15,000 x g로 5분간 원심분리하고 상등액을 새 튜브에서 꺼냈다.
- [0176] 샘플의 금속 이온 농도를 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)에 의해 결정하였다.
- [0177] 결과 (도 7a, 7b 및 7c 참조)를 세포의 건조 중량 1 kg 당 mg의 이온 농도로서 표현하였다. 따라서, 본 문맥 상, ppm (백만 분의 1)이라는 용어는 세포 매스 건조 중량 kg 당 mg 측정된 이온 mg으로서 이해되어야 한다.
- [0178] 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 좋은 방식을 포함하여, 본 발명의 바람직한 구체예들을 설명한다. 그러한 바람직한 구체예의 변형들은 전술한 설명을 읽으면 당업자에게 명확해질 것이다. 본 발명자들은 숙련된 기술자가 그러한 변형을 적절하게 사용할 것으로 기대하며, 본 발명자는 본 발명이 본원에 구체적으로

기재된 것과 다르게 실시되도록 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본 명세서에 첨부된 청구항에 열거된 주제의 모든 수정 및 등가물을 포함한다. 뿐만 아니라, 전술한 요소들의 모든 조합들과 이의 가능한 모든 조합 역시도, 본 명세서에 달리 언급되거나 명백히 모순되지 않는 한, 본원발명에 의해 포괄된다.

[0179] 기탁 및 전문가 솔루션

[0180] 균주 스트렙토코커스 쉐모필리스 CHCC15712를 2012년 4월 27일에 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany)에 수탁번호 DSM25955로 기탁하였다.

[0181] CHCC4895를 2007년 3월 29일에 DSMZ에 수탁번호 DSM19242로서 기탁하였다.

[0182] CHCC8833를 2006년 1월 11일에 DSMZ에 수탁번호 DSM17876로서 기탁하였다.

[0183] 기탁은 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 협약의 규정 하에 이루어졌다.

[0184] 본 출원인은 기탁된 미생물들의 시료가 본 출원인에 의하여 승인된 전문가에게만 분양될 것을 요구하는 바이다.

[0185] 참조문헌

[0186] Lin *et al.*, Microbiology (2011), 157, 419-429.

[0187] E.P. Skaar, PLoSPathog. (2010) Aug 12;6(8):e1000949.

[0188] Baichoo *et al.*, Molecular Microbiology (2002) 45 (6), 1613-1629.

[0189] Kosikowski, F.V. 및 Mistry, V.V., "Cheese 및 Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

[0190] Albert Saavedra *et al.*, 2013, Advanced Materials Research, 825, 115

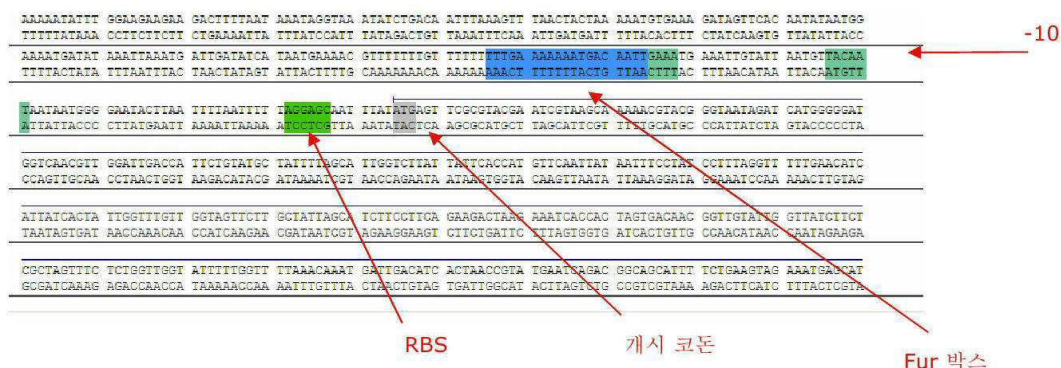
[0191] 이 건 출원명세서에 인용된 모든 참고문헌들은 그 내용 전체가 참조로 본 발명에 병합되었다.

도면

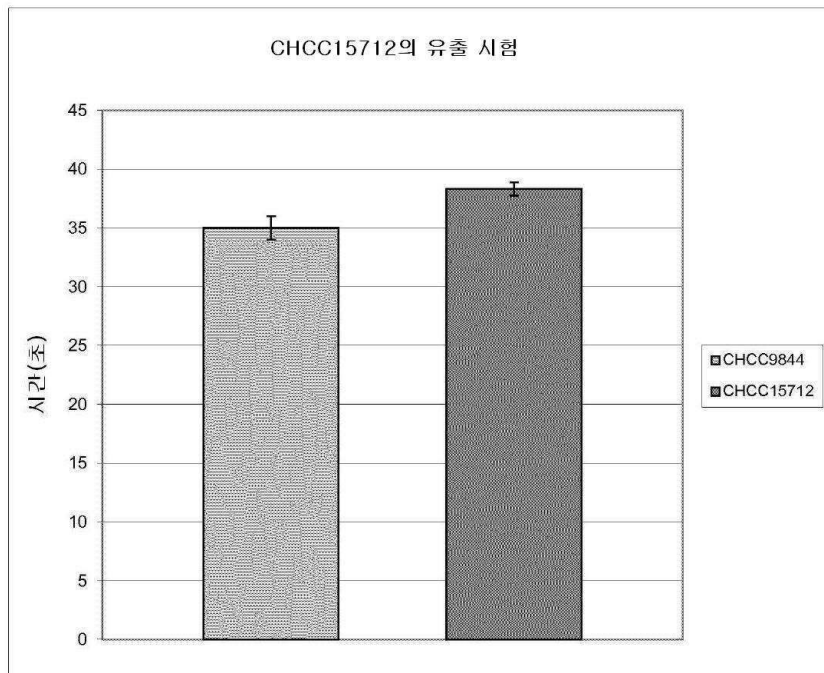
도면1a

FURBOX 바실러스	GATAATGATAATCATTATC
FURBOX S. 코르도니아	GCTATAGAAAATGATAGTT
FURBOX CHCC9844	TTTGAAAAAATGACAATT

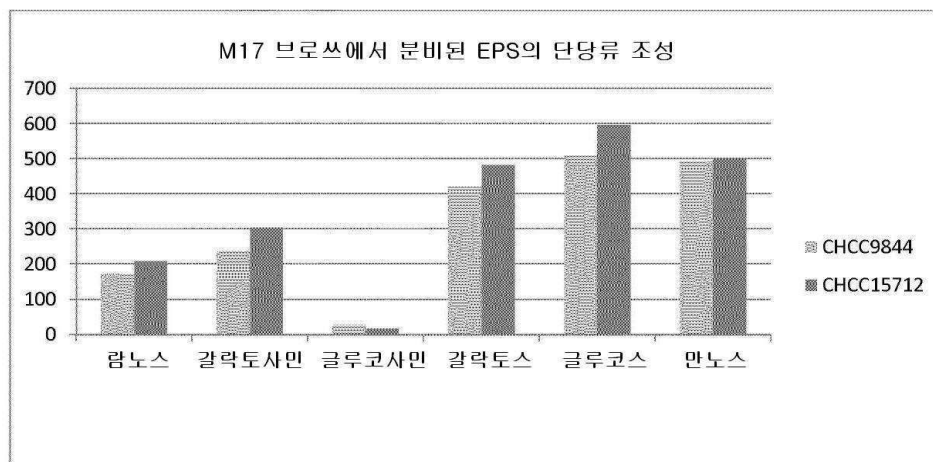
도면1b



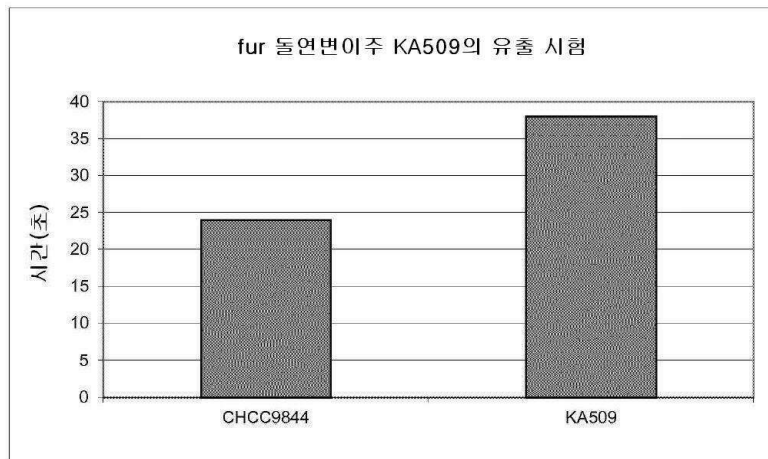
도면2



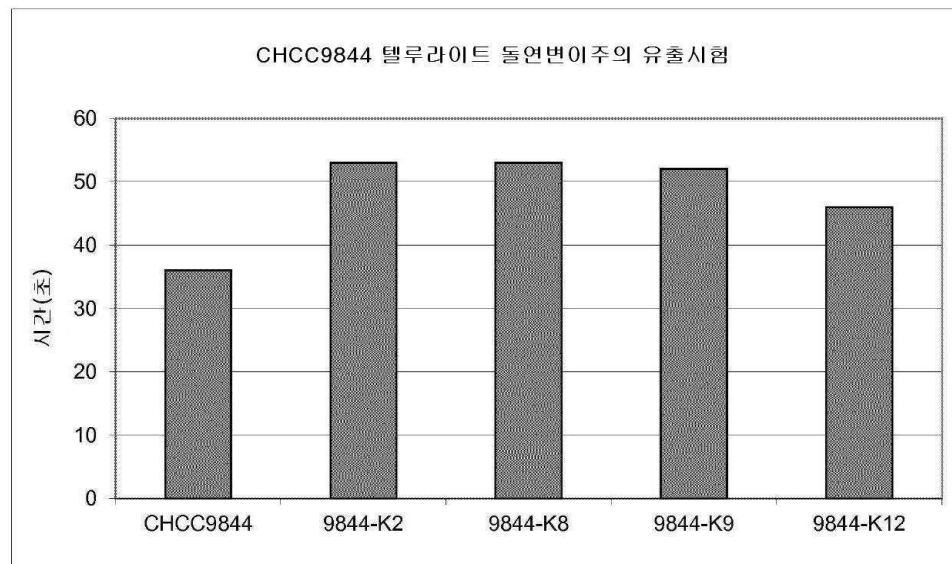
도면3



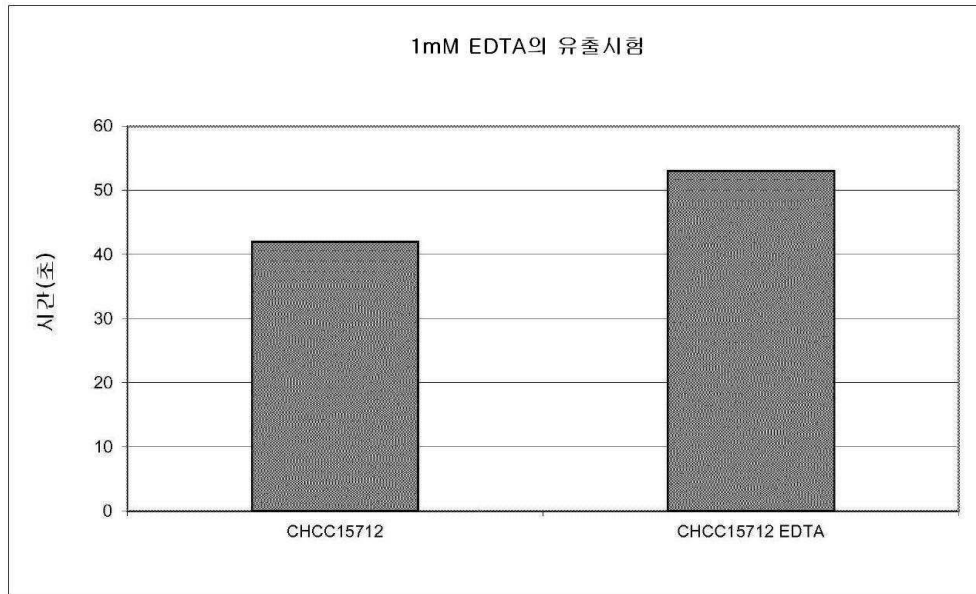
도면4



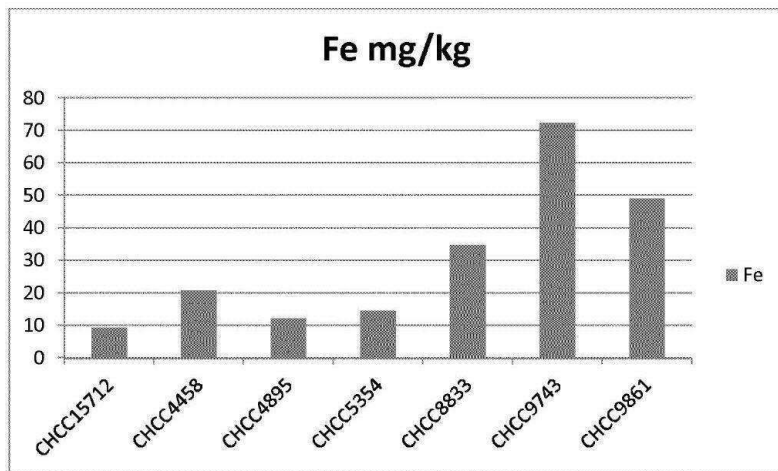
도면5



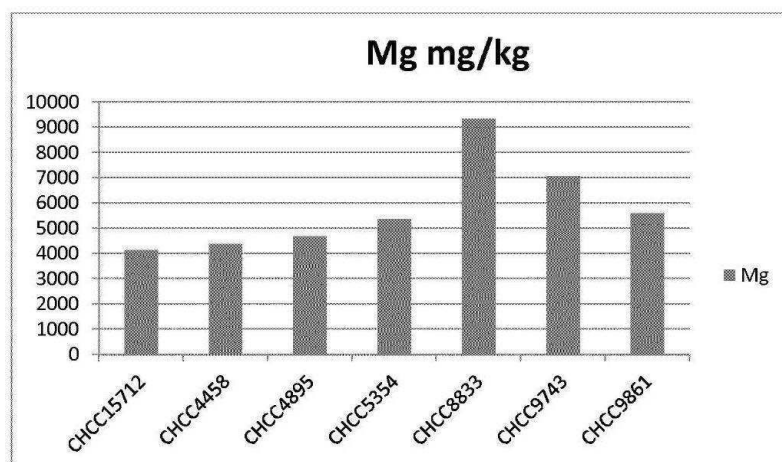
도면6



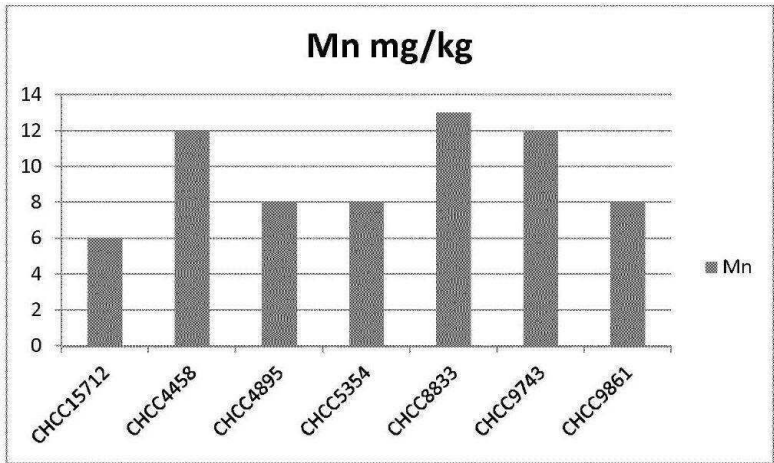
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Chr. Hansen A/S
<120> NEW BACTERIA
<140> EPPCT/EP2017/071352
<141> 2017-08-24
<160> 4
<170> BiSSAP 1.3.6
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Bacillus
<220>
<223> Fig 1a FURBOX Bacillus
<400> 1
gataatgata atcattatc
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptococcus gordonii
<220>
<223> Fig 1a FURBOX S. gordonii
<400> 2

gctatagaaa atgatatgtt 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Streptococcus thermophilus

<220>

<223> Fig 1a FURBOX CHCC9844

<400> 3

tttgaaaaaa atgacaatt 19

<210> 4

<211> 600

<212> DNA

<213> Streptococcus thermophilus

<220>

<223> Fig. 1 b

<400> 4

aaaaatattt ggaagaagaa gacttttaaat aaataggttaa atatctgaca atttaaagtt 60

taactactaa aaatgtgaaa gatagttcac aatataatgg aaaatgatat aaattaaatg 120

attgatatca taatgaaaac gtttttttgt ttttttttga aaaaaatgac aattgaaatg 180

aaattgtatt aatgttacaa taataatggg gaataacttaa ttttaatttt taggagcaat 240

ttatatgagt tcgcgtacga atcgtaagca aaaacgtacg ggtaatagat catgggggat 300

ggtcaacgtt ggattgacca ttctgtatgc tattttagca ttggctttat tattcaccat 360

gttcaattat aatttcctat ccttttaggtt tttgaacatc attatcacta ttggtttggt 420

ggtagttctt gctattagca tcttccttca gaagactaag aaatcaccac tagtgacaac 480

ggttgatttg gttatcttct cgctagtctt tctggttggt atttttgggt ttaaacaat 540

gattgacatc actaaccgta tgaatcagac ggcagcatct tctgaagtag aaatgagcat 600