



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 172 324** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК⁷ **C 07 K 14/195, C 12 N 15/10, 15/31, C 12 P 1/04/(C 12 P 1/04, C 12 R 1:265)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 96115457/13, 07.08.1996
(24) Дата начала действия патента: 07.08.1996
(30) Приоритет: 07.08.1995 EP 95810497.8
(43) Дата публикации заявки: 20.05.1999
(46) Дата публикации: 20.08.2001
(56) Ссылки: SU 877927, 15.08.1982. SU 896071, 07.01.1982. EP 0443543, 23.08.1991. WO 95/06736, 09.03.1995. WARD D.J. et al "Bacteriocin production in streptococcus thermophilis in "Abstracts of the annual meeting of the American society for microbiology", Washington, p.344, 05.19.1993
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Большая Спасская 25, стр.3, ООО "Городисский и Партнеры", Н.Г.Лебедевой

(71) Заявитель:
СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ С.А. (CH)
(72) Изобретатель: МОЛЛЕТ Бит (CH), ПИЛ Джон (GB), ПРИДМОР Дэвид (GB), РЕКХИФ Наджи (DZ), СУРИ Бруно (CH)
(73) Патентообладатель:
СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ С.А. (CH)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) БАКТЕРИОЦИН, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ШТАММ MICROCOCCUS VARIANS, НУКЛЕОТИДНЫЙ ФРАГМЕНТ, СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД

(57)
Изобретение относится к биотехнологии и касается бактериоцина из *Micrococcus varians*, нуклеотидного фрагмента, кодирующего бактериоцин, штаммов *Micrococcus varians* CNCM 1-1586 и CNCM 1-1587, продуцирующих указанный бактериоцин, а также способа получения

бактериоцина и его применения для получения пищевых продуктов и косметики в качестве агента, активного против патогенов. Бактериоцин настоящего изобретения обладает мощным бактерицидным эффектом, а также имеет более широкий спектр ингибирования различных бактериальных штаммов. 6 с. и 8 з.п. ф-лы, 11 табл.

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

RU ? 1 7 2 3 2 4 C 2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 172 324** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 14/195, C 12 N 15/10, 15/31, C 12 P 1/04/(C 12 P 1/04, C 12 R 1:265)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96115457/13, 07.08.1996

(24) Effective date for property rights: 07.08.1996

(30) Priority: 07.08.1995 EP 95810497.8

(43) Application published: 20.05.1999

(46) Date of publication: 20.08.2001

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja 25,
str.3, OOO "Gorodisskij i Partnery", N.G.Lebedevoj

(71) Applicant:
SOS'ETE DE PRODUIT NESTLE S.A. (CH)

(72) Inventor: MOLLET Bit (CH),
PIL Dzhon (GB), PRIDMOR Dehvid
(GB), REKKHIF Nadzhi (DZ), SURI Bruno (CH)

(73) Proprietor:
SOS'ETE DE PRODUIT NESTLE S.A. (CH)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) BACTERIOCIN, METHOD OF ITS PREPARING, STRAIN MICROCOCCUS VARIANS, NUCLEOTIDE FRAGMENT, SIGNAL PEPTIDE

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology, microbiology, molecular biology. SUBSTANCE: invention relates to bactericin from Micrococcus varians, nucleotide fragment encoding bactericin, strains Micrococcus varians CNCM 1-1586 and CNCM 1-1587 producing indicated bactericin and to method of preparing

bacteriocin and its using for preparing foodstuffs and cosmetic products as an agent showing activity against pathogens. This bacteriocin shows potent bactericidal effect and the more broad spectrum of inhibition of different bacterial strains. EFFECT: improved method of preparing, enhanced effectiveness of agent. 14 cl, 11 tbl

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

Изобретение относится к бактериоцину, к штамму, который продуцирует упомянутый бактериоцин, к способу получения бактериоцина и к применению такого бактериоцина и/или штамма, продуцирующего упомянутый бактериоцин, в производстве пищевых продуктов и косметики.

Бактериоцины выделены из многочисленных грам-положительных и грам-отрицательных бактерий. Бактериоцины представляют собой молекулы, по своей природе напоминающие белок, которые обладают бактерицидным эффектом, и по этой причине бактериоцин вызывает антагонистическую реакцию между бактерией, его продуцирующей, и другими, одним или более видами бактерий. Кроме того, спектр ингибирования бактериоцина зачастую ограничен видами, близкими к тому штамму, который его продуцирует.

Бактериоцины были, в частности, обнаружены в молочнокислых бактериях. Например, в патенте EP 0643136 (Societe des produits Nestle) описывается идентификация двух бактериоцинов из *Streptococcus thermophilus*. Сходным образом был выделен бактериоцин из *Lactobacillus lactis* (App. and Env. Microbiol., 1992, 58, 279-284; J. of Biol. Chem., 1993, 268, 16361-16368).

Однако к настоящему времени не известен бактериоцин, полученный из *Micrococcus varians*. *Micrococcus varians* в настоящее время широко применяется в производстве пищевых продуктов, в частности при ферментации мяса с целью получения деликатесных продуктов, таких как салями и другие колбасы. В этой связи очень важно иметь доступный продуцирующий бактериоцин штамм этой бактерии для того, чтобы бороться против патогенов.

Настоящее изобретение направлено на решение этой проблемы.

Описываемый в настоящем изобретении бактериоцин представляет собой бактериоцин из *Micrococcus varians*, при этом упомянутый бактериоцин представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID No: 1 или любую аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности SEQ ID No: 1 одним замещением, одной делецией и/или одной вставкой от 1 до 4 аминокислот.

Кроме того, любой нуклеотидный фрагмент, кодирующий указанный бактериоцин, в частности, нуклеотидный фрагмент, представленный последовательностью SEQ ID No: 2, также входит в рамки настоящего изобретения.

Описываемый в настоящем изобретении штамм относится также к штамму *Micrococcus varians*, который продуцирует указанный бактериоцин, в частности к штаммам CNCM I-1586 и CNCM I-1587 *Micrococcus varians*.

По способу получения бактериоцина в соответствии с настоящим изобретением штамм *Micrococcus varians*, который продуцирует бактериоцин, в частности, штамм CNCM I-1586 или штамм CNCM I-1587, культивируют в подходящей для роста микроорганизма среде с соблюдением благоприятных условий, позволяющих получить культуральную среду, содержащую от 10^7 до 10^{11} организмов нужного штамма на миллилитр, после чего культуральную среду центрифугируют, а экстракт супернатанта,

содержащий бактериоцин, используют для дальнейших стадий получения препарата. И, наконец, в настоящем изобретении описывается применение бактериоцина из *Micrococcus varians*, которое включает применение его нуклеотидной последовательности, равно, как и сигнальной последовательности, экстракта супернатанта, содержащего бактериоцин, а также штамма *Micrococcus varians*, который продуцирует бактериоцин, в производстве пищевых продуктов, косметики и фармацевтических продуктов для использования в области дерматологии и в гигиене полости рта.

В приведенном ниже описании изобретения бактериоцин обозначается термином "вариации".

В рамках настоящего изобретения условная единица (ye) определяется как величина, обратная наибольшему разбавлению, при котором образец все еще проявляет бактерицидный эффект в тесте, который каждому специалисту в данной области известен как "агаровый тест".

В рамках настоящего изобретения термин "фрагмент" или "фрагмент ДНК" следует понимать как фрагмент одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, который частично или полностью является кодирующим и который может быть синтезирован, реплицирован *in vitro* с помощью, например, известного метода полимеразно-цепевой реакции, или реплицирован *in vivo* в бактерии, например, типа *Escherichia coli*.

В рамках настоящего изобретения термин "гомологичный фрагмент" следует понимать как любой фрагмент, который отличается от фрагментов настоящего изобретения замещением, делецией или вставкой небольшого числа оснований. В контексте настоящего изобретения два фрагмента ДНК, которые кодируют один и тот же полипептид, в связи с дегенерацией генетического кода будут рассматриваться как гомологичные. В качестве гомологичного фрагмента рассматривается также фрагмент, который проявляет более 80% гомологии с фрагментом настоящего изобретения. В последнем случае гомология определяется по соотношению между количеством оснований в гомологичном фрагменте и их количеством в фрагменте настоящего изобретения.

И, наконец, в рамках настоящего изобретения термин "фрагмент, который гибридизируется" следует понимать как любой фрагмент, который способен к гибридизации с фрагментами настоящего изобретения по методу Саузерн-Блоттинга (Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989, chapter 9.31 to 9.58). Предпочтительно гибридизация выполняется в условиях, достаточно строгих, для того, чтобы избежать неспецифической гибридизации или гибридизации, которая оказывается относительно нестабильной.

Протеиноподобный фактор, в настоящем случае бактериоцин, обладающий мощным бактерицидным эффектом, был выделен из штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587. Бактериоцин, который был выделен из *Micrococcus varians* и который, следовательно, представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 1,

приведенной в перечне последовательностей ниже, был назван вариацином.

В связи со свойствами вариацина, настоящее изобретение относится к любому бактериоцину, который имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID No: 1 одним замещением, одной делецией и/или одной вставкой от 1 до 4 аминокислот. Таким образом, упомянутый бактериоцин, который имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности SEQ ID No: 1 одним замещением, одной делецией и/или одной вставкой от 1 до 4 аминокислот, может иметь более широкий спектр ингибирования для бактериального рода или для бактериальных штаммов, чем, например, упомянутый вариацин.

Представляется также возможным провести селекцию хромосомного нуклеотидного фрагмента, кодирующего вариации настоящего изобретения, из двух штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587. Оба упомянутых фрагмента описываются последовательностью SEQ ID No: 2, приведенной ниже в списке последовательностей.

Интерес настоящего изобретения представляет также любой нуклеотидный фрагмент, кодирующий вариацин настоящего изобретения, в частности, нуклеотидные фрагменты, которые являются гомологичными к последовательности SEQ ID No: 2 или гибридизируются с ней.

В частности, настоящее изобретение относится к нуклеотидам с 88 по 153 в последовательности SEQ ID No: 2, которые кодируют сигнальный пептид вариацина, к нуклеотидам от 154 до 228 в последовательности SEQ ID No: 2, кодирующим секретлируемый вариацин настоящего изобретения, и/или к нуклеотидам с 88 по 228 в последовательности SEQ ID No: 2, кодирующим бактериоцин, слитый с сигнальным пептидом.

Фрагмент, кодирующий секретлируемый вариацин, может быть использован для экспрессии вариацина настоящего изобретения в тех или иных микроорганизмах, отличных от *Micrococcus varians*. В этом случае нуклеотиды от 154 до 228 в последовательности SEQ ID No: 2 могут быть клонированы в вектор экспрессии справа от промотора или от сигнальной последовательности и слева от терминатора, учитывая рамку считывания, и затем упомянутый вектор может быть введен в растение, бактерию или дрожжи с тем, чтобы увеличить спектр ингибирования, включив в него, например, определенные бактерии.

Можно добиться использования сигнальной последовательности настоящего изобретения путем слияния участка с 88 по 153 нуклеотидов в последовательности SEQ ID No: 2 с интересующим геном, учитывая рамку считывания, и затем клонирования его целиком в вектор экспрессии *Micrococcus varians* так, чтобы позволить белку, кодируемому упомянутым интересующим геном, экспрессироваться и секретироваться, например, в *Micrococcus varians*.

Нуклеотиды с 88 по 228 в последовательности SEQ ID No: 2 могут быть клонированы в вектор экспрессии *Micrococcus varians* и введены затем в другой штамм

Micrococcus varians, так что последний указанный штамм начинает продуцировать вариацин настоящего изобретения.

Кроме того, штамм *Micrococcus varians*, который содержит либо интегрированный в свой геном, либо через участие вектора экспрессии фрагмент ДНК, кодирующий вариации настоящего изобретения, является частью настоящего изобретения. В частности, штаммы *Micrococcus varians*, депонированные 7 июня 1995 г. в соответствии с Будапештским договором, в Национальной коллекции культур микроорганизмов. Институт Пастера, Париж, Франция (Collection National de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, France), где они получили депозитные номера CNCM I-1586 и CNCM I-1587, являются частью настоящего изобретения.

Бактерии *Micrococcus varians* представляют собой грам-положительные и положительные на каталазу аэробные бактерии, являющиеся постоянно иммобилизованными. Они имеют сферическую форму и встречаются в виде тетрад, хаотично сгруппированных.

Колонии *Micrococcus varians* на BH1 среде (с сердечно-мозговой вытяжкой) окрашены в желтый цвет. Оптимальная температура для роста указанных штаммов составляет 25-37 °C.

Штаммы CNCM I-1586 и CNCM I-1587, охватываемые настоящим изобретением, метаболизируют и глюкозу, и фруктозу. А штамм CNCM I-1587 метаболизирует также сахарозу и фуранозу.

Кроме того, штамм CNCM I-1586 несет две плазмиды с размерами 4 и 12 т.п. н., тогда как штамм CNCM I-1587 имеет единственную плазмиду размером 7 т.п. н.

Культуральные супернатанты штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587 демонстрируют сравнительно широкий спектр ингибирования роста других бактерий, среди которых можно упомянуть, например, следующие: *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 curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* subsp. *faecalis*, споры и вегетативные клетки *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polyoxyxa*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus liqueniformis* и *Clostridia*.

Предпочтительно, по способу получения вариацина, штамм *Micrococcus varians*, продуцирующий вариацин, культивируют в среде и в условиях, благоприятных для его роста, с тем чтобы получать культуральную среду, содержащую от 10⁷ до 10¹⁰ организмов упомянутого штамма на миллилитр, после чего полученную культуру центрифугируют, а экстракт супернатанта, содержащий описываемый бактериоцин, подвергают дальнейшей обработке.

Для получения указанного экстракта штамм *Micrococcus varians* настоящего

изобретения, продуцирующий вариацин, в частности штамм CNCM I- 1586 или штамм CNCM I-1587, может культивироваться в той среде и с соблюдением тех условий, которые благоприятны для роста *Micrococcus varians*. В этом случае культивирование может осуществляться в ВНИ среде при температуре 25-37°C в аэробных условиях на качалке, до получения нужной концентрации организмов, например, от 10^7 до 10^{11} на миллилитр среды. Полученную стандартную культуру затем центрифугируют при 4000 - 6000 g, а экстракт супернатанта, содержащий описываемый бактериоцин, собирают.

Настоящее изобретение относится также к использованию вариацина, в частности, в форме экстракта, или к использованию штамма *Micrococcus varians*, который продуцирует упомянутый бактериоцин, для производства пищевых и косметических продуктов.

Культура одного из упомянутых штаммов *Micrococcus varians* настоящего изобретения может быть, в частности, использована при ферментации фарша для приготовления салями, а также для борьбы с заражением, например, клостридиями.

Вариацин в виде неочищенного экстракта или в очищенном виде может использоваться при добавлении к закваске, которую получают при использовании бактерий, устойчивых к упомянутому вариацину, в процессе приготовления сыров, таких, как сыры типа моццарелла, для того, чтобы избежать появления в сырах глазков, продуцируемых *Bacillus rooumpha*, споры которого выживают в процессе ферментации, и типа вахерина для того, чтобы бороться с загрязнениями, вызванными, например, *Listeria monocytogenes*.

Вариацин в грубом экстракте или в очищенной форме, или один из двух продуцирующих его штаммов может использоваться как добавка или агент, активные против патогенных бактерий, для получения десертных муссов, таких, как пастеризованные кремы, с тем, чтобы препятствовать росту спор таких микроорганизмов, как *Clostridia* и *Bacillus cereus*, или росту таких бактериальных штаммов, как *Listeria*.

Кроме того, вариацин в грубом экстракте или в очищенном виде или один из двух вышеуказанных штаммов могут использоваться как добавка или как агент, активные против патогенных бактерий, для изготовления косметических продуктов таких, как увлажняющие кремы или дезодоранты с тем, чтобы бороться с патогенными бактериями, загрязняющими в данном случае кожу.

Вариацин настоящего изобретения более подробно описывается ниже с помощью различных микробиологических, биохимических и генетических данных, которые иллюстрируют его свойства. Приведенные проценты являются весовыми процентами.

Единица бактериальной активности - "агаровый тест".

В контексте настоящего изобретения бактерицидная активность определяется в терминах условных единиц.

Супернатант стандартной культуры *Micrococcus varians* настоящего изобретения,

приготовленный в условиях, описанных например, в примере 1, имеет в типичном случае активность 640 уе/мл. Аналогично концентрат упомянутого супернатанта, который получают в условиях, описанных, например, в примере 2, имеет обычно активность 24000 уе/мл.

Упомянутый агаровый тест используют для определения наличия у образца при данном значении разбавления бактерицидной активности.

Для проведения этого теста 15 мл MRS агаровой среды, содержащей индикаторный штамм в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, наносят на чашку Петри. Штамм, чувствительный к вариацину, в настоящем случае, *Lactobacillus bulgaricus* (YL 5) или штамм *Lactobacillus helveticus* (N2), используется как индикаторный штамм.

В культуральной среде делают отверстия диаметром 5 мм. Исследуемые образцы супернатанта или концентрата супернатанта вливают в указанные отверстия в количестве 50 Mиди на отверстие. Чашки ставят на предварительную инкубацию при 4°C в течение 2 часов и затем инкубируют в течение ночи при температуре 30°C или 37°C, в зависимости от вида индикаторного штамма. После окончания роста индикаторного штамма становятся видимыми ореолы ингибирования. Величина разбавления, при котором образец больше не проявляет бактерицидной активности, представляет собой значение разбавления, начиная с которого ореол ингибирования уже больше не просматривается.

Инактивация ферментами

Упомянутый агаровый тест используется для определения того, инактивируется ли вариацин, выделенный в соответствии с настоящим изобретением, в присутствии протеолитического фермента или в присутствии каталазы.

Для того, чтобы провести такой тест, со скоростью 5 мг/мл к концентрату культурального супернатанта, описанному в примере 2, добавляют фермент. Создают условия для действия фермента при температуре инкубации в течение 60 минут перед помещением образца в агаровую лунку.

Параллельно готовят контроль с использованием того же концентрата при pH 7 и без добавления фермента. Контрольный образец инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут перед помещением его в агаровую лунку для тестирования с целью сравнения ореола ингибирования, полученного в присутствии фермента, с ореолом ингибирования в контроле. Диаметр контрольного ореола ингибирования составляет 27 мм.

В табл. 1 приведены результаты, полученные с ферментами, которые исследовали с использованием индикаторного штамма *Lactobacillus helveticus* (N2). В указанной таблице, как и в табл. II, фермент обозначается по его типу, названию поставщика и номера в каталоге поставщика. Число 0 указывает на отсутствие ореола ингибирования, другими словами, что бактерицидный эффект бактериоцина подавляется инкубированием последнего с ферментом. Число 27 указывает на то, что имеется ореол ингибирования размером 27 мм, соответствующий

бактерицидной активности вариацина.

В табл. II приведены результаты, которые были получены для ферментов, исследованных с использованием индикаторного штамма *Lactobacillus bulgaricus* (YL 5).

Результаты, приведенные в табл. I и II, показывают, что все протеолитические ферменты подавляют бактерицидную активность вариацина. Они свидетельствуют о том, что вариацин по своей природе представляет белковоподобное вещество и что эта протеиноподобная часть участвует в осуществлении бактерицидной активности.

Факт отсутствия, по результатам исследований, воздействия каталазы на бактерицидную активность вариацина указывает на то, что ингибирование роста двух индикаторных штаммов происходит не вследствие антибактериальной активности H_2O_2 , сходной с активностью бактериоцинов, поскольку H_2O_2 подверглась бы деградации каталазой.

Спектр ингибирования культурального супернатанта, содержащего вариацин

Был применен агаровый тест для того, чтобы определить, является ли антибактериальная активность культурального супернатанта, содержащего вариацин настоящего изобретения, ингибирующей активностью в отношении роста различных штаммов спор и бактерий. Таким образом был определен спектр ингибирования супернатанта.

Для проведения указанных тестов 15 мл стандартной среды, содержащей 15 мкл инокулята исследуемой культуры, которая была получена в ходе ночного культивирования накануне, наносят на чашки Петри с таким расчетом, чтобы получить бактериальную концентрацию в диапазоне 10^5 - 10^6 на 1 мл стандартной среды. При этом под стандартной средой понимается среда, благоприятная для роста исследуемого штамма. Если исследуемый штамм происходит из спор, их рост осуществляют в покрывающей среде в количестве 10^5 - 10^6 спор на 1 мл среды.

В каждой чашке Петри делают отверстия диаметром по 5 мм. По методу, приведенному в примере 1, в каждую из них вносят образцы культурального супернатанта по 50 мкл. Чашки ставят на предварительную инкубацию при температуре 4°C в течение 2 часов и затем инкубируют при температуре, благоприятной для роста исследуемого штамма в условиях теста в течение времени, необходимого для того, чтобы покрыть чашку видимым бактериальным газоном.

Эффект или степень ингибирования оценивается по диаметру наблюдаемого ореола ингибирования. Ингибирование оценивается как очень сильное (++++), если упомянутый ореол имеет диаметр 18-28 мм, сильное (+++), если ореол имеет диаметр 10-17 мм, среднее (++) , если диаметр составляет 5-9 мм, слабое (+), если диаметр равен 1-4 мм, и нулевое (-), если ореол ингибирования не обнаруживается.

Указанным способом были исследованы 32 штамма различных видов и подвидов молочнокислых бактерий, и ни один из них не проявил устойчивость к супернатанту. В табл. III приведены более подробные результаты

проведенного исследования. В ней, как и в последующих таблицах, обозначение штамма или его номер относятся к номерам, присвоенным данному штамму в Коллекции микроорганизмов Нестле в Швейцарии (Nestle Collection; Адрес: NESTEC S.A. Centre de Recherche, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland). Указанная в таблице температура означает температуру инкубации в рамках теста. А указанная среда означает стандартную среду, благоприятную для роста исследуемого штамма.

Из данных табл. III видно, что спектр ингибирования супернатантом достаточно широк, поскольку уровень ингибирования имеет примерно одинаковую степень выраженности у различных исследованных видов.

Спектр ингибирования культурального супернатанта, продуцирующего вариацин настоящего изобретения также рассматривается как широкий, поскольку он не ограничивается видами молочнокислых бактерий, а включает, как видно из представленных в табл. IV результатов, также другие виды грам-положительных бактерий, в частности, нежелательные или патогенные бактерии, такие, как *Listeria innocua*, *Listeria welshia*, *Listeria monocytogenes* и споры, например *Bacilli*, как видно из табл. IV.

Приведенные в табл. IV результаты позволяют предположить возможность использования описываемого супернатанта или очищенного вариацина как добавку при изготовлении пищевых продуктов, которая будет выполнять роль агента, активного против патогенных бактерий, в частности, против *Clostridia*, в мясных продуктах, против *Listeria monocytogenes* в сырах, против *Bacillus cereus* и *Listeria* в десертных муссах, или против *Bacilli* в свежих паштетах или соусах для свежих паштетов, от которых произошли указанные штаммы бактерий.

И, наконец, как можно видеть из результатов, приведенных в табл. V, вариацин не оказывает какого-либо ингибирующего эффекта на рост грам-отрицательных бактерий.

Спектр ингибирования концентрата супернатанта, содержащего вариацин

Процедура совпадает с описанным выше методом, за исключением того, что определяют ингибирующий эффект концентрата супернатанта, полученного по методу примера 2, на рост различных штаммов спор и бактерий.

Исследуют те же виды и подвиды, что и ранее. Результаты тестов приведены в табл. VI, VII и VIII. Указанное обозначение штамма или его номер соответствуют номеру, присвоенному данному штамму в Коллекции микроорганизмов Нестле, Швейцария (Nestle, Адрес: NESTEC S.A. Centre de Recherche, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland). Указанная температура относится к температуре инкубации, поддерживаемой в ходе тестирования. Указанная в таблицах среда относится к стандартной среде, благоприятной для роста исследуемого штамма.

Результаты, приведенные в табл. VI, VII и VIII, свидетельствуют о повышенной эффективности концентрата супернатанта по сравнению с супернатантом при

ингибировании роста многих исследованных штаммов. При этом спектр ингибирования отмечается для тех же видов и подвидов, но характеризуется большим уровнем ингибирования.

Приведенные данные позволяют предположить целесообразность получения, по методу примера 2, концентрата супернатанта, содержащего вариацин, и его применения для борьбы против патогенных бактерий при приготовлении, например, пищевых продуктов и косметики.

Устойчивость к pH

Для определения того, является ли вариацин, выделенный по способу настоящего изобретения, pH-зависимым, применяют также агаровый тест.

В этом случае на агар наносят индикаторный штамм с соблюдением всех условий, описанных в разделе "агаровый тест". В качестве индикаторного штамма используют *Lactobacillus helveticus* (N2).

pH экстракта концентрата культурального супернатанта, описанного в примере 2, доводят до значения от 2 до 10 с по мощью 2н NaOH и/или 2н HCL, экстракт инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут, после чего значение pH вновь доводят до 6-7, и затем в агаровую лунку вносят образец экстракта для проведения агарового теста.

Параллельно проводят исследование контроля с использованием того же концентрата супернатанта при pH 7, который инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут и затем контрольный образец вносят в агаровую лунку с тем, чтобы сравнить зоны ингибирования исследуемых образцов и контроля. Диаметр зоны подавления контроля составляет 27 мм.

В табл. IX, а также в табл. X и XI число 27 указывает на наличие зоны ингибирования размером 27 мм, что свидетельствует о полной бактерицидной активности вариацина.

Приведенные в табл. IX результаты показывают, что бактерицидная активность бактериоцина не подавляется. Поэтому можно сделать вывод о том, что бактерицидная активность вариацина не зависит от pH.

Устойчивость к нагреванию

Для определения того, является ли вариацин, выделенный по способу настоящего изобретения, температурозависимым, применяют также агаровый тест.

В этом случае на агаре выращивают индикаторный штамм, с соблюдением всех условий, описанных в разделе "агаровый тест". В качестве индикаторного штамма используют *Lactobacillus helveticus* (N2).

Экстракт концентрата культурального супернатанта, описанного в примере 2, доведенный до pH 7, инкубируют при температуре 100°C в течение периода времени от 15 до 60 минут, после чего значение pH доводят до 6-7 и затем в агаровую лунку вносят образец экстракта для проведения агарового теста.

Параллельно проводят исследование контроля с использованием того же концентрата супернатанта при pH 7, который также инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут и затем в агаровую лунку вносят контрольный образец. Проведенные процедуры позволяют провести сравнение

зон подавления исследуемых образцов с зоной контроля. Диаметр зоны ингибирования контроля составляет 27 мм.

Приведенные в табл. X данные указывают на то, что активность вариацина не зависит от температуры. Так, бактерицидная активность вариацина не подавляется даже после 60-минутной инкубации при температуре 100°C.

Устойчивость вариацина к нагреванию является весьма важной его биохимической характеристикой, которая имеет значение для использования его при получении пищевых продуктов и косметики. Так, вариации можно использовать в виде грубого экстракта или в очищенном виде при получении, например, пастеризованных пищевых продуктов, с тем, чтобы предохранить их от прорастания спор, в частности *Bacilli*, которые являются термотолерантными.

Устойчивость к нагреванию и pH

Активность вариацина исследуют, кроме того, при сочетании воздействия двух факторов: pH и температуры.

В этом случае на агаре выращивают индикаторный штамм, с соблюдением всех условий, описанных в разделе "агаровый тест". В качестве индикаторного штамма используют *Lactobacillus helveticus* (N2).

Экстракт концентрата культурального супернатанта, описанного в примере 2, доведенный до pH 4 или 7 с помощью 2н HCl и/или 2н NaOH, инкубируют при температуре 115°C в течение 20 минут, после чего значение pH доводят вновь до значения 6-7 и вносят в агаровую лунку образец экстракта для проведения агарового теста.

Параллельно проводят исследование контроля, имеющего pH 7, который инкубируют при температуре 37°C в течение 20 минут и затем в агаровую лунку вносят контрольный образец, с тем, чтобы сравнить зоны ингибирования исследуемых образцов с зоной контроля. Диаметр зоны ингибирования контроля составляет 27 мм.

Приведенные в табл. XI результаты показывают, что бактерицидная активность вариацина не подавляется при pH 4 или 7 в случае сочетания pH-фактора с повышением температуры.

Очистка вариацина

В 4 л ВНИ среды инокулируют культуру *Micrococcus varians*, которая продуцирует вариацин настоящего изобретения. Указанную стандартную культуру инкубируют при температуре 30°C в течение ночи в аэробных условиях при качании, после чего ее центрифугируют при 5000 g, а супернатант собирают в приемный сосуд, в который добавляют 72 г смолы XAD-7 (Амберлит (R)).

Смесь перемешивают при температуре 25 °C в течение 30 минут для облегчения адгезии молекул вариацина со смолой и затем все вместе переносят в сосуд из спекшегося стекла, после чего под вакуумом отфильтровывают супернатант.

Смолу последовательно промывают в 3 буферах, содержащих 20 mM цитрата натрия, pH 4 и изопропанол. При этом первый буфер содержит 10% изопропанола, второй буфер содержит 15% изопропанола и третий буфер содержит 20% изопропанола.

Смолу переносят на колонку, после чего проводят элюцию вариацина с помощью 700

мл буфера, содержащего 20 мМ цитрата натрия, pH 4 и 25% изопропанола. Постоянно осуществляют мониторинг бактерицидной активности с помощью описанного выше агарового теста.

Смешивают активные фракции и выпаривают изопропанол. Подготавливают 5 мл S-Ресурсную (S-Resourse) колонку для ВЭЖХ [Фармация (Pharmacia)], уравновешивая ее 20 мМ натрий-цитратным буфером. Упаренную смесь активных фракций наносят на колонку, после чего проводят элюцию содержимого колонки NaCl-буфером в градиенте от 100 до 400 мМ.

Собирают фракции и с помощью агарового теста проверяют бактерицидную активность очищенного таким образом вариацина.

Секвенирование вариацина N-терминальный участок вариацина, выделенного из штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587 и затем очищенного, секвенируют с использованием автоматизированного секвенатора Эпплайд Байосистемз 4774 (Applied Biosystems 4774).

В результате анализа было выявлено, что пептидная последовательность из 5 аминокислот идентична таковой на N-конце последовательности SEQID No: 1, приведенной ниже в перечне последовательностей.

Не представилось возможным в ходе секвенирования продемонстрировать наличие пептида, состоящего более чем из 5 аминокислот.

Кроме того, вариацин, выделенный из штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587 и впоследствии очищенный, гидролизуют под действием 6N HCl в течение 10 минут. При этом были получены 3 пептида, которые анализируют обычным способом с использованием ВЭЖХ. Оказалось возможным провести секвенирование только одного из трех выделенных пептидов, поскольку два других, по всей видимости, включают модификации пептидов.

Последовательность выделенного таким образом пептида оказалась идентичной участку, включающему аминокислоты с 19 по 22 в последовательности SEQ ID No: 1, приведенной ниже в списке последовательностей.

И, наконец, фракция, содержащая вариацин, выделенный и впоследствии очищенный из штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587, исследуют методом масс-спектрометрии, в результате чего был определен молекулярный вес вариацина, равный 2659 дальтон.

Гомология

Между последовательностями лактицина 481 из *Lactococcus lactis* и вариацина настоящего изобретения наблюдалась гомология. Гомология касается, в частности, последовательностей N-концевых участков обоих бактериоцинов. Так, последовательность от 1 до 5 аминокислоты на N-концевом участке вариацина идентична участку от 3 до 7 аминокислоты в последовательности SEQ ID No: 8 лактицина 481, который будет описан ниже в перечне последовательностей. Тем не менее описанное явление относится только лишь к области частичной гомологии, но не идентичности.

Кроме того, как было показано с помощью

масс-спектро-метрического анализа, секретлируемый лактицин имеет молекулярный вес, равный 2900 дальтон, тогда как молекулярный вес секретлируемого вариацина, как уже упоминалось, составляет 2659 дальтон.

В случае инокулирования по методу, описанному ранее в тесте на определение спектра ингибирования, в присутствии экстракта вариацина, штамма *Lactococcus lactis*, продуцирующего лактицин 481, видно, что рост упомянутого штамма ингибируется. Штамм *Lactococcus lactis*, продуцирующий лактицин 481, обладает иммунитетом к своему собственному бактериоцину-лактицину 481, однако, он не иммунен к вариацину, продуцируемому одним из двух штаммов *Micrococcus varians* настоящего изобретения. Таким образом, результаты, полученные с использованием вышеописанного теста на определение спектра ингибирования, подтверждают представление о том, что оба указанных бактериоцина различаются.

Приведенные выше генетические данные показывают, что, несмотря на то, что лактицин 481 и вариации проявляют гомологию последовательностей, их последовательности не идентичны. Биохимические и микробиологические данные подтверждают представление о том, что лактицин 481 и вариации являются двумя различными бактериоцинами.

Секвенирование гена вариацина

Дегенеративную нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 4, которая описана ниже в перечне последовательностей и которая соответствует C-концевому участку пептида в секвенированном ранее вариацине, конструируют известным способом. Затем смесь последовательностей SEQ ID No: 4 радиоактивно облучают при участии полинуклеотидкиназы из T4.

Традиционным способом получают препарат хромосомной ДНК из штаммов CNCM I-1586 и CNCM I-1587. Упомянутый препарат ДНК подвергают перевариванию ферментами Sall, SacI, SphI и BamHI в соответствии с рекомендациями, данными в инструкции поставщика. После этого на агарозный гель наносят 2 мкг продукта переваривания. Находящуюся в геле ДНК промывают 250 мМ HCl, после чего продукт перемещения переносят в щелочной среде из геля на мембрану "Зетапроба" (Биорад) ["Zetaprobe" (Biorad)]. После этого мембраны "Зетапроба" подвергают предварительной гибридизации при температуре около 55°C при последующем снижении указанной температуры на 5°C каждые 2 часа до температуры 40°C в среде, содержащей 6 x SSC раствор хлорида и цитрата натрия, 1% ДСН (SDS) и 0,25% снятого молока. Указанную мембрану далее гибридизируют с дегенеративной радиоактивной пробой, представляющей собой последовательность SEQ ID No: 4 в описанной ранее гибридизационной среде и при тех же температурных условиях. После этого смесь оставляют для инкубации при температуре 40 °C в течение 4 часов, затем мембрану промывают при температуре 40°C в 6 x SSC. И наконец, ее наносят на пленку для

ауторадиографии при - 80°C в течение 16 часов.

Результаты гибридизации демонстрируют наличие множества полос миграции: Sall полоса размером 7 т.п.н., SacI полоса размером 1,4 т.п.н., BamHI полоса размером 1,8 т.п.н. и SphI полоса размером более 15 т.п.н.

Затем 5 мкг геномной ДНК из штамма CNCM I-1586 расщепляют рестрикционным ферментом BamHI и отделяют фрагмент размером 1,6-2 т.п.н. хроматографией в геле агарозы с последующей элюцией той части геля, которая включает нужный фрагмент. Элюированный фрагмент ДНК лигируют с вектором pK19 (Gene, 56 (1987) 309-312), который был перед этим переварен BamHI и затем обрабатывают фосфатазой из кишечника теленка [Берингер Маннгейм (Boehringer Mannheim), часть N 713032].

Затем традиционным способом проводят трансформацию *Escherichia coli*, штамм BZ 234 [Коллекция Биоцентр, (Blocentrum collection), Базельский Университет, Швейцария], который является компетентным, средой для лигирования. Клоны, содержащие вставку, идентифицируют на агаровой среде, содержащей 50 мкг/мл канамицина, 60 нг/мл IPTG (изопропилтиогаляктозида) (Берингер Маннгейм, N 724815) и 300 нг/мл X-гал (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида) (Берингер Маннгейм, часть N 651745), которую инкубируют при температуре 37°C в течение 16 часов.

Белые колонии, которые обычно содержат вставку, вносят на 96-гнездное микротитрационное плато. При этом каждую белую колонию помещают в одно гнездо плато, которое содержит, кроме того, 150 мкл LB среды с добавлением 50 мкг/мл канамицина и инкубируют при температуре 37 °C в течение 20 часов для продуцирования мини-культур.

Готовят также праймеры противоположной ориентации, поскольку ориентация гена в векторе pK19 не известна. В этом случае указанные праймеры получают за счет лигирования нуклеотидного фрагмента, описываемого последовательностью SEQ ID No: 5, частично кодирующего лактицин 481, с одной или другой универсальной пробой pUC векторов, которые представляют собой соответственно последовательность SEQ ID No: 6 или последовательность SEQ ID No: 7.

1 мкл содержимого из каждой ячейки смешивают со 100 пмольями одного из указанных праймеров, 6 мкл 2 мМ дНТФ и 2,5 мкл Taq буфера (P.H. Stehelin & Cie AG, кат. No TP05b), после чего на всю полученную смесь наносят каплю Дина-вакс (Финнзимес Ой, 02201 Эспоо, Финляндия) (Dyna-wax, Finnzymes Oy, 02201 Espoo) и нагревают при температуре 98°C в течение 10 минут для лизиса бактерий; затем проводят полимеразно-цепьевую реакцию (ПЦР).

Далее осуществляют гель-электрофорез, в ходе которого позитивные клоны дают полосу размером 800 п.н.

С помощью описанного способа отбирают позитивные клоны и затем экстрагируют из этих клонов плазмидную ДНК; после этого дидезоксирибонуклеотидным методом секвенируют фрагмент ДНК, клонированный в вектор pK 19, с использованием набора для

секвенирования [Фармация Биотех (Pharmacia Biotech), часть No. 27-1682-01] и универсальных праймеров, после которых на основании данных, характеризующих полученную последовательность, используют специфические праймеры.

В результате проведенного исследования получают нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 2, приведенную ниже в перечне последовательностей. Упомянутая нуклеотидная последовательность кодирует последовательность SEQ ID No: 1, которая соответствует аминокислотной последовательности вариацина до созревания.

Приведенные ниже примеры служат целям иллюстрации способа получения и использования бактериоцина в соответствии с настоящим изобретением. Если нет других оговорок, указанные в примерах проценты означают весовые проценты.

Пример 1

В ВН1 среду инокулируют культуру, содержащую штамм *Micrococcus varians*. Проводят инкубацию в течение ночи при температуре 30°C при качании в аэробных условиях, что приводит к получению культуры, содержащей 10^8 организмов выращиваемого штамма на 1 мл среды. Полученную таким образом стандартную культуру центрифугируют. А стандартный супернатант собирают.

Пример 2

На основе 750 мл вышеупомянутого супернатанта, полученного по методу примера 1, готовят концентрат супернатанта, к которому добавляют 15 г смолы XAD-7 (Амберлит (R)). Смесь перемешивают при температуре 4°C в течение 60 минут и затем фильтруют через фильтр No. 604 (Schleicher & Schuell, Германия). Затем для удаления всех неадсорбированных белков фильтр промывают 1% цитратом натрия. Смолу отделяют и переносят в приемный сосуд, содержащий цитрат натрия и перемешивают всю полученную смесь в течение 2 минут. После этого смолу вместе с цитратом натрия переносят на колону и элюируют цитратом натрия 50% ацетонитрилом и 0,1% ТФУ (Трифторуксусная кислота). Элюат выпаривают, а остаток ресуспендируют в 50 мМ фосфатном буфере при pH 6,8.

Пример 3

При культивировании на ВН1 среде в течение ночи при температуре 30°C при качании в аэробных условиях получают 10 л культуры штамма *Micrococcus varians*. Затем непосредственно к культуре добавляют 200 г смолы XAD-7 (Амберлит) и все несильно перемешивают при температуре 4°C в течение 1 часа. После этого смесь фильтруют через фильтр No. 604 (Schleicher & Schuell, Германия), а смолу, оставшуюся на фильтре, промывают 10 л 50 мМ раствора уксусной кислоты, pH 5,2, для удаления бактерий. После этого к смоле добавляют 450 мл раствора, содержащего 100% этанол и 20 мМ ацетат аммония, и фильтруют всю полученную смесь для удаления смолы; затем фильтрат лиофилизируют с получением порошка, содержащего вариацина настоящего изобретения, который может быть далее использован в пищевой промышленности.

С помощью описанного ранее агарового теста определяют бактерицидную активность полученного порошка, который предварительно развели водой. Указанный порошок проявляет активность не менее 10^5 уе/г порошка.

И, наконец, вышеупомянутый порошок добавляют в дозе 0,5 г/кг к получаемой традиционным способом мясной пене. В результате мясная пена содержит 50 уе бактериоцина в расчете на 1 г пены, и этого количества достаточно для полного ингибирования развития в ней патогенных бактерий, в частности Clostridia

Пример 4

Данный пример относится к получению увлажняющего крема для ухода за кожей, который содержит порошок, описанный в примере 3, в дозе 0,05 г/кг, который представляет собой вариационный, способный при активности 5 уе/г ингибировать развитие на коже нежелательных бактерий, таких как Staphylococcus aureus и Streptococcus pyogenes.

Для приготовления указанной среды смешивают компоненты липидной фазы А и нагревают при температуре 75°C. Готовят липидную фазу Б и также нагревают при температуре 75°C медленно, при помешивании, добавляют липидную фазу А, затем все содержимое, также при медленном помешивании, охлаждают до температуры окружающей среды, что соответствует примерно 25°C. Медленно, при этой же температуре, в порядке, указанном ниже, добавляют составляющие смеси В.

Жидкая фаза А - %

Г"У-6 стеарат, глицерат и ПЭГ-20-цетиловый эфир (ПЭГ-полиэтиленгликоль) - 15

Жидкий парафин - 5

Масло из проростков пшеницы, стабилизированное 0,1% фенилинданом (антиоксидантом) и 1% соевым фосфолипидом (см. EP94109355.1) - 3

Масло из сладкого миндаля - 2

Цетиловый спирт - 1

Изостеарил изостеарат - 2

2-Октилдодецил миристилат - 1

Ланолиновый воск - 1

Водная фаза Б - %

Метилизотиазолин - 0,1

Деминерализованная вода - 59,6

Плацентарный белок человека - 2

В Добавки - %

Пропиленгликоль и экстракт календулы - 2

50%-ный растворимый коллаген в деминерализованной воде - 5,8

Парфюмерная отдушка - 0,3

2,5% порошок бактериоцина, полученный по методу примера 3, в деминерализованной воде - 0,2

Пример 5

Описанный в примере 3 порошок бактериоцина добавляют в количестве 0,5 г/кг к средству для полоскания ротовой полости. Указанное средство приобретает в результате

этого способность ингибировать развитие патогенных бактерий, в частности Streptococcus sorbinus, Streptococcus sanguis, Streptococcus mutans и Actinomyces viscosus в ротовой полости.

Пример 6

Раствор, включающий порошок бактериоцина, полученный по методу примера 3, разбавляют водой до 1%-ной концентрации и разбрызгивают на пищевые продукты, которые подлежат стерилизации для предупреждения вторичной контаминации в процессе упаковки.

Формула изобретения:

1. Бактериоцин из Micrococcus varians, описываемый аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 1.

2. Бактериоцин по п. 1 для получения пищевых продуктов, косметики или фармацевтических продуктов, в частности для применения в дерматологии и в гигиене полости рта.

3. Фрагмент ДНК, кодирующий бактериоцин по п.1, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID No: 2.

4. Фрагмент ДНК по п.3, в котором нуклеотиды с 88 по 228 кодируют сигнальный пептид с секретируемым бактериоцином.

5. Фрагмент ДНК по п.3, в котором нуклеотиды с 154 по 228 кодируют секретируемый бактериоцин.

6. Фрагмент ДНК по п.3, в котором нуклеотиды с 88 по 153 кодируют сигнальный пептид.

7. Сигнальный пептид из Micrococcus varians, кодируемый нуклеотидами с 88 по 153 в последовательности SEQ ID No: 2.

8. Штамм Micrococcus varians CNCM 1-1586-производитель бактериоцина по п.1.

9. Штамм по п.8 для получения пищевых продуктов, косметики или фармацевтических продуктов, в частности, для применения в дерматологии и в гигиене полости рта.

10. Штамм Micrococcus varians CNCM 1-1587-производитель бактериоцина по п.1.

11. Штамм по п.10 для получения пищевых продуктов, косметики или фармацевтических продуктов, в частности для применения в дерматологии и в гигиене полости рта.

12. Способ получения бактериоцина по п.1, включающий в себя культивирование штамма Micrococcus varians в среде и условиях, благоприятных для его роста, до достижения концентрации микроорганизмов в культуральной среде от 10^7 до 10^{11} микроорганизмов/мл, центрифугирование полученной культуры и получение экстракта супернатанта, содержащего бактериоцин.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что культивируют штамм по п.8 или 10.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что экстракт используют для получения пищевых продуктов, косметики или фармацевтических продуктов, в частности, для применения в дерматологии и в гигиене полости рта.

60

Таблица I

Фермент	Температура инкубации (°C)	Инактивация (мм)
Каталаза (СИГМА С-10)	30	27
Проназа Е (СИГМА Р-8038)	37	0
Протеиназа К (МЕРК 1000 144)	37	0
Фицин (СИГМА F-3266)	37	0

Таблица II

Фермент	Температура инкубации (°C)	Инактивация (мм)
Каталаза (СИГМА С-10)	30	27
Проназа Е (СИГМА Р-8038)	37	0
Протеиназа К (МЕРК 1000 144)	37	0
Фицин (СИГМА F-3266)	37	0

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

Таблица III

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибирующее влияние
<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>lactis</i>	N 9	37	MRS	++
	N 62	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>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 carnosum</i>	LCA 3	37	M 17	++++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>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	++

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Таблица IV

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибирование
<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> (споры и вегетативные клетки)	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	-

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибирование
<i>Bacillus cereus</i> (споры и вегетативные клетки)	С 1	30	BHI	++
	С 2	30	BHI	++
	С 5	30	BHI	++
	С 6	30	BHI	++
	79	30	BHI	++++
	С 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 stearothermophilus</i>	10	30	BHI	-
<i>Bacillus circulans</i>	215	30	BHI	++++
<i>Bacillus pumilus</i> (споры и вегетативные клетки)	В 1	30	BHI	++
	В 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++
<i>Clostridium botulinum</i> (споры и вегетативные клетки)	100003	45	DRMC	++
	100006	45	DRMC	++
	100019	45	DRMC	++
	100023	45	DRMC	++
<i>Clostridium butyricum</i> (споры и вегетативные клетки)	102001	45	DRMC	++
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (споры и вегетативные клетки)	107002	45	DRMC	+
<i>Clostridium perfringens</i> (споры)	103001	45	DRMC	+
<i>Clostridium sporogenes</i> (споры и вегетативные клетки)	104001	45	DRMC	+
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (споры и вегетативные клетки)	106001	45	DRMC	+
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> (споры и вегетативные клетки)	105001	45	DRMC	+

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибиро-
				вание
<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	+

Таблица V

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибиро-
				вание
<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	-

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Таблица VI

Виды	No.	Т (°C)	Среда	Ингибирована-
				ние
<i>Lactococcus lactis</i>	ST.2	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	++
<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	+++

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

Таблица VII

Виды	№.	Т (°С)	Среда	Ингибирование
<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 innocua</i>	7	30	BHI	++++
<i>Listeria monocytogenes</i>	FSM 122	30	BHI	++++
<i>Listeria welhia</i>	2	30	BHI	++++
<i>Bacillus subtilis</i> (споры и вегетативные клетки)	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> (споры и вегетативные клетки)	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 stearothermophilus</i>	10	30	BHI	-

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Виды	No.	T (°C)	Среда	Ингибиро-
				вание
<i>Bacillus circulans</i>	215	30	BHI	++++
<i>Bacillus pumilus</i> (споры и вегетативные клетки)	B 1	30	BHI	++
	B 2	30	BHI	+++
	213	30	BHI	++++
<i>Clostridium butyricum</i> (споры и вегетативные клетки)	102001	45	DRMC	+++
<i>Clostridium perfringens</i> (споры)	103001	45	DRMC	++
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (споры и вегетативные клетки)	107002	45	DRMC	++
<i>Clostridium sporogenes</i> (споры и вегетативные клетки)	104001	45	DRMC	++
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (споры и вегетативные клетки)	106001	45	DRMC	++
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> (споры и вегетативные клетки)	105001	45	DRMC	++
<i>Clostridia botulinum</i> (споры и вегетативные клетки)	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	++

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

Таблица VIII

Виды			Среда	Ингибирование
	№.	T (°C)		
<i>E. coli</i>	1	30	ВНІ	-
<i>Enterobacter chloacae</i>	72	30	ВНІ	-
<i>Salmonella anatum</i>	XIV/20	30	ВНІ	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	XIV/274	30	ВНІ	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	30	ВНІ	-

Таблица IX

pH	Зоны подавления, мм
2	27
4	27
6	27
8	27
10	27

Таблица X

Температура (°C)	Время инкубации (мин.)	Зоны ингибирования (мм)
100	15	27
100	30	27
100	60	27

Таблица XI

pH	Инкубационный период (мин.)	Температура инкубации (°C)	Зона подавления (мм)
4	20	115	27
7	20	115	27

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) Общая информация:

(i) Заявитель:

(A) Наименование: СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ
(SOCIETE DES PRODUITS NESTLE)

(B) Улица: Авеню Нестле 55 (Avenue Nestle 55)

(B) Город: Вевей (Vevey)

(Г) Штат или Провинция: Кантон де Во (Canton
de Vaud)

(Д) Страна: Швейцария

(E) Почтовый код: 1800

(Ж) Телефон: (041) 21 924 34 20

(З) Телефакс: (041) 21 924 28 20

(ii) Название изобретения: Бактериоцин из
Micrococcus varians

(iii) Количество последовательностей: 8

(iv) Машиночитаемая форма:

(A) Тип среды: флоппи-диск

(B) Компьютер: IBM PC-совместимый

(B) Операционная система: PC-DOS/MS-DOS

(Г) Программное обеспечение: ПатентИн Рилиз
(PatentIn Release) # 1.0, версия # 1.30
(EPO)

(2) Информация по последовательности SEQ ID No: 1:

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 25 аминокислот

(B) Тип: (аминокислотная)

(B) Характеристика цепи:

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: белок

(vi) Исходный источник:

(A) Организм: *Micrococcus varians*

(B) Индивид/Изолят: два клона, CNCM I-1586 и
CNCM I-1587

(xi) Описание последовательности: SEQ ID No: 1:

Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Pro	Thr	Ile	Ser	His	Glu	Cys	His	Met	Asn	Ser
1				5				10						15	
Phe	Gln	Phe	Val	Phe	Thr	Cys	Cys	Ser							
			20					25							

(2) Информация по последовательности SEQ ID No: 2:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 278 пар оснований

(B) Тип: нуклеотидная

(B) Характеристика цепи: двойная

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: ДНК (геномная)

(vi) Исходный источник:

(A) Организм: *Micrococcus varians*

(B) Индивид/Изолят: два клона, CNCM I-1586 и
CNCM I-1587

RU 2172324 C2

RU ?172324 C2

(ix) Особенности:

(A) Наименование/Ключ: CDS

(B) Расположение: 88...228

(ix) Особенности:

(A) Наименование/Ключ: sig_пептид

(B) Расположение: 88...153

(ix) Особенности:

(A) Наименование/Ключ: mat_пептид

(B) Расположение: 154...228

(xi) Описание последовательности: SEQ ID No: 2:

GTTGAAAATC ATCCGGAAGG ATGATTCTGT GTTCATGCGA GGCCACCCGG 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	
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) Информация по последовательности SEQ ID No: 3:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 47 аминокислот

RU 2 1 7 2 3 2 4 C 2

RU ? 1 7 2 3 2 4 C 2

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: другая нуклеотидная кислота

(А) Описание: /desc = "олигонуклеотид"

(xi) Описание последовательности SEQ ID No: 5:

GGNTCNGGNG TNATHCAYAC NATHTCNCAU GARTGYAAYA TGA

(2) Информация по последовательности SEQ ID No: 6:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 18 пар оснований

(Б) Тип: нуклеотидная

(В) Характеристика цепи: одноцепочечная

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: другая нуклеотидная кислота

(А) Описание: /desc = "олигонуклеотид"

(xi) Описание последовательности SEQ ID No: 6:

ATAACAATTT CACACAGG

(2) Информация по последовательности SEQ ID No: 7:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 18 пар оснований

(Б) Тип: нуклеотидная

(В) Характеристика цепи: одноцепочечная

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: другая нуклеотидная кислота

(А) Описание: /desc = "олигонуклеотид"

(xi) Описание последовательности SEQ ID No: 7:

GGTTTTCCCA GTCACGAC

(2) Информация по последовательности SEQ ID No: 8:

(i) Характеристика последовательности:

RU 2172324 C2

RU 2172324 C2

(А) Длина: 7 аминокислот

(Б) Тип: аминокислота

(В) Характеристика цепи: одноцепочечная

(Г) Топология: линейная

(ii) Молекулярный тип: пептид

(xi) Описание последовательности: SEQ ID No: 8:

Lys Gly Gly Ser Gly Val Ile

1

5

RU 2172324 C2

RU ?172324 C2