(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 952080 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 952080

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/31
C07K 14/315
C12N 1/20
C12N 15/62
C12P 21/02
A61K 7/00
A61K 7/16
A61K 38/16
A23C 9/123
A23B 4/22
A23L 3/3571

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.08.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.05.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.05.1995**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **24.08.1994 PCT/EP1994/002805**

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

03.09.1993 CH 2628/93

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Germond, Jacques Edouard,** Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 • **Marciset, Oliver,** Switzerland, SVEITSI, (CH)
3 • **Mollet, Beat,** Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

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

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Bakteriosiinit Streptococcus thermophilus'ista
Bacteriosiner från Streptococcus thermophilus

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

I-1351 CNCM

Bakteriosiinit Streptococcus thermophilus'ista. - Bacteriosiner från Streptococcus thermophilus.

Keksinnön kohteena on kaksi bakteriosiinia Streptococcus thermophilus'ista, S. thermophilus -kanta, joka tuottaa näitä bakteriosiineja, menetelmä näiden bakteriosiinien tuottamiseksi tästä kannasta, samoin kuin näiden bakteriosiinien ja/-tai tämän kannan käytöt elintarvikkeiden tai kosmeettisten tuotteiden valmistuksessa.

Tekniikan taso

Bakteriosiini on antibakteriaalinen aine eli aine, joka on aktiivinen bakteereja vastaan ja käsittää proteiiniosan, joka liittyy antibakteriaaliseen vaikutukseen tai antibioottivaikutukseen. Bakteriosiinilla on yleensä kapea aktiivisuuskirjo tai estokirjo, joka usein rajoittuu lajiin, joka on lähisukuinen bakteerilajille, joka tuottaa sitä.

Nykyisin tunnetaan neljä S. thermophilus -bakteriosiinia.

Ensimmäisellä on, erityisesti, molekyylimassa 10 - 20 kD, se on lämpölabiilia 90 °C:ssa ja pepsiinille herkkää (Smaczny et al., Deutsche Molkerei-Zeitung, 105: 15, 460-464, 1984).

Toisella, joka kuvataan pääasiassa bakteriaalisella estokirjollaan julkaisussa EP 443543, on erityisesti kapasiteetti estää Staphylococcus- ja Pseudomonas -suvun bakteerien kasvua, ja kyvyyttömyys estää Lactococcus- ja Enterococcus -suvun bakteerien ja Bacillus cereus -lajin kasvua.

Kolmas, jonka on kuvannut Pulusani et al. (J. of Food Science, 44:2, 575-578, 1979), estää voimakkaasti Pseudomonas'ia, ei ole pepsiinille herkkä, ja sisältää sokeritähteitä.

Lopuksi, neljäs, jonka on kuvannut Gilano et al. (Microbiologie-Aliment-Nutrition, 8, 21-30, 1990), ei ole pepsiinille herkkä, sisältää sokeritähteitä eikä kulje membraanin läpi, jonka huokoisuus on 100 kD.

S. thermophilus on nykyisin hyvin tärkeä elintarvikesektorilla, liittyen erityisesti meijerituotteiden kuten esimerkiksi jogurttien ja joidenkin juustojen valmistukseen. Lisäksi on hyvin harvoja bakteriosiineja, jokta ovat aktiivisia samanaikaisesti Bacillus'ta, Clostridium'ia ja Listeria'a vastaan. Sen vuoksi voi olla käyttökelpoista että on laajempi bakteriosiinien alue, ts. on tarvetta laajemmalle bakteriosiinien alueelle, joita tämän lajin edustajat tuottavat, jotta olisi erityisesti laajempi antibakteriaalisen aktiivisuuden kirjo, erityisesti tämän tyyppisen tuotteen yhteydessä.

Keksinnön tarkoitus on vastata tähän tarpeeseen.

Keksinnön yhteenveto

Yksi keksinnön kohteista on kahden uuden S. thermophilus -bakteriosiinin aminohapposekvenssin, samoin kuin niiden erittymisen sallivan signaalipeptidin aminohapposekvenssin karakterisointi.

Myös näitä kahta bakteriosiinia koodittavat nukleotidisekvenssit ovat keksinnön eräänä toisena kohteena.

Streptococcus thermophilus -kannat, jotka tuottavat ainakin toista keksinnön mukaisista bakteriosiineista, ovat myös keskinnön eräänä kohteena, erityisesti alla kuvattu S. thermophilus -kanta CNCM I-1351, joka pystyy tuottamaan keksinnön mukaisia kahta bakteriosiinia.

Keksinnön edelleen eräänä kohteena on menetelmä ainakin toisen keksinnön mukaisen bakteriosiinin uutteen tuottamiseksi.

Lopuksi, keksinnön viimeisenä kohteena on keksinnön mukaisten bakteriosiinien käyttö ja niiden nukleiinisekvenssin samoin kuin niiden signaalisekvenssin käyttö.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

S. thermophilus -kanta CNCM I-1351 eristettiin fermentoidusta meijerituotteesta Tsekkoslovakiasta, ja hämmästyttävästi havaittiin, että sillä on huomattava ominaisuus, että se estää bakteerien laajan joukon kasvua. Tämä kanta talletettiin 5. elokuuta 1993 kansainvälisen Budapestin sopimuksen mukaan kansainväliseen talletuslaitokseen the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, PASTEUR INSTITUTE, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Ranska, jossa se sai tulonumeron I-1351.

Tämän kannan yksityiskohdat erityisesti sen morfologian, sokerien fermentoinnin ja vastaavien ominaispiirteiden suhteen esitetään alla:

Morfologia:
- Ei-flagelloituja, ketjua muodostavia kokkeja. Ei itiöiden muodostusta.
- Gram-positiivisia mikro-organismeja, katalaasinegatiivisia ja fakultatiivisia anaerobeja.

Sokerien fermentointi:
Maitohapon tuotanto D-glukoosista, laktoosista, sakkaroosista, raffinoosista. Ei maitohapon tuotantoa mannoosista, fruktoosista, galaktoosista.

Muut:

Kanta tuottaa ainakin kahta bakteriosiinia, yhtä proteiinia bakteriosiinien vastaista immuniteettia varten, ja eksopolysakkarideja, joilla on rakenteenmuodostusominaisuuksia.

Sen vuoksi CNCM I-1351 -kannan kasvatussupernatantilla on suhteellisen laaja antibakteriaalisen aktiivisuuden kirjo. Tälle supernatantille herkkiä bakteereja voivat olla mm. Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis, Lactococcus lactis biovar diacetylactis, Lactococcus cremoris, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus brevis, Leuconostoc cremoris, Leuconostoc mesenteroides, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Propionibacterium, Listeria innocua, Listeria momocytogenes, Micrococcus varians, ja Clostridium botulinum'in, Clostridium tyrobutyricum'in, Clostridium bifermentans'in, Clostridium sporogenes'in, Bacillus subtilis'in, Bacillus pumilus'in ja Bacillus cereus'in itiöt ja vegetatiivisolut, esimerkiksi (Bactéries lactiques, vol 1, 1994, Lorica -painos).

Sitten tästä CNCM I-1351 -kannasta oli mahdollista eristää kaksi proteiinitekijää, joita kutsutaan bakteriosiineiksi, ja jotka ovat vastuussa tästä antibakteriaalisesta aktiivisuudesta.

Tätä varten ensimmäisellä keksinnön mukaisella bakteriosiinilla, jota kutsutaan tässä selityksessä nimellä "termofiliini 1", on sekvenssi SEQ ID NO:1, joka kuvataan alla olevassa sekvenssiluettelossa.

Lisäksi voidaan ennakoida, että tällä bakteriosiinilla voi olla antibakteriaalinen aktiivisuus, jolla on laajempi tai spesifisempi kirjo yhdelle suvulle tai yhdelle bakteerialajille, kuin termofiliini 1:llä, kun viimeksi mainitulla on sekvenssi, joka poikkeaa sekvenssistä SEQ ID NO:1 esimerkiksi ainakin yhden aminohapon substituutiolla, deleetiolla ja/tai insertiolla. Itse asiassa on jo julkaisusta EP 521240 tunnettua, että nisiini Z:lla on edullisempi aktiivisuuskirjo kuin nisiini A:lla, kun se taas poikkeaa nisiini A:sta vain yhden

aminohapon substituutiolla.

Juuri tämän vuoksi kaikkia bakteriosiineja, joissa on ainakin yhden aminohapon substituutio, deleetio ja/tai insertio alkuperäisessä sekvenssissään SEQ ID NO:1, voidaan pitää keksinnön mukaisina bakteriosiineina.

Toisella keksinnön mukaisella bakteriosiinilla, jota kutsutaan tässä selityksessä nimellä "termofiliini 2", on sekvenssi SEQ ID NO:2, joka kuvataan alla olevassa sekvenssiluettelossa. Voidaan myös ennakoida, että tällä bakteriosiinilla voi olla antibakteriaalista aktiivisuutta, kun sillä on sekvenssi, joka poikkeaa sekvenssistä SEQ ID NO:2 esimerkiksi ainakin yhden aminohapon substituutiolla, deleetiolla ja/tai insertiolla. Tätä varten kaikkia bakteriosiineja, joissa on ainakin yksi edellä kuvatuista modifikaatioista alkuperäisessä sekvenssissään SEQ ID NO:2, voidaan pitää keksinnön mukaisina bakteriosiineina.

Lisäksi keksinnön eräänä toisena kohteena ovat myös nukleotidisekvenssit, jotka koodittavat termofiliini 1:tä ja termofiliini 2:ta, koska niitä voidaan käyttää antamaan, esimerkiksi transformoimalla, bakteereille, hiivalle tai kasveille, kapasiteetin estää määrättyjä bakteereita. Täten nämä nukleotidisekvenssit voivat olla suhteellisen vaihtelevia geneettisen koodin degeneraation vuoksi, ja erityisesti sisältyy CNCM I-1351 -kannan operoniin, jolla on alla olevassa sekvenssiluettelossa kuvattu nukleotidisekvenssi SEQ ID NO:3.

Erityisesti on mahdollista käyttää nukleotidisekvenssiä, joka käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 221 - 475, ja joka koodittaa termofiliini 1:tä signaalipeptidinsä kanssa. On kuitenkin edullisempaa käyttää vain sekvenssiä, joka koodittaa signaalipeptidiä, sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidista 221 nukleotidiin 288, sulattamaan sen yhteen kiinnostuksen kohteena olevaan geeniin, niin että se voi sallia tämän kiinnostuksen kohteena olevan geenin koodittaman proteiinin erit-

tymisen Streptococcus thermophilus -kannalla. Samoin on edullisempaa käyttää vain sekvenssiä, joka koodittaa eritettyä termofiliini 1:tä, sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidista 289 nukleotidiin 475, jotta se pystyttäisiin fuusioimaan signaalisekvenssiin ekspressioplasmidissa, esimerkiksi, sen ekspressoimiseksi muussa mikro-organismissa kuin S. thermophilus.

Samoin voidaan käyttää nukleotidisekvenssiä, joka käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 495 - 686, ja joka koodittaa termofiliini 2:ta signaalipeptidinsä kanssa. On kuitenkin edullisempaa käyttää vain sekvenssiä, joka koodittaa signaalipeptidiä, sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidista 495 nukleotidiin 557, jotta voitaisiin sallia minkä hyvänsä tähän peptidiin fuusioidun proteiinin erittyminen Streptococcus thermophilus -kannalla. Samoin on edullisempaa käyttää vain sekvenssiä, joka koodittaa eritettyä termofiliini 2:ta, sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidista 558 nukleotidiin 686, jotta se voitaisiin fuusioida signaalisekvenssiin ekspressioplasmidissa, esimerkiksi, sen ekspressoimiseksi muussa mikro-organismissa kuin S. thermophilus.

Lopuksi, koska on havaittu, että määrätyillä S. thermophilus -kannoilla, muilla kuin kannalla CNCM I-1351, on samanlainen estokirjo kuin kannalla CNCM I-1351, ja resistenssiä viimeksi mainitulle (erityisesti alla kuvatuilla kannoilla Sfil2 ja 25), on hyvin todennäköistä, että nämä kannat voivat tuottaa ainakin yhtä keksinnön mukaisista bakteriosiineista, samalla kuin immuniteettiproteiinia, joka antaa tämän resistenssin. Tätä varten kaikki kannat, jotka pystyvät tuottamaan ainakin yhtä edellä kuvatuista bakteriosiineista, luetaan mukaan tähän keksintöön.

Menetelmässä uutteen tuottamiseksi, joka sisältää ainakin yhtä keksinnön mukaista bakteriosiinia, S. thermophilus -kantaa, joka tuottaa ainakin yhtä mainituista bakteriosiineista, kasvatetaan väliaineessa ja olosuhteissa, jotka ovat suotui-

sat S. thermophilus'in kasvulle, kunnes väliaine sisältää 10^7 - 10^9 kannan mikro-organismia/ml, saatu viljelmä sentrifugoidaan, ja sitten valmistetaan uute supernatantista, joka sisältää ainakin yhtä mainituista bakteriosiineista.

Tämän uutteen tuottamiseksi S. thermophilus -kantaa, joka tuottaa ainakin yhtä mainituista keksinnön mukaisista bakteriosiineista, erityisesti S. thermophilus -kantaa CNCM I-1351, voidaan sen vuoksi kasvattaa väliaineessa ja olosuhteissa, jotka ovat suotuisat S. thermophilus'in kasvulle. Sitä voidaan esimerkiksi kasvattaa erityisesti MSK-välaineessa (kuorittua lehmänmaitoa, jota on täydennetty hiivauutteella) tai HJ-väliaineessa (ultrasuodatuksen läpäissyt lehmänmaito, jota on täydennetty hiivauutteella ja "soytone":lla). Sitä kasvatetaan edullisesti väliaineessa, joka on selektiivistä Streptococcus -kannalle, kuten M 17 -väliaineessa, jonka on kuvannut P.E. Terzaghi et al., J. Appl. Microbiol., 29, 807-813 (1975), ja jota on täydennetty 0,5 - 2 %:lla sokeria, jota S. thermophilus voi fermentoida, erityisesti esimerkiksi sakkaroosilla, laktoosilla tai glukoosilla.

Sellaista väliainetta voidaan valmistaa sekoittamalla 95 ml perusväliainetta ja 5 ml liuosta, joka sisältää 10 g fermentoituvaa sokeria/100 ml vettä, jolloin fermentoituvan sokerin ja perusväliaineen liuoksia on kumpaakin steriloitu erikseen 121 °C:ssa 15 min ajan, ja jolloin perusväliaine on valmistettu liuottamalla seuraavat komponentit 950 ml:aan kiehuvaa vettä:

- trypsiinikaseiinihydrolysaatti	2,5 g
- pepsiinilihahydrolysaatti	2,5 g
- papaiinisoijapapuhydrolysaatti	5,0 g
- hiivauute	2,5 g
- lihauute	5,0 g
- ß-glyserofosfaatti	19 g
- Mg-sulfaatti	0,25 g
- askorbiinihappo	0,5 g

Mainittua kantaa voidaan kasvattaa mainitussa väliaineessa, joka on suotuisaa S. thermophilus'in kasvulle, 37 - 48 °C:ssa 2 - 8 tunnin ajan esimerkiksi, kunnes väliaine sisältää noin 10^7 - 10^9 kannan mikro-organismia/ml, arvon noin 10^8 mikro-organismia/ml vastatessa, toisaalta, väliaineen optista tiheyttä, mitattuna 600 nm:llä (OD_{600}), noin 3,6 ja, toisaalta, konsentraatiota, joka saavutetaan lehmän maidossa pisteessä, jossa se koaguloituu kasvatetun kannan tuottaman haponmuodostuksen vaikutuksesta.

Mainitun supernatantin raakauutteen valmistamiseksi on mahdollista käyttää mitä hyvänsä sopivaa saostusmenetelmää, kuten esimerkiksi saostusta trikloorietikkahapolla, "ulossuolausta" tai liuotinsaostusta. Tämän raakauutteen valmistamiseksi supernatantin pH-arvo säädetään edullisesti happamaan pH-arvoon 1,0 - 2,0 H_3PO_4:llä, saostuma poistetaan, ja suoritetaan yksi tai useita peräkkäisiä trikloorietikkahapolla saostuksia, joista kutakin seuraa uudelleensuspendointi vesipohjaiseen suspensioon trifluorietikkahapolla.

Bakteriosiinien ja/tai näitä keksinnön mukaisia bakteriosiineja tuottavan Streptococcus thermophilus -kannan käyttö varustetaan elintarviketuotteiden tai kosmeettisten tuotteiden valmistukseen.

Mainitun Streptococcus thermophilus -kannan viljelmää voidaan käyttää erityisesti herätteenä juustojen valmistuksessa, erityisesti juustojen, jotka ovat mozzarella -tyyppiä (jotta vältettäisiin reiät, joita tuottaa Bacillus polymixa, jonka itiöt kestävät fermentoinnin elossa), sveitsiläistyyppiä (kuten Gruyére tai Emmental, Clostridium tyrobutyricum'in aiheuttaman kontaminaation vastustamiseksi), vacherin-tyyppiä (Listeria monocytogenes'in aiheuttaman kontaminaatioon estämiseksi), ja "séré"-tyyppiä (ranskankielinen mini pehmeälle - tai kermajuustolle), tai esimerkiksi hapotettujen maitotuotteiden, erityisesti jogurtin tai pikkulapsille tarkoitettujen maitojauheen formulaatioissa.

Mainittua Streptococcus thermophilus -kantaa voidaan kasvattaa erityisesti maidossa yhdistelmänä Lactobacillus bulgaricus -kannan kanssa, joka on lievästi herkkää termofiliinille (esimerkiksi alla kuvatun kannan YL5 kanssa), jotta vältettäisiin L. bulgaricus'ista johtuva jogurtin jälkihapottuminen.

Mainittuja bakteriosiineja, erityisesti raaka- tai puhdistetun uutteen muodossa, tai mainittua kantaa, voidaan myös käyttää lisäaineena tai aktiivisena aineena patogeenisiä bakteereja vastaan, erityisesti valmistettaessa lihatuotteita kuten hyytelöjä, aktiivisena aineena clostridia -itiöiden, erityisesti Clostridium botulinum'in kasvuna vastaan, tai valmistettaessa emulsiovoiteita tai pesunesteitä, aktiivisena aineena ihon patogeenisiä bakteereja vastaan, tai vaihtoehtoisesti oraalisten terveydenhoitotuotteiden valmistuksessa, aktiivisena aineena suuontelon patogeenisia bakteereja vastaan, erityisesti esimerkiksi Streptococcus sobrinus'ta vastaan.

Keksinnön mukaisia bakteriosiineja luonnehditaan alla yksityiskohtaisemmin erilaisten mikrobiologisten, biokemiallisten ja geneettisten tietojen avulla, jotka kuvaavat niiden ominaisuuksia. %-osuudet esitetään painon mukaan.

Antibakteriaalisen aktiivisuuden yksikkö - "Agarkaivotesti"

Keksinnön kuvauksen puitteissa antibakteriaalinen aktiivisuus määritellään mielivaltaisina yksikköinä.

Yksi mielivaltainen yksikkö (au) määritellään käänteisaarvoksi suurimmasta laimennusasteesta, jolla näytteellä yhä on antibakteriaalista aktiivisuutta estissä, jonka ammattimiehet tuntevat nimellä "agar well test" ("agarkaivotesti"), englanninkielisellä ilmauksella, joka tarkoittaa sananmukaisesti testiä, jossa käytetään agariin leikattua kaivoa.

Keksinnön mukaisella S. thermophilus -viljelmän supernatantin standardinäytteellä, joka on valmistettu esimerkissä 1 kuvatuissa standardiolosuhteissa, on tyypillisesti aktiivisuus 32 au tilavuudella 70 µl. Siksi tämä tarkoittaa aktiivisuutta 460 au/ml.

Bakteriosiinin standardiraakauutteella, joka on saatu esimerkissä 1 kuvatusta kasvatussupernatantista, jota seuraa kaksi peräkkäistä saostusta trikloorietikkahapolla, joita kumpaakin seuraa uudelleensuspendointi vesipohjaiseen suspensioon trifluorietikkahapon kanssa, on tyypillisesti aktiivisuus noin $1,4 \times 10^5$ au/ml.

Juuri mainitun agarkaivotestin avulla määritetään, onko näytteellä yhä antibakteriaalista aktiivisuutta määrätyllä laimennosasteella.

Tämän tekemiseksi 35 ml M 17 -väliainetta kaadetaan petrimaljaan, ja siihen lisätään 1 % sakkaroosia ja 1,5 % agaria.

5 ml M 17 väliainetta, johon lisätään 1 % sakkaroosia ja 0,75 % agaria, siirrostetaan 5 µl:lla viljelmää, joka on valmistettu edeltävän yön aikana, ja jossa on S. thermophilus -kantaa, joka on tyypillisesti herkkää keksinnön mukaiselle bakteriosiinille (tyypillinen indikaattori), tässä tapauksessa esimerkiksi Sfi3-kantaa.

5 ml kaadetaan 35 ml:n päälle, ja jätetään kuivumaan 15 minuutiksi laminaarivirtauksen alla. Kasvatusväliaineeseen lävistetään reikiä, joiden halkaisija on 5 mm.

Testinäytteet kaadetaan reikiin, määrässä 70 µl/reikä. Inkubointia suoritetaan 6 tunnin ajan anaerobisissa olosuhteissa 42 °C:ssa. Tämän inkuboinnin aikana tyypillinen indikaattorikanta on kasvanut ja estorenkaat ovat näkyvissä. Laimennosaste, jolla näytteellä ei enää ole antibakteriaalista aktiivisuutta, on laimennosaste, jolla estorengas ei enää ole ero-

tettavissa.

Inaktivointi entsyymeillä

Mainitun agarkaivotestin avulla, agarilla, joka on edellä kuvatulla tavalla siirrostettu mainitulla tyypillisellä indikaattorikannalla, määritetään, inaktivoituvatko keksinnön mukaiset bakteriosiinit erilaisilla entsyymeillä vai eivät.

Kaikilla käytetyillä entsyymeillä paitsi lipaasilla, mainittuun standardiraakauutteeseen, jota on laimennettu 33-kertaisesti entsyymin toimittajan suosittelemaan puskuriin, lisätään 1 µg/ml - 10 mg/ml entsyymiä, jotta saataisiin näytteitä, jotta saataisiin 70-µl näytteitä tasolla 300 au. Sitten entsyymin annetaan vaikuttaa 30 min ajan, toimittajan suosittelemassa lämpötilassa, ennen kuin koko seos lisätään agarkaivotestin kaivoon.

Toisaalta kaupallisella lipaasilla lisätään ensin 1 µl inhibiittorien seosta (1,25 M EDTA:ta; 0,25 % pepstatiini A:ta (P4265 Sigma); 0,25 % E-64:ää (E3132 Sigma); 0,25 % aprotiniinia (A1153 Sigma)) 100 µl:aan liuosta, joka sisältää 200 µg/ml lipaasia, inhibiittorien annetaan vaikuttaa 45 min ajan huoneenlämpötilassa, lisätään sitten 5 µl (450 au) laimennettua standardiraakauutetta, ja annetaan reagoida 30 min ajan 37 °C:ssa, sitten 70 µl seosta lisätään agarkaivotestin kaivoon. Laimennoksiin käytetyt puskurit ovat seuraavat.

- pH 2,0: 100 mM maleiinihappoa säädettynä NaOH:lla,
- pH 7,0: 100 mM fosfaattipuskuria (K_2HPO_4/KH_2PO_4),
- pH 7,5: 100 mM fosfaattipuskuria (K_2HPO_4/KH_2PO_4),
- pH 7,75: 100 mM Tris·Cl.

Estorenkaan halkaisijaa verrataan kontrollihalkaisijaan renkaalla, joka on saatu lisäämättä entsyymiä, joka kullakin puskurilla ja kussakin inkubointilämpötilassa, on noin 14 mm.

Taulukossa I alla esitetään testatuilla entsyymeillä saadut tulokset. Tässä taulukossa entsyymi merkitään sen tyypin, toimittajan nimen ja toimittajan tavaranimikenumeron mukaan. Bakteriosiinin inaktivointi ilmaistaan lisätyn entsyymin konsentraation funktiona. Luku 0 tarkoittaa, ettei jäljellä ole mitään rengasta, ts. että entsyymin kanssa inkubointi heikensi keksinnön mukaisen bakteriosiinin antibakteriaalista aktiivisuutta. Luku 14 ilmoittaa, että jäljellä oli yhä 14-mm rengas, vastaten keksinnön mukaisen bakteriosiinin täyttä antibakteriaalista aktiivisuutta.

Taulukko I

Entsyymit	Konsentraatio (µg/ml)	puskurin pH-arvo	Inkubointilämpötila (°C)	Inaktivaatio (mm)
Pepsiini (SIGMA P-700)	10	2,0	37	0
Proteinaasi K (MERCK 1000 144)	4	7,0	37	0
Pisiini (SIGMA P-3266)	10	7,0	37	0
Pronase E (SIGMA P-8038)	10	7,5	37	0
Nagarse (SIGMA P-4789)	10	7,5	37	0
Trypsiini (SIGMA T-8128)	10	7,5	25	0
α-kymotrypsiini (SIGMA C-7762)	1	7,75	25	0
Katalaasi (SIGMA C-10)	10000	7,75	25	14
α-amylaasi (SIGMA A-0521)	1	7,75	25	14
Lipaasi (SIGMA L-0382) + proteaasi-inhibiittorit	200	7,75	37	14

Kaikki proteaasit estävät supernatantin antibakteriaalista aktiivisuutta, mikä osoittaa, että tähän aktiivisuuteen osallistuu proteiiniosa.

Se tosiseikka, ettei havaita lainkaan katalaasivaikutusta bakteriosiinien antibakteriaaliseen aktiivisuuteen, osoittaa myös, ettei tyypillisen indikaattorikannan kasvun esto johdu H_2O_2:n antibakteriaalisesta aktiivisuudesta, jolla H_2O_2:lla tiedetään olevan samanlainen aktiivisuus kuin bakteriosiineilla, koska H_2O_2 olisi hajonnut katalaasilla.

Samoin se tosiseikka, ettei havaita antibakteriaalisen aktiivisuuden inaktivoitumista α-amylaasilla, osoittaa tähän antibakteriaaliseen aktiivisuuteen liittyvien α-amylaasilla hydrolysoituvien sokerien puuttumisen.

Lisäksi se tosiseikka, ettei lipaasilla ole vaikutusta antibakteriaaliseen aktiivisuuteen, osoittaa myös tähän aktiivisuuteen liittyvän lipidifraktion puuttumisen.

Estokirjo

Agarkaivotestin avulla agarilla, joka on siirrostettu erilaisilla itiöiden tai bakteerien kannoilla, määritetään onko kasvatussupernatantilla CNCM I-1351 -kannasta, joka tuottaa keksinnön mukaista kahta bakteriosiinia, näiden eri bakteerien kasvua estävää aktiivisuutta, ts. tälle supernatantille määritetään estokirjo.

Tämän tekemiseksi tarkkaillaan estovaikutusta testatun kannan kasvuun, joka estovaikutus on tuotettu supernatanttinäytteellä, jonka aktiivisuus on 300 au pH-arvossa 7,0, suhteessa vaikutukseen, joka on normaalisti nolla, samalla näytteellä, joka on aikaisemmin deaktivoitu inkuboimalla 30 min ajan 37 °C:ssa, kun läsnä on 5 µg/ml proteinaasi K:ta.

Näiden määritysten suorittamiseksi käytetään FALCON 3046 Multiwell-kudosviljelylevyjä. 6 ml M17 -väliainetta, joka sisältää, lisäksi, 1 % laktoosia ja 1,5 % agaria (M17L -väliaine) päällystetään 700 µl:lla M17 -väliainetta, joka sisältää, lisäksi, 1 % laktoosia ja 0,6 % agaria, ja joka on siirrostettu 1 %:lla testikannan viljelmää, joka on valmistettu edellisen yön aikana ja laimennettu OD_{600} -arvoon 0,1.

Kun testikannan on kasvettava itiöistä, siirrostus suoritetaan 10^5 - 10^6 itiöllä/ml päällystysväliainetta.

Kun testikanta ei ole Lactococcus, Streptococcus tai Enterococcus, M17L -väliaine korvataan standardiväliaineella, joka on kyseessä olevan bakteerin kasvulle suotuisaa, erityisesti MRS -väliaineella, joka sisältää, lisäksi, 2 % glukoosia Lactobacillus'ta, Pediococcus'ta, Leuconostoc'ia ja Bifidobacterium'ia varten (Sanofi Diagnostics Pasteur, Ranska), RCM -väliaineella Clostridium'in itiöitä tai vegetatiivisoluja varten (Oxoid, Englanti), ja BHI -väliaineella (Difco, USA) muita testattuja bakteeretia varten.

Levyä kohden lävistetään kaksi reikää, joiden halkaisija on 5 mm ja syvyys 5 mm. Toiseen rei'istä lisätään 70 µl näytettä, jossa on tasolla 300 au keksinnön mukaista bakteriosiinia, ja toiseen samaa näytettä, joka on aikaisemmin deaktivoitu. Inkubointi suoritetaan lämpötilassa, joka on suotuisa testatun kannan kasvulle ajanjaksoksi, joka on välttämätön jotta se peittäisi levyn näkyvällä bakteerikerroksella.

Vaikutus tai estoaste karakterisoidaan havaitun estorenkaan halkaisijalla. Katsotaan, että esto on hyvin suurta (++++), jos renkaan halkaisija on 16 - 18 mm, suurta (+++) halkaisijalla 11,5 - 15,5 mm, keskinkertaista (++) halkaisijalla 7,5 - 11 mm, heikkoa (+) halkaisija of 5 - 7,5 mm ja nolla (-), ellei havaita rengasta.

Täten testataan yli 74 maitohappobakteerien eri lajien ja alalajien kantaa, ja havaitaan, että vain noin 7 % niistä on supernatantille resistenttejä. Näiden testien tuloksen yksityiskohdat esitetään alla olevassa taulukossa II. Tässä taulukossa II, kuten seuraavissakin taulukoissa, ilmoitettu kannan nimi tai numero on numero, joka sille on annettu Nestlé -kokoelmassa (osoite: NESTEC S.A., Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Sveitsi). Ilmoitettu lämpötila on inkubointilämpötila testin aikana.

Taulukko II

Laji	No	T (°C)	Esto
Streptococcus thermophilus	YS3	42	+++
	YS4	42	+++
(Kannoilla Sfi 12 ja 25 on	YS11	42	+++
resistenssiä kannalle CNCM	YS7	42	+++
I-1351 ja antibakteriaalisen	YS8	42	+++
aktiivisuuden kirjo, joka on	YS20	42	+++
samanlainen kuin tällä	Sfi3	42	+++
kannalla)	Sfi18	42	+++
	Sfi19	42	+++
(Kannalla STII on resistenssiä	Sfi20	42	+++
vain kannalle CNCM I-1351; vai-	Sfi16	42	+++
kuttaa kuitenkin siltä, että	ST11	42	-
alle 5 % streptokokeista pystyy	Sfi12	42	-
ekspressoimaan sellaista resis-	Sfi25	42	-
tenssiä)			
Lactococcus lactis	SL2	30	++
(Nisiinintuottajat)	SL13	30	++
	SL16	30	++
	SL25	30	++
	SL31	30	++
	SL63	30	++
Lactococcus lactis	SLP26	30	++
	SLP29	30	++
	SLP24	30	++
	SL64	30	++
	SL58	30	++
	SL40	30	++
Lactococcus lactis biovar	SD39	30	++
diacetylactis	SD80	30	++
	SD57	30	++
	SD11	30	++
	SD113	30	++
Lactococcus cremoris	SC20	30	++
	SC15	30	++
	SC11	30	++
	SC145	30	++
	SC63	30	++
	SC28	30	++
Enterococcus faecalis	SFS1	30	+
	SFS2	30	+
	SFS10	30	+
Enterococcus faecium	SFM1	30	++
	SFM3	30	++
	SFM6	30	++
	SFM10	30	++
	SFM14	30	++
	SFM9	30	+
Lactobacillus fermentum	L26	30	++
	L50	30	++
	L28	30	++
	LF16	30	++
	LF15	30	++

Lactobacillus helveticus	LH91	40	++++
	LH2	40	+++
	LH3	40	+++
	LH1	40	+++
Lactobacillus acidophilus	LQ1	40	++
	LQ3	40	+
	LQ10	40	++
	LQ21	40	+
	LQ23	40	++++
	LQ26	40	-
Lactobacillus brevis	LB2	30	+++
	LB10	30	-
	LB13	30	+++
Lactobacillus bulgaricus	YL12	40	++++
	YL2	40	+
	YL5	40	++
	LB32	40	+++
Leuconostoc cremoris	LCC1	30	++
	LCC7	30	++
	LCC2	30	++
Leuconostoc mesentroides	LCM9	30	++
	LCM10	30	++
	LCM18	30	++

Tässä taulukossa II havaitaan, että supernatantin estokirjo on kapea siinä mielessä, että määrätyillä Lactobacillus -lajeilla, kuten Lactobacillus acidophilus'illa, Lactobacillus brevis'illä ja Lactobacillus bulgaricus'illa, esimerkiksi, estoaste on heterogeeninen. Muilla lajeilla, kuten esimerkiksi L. fermentum'illa, L. helveticus'illa ja Lactococcusilla, estoaste on homogeeninen.

Tämä on edullista sen tosiseikan valossa, että on hyvin vaikeaa erottaa yhtä kantaa toisesta saman lajin kannasta. Sen vuoksi on mahdollista ottaa huomioon supernatantin tai puhdistettujen bakteriosiinien edullinen käyttö teollisten kantojen erottamiseksi toisistaan.

On myös mahdollista ottaa huomioon ainakin yhtä keksinnön mukaisista bakteriosiineista tuottavan kannan käyttö viljelmässä toisen maitohappobakteerikannan kanssa, joka on luonnollisesti resistenttiä, tai hieman herkkää, väliaineessa olev(a/i)lle bakteriosiin(e)ille. Täten voidaan tuottaa jogurtteja, erityisesti jogurtteja, joilla on vähentynyt jälki-

happamoituminen.

Havaitaan myös, että supernatantti estää L. lactis'in kuuden nisiiniä tuottavan kannan kasvun. Tämä todistaa, ettei keksinnön mukainen bakteriosiini ole nisiiniä. Tämä varmistetaan tosiseikalla, että trypsiini inaktivoi keksinnön mukaista bakteriosiinia tasolla 10 µg/ml (katso taulukkoa I), mikä ei päde nisiinin tapauksessa.

Keksinnön mukaista kahta bakteriosiinia tuottavan viljelmän supernatantin estokirjo on kuitenkin myös leveä siinä mielessä, että se ei ole rajoittunut maitohappobakteereihin, vaan se ulottuu muihin Gram-positiivisten bakteerien lajeihin, erityisesti elintarvikebakteereihin Bifidobacterium, ei-toivottuihin tai patogeenisiin bakteereihin Propionibacterium, Listeria innocua, Listeria monocytogenes ja Micrococcus varians, ja lukuisten Clostridium- ja Bacillus -suvun patogeenisten bakteerien itiöihin ja soluihin, kuten alla taulukossa 3 esitetyt tulokset osoittavat.

Taulukko III

Taulukko II

Laji	No	T (°C)	Esto
Bifidobacterium breve	BBR 27	37	+++
	BBR4	37	+++
	BBR39	37	+++
Bifidobacterium longum	BL20	37	+++
	BL18	37	+++
	BL22	37	+++
Bifidobacterium bifidum	BB7	37	+++
	BB9	37	+++
	BB12	37	+++
Bifidobacterium infantis	B16	37	+++
	B11	37	+++
Propionibacterium	PP1	30	+++
Clostridium botulinum	CB1	30	+
(Itiöt ja vegetatiivisolut)	CB2	30	++
Clostridium tyrobutiricum	107001	30	+
(Itiöt ja vegetatiivisolut)	107002	30	++

Itiöiden seos Clostridium sporogenes Clostridium fermentum Clostridium butilinum (6 kantaa)	100021 100022 A-69: B-213; BKA40; B-73-211; A-80-124clovis; B-1-NCA	30	++
Listeria innocua	24	30	+
	25	30	+
	27	30	+
	39	30	+
	40	30	+
	41	30	+
Listeria monocytogenes	57	30	++
	58	30	++
	59	30	++
	60	30	++
	61	30	++
	62	30	++
Bacillus subtilis (itiöt ja vegetatiivisolut)	A2	30	++
	A3	30	++
	A13	30	++
	A14	30	++
	A15	30	++
Bacillus pumilus (Itiöt ja vegetatiivisolut)	B2	30	++
Bacillus cereus (Itiöt ja vegetatiivisolut)	C14	30	++
Micrococcus varians	MCV1	30	++
Micrococcus luteus (nisiini-indikaattori)	MCL1	30	-

Tässä taulukossa kuvatut tulokset tekevät mahdolliseksi, mm., ottaa lukuun tämän supernatantin tai puhdistettujen bakteriosiinien edulliset käytöt, lisäaineena valmistettaessa elintarviketuotteita patogeenisten aineiden vastaiseksi aktiiviseksi aineeksi, erityisesti esimerkiksi lihatuotteissa Clostridium'ia vastaan, juustoissa Listeria monocytogenes'iä ja C. tyrobutyricum'ia vastaan, tai tuoreessa pastassa tai tuoretta pastaa varten tarkoitetuissa makkaroissa Bacillus'ta vastaan, joista edellä olevat kannat ovat itse asiassa peräisin.

Lopuksi keksinnön mukaisilla bakteriosiineilla ei ole estovaikutusta Gram- -bakteerien kasvuun, kuten voidaan havaita alla taulukossa IV kuvattujen tulosten valossa.

Taulukko IV

Taulukko II

Laji	No.	T (°C)	Esto
Escherichia coli	BZ234	37	-
Salmonella thyphimurium	274	37	-
	273	37	-
Pseudomonas aeruginosa	5	37	-
	15	37	-
Pseudomonas fluorescens	11	37	-
	12	37	-

Lämpöresistenssi, stabiilisuus

Esimerkissä 1 kuvatuissa olosuhteissa saadussa uutteessa läsnä olevilla bakteriosiineilla ei ole hyvää stabiilisuutta säilytyksessä 4 °C:ssa, jos uutetta ei ole aikaisemmin kuumennettu. Toisaalta niillä on hyvä stabiilisuus säilöntää vastaan, jos uutetta esimerkiksi kuumennetaan terävästi ainakin 15 min ajan 90 - 121 °C:ssa.

Tarkastettiin erityisesti, että yli 50 % sellaisen uutteen alkuperäisestä aktiivisuudesta säilyy 5 kuukauden 4 °C:ssa varastoinnin jälkeen, jos mainittua uutetta kuumennetaan etukäteen 20 min ajan 94 °C:ssa esimerkiksi vesihauteella. Tarkastettiin myös, että 100 % aktiivisuudesta säilyy sen jälkeen, kun mainittua uutetta on kuumennettu 60 min ajan 100 °C:ssa (testi suoritettiin termostoidulla öljyhauteella 1 ml:lla keksinnön mukaisen S. thermophilus -kannan viljelmän supernatanttia, joka oli konsentroitua tai muuta).

Toisaalta keksinnön mukaisilla bakteriosiineilla säilyy vain noin kolmasosa niiden aktiivisuudesta sen jälkeen, kun niitä on esimerkiksi sterilointikäsitelty 30 min ajan 121 °C:ssa (testi suoritettu 40 ml:lla keksinnön mukaisen menetelmän S. thermophilus -kannan viljelmän konsentroimattomalla supernatantilla).

Lopuksi ultrasuodatustesteillä Amicon-suodattimilla, minkä jälkeen seuraa geelielektroforeesi (SDS-PAGE), havaitaan, että keksinnön mukaiset bakteriosiinit S. thermophilus'in viljelmän supernatantissa, erityisesti esimerkissä 1 saadussa standardiviljelmän supernatantissa, esiintyy aggregaattien muodossa, joiden molekyylimassa (MW) on yli 10 kDa, ja joista 67 %:lla on MW alle 100 kDa tasolla 33 % on MW yli 100 kDa.

Bakteriosiinien puhdistus

Seuraavassa kuvauksessa trifluorietikkahapon ja asetonitriilin %-osuudet esitetään tilavuuden mukaan.

Tuotetaan 1 l CNCM I-1351 -kannan viljelmää M17 -väliaineessa, jota on täydennetty 1 % sakkaroosia, 6 tunnin ajan, 42 °C:ssa ja anaerobisissa olosuhteissa.

Sitten lisätään 20 g XAD-7 -hartsia (Sigma) suoraan viljelmään, ja koko seosta sekoitetaan varovasti 1 tunnin ajan 4 °C:ssa. Sitten seos suodatetaan Schleicher & Schvell -suodattimen no. 604 (Saksa) läpi, sitten suodattimella pysynyt hartsi pestään bakteerien poistamiseksi 1 l:lla 50 mM etikkahappoliuosta, pH 5,2. Sitten hartsi lisätään kolonniin, ja bakteriosiinit eluoidaan 45 ml:lla liuosta, joka sisälsi 70 % asetonitriiliä ja 0,1 % trifluorietikkahappoa (TFA). Sitten saadaan eluaattia, joka sisältää molempia bakteriosiineja.

Sitten nämä kaksi eluoitua bakteriosiinia erotetaan seuraavalla tavalla.

Eluaatin tilavuus pienennetään ensin 24 ml:aan sentrifugointi/pakastuskuivauksella (Speedvac, Savant Instrument), sitten saatu tilavuus säädetään konsentraatioon 2 M NaCl ja 250 mM Tris·Cl, pH 8, tilavuuteen 50 ml, sitten tämä tilavuus injisoidaan Phenyl Superose HR 16/10 -kolonniin, jolla on hydrofobista vuorovaikutusta (Pharmacia), ja joka on tasapainotettu aikaisemmin puskurilla, joka sisältää 50 mM Tris·Cl:ää,

pH 8 ja 2 M NaCl:ää. Ajetaan sitten peräkkäin nopeudella 4 ml/min 200 ml edellä olevaa puskuria, 100 ml lineaarista gradienttia lähtien edellä olevasta puskurista ja lopettaen 50 mM Tris·Cl liuoksella, pH 8, 100 ml edellä olevaa liuosta, 60 ml puhdasta vettä, 60 ml 50 mM Tris·Cl -liuosta, pH 8, ja lopuksi 60 ml puhdasta vettä.

50 µl kutakin fraktiota, joka on kerätty kolonnin ulostulossa, laimennetaan sitten 50 µl:aan 0,1 % TFA:ta, sitten testataan kunkin seoksen antibakteriaalinen aktiivisuus edellä kuvatulla agarkaivotestillä.

Täten havaitaan, että fraktioilla 470:nnestä ml:sta 490:teen ml:aan on antibakteriaalista aktiivisuutta. Sitten nämä fraktiot sekoitetaan, tämän seoksen tilavuus pienennetään sentrifugointi/pakastuskuivauksella 1 ml:ksi, sitten tämä pienennetty tilavuus injisoidaan Pep RPC HR 5/5 -kolonniin (Pharmacia), joka on tasapainotettu etukäteen 0,1-%:isella TFA-liuoksella, jota kutsutaan tässä kuvauksessa "liuokseksi A". Valmistetaan myös eluutioliuos "B", joka sisältää 70 % asetonitriiliä ja 0,097 % TFA:ta. Sitten kolonnin läpi ajetaan peräkkäin nopeudella 1 ml/min 1 ml liuosta A, 9 ml lineaarista gradienttia lähtien liuoksesta A ja päättyen 50/50-seokseen liuoksista A ja B, 2 ml tätä viimeksi mainittua seosta, 7 ml lineaarista gradienttia lähtien tästä viimeksi mainitusta seoksesta ja lopettaen toisella 20/80 -seoksella liuoksista A ja B, 2 ml lineaarista gradienttia lähtien tällä toisella seoksella ja lopettaen liuoksella B, sitten 2 ml tätä viimeksi mainittua liuosta.

Sitten fraktioiden antibakteriaalinen aktiivisuus kolonnin ulostulossa määritetäänedellä kuvatulla agarkaivotestillä. Kaikilla fraktioista 14:sta ml:sta 22:nteen ml:aan on antibakteriaalista aktiivisuutta. Toisaalta fraktioissa 15 ja 21 (millilitroissa) erotetaan kaksi tärkeää huippua, jotka havaitaan optisella tiheydellä 215 mn.

Bakteriosiinien sekvensöinti

Fraktioiden 15, 18, 20, 21 ja 22 sisältämien proteiinien N-terminaalinen osa sekvensöidään automaattista Applied Biosystems 4774 -sekvensöijää käyttämällä.

Täten fraktiossa 15 paljastetaan peptidin läsnäolo, jolla on 48 aminohapon sekvenssi, joka on identtinen sekvenssin SEQ ID NO:1 N-terminaalisen osan kanssa. Eräällä toisella peptidillä, jota on pääasiassa läsnä fraktiossa 21, on myös 23 aminohapon sekvenssi, joka on identtinen, N-terminaalisen osan suhteen, sekvenssin SEQ ID NO:2 kanssa.

Tämän vuoksi nämä tulokset osoittavat, että kanta CNCM I-1351 tuottaa kahta peptidiä, joilla on antibakteriaalista aktiivisuutta. Fraktioilla 15 ja 21 saatujen estorenkaiden ulkonäköjen välinen ero tekee kuitenkin mahdolliseksi epäillä keksinnön mukaisen termofiliini 1:n ja termofiliini 2:n välistä erilaista antibakteriaalista aktiivisuutta.

Toisaalta aminohappokoostumus fraktioissa 15 ja 21, jotka oli aikaisemmin hydrolysoitu 6 N HCl:llä, 100 °C:ssa 24 h, analysoidaan tunnetulla "dabsyyliklorididerivatisointi"- menetelmällä. Tulokset osoittavat, että kummankin fraktion aminohappokoostumus vaikuttaa jo vastaavan niiden vastaavaa peptidisekvenssiä.

Lopuksi fraktiot 15 ja 21 alistetaan myös massaspektometrialle, ja termofiliini 1:lle paljastetaan molekyylimassa luokkaa 5800 Da, ja termofiliini 2:lle paljastetaan molekyylimassa luokkaa 3900 Da.

Geenien sekvensöinti bakteriosiineja varten

Alla kuvatussa sekvenssiluettelossa kuvatut degeneroituneet nukleotidisekvenssit SEQ ID NO:6 ja SEQ ID NO:7, jotka vastaavat vastaavasti aikaisemmin sekvensöidyn termofiliini 1

-peptidin N-terminaalista osaa ja C-terminaalista osaa, valmistetaan tavanomaisella tavalla.

Sitten osa SEQ ID NO:6 -sekvenssien seoksesta tehdään radioaktiiviseksi T4 -polynukleotidikinaasin vaikutuksella tavalla, joka kuvataan laboratoriokäsikirjassa "Molecular cloning, a laboratory manual" (2. painos, Sambrook et al., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989), jota kutsutaan tässä selityksessä nimellä "Maniatis".

Sitten suoritetaan PCR ("polymeraasiketju-reaktio") degeneroitujen sekvenssien SEQ ID NO:6 ja SEQ ID NO:7 kahden ei-radioaktiivisen seoksen avulla, kromosomaalisella DNA-valmisteella kannasta CNCM I-1351, tavalla, joka kuvataan käsikirjassa "PCR techology" (H.A. Erdlich toimittaja, M stockton press, Lontoo).

Sitten paljastetaan 128 emäsparin (pb) vyöhyke elektroforeesigeelillä, joka sitten eluoidaan tavalla, joka kuvataan käsikirjassa Maniatis. Sitten osa kloonataan suoraan plasmidiin pGEM-T (Promega) toimittajan suositusten mukaisesti, ja sekvensöidään sitten "dideoksinukleotidi"-menetelmällä, jonka on kuvannut Maniatis, universaaleja pUC19-koettimia käyttämällä. Täten saadaan koetin, jolla on sekvenssi SEQ-ID NO:8, joka kuvataan alla olevassa sekvenssiluettelossa, vastaten sekvenssiä, joka koodittaa termofiliini 1:n aminohappoja 9 - 47. Lopuksi eluoidun 128-pb vyöhykkeen loppuosa tehdään radioaktiiviseksi menetelmällä, jota kutsutaan käsikirjassa Maniatis nimellä "random priming" ("sattumanvarainen alukkeenmuodostus").

Toisaalta suoritetaan EcoRI:llä ja HindIII:lla kannasta CNCM I-1351 olevan kromosomaalisen DNA-valmisteen sulatus entsyymin toimittajan suositusten mukaan, sitten 10 µg sulatustuotteesta ajetaan analyyttisellä elektroforeesigeelillä, DNA siirretään geeliltä alkaliseen väliaineeseen "Zeta-koetin" membraanille (Biorad), membraania esihybridisoidaan yön yli

54 °C:ssa väliaineessa, joka sisältää 6X SSC:tä, 1 % SDS:ää ja 1 % kuorittua maitoa, sitten tämä membraani hybridisoidaan radioaktiiviseen degeneroituneeseen koettimeen SEQ ID NO:6 aikaisemmassa hybridisointiväliaineessa, ensin 18 tunnin ajan 54 °C:ssa, alentaen lämpötilaa 2 °C:lla joka 3. tunti, sitten 24 tunnin ajan 42 °C:ssa. Sitten membraania pestään 2 min ajan, kolmesti peräkkäin, 6X SSC:ssä huoneenlämpötilassa, ja 1 min ajan 6X SSC:ssä 47 °C:ssa. Lopuksi membraani paljastetaan autoradiografiafilmille. Kaikki nämä vaiheet suoritetaan Maniatis-käsikirjan mukaan.

Sitten paljastetaan 3,6-kb vyöhyke, joka tekee meille mahdolliseksi paikantaa kannan CNCM I-1351 kromosomaalisen DNA:n (300 μg) preparatiivisessa elektroforeesigeelissä, joka suoritettiin samoissa olosuhteissa kuin edellä kuvattiin, geeliosan käsittäessä kiinnostuksen kohteena olevan DNA-palan. Sitten tämä geeliosa leikataan pois ja eluoidaan tavanomaisella tavalla, ja eluoitu DNA liitetään vektoriin pUC19 (Messing et al., Methods Enzymol., 101:20, 1983), joka on aikaisemmin hydrolysoitu EcoRI:llä ja HindIII:lla. Nämä vaiheet suoritetaan Maniatis -käsikirjan mukaan.

Escherichia coli -kanta BZ234 (Biocentre collection, University of Bâle, Sveitsi) joka on tehty etukäteen kompetentiksi, transformoidaan tavanomaisesti liittämisväliaineella. Sitten transformoidut solut valitaan α-komplementoinnilla. Sitten menetelmällä, jota kutsutaan nimellä "colony lift" ("kolonian nosto"), Maniatis'in mukaan, 300 transformoitua koloniaa siirretään suodattimelle, jossa ne liuotetaan, ne hybridisoidaan radioaktiiviseen sekvenssiin SEQ ID NO:8, sitten suodatin paljastetaan autoradiografiafilmille.

Sitten filmillä havaitaan 13 koloniaa, joissa on plasmidi, joka pystyy hybridisoitumaan sekvenssin SEQ ID NO:8 kanssa. Sitten näistä kolonioista valitaan kaksi, plasmidi-DNA uutetaan niistä tavanomaisesti, ja DNA-fragmentti kloonattuna kahteen valittuun pUC19-plasmidiin sekvensöidään "dideoksi-

nukleotidi"-menetelmällä, universaalisten pUC19-koettimien avulla, sitten täten saadaan koettimet, jotka perustuvat sekvensseihin.

Täten saadaan alla olevassa sekvenssiluettelossa kuvattu nukleotidisekvenssi SEQ ID NO:3, joka on identtinen kahdelle valitulle plasmidille. Täten tämä sekvenssi käsittää operonin, joka koodittaa kahta proteiinia, joilla on aminohapposekvenssit SEQ ID NO:4, joka vastaa ennen kypsymistä termofiliini 1:tä, ja SEQ ID NO:5, joka vastaa ennen kypsymistä termofiliini 2:ta (katso alla olevaa sekvenssiluetteloa). Eräs kolmas avoin lukukehys alkaa myös tämän sekvenssin nukleotidista 679, ja sen pitäisi varmasti vastata immuniteettigeenistä.

Vertaamalla puhdistetuista bakteriosiineista olevia N-terminaalisia peptidisekvenssejä ja operonin SEQ ID NO:3 koodikehysten koodittamien proteiinien aminohapposekvenssejä voidaan määrittää, että aminohapposekvenssin SEQ ID NO:4 (termofiliini 1) proteiinissa on 23 aminohapon johtopeptidi, jossa on glysiini-glysiini -yksikkö, joka on maitohappobakteereista olevien bakteriosiinien luokan ominaispiirre. Lopuksi termofiliini 1:n molekyylimassa, laskettuna sen nukleotidisekvenssistä, vastaa spektrometrialla havaittua, ts. on luokkaa 5800 Da.

Samoin aminohapposekvenssin SEQ ID NO:5 (termofiliini 2) proteiinissa on 21 aminohapon johtopeptidi, jossa on glysiini-glysiini -yksikkö, joka on maitohappobakteereista olevien bakteriosiinien luokan ominaispiirre. Lopuksi termofiliini 2:n molekyylimass, laskettuna sen nukleotidisekvenssistä, vastaa spektrometrialla havaittua, ts. on luokkaa 3900 Da.

Eri bakteriosiinien merkitys

Termofiliini 1:n sekvenssillä havaittiin homologiaa "laktokokeiini M"-operonin ensimmäisen peptidin kanssa (Klaenhammer

et al., FEMS Micro. Rew., 12, 39-86, 1993). Tämä homologia liittyy GA-yksikön toistoon. Samoin termofiliini 2:lla havaittiin homologiaa "laktasiini F" -operonin geenin kanssa (Klaenhammer et al., edellä mainittu), GenEMBL -tietopankissa käyttämällä TFASTA -ohjelmaa GCG:stä.

Kaksi laktokokeiini M- ja laktasiini F-operonia koodittavat itse asiassa poraatiokomplekseja, jotka ovat tekemisissä useiden peptidien kanssa. Sen vuoksi on mahdollista, että aikaisemmin kuvattu operoni voi koodittaa peptidejä, jotka vaikuttavat yhdessä poraatiokompleksissa.

Siitäö huolimatta ei ole pois suljettua, että kaksi bakteriosiinia vaikuttavat toisistaan riippumatta, johtuen hieman erilaisesta estorenkaasta, joka aikaisemmin kuvatussa agarkaivotestissä havaittiin kahden termofiliinin välillä.

Alla olevat esimerkit esitetään keksinnön mukaisen bakteriosiinin valmistusmenetelmän ja käyttöjen kuvauksena. %-osuudet esitetään tässä painon mukaan, ellei muuta mainita.

Esimerkki 1

M17 -kasvatusväliainetta, johon on lisätty 1 % sakkaroosia, siirrostetaan 1 %:lla (tilavuus/tilavuus) viljelmää, joka sisältää 10^8 S. thermophilus -kannan CNCM I-1351:n mikro-organismia/ml. Inkubointia suoritetaan 6 tunnin ajan 42 °C:ssa anaerobisissa olosuhteissa, minkä jälkeen väliaine sisältää noin 10^8 kannan mikro-organismia/ml ja sen OD_{600} on 3,6.

Täten saatu standardiviljelmä sentrifugoidaan. Supernatantti (standardi) kerätään. Se säädetään H_3PO_4:llä happamaksi pH-arvoon 1,5, saadaan sakkaa, joka poistetaan sentrifugoimalla, ja kerätään hapan saostussupernatantti.

Viimeksi mainitun sisältämät bakteriosiinit saostetaan 10-%:isella trikloorietikkahapolla. Saostetut bakteriosiinit

kerätään ja suspendoidaan tämän jälkeen uudelleen vesipohjaiseen suspensioon, jossa on 0,2 % trifluorietikkahappoa (tilavuus/tilavuus).

Bakteriosiinit saostetaan uudelleen 10-%:isella trikloorietikkahapolla. Saostuneet bakteriosiinit kerätään, ne pestään 100-%:isella asetonilla, ja ne suspendoidaan uudelleen vesipohjaiseen suspensioon, jossa on 0,2 % trifluorietikkahappoa (tilavuus/tilavuus).

Saadaan keksinnön mukaisten bakteriosiinien standardiraakauutetta, jonka aktiivisuus on 1,4105 au/ml.

Alla olevassa taulukossa VI esitetään joitain yksityiskohtia standardisupernatantin yhden litran ominaispiirteistä ja standardiraakauutteen 18 ml:n ominaispiirteistä, ts. siitä saadusta tiivisteestä, erityisesti proteiinipitoisuuden ja antibakteriaalisen aktiivisuuden mielessä.

Taulukko VI

	Tilavuus (ml)	Kokonais-proteiini (PIERCE-pakkaus) (mg)	au/ml	au/mg proteiinia	au/mg kuivapainoa	Kokonais-aktiivisuus (au)
Supernatantti	1000	6700	$4,6x10^2$	68	-	$4,6x10^3$
Raakauute	18	83	$1,4x10^5$	$2,5x10^5$	$1,4x10^5$	$2,1x10^6$

Esimerkki 2

Valmistetaan tyypiltään kovia jogurtteja, jotka käsittävät keksinnön mukaista S. thermophilus -kantaa CNCM I-1351, ja S. thermophilus -kantaa ST11 (joka on keksinnön mukaisille bakteriosiineille resistenttiä mutta jolla ei ole antibakteriaalista aktiivisuutta), ja edellä mainittua L. bulgaricus -kantaa YL5.

Täten valmistetaan maitoa, joka perustuu kokomaitoon ja joka sisältää 3,7 % rasvaa ja 2,5 % kuorittua maitojauhetta. 40 l tätä maitoa pastöroidaan 6 min ajan 92 °C:ssa, sitten se homogenisoidaan 75 °C:ssa ja 15 MPa:ssa (150 bar) (kaksi vaihetta), lopuksi se jäähdytetään lämpötilaan noin 42 °C.

Sitten pakastekuivatut kannat S. thermophilus CNCM I-1351, S. thermophilus ST11 ja L. bulgaricus YL5 aktivoidaan uudelleen useilla peräkkäisillä esikasvatuksilla steriilissä MSK -väliaineessa (10 % liuotettua kuorittua maitojauhetta, joka sisältää 0,1 % kaupallista hiivauutetta).

Sitten steriili maito siirrostetaan määrällä 1 % (tilavuus/-tilavuus) kunkin S. thermophilus -kannan kolmatta esiviljelmää otettuna väliaineenkoaguloimisvaiheessa, ja määrällä 2 % (tilavuus/tilavuus) L. bulgaricus -kannan kolmatta esiviljelmää otettuna väliaineenkoaguloimisvaiheessa. Sitten maitoa inkuboidaan 42 °C:ssa pH-arvoon noin 4,65, sitten se jäähdytetään 4 °C:seen.

Vertailun vuoksi valmistetaan perinteistä kovatyyppistä jogurttia samalla tavalla kuin edellä kuvattiin, aikaisemmin kuvatuilla S. thermophilus -kannoilla YS8 ja SFi3, ja L. bulgaricus -kannalla YL18, joita perinteisesti käytetään jogurtin valmistukseen.

Alla olevassa taulukossa kuvataan saatujen tuotteiden ominaispiirteet, erityisesti niiden pH-arvo niiden 4 °C:ssa säilytyksen aikana.

Esimerkit	Aika hapotukseen pH-arvoon 4,65	Tuotteen pH-arvo 1 päivän kuluttua (4 °C:ssa)	Tuotteen pH-arvo 24 päivän kuluttua (4 °C:ssa)
Esimerkki 2	8 tuntia 30 min	4,6	4,6
Vertailuesimerkki	6 tuntia	4,34	4,3

Esimerkki 3

Valmistetaan perinteisellä tavalla mozzarellajuustoa S. thermophilus -kannan CNCM-1351 avulla.

Esimerkki 4

10 l S. thermophilus -kannan CNCM I-1351 viljelmää tuotetaan M17 -väliaineessa, jota on täydennetty 1 %:lla sakkaroosia, 6 tunnin ajan 42 °C:ssa ja anaerobisissa olosuhteissa. Sitten viljelmään lisätään suoraan 200 g XAD-7 -hartsia (Sigma), koko seosta sekoitetaan varovasti 1 tunnin ajan 4 °C:ssa. Sitten seos suodatetaan Schleicher & Schvell -suodattimen no. 604 (Saksa) läpi, sitten suodattimelle jäänyt hartsi pestään bakteerien poistamiseksi 10 l:lla 50 mM etikkahappoliuosta, pH 5,2. Sitten hartsiin lisätään 450 ml liuosta, joka sisältää 100 % etanolia ja 20 mM ammoniumasetaattia, koko seos suodatetaan hartsin poistamiseksi, sitten suodos pakastekuivataan, kunnes saadaan jauhetta, joka sisältää keksinnön mukaisia bakteriosiineja, ja jota voidaan käyttää elintarviketeollisuudessa.

Antibakteriaalinen aktiivisuus tällä jauheella, joka on liuotettu aikaisemmin veteen, määritetään sitten edellä kuvatulla agarkaivotestillä. Tällä jauheella on 10^7 au/g jauhetta.

Lopuksi 0,5 g/kg edellä olevaa jauhetta lisätään lihahyytelöön sen perinteisellä tavalla tapahtuvan valmistuksen aikana. Täten saadaan lihahyytelöä, joka sisältää $5 \cdot 10^3$ au/g bakteriosiineja, jotka voivat estää täysin patogeenisten bakteerien, erityisesti Clostridium'in kehittymisen.

Esimerkki 5

Tämä esimerkki liittyy ihonhoitoon tarkoitetun kosteusvoiteen valmistukseen, joka voide sisältää 0,05 g/kg esimerkissä 4 kuvattua jauhetta, ts. sen vuoksi 510^2 au/g bakteriosiineja, jotka pystyvät estämään ei-toivottujen bakteerien kehittymi-

sen iholla.

Tämän emulsion valmistamiseksi lipidifaasin A komponentit sekoitetaan, ja se kuumennetaan 75 °C:seen. Valmistetaan vesifaasi B, ja myös se kuumennetaan 75 °C:seen, sitten se lisätään lipidifaasiin A sekoittaen samalla hitaasti, ja sitten seos jäähdytetään, hitaasti sekoittaen, huoneenlämpötilaan, ts. noin 25 °C:seen. Tässä lämpötilassa lisätään hitaasti ainesosat C formulaation järjestyksessä.

Lipidifaasi A

	%
Peg-6-stearaatti, glyseraatti ja peg-20-sethyylieetteri (peg:polyetyleeniglykoli)	15
Vaseliiniöljy	5
Vehnänalkioöljy, joka on stabiloitu 0,1 %:lla fenyyli-indaaneja (hapetuksenestoaine) ja 1 %:lla soijafosfolipidejä (katso EP4109355.1)	3
Makeat manteliöljyt	2
Setyylialkoholi	1
Isostearyyli-isostearaatti	2
2-oktyyli-dodekyyli-myristaatti	1
Lanoliinivaha	1

Vesipohjainen faasi B

	%
Metyyli-isotiatsoliini	0,1
Demineralisoitu vesi	59,6
Ihmisen istukan proteiini	2

Lisäaineet C

	%
Propyleeniglykjoli ja calendulauute	2
50 % liukoista kollageenia demineralisoidussa vedessä	5,8
Hajuste	0,3
2,5 % esimerkin 4 mukaista bakteriosiinijauhetta demineralisoidussa vedessä	0,2

Esimerkki 6

0,5 g/kg esimerkissä 4 kuvattua bakteriosiinijauhetta lisätään nestemäiseen hammastahnaan. Täten tämä hammastahna pystyy estämään suuontelon patogeenisten bakteerien, ja erityisesti Streptococcus sobrinus'in kehittymisen.

Esimerkki 7

Liuosta, joka sisältää esimerkin 4 bakteriosiinijauhetta laimennettuna veteen määrä 1 %, suohkutetaan elinterviketuotteelle, joka on tarkoitettu steriloitavaksipakkauksen aikana tapahtuvan jälkikontaminoitumisen estämiseksi.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
(B) KATU: Case postale 353
(C) KAUPUNKI: Vevey
(E) MAA: Sveitsi
(F) POSTINUMERO): 1800
(G) PUHELIN: (021) 924 47 60
(H) TELEFAX: (021) 924 28 80

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Bacteriosins from Streptococcus thermophilus

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 8

(iv) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINEEN TYYPPI: levyke
(B) TIETOKONE: IBM Pc-yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: Pc-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio #1.25 (EPO)

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: CH 2628/93-7
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 1993-09-03

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 62 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Streptococcus thermophilus
(B) KANTA: CNCM I-1351

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 1:

```
Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Leu Lys Asp Met Gly Gly Tyr Ala Leu Ala
1               5                  10                  15

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Leu Trp Gly Ala Pro Ala Gly Gly Val Gly
            20                  25                  30

Ala Leu Pro Gly Ala Phe Val Gly Ala His Val Gly Ala Ile Ala Gly
        35                  40                  45

Gly Phe Ala Cys Met Gly Gly Met Ile Gly Asn Lys Phe Asn
    50                  55                  60
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 2:N TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 43 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Streptococcus thermophilus
(B) KANTA: CNCM I-1351

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 2:

```
Gln Ile Asn Trp Gly Ser Val Val Gly His Cys Ile Gly Gly Ala Ile
1               5                  10                  15

Ile Gly Gly Ala Phe Ser Gly Gly Ala Ala Ala Gly Val Gly Cys Leu
            20                  25                  30
```

Val Gly Ser Gly Lys Ala Ile Ile Asn Gly Leu
35 40

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 770 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Streptococcus thermophilus
(B) KANTA: CNCM I-1351

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) ASEMA: 221..475

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: sig_peptidi
(B) ASEMA: 221..289

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: mat_peptidi
(B) ASEMA: 290..475
(D) LISÄTIEDOT: /tehtävä= "koodittaa termofiliini 1:tä"

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) ASEMA: 495..686

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: sig_peptidi
(B) ASEMA: 495..557

(ix) PIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: mat_peptide
(B) ASEMA: 558..686
(D) LISÄTIEDOT: /tehtävä= "koodittaa termofiliini 2:ta"

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 3:

```
AATGGCACGA ACGTCCTGAA TGGTTAAAAG ATATTTCGGA TCTTCCTAAA AAATACATAC       60

TGAACGGTCG CTTTCCCTTC TTGAATGGTA AAATTTTCCC ATTAGGAAAG TTAAATGACT      120

GTTCAAGAAA TGGGGAAATT ATTTTTTGAA GTAGTGCTAT ACTAGACTTG TCAAGGTTGC      180

AACCCGACAA AATAAAAATA TIAGGTAGGA GATATTTACA ATG AAT ACA ATA ACT         235
                                            Met Asn Thr Ile Thr
                                            -23         -20

ATT TGT AAA TTT GAT GTT TTA GAT GCT GAA CTT CTT TCG ACA GTT GAG         283
Ile Cys Lys Phe Asp Val Leu Asp Ala Glu Leu Leu Ser Thr Val Glu
            -15                 -10                 -5

GGT GGA TAC TCT GGT AAG GAT TGT TTA AAA GAC ATG GGA GGA TAT GCA         331
Gly Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Leu Lys Asp Met Gly Gly Tyr Ala
          1               5                  10

TTG GCA GGA GCT GGA AGT GGA GCT CTG TGG GGA GCT CCA GCA GGA GGT         379
Leu Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Leu Trp Gly Ala Pro Ala Gly Gly
 15                  20                  25                  30

GTT GGA GCA CTT CCA GGT GCA TTT GTC GGA GCT CAT GTT GGG GCA ATT         427
Val Gly Ala Leu Pro Gly Ala Phe Val Gly Ala His Val Gly Ala Ile
                35                  40                  45

GCA GGA GGC TTT GCA TGT ATG GGT GGA ATG ATT GGT AAT AAG TTT AAC         475
Ala Gly Gly Phe Ala Cys Met Gly Gly Met Ile Gly Asn Lys Phe Asn
            50                  55                  60

TAAGGAAGGA GTTTATATC ATG AAG CAG TAT AAT GGT TTT GAC GTT CTA CAT        527
                     Met Lys Gln Tyr Asn Gly Phe Glu Val Leu His
                     -21 -20                 -15

GAA CTT GAC TTA GCA AAT GTA ACT GGC GGT CAA ATT AAT TGG GGA TCA         575
Glu Leu Asp Leu Ala Asn Val Thr Gly Gly Gln Ile Asn Trp Gly Ser
-10                  -5                  1               5
```

```
GTT GTA GGA CAC TGT ATA GGT GGA GCT ATT ATC GGA GGT GCA TTT TCA      623
Val Val Gly His Cys Ile Gly Gly Ala Ile Ile Gly Gly Ala Phe Ser
            10                  15                  20

GGA GGT GCA GCG GCT GGA GTA GGA TGC CTT GTT GGG AGC GGA AAG GCA      671
Gly Gly Ala Ala Ala Gly Val Gly Cys Leu Val Gly Ser Gly Lys Ala
         25                  30                  35

ATC ATA AAT GGA TTA TAAAAGTCTT TTATCGCTTT TATTATTCAT AATTCCCCTT      726
Ile Ile Asn Gly Leu
     40

GTAGTTATAC TAATCGTTCT TCGAAAGAAT AATCAGAAAC TAAT                     770
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
   (A) PITUUS: 85 aminohappoa
   (B) TYYPPI: aminohappo
   (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 4:

```
Met Asn Thr Ile Thr Ile Cys Lys Phe Asp Val Leu Asp Ala Glu Leu
-23         -20                 -15                 -10

Leu Ser Thr Val Glu Gly Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Leu Lys Asp
         -5                  1                   5

Met Gly Gly Tyr Ala Leu Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Leu Trp Gly
 10                  15                  20                  25

Ala Pro Ala Gly Gly Val Gly Ala Leu Pro Gly Ala Phe Val Gly Ala
                 30                  35                  40

His Val Gly Ala Ile Ala Gly Gly Phe Ala Cys Met Gly Gly Met Ile
             45                  50                  55

Gly Asn Lys Phe Asn
         60
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 64 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 5:

```
Met Lys Gln Tyr Asn Gly Phe Glu Val Leu His Glu Leu Asp Leu Ala
-21 -20                 -15                 -10

Asn Val Thr Gly Gly Gln Ile Asn Trp Gly Ser Val Val Gly His Cys
 -5                   1                   5                  10

Ile Gly Gly Ala Ile Ile Gly Gly Ala Phe Ser Gly Gly Ala Ala Ala
             15                  20                  25

Gly Val Gly Cys Leu Cal Gly Ser Gly Lys Ala Ile Ile Asn Gly Leu
         30                  35                  40
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)

(iii) HYPOTEETTINEN: KYLLÄ

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 6:

GAYATGGGNG GNTAYGC 17

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)
(iii) HYPOTETTINEN: KYLLÄ

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 7:

GCTATNGCNC CNACGTG 17

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Streptococcus thermophilus
(B) KANTA: CNCM I-1351

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO: 8:

GATTGTTTAA AAGACATGGG AGGATATGCA TTGGCAGGAG CTGGAAGTGG AGCTCTGTGG 60

GGAGCTCCAG CAGGAGGTGT TGGAGCACTT CCAGGTGCAT TTGTCGGAGC TCATGTTGGG 120

GCAATTGC 128

Patenttivaatimukset

1. Streptococcus thermophilus -bakteriosiini, t u n n e t t u siitä, että sillä on aminohapposekvenssi SEQ ID NO:1.

2. Streptococcus thermophilus -bakteriosiini, t u n n e t t u siitä, että sillä on aminohapposekvenssi SEQ ID NO:2.

3. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukaiset bakteriosiinit, t u n n e t u t siitä, että ne eroavat sekvenssistä SEQ ID NO:1 tai SEQ ID NO:2 ainakin yhden aminohapon substituutiolla, deleetiolla ja/tai insertiolla.

4. Nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodittaa yhtä patenttivaatimusten 1 - 3 mukaisista Streptococcus thermophilus -bakteriosiineista.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että sillä on nukleotidisekvenssi SEQ ID NO:3, joka koodittaa patenttivaatimusten 1 ja 2 mukaisia bakteriosiineja.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 221 - 475.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 289 - 475.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 495 - 686.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 558 - 686.

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 221 - 288.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen nukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO:3 nukleotidit 495 - 557.

12. Streptococcus thermophilus -signaalipeptidi, t u n n e t t u siitä, että sitä koodittavat patenttivaatimusten 10 ja 11 mukaiset nukleotidisekvenssit.

13. Streptococcus thermophilus -kanta, t u n n e t t u siitä, että se tuottaa ainakin yhtä patenttivaatimusten 1 - 3 mukaisista bakteriosiineista, erityisesti Streptococcus thermophilus -kanta CNCM I-1351, joka tuottaa patenttivaatimusten 1 ja 2 mukaisia bakteriosiineja.

14. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaisen ainakin yhden bakteriosiinin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että Streptococcus thermophilus -kantaa, joka tuottaa ainakin yhtä mainituista bakteriosiineista, kasvatetaan väliaineessa ja olosuhteissa, jotka ovat suotuisat Streptococcus thermophilus'in kasvulle, kunnes väliainen sisältää 10^7 - 10^9 mainiotun kannan mikro-organismia/ml, saatu viljelmä sentrifugoidaan, ja sitten valmistetaan supernatantin uutetta, joka sisältää ainakin yhtä mainituista bakteriosiineista.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun supernatantin sisältämistä mainituista bakteriosiineista ainakin yhden uutteen valmistamiseksi supernatantin pH-arvo säädetään H_3PO_4:llä pH-arvoon 1,0 - 2,0, poistetaan saostuma, ja suoritetaan trikloorietikkahapolla yksi tai useita peräkkäisiä saostuksia, joiden jälkeen suspendoidaan uudelleen vesipohjaiseen suspensioon trifluorietikkahapon kanssa.

16. patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu Streptococcus thermophilus -kanta on CNCM I-1351 -kanta, joka tuottaa mainittuja bakteriosiineja.

17. Patenttivaatimusten 1 - 3 mukaisen ainakin yhden bakteriosiinin käyttö, erityisesti uutteen muodossa, joka on saatu patenttivaatimuksen 14 mukaisesti ja/tai Streptococcus thermophilus -kannan käyttö, joka tuottaa ainakin yhtä mainituista bakteriosiineista, elintarvikkeiden tai kosmeettisten tuotteiden valmistuksessa.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen käyttö, mainitun Streptococcus thermophilus -kannan viljelmän, herätteenä juustojen valmistuksessa tai hapotettujen maitotuotteiden valmistuksessa.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen käyttö, ainakin yhden mainituista bakteriosiineista tai mainitun kannan, lisäaineena tai aktiivisena aineena patogeenisia bakteereja vastaan, erityisesti lihatuotteiden kuten hyytelöiden valmistuksessa, aktiivisena aineena Clostridium botulinum'ia vastaan, tai ihovoiteiden tai pesunesteiden valmistuksessa, aktiivisena aineena ihon patogeenisia bakteereita vastaan, tai oraalisten terveydenhoitotuotteiden valmistuksessa, aktiivisena aineena suuontelon patogeenisia bakteereita vastaan, erityisesti Streptococcus sobrinus'ia vastaan.

20. Ainakin yhden, patenttivaatimusten 4 - 9 mukaisista nukleotidisekvensseistä käyttö, antamaan, transformaatiolla, bakteereille, hiivalle tai kasveille, kapasiteetin estää määrättyjä bakteereita.

21. Patenttivaatimusten 10 ja 11 mukaisten nukleotidisekvenssien käyttö, signaalisekvenssinä, joka on fuusioitunut kiinnostuksen kohteena olevaan geeniin, antamaan, transformaatiolla, Streptococcus thermophilus -kannalle kapasiteetin

erittää mainitun, kiinnostuksen kohteena olevan geenin koodittamaa proteiinia.