(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/62
C07K 14/315
C12P 21/02
C12R 1/46

(45) 공고일자 1999년04월01일
(11) 등록번호 특0183187
(24) 등록일자 1998년12월15일

(21) 출원번호	특1995-701744	(65) 공개번호	특1995-704499
(22) 출원일자	1995년05월02일	(43) 공개일자	1995년11월20일
(86) 국제출원번호	PCT/EP 94/02805	(87) 국제공개번호	WO 95/06736
(86) 국제출원일자	1994년08월24일	(87) 국제공개일자	1995년03월09일
(81) 지정국	국내특허 : 호주 브라질 캐나다 중국 체코 핀란드 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 뉴질랜드 폴랜드 러시아 스웨덴 슬로바키아 우크라이나 미국		
(30) 우선권주장	2628/93-7 1993년09월03일 스위스(CH)		

(73) 특허권자 소시에떼 데 프로듀이 네슬레 소시에떼 아노님 로망 엘. 뷜르
스위스연방 체하-1800 베베이 사서함 353
(72) 발명자 쟈끄-에드아루 제르몽
스위스연방 체하-1023 크리씨에 슈멩 데 쎄드르 18
올리비에 마르씨제
스위스연방 체하-1005 로잔느 아브뉘 뒤 레망 40
베아 몰레
스위스연방 체하-1074 몰리-마르고 루뜨 드 몰리-마르고
(74) 대리인 이준구, 박해선

심사관 : 김형준

(54) 스트렙토코커스 써모필러스 기원 박테리오신

요약

본 발명은 아미노산 서열 SEQ ID NO : 1 및 SEQ ID NO : 2를 갖는 두 종류의 새로운 스트렙토코커스 써모필러스 기원의 박테리오신, 이러한 두 박테리오신의 신호 펩티드, 이러한 박테리오신을 인코드하는 뉴클레오티드 서열 특히, 서열 SEQ ID NO: 3을 갖는 상기 박테리오신을 인코드하는 오페론, 하나 이상의 상기 박테리오신을 만드는 균주, 특히, CNCM I-1351 균주, 하나 이상의 상기 박테리오신을 함유하는 상층액 추출물을 제조하는 방법, 그리고, 식품 특히, 치즈 및 산성화된 우유 및 화장품의 제조에 있어 병원균에 대한 유효 제제로써 사용되는 박테리오신에 관한 것이다.

명세서

[발명의 명칭]

스트렙토코커스 써모필러스 기원 박테리오신

[발명의 상세한 설명]

본 발명의 주제는 스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus) 기원의 두가지 박테리오신, 이러한 박테리오신을 만드는 스트렙토코커스 써모필러스 균주, 이러한 균주로부터 박테리오신을 제조하는 방법 뿐만 아니라, 이러한 박테리오신 및/또는 이 균주를 식품 또는 화장품의 제조에 사용하는 것이다.

[기술의 설명]

박테리오신은 항균 효과 또는 항생 효과에 관여하는 단백질 부분을 함유하는, 세균에 대하여 유효한 항균 물질 또는 체제이다. 박테리오신은 일반적으로 그를 만드는 세균 종과 밀접한 종에 대하여 제한되는 좁은 활성 범위 또는 억제 범위를 가진다.

현재, 4가지 스트렙토코커스 써모필러스 박테리오신이 알려져 있다.

첫번째는 특별히 10 - 20 kD의 분자량을 가지며, 90℃에서 이열성 및 펩신에대한 감수성을 가진다(Smaczny et al., Deutsche Molkerei-Zeitung, 105:15, 460-464, 1984).

두번째는 유럽 특히 443543에 주로 그 세균 억제 범위가 기재되어 있으며, 특별히 스타필로코커스(Staphylococcus) 및 슈도모나스(Pseudomonas)속의 세균 증식을 억제하는 능력과 락토코커스(Lactococcus) 및 엔테로코커스(Enterococcus)속 및 바실러스 세레우스 종의 세균증식을 억제 하는데 불활성을 가지고 있다.

세번째는 풀루사니(Pulusani) 등이 설명한 것(J. of Food Science, 44:2, 575-578, 1979)으로 슈도모나스

를 크게 억제하며, 펩신에 대한 감수성이 없고 잔여당을 함유한다.

마지막으로, 네번째는 길라노(Gilano) 등이 설명한 것(Microbiologie-Aliment-Nutrition, 8, 21-30, 1990) 으로, 펩신에 대한 감수성이 없으며 잔여당을 함유하고, 100Kd의 투과성을 가진 막을 통과하지 못한다.

이제, 스트렙토코커스 써모필러스는 특별히 예를 들면 요구르트 및 몇가지 치즈와 같은 유제품의 제조에 관련하여 식품 분야에서 매우 중요하다. 더욱이 바실러스(Bacillus), 클로스트리디움(Clostridium) 및 리스테리아(Listeria)에 대하여 동시에 유효한 박테리오신은 거의 존재하지 않는다. 그러므로 이러한 유형의 제품에서 특별히 더 넓은 항균 활성 범위를 가지는 것은 매우 유용하고, 달리 말하면 이러한 대표적인 종에서 만들어지는 더 넓은 범위의 박테리오신이 필요하다.

본 발명의 목적은 이러한 필요에 부응하는 것이다.

[발명의 요약]

본 발명의 주제중 하나는 두 종류의 새로은 스트렙토코커스 써모필러스 박테리오신의 아미노산 서열 뿐만 아니라, 그 방출을 허락하는 신호 펩티드의 특성 규명이다.

또한, 이러한 두 박테리오신을 인코딩(encoding) 하는 뉴클레이티드의 서열은 본 발명의 또 다른 주제이다.

본 발명에 따라 하나 이상의 박테리오신을 만드는 스트렙토코커스 써모필러스 균주는 특히 본 발명의 따른 두 종류의 박테리오신을 만들 수 있는 하기 기재된 스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주는 본 발명의 또 다른 주제이다.

본 발명에 따른 하나 이상의 박테리오신 추출물을 만드는 방법은 또한 본 발명의 또다른 주제이다.

마지막으로, 본 발명의 최종 주제는 본 발명에 따른 박테리오신의 사용 및 그 핵산 서열 뿐만 아니라 그 신호 서열의 사용이다.

[발명의 상세한 설명]

스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주를 체코슬로바키아의 발효 유제품으로부터 분리하였을 때, 놀랍게도 넓은 범위의 세균 증식을 억제하는 뚜렷한 성질을 갖는 것이 관찰되었다. 이 균주를 부다페스트 협약에 의거, 1993년 8월 5일 프랑스의 파스테르 연구소의 국립 종균소(Collection Nationale de Cultures de Microorganisms, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15)에 기탁 하였고, 그 기탁 번호는 I-1351이다.

특별히, 이 균주의 형태, 당의 발효 등에 대한 자세한 설명은 하기에 주어진다.

형태 :

- 무 편모 사슬 형성 구균, 포자 형성하지 않음.

- 그람-양성형 미생물, 카탈라제 음성 및 통성혐기성균.

당의 발효 :

D-글루코스, 젖당, 자당, 라피노스로부터 젖산의 생산. 만노스, 과당, 갈락토스로부터 젖산을 생산 못함.

기타 :

둘 이상의 박테리오신, 박테리오신에 대한 면역성을 갖는 단백질 및 망상의 성질을 갖는 외부폴리사카리드(exopolysaccharides)를 생산하는 균주.

그러므로, CNCM I-1351 균주의 배양 상층액은 비교적 넓은 항균 활성 범위를 갖는다. 이러한 상층액에 대한 세균 감수성 중에서 예를 들면 스트렙토코커스 써모필러스, 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis), 락토코커스 락티스 비오바 디아세틸락티스(biovar diacetylactis), 락토코커스 크레모리스(L. cremoris), 엔테로코커스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코커스 패시움(E. faecium), 락토바실러스 퍼멘툼(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 헬베티커스(Lactovacillus helveticus), 락토바실러스 불가리커스(Lactovacillus bulgaricus), 락토바실러스 액시도필러스(Lactovacillus acidophilus), 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis), 루코노스톡 크레모리스(Leuconostoc cremoris), 루코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides), 비피도박테리움 브레베(Bifidobacterium breve), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum), 비피도박테리움 비피둠(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리움 인판티스(Bifidobacterium infantis), 프로피오니박테리움(Propionibacterium), 리스테리아 이노쿠아(Listeria innocua), 리스테리아 모모사이토제네스(Listeria momocytogenes), 마이크로코커스 베리안스(Micrococcus varians) 및 클로스트리디움 보틀리늄(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 티로부티리컴(Clostridium tyrobutyricum), 클로스티리디움 비페멘타스(Clostridium bifementans), 클로스트리디움 스포로제네스(Clostridium sporogenes), 및 바실러스 섭틸러스(Bacillus subtilis), 바실러스 푸밀러스(Bacillus pumilus) 및 바실러스 세레우스(Bacillus cere us), 및 바실러스 세레우스(Bacillus cereus)의 영양생장기 세포의 포자들이 포함된다(Bacteries lactique, Vol 1, 1994, Lorica edition).

CNCM I-1351 균주로부터 항균 활성을 담당하는 박테리오신이라고 불리는 두 단백질 요소를 분리하는 것이 가능하였다.

최종적으로, 여기에서 써모필린 1(thermophilin 1)이라 명명한, 본 발명에 따른 첫번째 박테리오신은 하기 서열 목록에 기재된 서열 SEQ ID NO: 1을 가진다.

더욱이, 하나의 속 또는 하나의 세균 종에 대하여 써모필린 1에 의해 나타나는 것 보다 더 넓고 더 특별한 범위의 항균 활성을 갖는 박테리오신을 고안하는 것이 가능하고, 후자의 경우 하나 이상의 아미노산의

치환, 결실 및/또는 삽입 등으로 서열 SEQ ID NO: 1과는 상이하다. 정말로, 그것은 니신 Z가 니신 A보다 더 이로운 활성 범위를 가지지만, 단지 하나의 아미노산의 치환이 있어 니신 A와 다르다는 것이 유럽 특허 EP-521240에 이미 공지되어있다.

이것이 원 서열 SEQ ID NO: 1에서 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입을 갖는 모든 박테리오신은 본 발명에 따른 박테리오신으로 간주될 수 있는 이유이다.

여기에서 써모필린 2(thermophilin 2)라 명명한 본 발명에 따른 두 번째 박테리오신은 하기 서열 목록에 기재된 서열 SEQ ID NO: 2를 가진다. 또한, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의하여 서열 SEQ ID NO: 2와는 상이한 서열을 가질 때, 항균 활성을 갖을 수 있는 박테리오신을 고안할 수 있다. 끝으로, 원 서열 SEQ ID NO: 2에서 상기 기재된 하나 이상의 변형을 갖는 모든 박테리오신은 본 발명에 따른 박테리오신으로 간주될 수 있다.

덧붙여서, 써모필린 1 및 써모필린 2를 인코드하는 뉴클레오티드는 형질 전환에 의하여 예를 들면 세균, 이스트 또는 식물 등에 특정의 세균을 억제할 수 있는 능력을 전달하는 데 각각 사용될 수 있기 때문에 본 발명의 또 다른 주제이다. 그러므로 이러한 뉴클레오티드의 서열은 유전 암호의 변형(degeneracy) 때문에 비교적 다양하고, 특별히, 하기 서열 목록상에 기재된 핵산 서열 SEQ ID NO: 3을 갖는 SNCM I-1351 균주의 오페론(operon)내에 함유될 수 있다.

특별히, 써모필린 1과 함께 그 신호 펩티드를 인코드하는 서열 SEQ ID NO: 3의 221-475 뉴클레오티드를 함유하는 핵산 서열을 사용하는 것이 가능하다. 그러나, 서열 SEQ ID NO: 3의 221-288 뉴클레오티드로부터 신호 펩티드를 인코드하는 서열을 사용하여, 스트렙토코커스 써모필러스 균주에 의하여 유의한 유전자에 의하여 인코드되는 단백질의 방출을 허용하기 위하여, 원하는 유전자와 혼합하는 것이 특별히 이롭다. 마찬가지로, 발현 플라스미드에서의 신호 서열과의 혼합을 가능하게 하기 위하여, 예를 들면 스트렙토코커스 써모필러스 외의 다른 미생물에서 발현되기 위하여, 서열 SEQ ID NO: 3의 289-475 뉴클레오티드로부터 방출된 써모필린 1을 인코드하는 서열만을 사용하는 것이 바람직하다.

마찬가지로, 써모필린 2와 함께 그 신호 펩티드를 인코드하는 서열 SEQ ID NO: 3의 495-686 뉴클레오티드를 함유하는 핵산 서열이 사용될 수 있다. 그러나, 스트렙토코커스 써모필러스 균주에 의하여 이러한 펩티드와 혼합된 모든 단백질의 방출을 허용하기 위하여 서열 SEQ ID NO: 3의 495-557 뉴클레오티드로부터 신호 펩티드를 인코드하는 서열을 사용하는 것이 더욱 이롭다. 게다가, 발현 플라스미드에서의 신호 서열과의 혼합을 가능하게 하기 위하여, 즉 스트렙토코커스 써모필러스 외의 다른 미생물에서 발현되기 위하여 서열 SEQ ID NO: 3의 558-686 뉴클레오티드로부터 방출은 써모필린 2를 인코드하는 서열을 사용하는 것이 바람직하다.

끝으로, CNCM I-1351 균주 이외의 다른 어떤 스트렙토코커스 써모필러스 균주는 CNCM I-1351군주가 나타내는 것과 유사한 억제 범위 및 후자에 대한 저항성을 나타내는 것이 관찰되므로(특별히, 하기에서 기재된 Sfi 12 및 25), 이러한 균주들은 본 발명의 하나 이상의 박테리오신을 만들 수 있으며, 동시에 이러한 저항성에 대한 면역성의 단백질을 제공하는 것처럼 보인다. 결국, 상기 기재된 하나 이상의 박테리오신을 만들 수 있는 모든 균주는 본 발명에 포함된다.

본 발명에 따른 하나 이상의 박테리오신을 함유하는 추출물을 만드는 방법에 있어서, 하나 이상의 상기 박테리오신을 제조할 수 있는 스트렙토코커스 써모필러스균주는 배지 1 ml 당 10^7-10^9의 균주를 포함하도록 스트렙토코커스 써모필러스의 증식에 알맞는 배지 및 조건에서 배양하고, 원심분리하여 하나 이상의 상기 박테리오신을 함유하는 상층액의 추출물을 만든다.

그러므로 이러한 추출물을 만들기 위하여, 본 발명에 따른 하나 이상의 상기 박테리오신을 만들 수 있는 스트렙토코커스 써모필러스 균주, 특별히 스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주가 스트렙토코커스 써모필러스의 증식에 적당한 배지 및 조건하에서 배양될 수 있다. 이것은 예를 들면 특별히, MSK 배지(이스트 추출물이 보충된 소 탈지유) 또는 HJ 배지(이스트 추출물 및 소이톤이 보충된 소 탈지유 초여과물의 보충)에서 배양될 수 있다. M17 배지(P.E. Terzaghi et al., J. Appl. Microbiol., 29, 807-813, 1975)에 특별히, 자당, 젖당 또는 글루코스 같은 스트렙토코커스 써모필러스에 의해 발효될 수 있는 0.5-2%의 당이 보충된 배지와 같은 스트렙토코커스에 대하여 감수성 있는 배지에서 배양하는 것이 바람직하다.

그러한 배지는 95ml의 기본 배지에 물 100ml당 발효될 수 있는 당 10g을 함유하는 용액 5ml을 혼합하여 제조될 수 있는데, 이러한 발효될 수 있는 당의 용액 및 기본 배지는 121 ℃에서 15분 동안 각각 멸균하며, 기본 배지는 하기 성분을 950 ml의 끓는 물에 용해시켜 제조한다.

- 트립신 카세인 수해물 2.5 g
- 펩신 미트 수해물 2.5 g
- 펩신 소이빈 수해물 5.0 g
- 이스트 추출물 2.5 g
- 미트 추출물 5.0 g
- 베타-글리세르포스페이트 19 g
- 황산마그네슘 0.25 g
- 아스코빅산 0.5 g

상기 균주는 스트렙토코커스 써모필러스의 생장에 적당한 37-48℃에서 2-8시간 동안 상기의 배지에서, 한편으로는 배지 1ml 당 10^7-10^9 균주를 함유될 때까지, 10^8 세균수/ml의 값에 해당하는 600nm(OD_{600})에서의 배지의 흡광도는 약 3.6이 되도록, 다른 한편으로는 배양된 균주에 의하여 만들어진 산성화 효과에 의하여 소 우유가 응고되는 지점에 도달된 농도까지 배양될 수 있다.

상기 상층액의 조추출물을 제조하기 위하여, 예를 들면 트리클로로아세트산에 의한 침전법, 석출 또는 용매 침전법과 같은 어떠한 적절한 침전법을 사용하는 것이 가능하다. 바람직하게는 이러한 조추출물을 제조하기 위하여, 상층액의 pH를 H_3PO_4로 1.0-2.0으로 적정하여, 침전물을 제거하고, 트리플루오로아세트산의 수용성 현탁액에 재현탁을 수반한 한 번 이상의 연속적인 침전을 수행한다.

본 발명에 따른 박테리오신 및/또는 이러한 박테리오신을 만들 수 있는 스트렙토코커스 써모필러스 균주의 사용은 식품 및 화장품의 제조에 제공될 수 있다.

상기 스트렙토코커스 써모필러스 균주의 배양은 특별히 치즈 제조, 특히 모짜렐라 형 [바실러스 폴리믹사(Bacillus polymixa)에 의해 만들어지는, 그 포자가 발효로 생존하는 구멍을 회피하기 위하여], 스위스형(클로스트리디움 티로부티리쿰에 의한 오염 방지를 위한 Gruyere 또는 Emmental), 바세린(vacherin) 형(리스테리아 모노사이토제너스의 오염 방지를 위하여) 및 세레(Sere) 형 (소프트 또는 크림 치즈의 프랑스 이름)치즈, 또는 산성화된 우유의 제조, 특별히 요구르트, 유아용 분말 우유의 종균(starter)으로 사용될 수 있다.

특별히, 상기 스트렙토코커스 써모필러스 균주는 락토바실러스 불가리커스에 기인한 요구르트의 후-산성화를 방지하기 위하여 써머필린에 대하여 약하게 감수성 있는 (예를 들면, 하기에 기재된 균주 YL5) 락토바실러스 불가리커스 균주와의 조합으로 우유에서 배양할 수 있다.

특별히 조-또는 정제된 추출물 형태의 상기 박테리오신 또는 상기 균주는 특별히 무스(mousse)와 같은 육류 제품의 제조에 있어서 병원성 세균을 억제하는 또는 활성 제제로,특별히, 클로스트리디아 포자, 클로스트리디움 보툴리눔의 증식 억제 활성 제제로 또는 크림 또는 로션의 제조에 있어서, 피부의 병원성 세균에 대한 활성 제제 또는 구강 건강 식품의 제조에 있어서, 협강의 병원성 세균, 특별히 스트렙토코커스 소브리너스의 억제 활성제제로써 또한 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 박테리오신은 그 성질을 설명하는 다양한 미생물학적, 생화학적 및 유전학적 자료를 이용하여 하기에서 더욱 자세하게 특성화 된다. 백분율은 중량비로 나타난다.

항균 활성 단위 - 아가 홈(Agar well) 실험

본 발명의 범주내에서, 항균 활성은 독자적 단위로서 정의된다.

하나의 독자적 단위(au)는 본 기술 분야의 숙련자에게 공지된 아가 홈 실험에서 항균 활성을 나타내는 가장 높은 희석 비의 역수로서 정의되며, 여기서 아가 홈의 의미는 문자 그대로 아가상의 잘린 홈을 사용하는 실험을 의미한다.

본 발명에 따른 스트렙토코커스 써모필러스 배양 상층액의 표준 시료는 실시예 1에 기재된 표준 조건하에서 제조하고, 일반적으로 70㎕의 부피의 경우 32 au 활성을 나타낸다. 그러므로 이것은 460au/ml의 활성을 의미한다.

실시예 1에서 기재된, 연이은 트리클로로아세트산 수용성 현탁액에 재현탁한 후 트리클로로아세트산의 연속적인 두 번의 침전법으로 배양 상층액으로부터 수득한 박테리오신의 표준 조추출물은 전형적으로, 약 1.4×10^5 au/ml의 활성을 갖는다.

시료가 여전히 주어진 희석 비에서 항균 활성을 갖는 지를 결정하기 위하여 아가 홈 실험을 사용하였다.

이 실험을 수행하기 위하여, M17 배지 35ml을 페트리 접시에 붓고, 1%의 자당 및 1.5%의 아가를 그 위에 붓는다.

1% 자당 및 0.75%의 아가가 첨가된 M17 배지 5ml에 본 발명의 박테리오신에 대하여 전형적인 감수성을 가지는 스트렙토코커스 써모필러스 균주, 이 경우엔 예를 들면 전날밤 동안 준비된 5㎕l의 균주 Sfi3의 배양액을 접종한다.

그 5ml을 35ml위에 붓고, 라미나 플로우(laminar flow)하에서 15분간 건조시킨다. 배양액 배지에 5mm구경의 구멍을 뚫는다.

실험 시료를 구멍 당 70 ㎕의 양으로 구멍에 붓는다. 42℃의 온도로 혐기성 조건하에서, 6시간 동안 배양한다. 이 배양 동안 전형적인 표식 균주는 증식하였고, 억제 원광이 보인다. 시료가 더 이상 항균 활성을 나타내지 않는 희석 비는 억제 원광이 더 이상 구별되지 않는 희석 비이다.

[효소에 의한 불활성]

상기 아가 홈 실험으로, 상기에서 기재된 전형적인 표식 균주로 접종된 아가상에 본 박테리오신이 불활성인지 또는 다양한 효소에 의한 것인지 결정할 수 있다.

리파아제를 제외하고 사용되는 모든 효소의 경우, 300au의 시료 70㎕를 수득하기 위하여, 1㎍/ml-10mg/ml의 효소를 효소 공급원으로 적용하는 33배의 완충용액으로 희석된 상기 표준 조추출물에 첨가한다. 그런 다음 그 효소를 아가 홈 실험의 홈에 두기 전에 공급원에 의하여 적용된 온도로 30분 동안 반응시킨다.

한편, 상업용 리파아제의 경우, 억제제의 혼합물 [1.25M EDTA; 0.25% 펩스타틴 A(p4265, Sigam); 0.25% E-64(E3132, Sigma); 0.25% 아프로티닌(A1153, Sigma)] 1㎕를 처음에는 200 ㎕/ml의 리파아제를 함유하는 용액 100 ㎕에 첨가하고, 억제제를 45분 동안 실온에서 반응시킨 후, 그런 다음 희석된 표준 조추출물 5 ㎕(450au)를 부과하고 30분 동안 37℃에서 반응을 시키고, 그 혼합물 70㎕를 아가 홈 실험의 홈상에 둔다. 희석에 사용되는 완충용액은 하기이다.

-pH 2.0 : 수산화나트륨으로 적정한 100mM 말레산,

-pH 7.0 : 100mM 인산 완충용액(K_2HPO_4/KH_2PO_4),

-pH 7.5 : 100mM 인산 완충용액(K_2HPO_4/KH_2PO_4),

-pH 7.75 : 100mM Tris-Cl.

억제 원광의 구경은 각 완충용액 및 각각의 반응 온도에서 효소의 첨가 없이 수득된 대조군의 원광과 비교하였을 때, 약 14 mm였다.

하기 표 1은 실험된 효소에 의해 수득된 결과를 나타낸다. 이 표에서, 효소는 그 유형, 공급원의 이름 및 공급원 항목 번호에 따라 표시된다. 박테리오신의 불활성은 첨가된 효소의 농도에 따른 함수로써 나타난다. 0의 의미는 어떠한 원광도 없음을 나타내며, 즉 본 박테리오신의 항균활성은 효소에 의한 반응으로 손상되었음을 의미한다. 숫자 14는 본 박테리오신의 완전한 항균활성에 해당하는 14mm 구경의 원광이 있음을 의미한다.

표 1

효 소	농 도 (㎍/ml)	완충 용액 pH	배양 온도 (℃)	불활성 (mm)
펩신 (SIGMA P-700)	10	2.0	37	0
프로테나아제 K (MERCK 1000 144)	4	7.0	37	0
피신 (SIGMA P-3266)	10	7.0	37	0
프로나아제 E (SIGMA P-8038)	10	7.5	37	0
나가제 (SIGMA P-4789)	10	7.5	37	0
트립신 (SIGMA T-8128)	10	7.5	25	0
α-키모트립신 (SIGMA C-7762)	1	7.75	25	0
카탈라제 (SIGMA C-10)	10000	7.75	25	14
α-아밀라제 (SIGMA A-0521)	1	7.75	25	14
리파아제 (SIGMA L-0382) + 프로테아제 억제제	200	7.75	37	14

프로타아제 모두는 상층액의 항균 활성을 억제하며, 이것은 이러한 활성에 단백질 부분이 관여한다는 것을 나타낸다.

박테리오신의 항균활성에 대한 카탈라제의 어떠한 영향도 관찰되지 않은 사실은 또한, H_2O_2는 카탈라제에 의하여 분해되므로, 전형적인 표식 균주의 증식 억제는 박테리오신과 유사한 항균활성을 가지는 것으로 알려진 H_2O_2에 기인한 것이 아님을 나타낸다.

게다가, α-아밀라제에 의한 어떠한 항균 활성의 불활성도 관찰되지 않는 사실은 이 항균 활성에 α-아밀라제에 의한 가수분해성 당이 관여하지 않음을 나타낸다.

덧붙여서, 리파아제도 또한 항균활성에 아무런 영향을 미치지 않음으로 이러한 활성에 관여된 지질 부분이 없음을 나타낸다.

[억제 범위]

아가 홈 실험과 함께, 본 발명에 따른 두 종류의 박테리오신을 만드는 CNCM I-1351 균주의 배양 상층액이 이러한 다양한 세균의 증식에 대하여 억제활성을 갖고 있는지, 즉 억제 범위가 이러한 상층액으로 결정되는지 알기 위하여 아가에 다양한 균주의 포자 또는 세균을 접종하였다.

이것을 수행하여, pH 7.0에서 300au의 활성을 나타내는 상층액 시료로 만들어진 실험 균주의 증식에 대한 억제효과는 앞서 프로테나제 K 5 ㎍/ml의 존재하에서 37℃에서 30분 동안 반응으로 불활성된 동일한 시료의 효과 즉, 정상적으로 0이 나타났다.

이러한 분석을 수행하기 위하여, FALCON 3046 다공 조직 배양판(multi-well tissue culture plate)을 사용하였다. 1%락토오스 및 1.5% 아가를 함유하는 M17 배지(M17L 배지) 6ml에 전날 밤 동안 준비한 실험 균주를 0.1의 OD_{600}값이 되도록 희석한 1%의 배양액으로 접종된, 1% 젖당 및 0.6% 아가를 함유하는 M17 배지 700㎕로 덮는다.

실험 균주가 포자로부터 증식할 때, 상층 배지 1ml 당 10^5-10^6의 포자를 접종한다.

실험 균주가 락토코커스, 스트렙토코커스 또는 엔테로코커스가 아닐 때, M17L 배지가 세균의 증식에 적당한 표준 배지, 특별히 락토바실러스, 페디오코커스(Pediococcus), 루코노스톡 및 비피도박테리움의 경우

에는 2% 글루코스가 첨가된 MRS 배지(Sanofi Diagnostics Pasteur 제조, 프랑스), 클로스트리디움의 포자 또는 영양생장기 세포의 경우에는 RCM 배지(Oxoid 제조, 영국), 그리고 다른 세균의 경우에는 BHI 배지(Difco 제조, 미국)로 대체하는 것이 중요하다.

구경 5mm 및 깊이 5mm의 구멍 두 개를 판에 뚫는다. 300au의 본 박테리오신 시료 70㎕를 구멍 하나에 두고, 다른 하나에는 앞서 불활성된 동일한 시료를 둔다. 볼 수 있는 세균층으로 플레이트가 덮일 때까지의 필요한 기간 동안 실험 균주의 증식에 알맞는 온도에서 배양시킨다.

억제 효과 또는 정도는 관찰된 억제 원광의 구경으로 특징된다. 원광의 구경이 16-18mm이면 매우 높은(++++) 억제이며, 구경이 11.5-15.5mm이면 높은(+++) 억제이고, 구경이 7.5-11mm이면 평균이고, 구경이 5-7.5mm이면 약한(+) 억제이고, 구경이 0(-)이면 원광이 관찰되지 않은 것을 의미한다.

다양한 종 및 아종의 젖산 세균 74 균주 이상을 실험하였을 때, 그것들 중 단지 7%만이 상층액에 대하여 내성을 나타내었다. 이러한 실험의 자세한 결과는 하기 표 2에 제시된다. 하기 표들에서 나타나는 것처럼 표 2에서, 균주명 또는 번호는 네슬레 종균(Nestle Collection) (주소: NESTEC S.A., Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, CH-100 Lausanne 26, 스위스)에서 기인한 번호이다. 나타난 온도는 실험 동안의 배양 온도이다.

표 2

종	번 호	온 도 (℃)	억 제
스트렙토코커스 써모필러스 (균주 CNCM I-1351 에 대한 내성 및 이 균주와 유사한 항균활성을 나타내는 균주 Sfi 12 및 25)	YS3	42	+++
	YS4	42	+++
	YS11	42	+++
	YS7	42	+++
	YS8	42	+++
	YS20	42	+++
	Sfi3	42	+++
	Sfi18	42	+++
	Sfi19	42	+++
	Sfi20	42	+++
(오직 CNCM I-1351 균주에 대해서만 내성을 나타내는균주 STII; 그러나 스트렙토코시의 5% 미만만이그러한 내성을 나타낼 수 있다.)	Sfi16	42	+++
	ST11	42	-
	Sfi12	42	-
	Sfi25	42	-
락토코커스 락티스 (니신 생산자)	SL2	30	++
	SL13	30	++
	SL16	30	++
	SL25	30	++
	SL31	30	++
	SL63	30	++
락토코커스 락티스	SLP26	30	++
	SLP29	30	++
	SLP24	30	++
	SL64	30	++
	SL58	30	++
	SL40	30	++
락토코커스 락티스 비오바 디아세틸락티스	SD39	30	++
	SD80	30	++
	SD57	30	++
	SD11	30	++
	SD113	30	++
락토코커스 크레모리스	SC20	30	++
	SC15	30	++
	SC11	30	++
	SC145	30	++
	SC63	30	++
	SC28	30	++

표 2 (계속)

종	번호	온도 (℃)	억제
엔테로코커스 패칼리스	SFS1	30	+
	SFS2	30	+
	SFS10	30	+
엔테로코커스 패시움	SFM1	30	++
	SFM3	30	++
	SFM6	30	++
	SFM10	30	++
	SFM14	30	++
	SFM9	30	+
락토바실러스 퍼멘툼	L26	30	++
	L50	30	++
	L28	30	++
	LF16	30	++
	LF15	30	++
락토바실러스 헬베티쿠스	LH91	40	++++
	LH2	40	+++
	LH3	40	+++
	LH1	40	+++
락토바실러스 악시도필러스	LQ1	40	++
	LQ3	40	+
	LQ10	40	++
	LQ21	40	+
	LQ23	40	++++
	LQ26	40	-
락토바실러스 브레비스	LB2	30	+++
	LB10	30	-
	LB13	30	+++
락토바실러스 불가리커스	YL12	40	++++
	YL2	40	+
	YL5	40	++
	LB32	40	+++
루코노스톡 크레모리스	LCC1	30	++
	LCC7	30	++
	LCC2	30	++
루코노스톡 메센테로이데스	LCM9	30	++
	LCM10	30	++
	LCM18	30	++

표 2에서, 상층액의 억제 범위는 락토바실러스 악시도필러스, 락토바실러스 브레비스 및 락토바실러스 불가리커스와 같은 특정의 락토바실러스 종의 경우 처럼 좁고, 억제의 정도는 상이하다. 그러나, 락토바실러스 퍼멘툼, 락토바실러스 헬베티커스 및 락토바실러스와 같은 다른 종들의 경우 제 정도는 동일하다.

이것은 동일한 종내에서 하나의 균주를 다른 균주와 구별하는 것이 매우 어렵다는 사실에 비추어 이로운 점이다. 그러므로, 산업적 균주들을 구별하기 위하여 상층액 또는 정제된 박테리오신의 유리한 사용을 고

안하는 것이 가능하다.

또한, 본 발명에 따라 배지내에서 만들어진 박테리오신에 대하여 자연적인 내성 또는 사소한 감수성을 가지는 또다른 젖산 세균 균주와 함께 배양 하는데 있어, 하나 이상의 박테리오신을 만드는 균주의 사용을 고안하는 것이 가능하다. 요구르트, 특별히 감소된 후-산화를 나타내는 요구르트는 그렇게 제조될 수 있다.

또한, 상층액은 6개의 니신을 제조하는 락토바실러스 락티스 균주의 증식을 억제하는 것이 관찰된다. 이것은 본 박테리오신이 니신이 아님을 증명한다. 이것은 본 박테리오신이 니신의 경우에는 그렇지 않은 10 ㎕/ml의 트립신에 의하여 불활성된다는 사실에 의하여 확인된다 (참조. 표 1).

그러나, 본 발명의 두 박테리오신을 만드는 배양 상층액의 억제 범위는 젖산 세균 종에 제한되지 않고, 그람-양성형 세균, 특별히 비피도박테리움과 같은 식품 세균, 리스테리아 이노쿠아, 리스테리아 모노사이토제네스 및 마이크로코커스 베리안스와 같은 바람직하지 않은 또는 병원성 세균, 그리고 클로스트리디움 및 바실러스 속의 많은 병원성 세균의 포자 및 그 세포의 경우에 까지 확장되므로 넓고, 그 결과는 하기 표 3에 제시된다.

표 3

종	번 호	온도 (℃)	억 제
비피도박테리움 브레브	BBR27 BBR4 BBR39	37 37 37	+++ +++ +++
비피도박테리움 롱굼	BL20 BL18 BL22	37 37 37	+++ +++ +++
비피도박테리움 비피둠	BB7 BB9 BB12	37 37 37	+++ +++ +++
비피도박테리움 인판티스	B16 B11	37 37	+++ +++
프로피오니박테리움	PP1	30	+++
클로스트리디움 보툴리늄 (포자 및 영양생장기 세포)	CB1 CB2	30 30	++ ++
클로스트리디움 티로부티리쿰 (포자 및 영양생장기 세포)	107001 107002	30 30	+ ++

표 3 (계속)

종	번 호	온도 (℃)	억 제
하기 종 포자의 혼합물: 클로스트리디움 스포로제네스 클로스트리디움 퍼멘튬 클로스트리디움 무틸리늄 (6 균주)	100021 100022 A-69; B-213; BKA40 B-73-211; A-80-124clovis; B-1-NCA	30	++
리스테리아 이노쿠아	24 25 27 39 40 41	30 30 30 30 30 30	+ + + + + +
리스테리아 모노사이토제네스	57 58 59 60 61 62	30 30 30 30 30 30	++ ++ ++ ++ ++ ++
바실러스 섭틸러스 (포자 및 영양생장기 세포)	A2 A3 A13 A14 A15	30 30 30 30 30	++ ++ ++ ++ ++
바실러스 푸미러스 (포자 및 영양생장기 세포)	B2	30	++
바실러스 세레우스 (포자 및 영양생장기 세포)	C14	30	++
마이크로코커스 베리안스	MCV1	30	++
마이크로코커스 루터스 (니신 표식자)	MCL1	30	-

표 3에 기재된 결과는 무엇보다는 특히 병원성 매개제 특별히, 클로스트리디움에 대한 육류 제품, 리스테리아 모노사이토제네스 및 클로스트리디움 티로부티루쿰에 대한 치즈 제품 또는 바실러스에 대한 신선한 파스타 또는 소스용 신선한 파스타 또는 소스에 대한 유효 제제로써, 상기 균주로부터 기원하는 식품의 제조에 있어서 첨가제로의 이로운 사용을 고안할 수 있다.

끝으로, 본 박테리오신은 하기 표 4에 기재된 결과에서 보는 바처럼 그람-음성형 세균의 증식에 억제 효과를 나타내지 않는다.

표 4

종	번 호	온도 (℃)	억 제
의. 콜리	BZ234	37	-
살모넬라 티피무리움	274 273	37 37	- -
슈도모나스 에루기노사	5 13	37 37	- -
슈도모나스 플루오르센스	11 12	37 37	- -

[내열성, 안정성]

실시예 1에서 기재된 조건하에서 수득된 추출물에 존재하는 박테리오신은 그 추출물이 앞서 가열되지 않았다면, 4℃의 보관에서 좋은 안정성을 나타내지 않는다. 한편, 추출물을 예를 들면 90-121℃로 최대 15분 동안 급속히 가열시키면 보관에 대한 좋은 안정성이 나타난다.

예를 들어, 상기 추출물을 미리 수조에서 94℃로 20분 동안 가열하면, 4℃에서 5개월간의 보관 후에도 그 추출물은 50%이상의 활성이 보존된다는 것이 특별히 조사되었다. 또한, 상기 추출물을 100℃에서 60분간 가열한 후에는 활성의 100%가 보존된다는 것이 조사되었다(실험은 항온유조에서, 1ml의 농축된 상층액 또는 본 방법에 따른 스트렙토코커스 써모필러스 균주의 배양액으로 수행되었다.).

한편, 본 박테리오신은 121℃에서 30분 동안의 멸균처리 이후, 단지 약 활성의 1/3이 보존된다(실험은 본 방법에 따른 스트렙토코커스 써모필러스 균주의 배양액의 비농축된 상층액 40ml로 수행되었다.).

마지막으로, 겔 전기영동(SDS-PAGE) 이후에 아미콘 여과기를 사용하여 초여과법을 수행함으로써, 스트렙토코커스 써모필러스 배양액의 상층액에 있는, 특별히 실시예 1에서 수득된 표준 배양액의 상층액에 있는 본 발명의 박테리오신은 10kDa 보다 큰 분자량(MW)의 응집물 형태로 존재하고, 그중 67%는 100kDa보다 더 작은 분자량을 나타내고, 33%는 100kDa보다 더 큰 분자량을 나타낸다.

[박테리오신의 정제]

하기 설명에서, 트리플로오로아세트산 및 아세토니트릴은 부피에 대한 백분율로 나타난다.

1%과당이 보충된 M17 배지에서, 42℃로 6시간 동안 혐기성 조건하에서 CNCM I-1351 균주의 배양액 1ℓ를 제조한다.

20g의 XAD-7수지(Sigma 사 제품)를 직접 배양액에 부은 다음, 그 전체를 4℃에서 1시간 동안 약하게 교반한다. 그 혼한물을 Schleicher Schvell filter No. 604(독일)로 여과한 뒤, 세균을 제거하기 위하여 pH 5.2의 50 mM 아세트산 용액 1 l로 필터에 붙은 수지를 세척한다. 그 수지를 컬럼에 두고 70% 아세토니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)를 함유하는 45ml의 용액으로 박테리오신을 용출한다. 두 박테리오신을 함유하는 용출액이 수득된다.

이러한 두 용출된 박테리오신은 하기 방법으로 분리된다.

용출액의 부피를 먼저 원심분리/동결건조로 24ml로 감소시키고, 수득된 부피를 pH 8의 2M 염화나트륨 및 250mM Tris-C1 농도로 50ml의 부피로 적정한 뒤, 이 부피를 앞서 pH8의 2M 염화나트륨 및 250mM Tris-C1을 함유하는 완충용액으로 평형시킨 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 갖는 페닐 수퍼로즈 HR 16/20 컬럼(Pharmacia 사 제조)에 주입한다. 상기 완충용액 200ml, 상기 완충용액의 초기 농도와 pH8의 50 mM Tris-C1 용액의 최종 농도에 의한 연속 농도 구배(linear gradient) 용액 100ml, 상기 용액 100ml, 순수한 물 60ml, pH의 50mM TRIS-C1용액 60ml 그리고, 마지막으로 순수한 물 60ml을 4 ml/분의 속도로 연속적으로 통과시킨다.

각각의 분획 50㎕를 컬럼의 유출구에서 모으고, 그런 다음 0.1% TFA 50㎕로 희석하여 각각의 혼합물의 항균 활성을 상기에서 설명한 아가홈 실험으로 측정한다.

470-490번째 분획에서 항균 활성이 나타나는 것이 관찰되었다. 이러한 분획을 혼합한 다음, 혼합물의 부피를 원심분리/동결건조에 의하여 1ml로 감소시키고, 감소된 부피를 본 명세서에서 용액 A아로 부르는 0.1% TFA용액에 미리 평형된 Pep RPC HR 5/5 컬럼(Pharmacia 사 제조)에 주입한다. 70% 아세토니트릴 및 0.097% TFA를 함유하는 용출 용액 B를 또한 제조한다. 용액 A 1 ml, 초기 농도의 용액 A와 B의 50/50 혼합물 최종농도의 연속 농도 구배 9ml, 후자의 혼합물 2ml, 초기 농도의 후자의 혼합물과 최종 농도의 용액 A 와 B의 20/80의 두 번째 혼합물의 연속 농도구배 7ml, 초기 농도의 이 두 번째 혼합물과 최종농도 용액 B의 연속 농도 구배 2ml 그리고 이 후자 용액 2ml을 1ml/분의 속도로 연속적으로 컬럼을 통과시킨다.

컬럼의 유출구에서 분획의 항균 활성은 상기에서 설명한 아가 홈 실험으로 결정하였다. 14-22번째의 모든 분획에서 항균 활성이 나타난다.

한편으로, 215㎚의 흡광도에서 관찰된 두 개의 중요한 단배질 피크(peak)는 15 및 21번째 분획에서 구별된다.

[박테리오신의 서열]

분호기 15, 18, 20, 21 및 22에 함유되어 있는 단백질의 N-말단 부분은 자동 서열분석기(Applied Biosystem 4774 sequencer)를 사용하여 서열 분석한다.

N-말단 부위에서 서열 SEQ ID NO: 1의 것과 구별되는 48 아미노산의 서열을 가지는 펩티드의 존재는 분획 15에서 밝혀진다. 또한, 분획 21에 지배적으로 존재하는 펩티드는 N-말단의 부분에서 서열 SEQ ID NO: 2의 것과 구별되는 23 아미노산의 서열을 가진다.

그러므로, 이러한 결과는 CNCM I-1351 균주가 항균 활성을 가지는 두 개의 펩티드를 만드는 것을 보여준다. 그러나, 분획 15 및 21사이에 수득되는 억제 원광의 상이한 외형은 본 발명의 써모필린 1 및 써모필린 2 사이의 상이한 항균활성을 추측하게 해준다.

한편, 분획 15 및 21의 아미노산 조성은 먼저, 100℃에서 24시간 동안 6N염산을 사용하여 가수분해하고, 댑실 클로리드(dabsyl chloride)변형법이라는 공지의 방법으로 분석한다. 그 결과는 각 분획의 아미노산 조성이 그 각자의 펩티드 서열에 해당하여 나타남을 보여준다.

마지막으로, 분획 15 및 21은 질량 분석법을 수행하여, 써모필린 1은 5800 D, 써모필린 2는 3900 D의 분자량임이 밝혀진다.

[박테리오신 유전자의 서열 분석]

앞서 서열 분석된 써모필린 1의 N-말단 및 C-말단 부위에 각각 해당하는, 하기 서열 목록에 기재된 변형 핵산 서열(degenerate nucleic sequence) SEQ ID NO: 6 및 SEQ ID NO: 7은 종래의 방법으로 제조된다.

SEQ ID NO: 6 서열의 혼합물 부분을 본 명세서에서 마니아티스(Maniatis)라고 부르는 실험서 Molecular cloning, a laboratory manual(2판, Sambrook et al., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989)에 기재된 대로 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제의 작용에 의하여 방사성을 띄게 할 수 있다.

폴리머라제 연쇄 중합 반응(polymerase chain reaction)은 변형 서열(degenerate sequence)SEQ ID NO: 6 및 SEQ ID NO: 7의 두 비방사성 혼합물을 사용하여 실험서 PCR technology (H.A. Erdlich editor, M stockton press, 런던)에 기재된 대로 CNCM I-1351 균주로부터 염색체 DNA를 제조하여 수행한다.

128 염기쌍의 밴드(band)가 전기영동 겔에 나타나며, 이것을 마니아티스에 따라 용출한다. 한 부분을 직접 플라스미드 pGEM-T(Promega사 제품)로 공급원에 따라 클론하고, 마니아티스에 따라 보편적인 pUC 19 프로브(probe)를 사용하여 디디옥시뉴클레오티드(dideoxynucleotide) 방법에 의하여 서열분석을 한다. 써모필린 1의 아미노산 9-47을 인코드하는 서열에 해당하는 하기 서열 목록에 기재된 서열 SEQ ID NO: 8을 가지는 프로브가 수득된다. 마지막으로, 용출된 128pb의 밴드 이외의 다른 부분은 마니아티스에 따라 랜덤 프라이밍(random priming)이라는 방법에 의하여 방사성을 띄게 한다.

한편, CNCM I-1351 균주로부터 제조된 염색체 DNA의 분해는 효소 공급원에 따라 EcoRI 및 HindIII로 수행하고, 분해 산물 10㎍을 전기영동 분석 겔을 수행하고, DNA를 겔로부터 제타 프로브(Zeta probe) 멤브레인(Biorad사 제품)상의 염기성 매질로 옮기고, 이 멤브레인을 6×SSC, 1% SDS 및 1% 탈지유를 함유하는 매질에서 54℃로 밤새 프리하이브리드(prehybride)시키고, 이 멤브레인을 앞서의 하이브리드 매질에서, 처음에는 54℃에서 18시간 동안, 그 후 매 3시간 마다 2℃ 감소시켜 42℃에서 24시간 동안 방사성 변형 서열 SEQ ID NO: 6과 하이브리드시킨다. 그 멤브레인을 실온에서 6×SSC로 2분 동안 연속해서 세 번을 세척하고, 47℃에서 6×SSC로 1분 동안 세척한다. 그 멤브레인을 최종적으로, 방사성자동사진(autoradiography)필름에 노출한다. 이러한 모든 단계는 마니아티스 실험서에 따라 수행한다.

상기 기재된 것과 동일한 조건하에서, CNCM I-1351 균주의 염색체 DNA (300㎍)의 전기영동 겔 상에서 유의한 DNA 조각을 함유하는 부분은 3.6kb밴드로 나타난다. 이 겔 부분을 잘라내어 종래의 방법으로 용출시키고, 용출된 DNA를 앞서 EcoRI 및 HindIII로 가수분해된 벡터 pUC 19(Messing et al., Methods Enzymol, 101:20, 1983)에 삽입한다. 이러한 단계는 마니아티스 실험서에 따랄수행한다.

앞서, 완전하게 한 이.콜리 BZ234 균주(Biocentre collection, 발레 대학교, 스위스)를 리게이션(ligation) 매질로 종래의 방법대로 형질전환한다. 형질전환된 세포를 α-상보성 방법(α-complementation)으로 선별한다. 마니아티스에 따라 콜로니 리프트(colony lift)라고 불리우는 방법에 의하여 형질전환된 300의 콜로니를 필터에 옮기고, 그것을 용균하여 방서성 서열 SEQ ID NO: 8에 하이브리드하고, 그 필터를 방사성 자동사진 필름에 노출시킨다.

서열 SEQ ID NO: 8과 하이브리드 할 수 있는 플라스미드를 가진 13콜로니(colony)가 필름상에서 관찰된다. 이러한 콜로니중 둘을 선별하고, 그것으로부터 플라스미드 DNA를 종래의 방법에 의하여 추출하고, 선별된 플라스미드 pUC19로 클론된 DNA절편을 디디옥시뉴클레오티드 방법에 의하여 일반적인 pUC19프로브를 사용하여 서열분석하고, 그때, 그 서열에 근거한 프로브가 수득된다.

하기 서열 목록에 기재된 핵산 서열 SEQ ID NO: 3은 선별된 두 플라스미드와 구별되어 수득된다. 이러한 서열은 써모필린 1의 선별된 두 플라스미드와 구별되어 수득된다. 이러한 서열은 써모필린 1의 성숙 전에 해당되는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4 및 써모필린 성숙 전에 해당하는 SEQ ID NO: 5(하기 서열목록 참조)를 갖는 두 단백질을 인코드하는 오페론을 함유한다. 세 번째 개방 해독틀(open reading frame)은 이 서열의 뉴클레오티드 679로부터 시작하고, 이것은 면역 유전자에 해당한다.

정제된 박테리오신의 N-말단의 펩티드 서열 및 오페론 SEQ ID NO: 3의 암호틀에 의하여 인코드되는 단백질의 아미노산 서열에 비교하여, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4(써모필린 1)의 단백질은 젖산 세균 기원 박

테리오신 분류의 특성인 글리신-글리신 단위를 갖는 23 아미노산의 선도 펩티드를 갖는 것을 결정한다. 마지막으로, 써모필린 1의 분자량은 분광법에 의한 것에 해당하는 핵산 서열로부터 측정될 수 있는데, 5800 D이다.

덧붙여서, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5(써모필린 2)의 단백질은 젖산 세균 기원 박테리오신 분류의 특성인 글리신-글리신 단위를 갖는 21 아미노산의 선도 펩티드를 갖는다. 마지막으로, 써모필린 2의 분자량은 분광법에 의한 것에 해당하는 핵산 서열로부터 측정될 수 있는데, 3900 D이다.

[상이한 박테리오신의 역할]

락토코카인(lactococein) M 오페론(Klaenhammer et al., FEMS Micro. Rew., 12, 39-86, 1993)의 첫 번째 펩티드의 상동은 써모필린 1의 서열에서 발견된다. 이러한 상동은 GA단위의 반복과 관련되어 있다. 게다가, 락타신(lactacin) F 오페론(Klaenhammer et al., 상동) 유전자에 대한 상동은 GenEMBL 자료 은행의 GCG로부터 TFASTA 프로그램을 사용하였을 때, 써모필린 2의 경우에 발견된다.

락토신 M 및 락토신 F 두 오페론은 사실상 여러 펩티드에 관여하는 포레이션(poration) 복합체를 인코드한다. 그러므로, 상기 오페론은 포레이션 복합체에서 함께 작용하는 펩티드를 인코드하는 것이 가능하다.

그럼에도 불구하고, 상기 설명한 아가 홈 실험에서 두 써모필린 간에는 어느 정도의 상이한 억제 원광이 관찰되므로, 두 박테리오신의 독립적으로 작용하는 것을 배제할 수 없다.

하기 실시예는 본 발명에 따른 박테리오신의 제조 및 사용 방법을 설명하기 위하여 제시된다. 거기서 기재된 %는 다른 설명이 없는 한 중량비이다.

[실시예 1]

1%과당이 첨가된 M17 배지에 ml당 약 10^8의 스트렙토코커스 써모필러스 균주 CNCM I-1351을 함유하는 1%의 배양액을 접종하였다. 배양은 배지 ml당 10^8의 균주가 함유되고 OD^{600}은 3.6이 되도록 혐기성 조건에서 42℃로 6시간 동안 수행한다.

그렇게 수득된 표준 배양액을 원심분리한다. 상층액(표준)을 모은다. H_3PO_4로 pH 1.5로 산성화 하고, 원심분리로 침전물을 제거하고, 산성 침전의 상층액을 모은다.

이 상층액에 함유된 박테리오신을 10% 트리클로로아세트산으로 침전시킨다. 이 침전된 박테리오신을 모아 0.2% 트리플루오로아세트산의 수용성 현탁액(부피/부피)에 재현탁한다.

박테리오신을 10% 트리클로로아세트산으로 재침전 시킨다. 침전된 박테리오신을 모아 100% 아세톤으로 세척하고, 0.2% 트리플루오로아세트산의 수용성 현탁액(부피/부피)에 재현탁한다.

1.4×10^5 au/ml의 활성을 가지는 본 박테리오신의 표준 조추출물이 수득된다.

하기 표 6은 1l의 표준 상층액 및 18ml의 표준 조추출물의 특성, 즉 수득된 농축물에서 단백질 함량 및 항균 활성의 면이 자세하게 나타난다.

표 6

	부 피 (ml)	총 단백질 (PIRCE kit) (mg)	au/ml	au/mg 단백질	au/mg 건량	총 활성 (au)
상층액	1000	6700	4.6×10^2	68	.	4.6×10^3
조추출물	18	83	1.4×10^5	2.5×10^5	1.4×10^5	2.1×10^6

[실시예 2]

본 발명의 스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주, 그리고 스트렙토코커스 써모필러스 ST11 균주(본 발명에 따른 박테리오신에는 내성을 나타내나 어떠한 항균 활성을 가지지 않음) 및 상기 언급한 락토바실러스 불가리커스 YL5 균주를 함유하는 호상(set-style) 요구르트를 제조한다.

3.7% 지방 및 2.5% 탈지분유 분말을 함유하는 우유를 제조한다. 이 우유 40 l를 92℃에서 6분간 저온 살균하고, 그것을 75℃에서 150bar로 균질화 하고 (두 단계), 마지막으로, 약 42℃의 온도로 냉각시킨다.

동결 건조된 스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351, 스트렙토코커스 써모필러스 ST11 및 락토바실러스 불가리커스 YL5 균주를 멸균된 MSK배지(상용의 0.1% 이스트 추출물을 함유하는 10%의 재조성된 분말 탈지분유)에서 여러번의 전배양으로 재활성시킨다.

배지의 응집 시기에서 취한 3차 전배양의 스트렙토코커스 써모필러스 균주 각각을 1%(부피/부피)의 양으로 그리고, 같은 시기의 3차 전배양의 락토바실러스 불가리커스 균주 2%를 멸균된 우유에 접종한다. 그 우류를 42℃에서 약 pH 4.65까지 배양하고, 4℃로 냉각한다.

비교를 위하여, 요구르트의 생산에 종래 사용되는 스트렙토코커스 써모필러스 YS8 및 SFi3 균주와 락토바실러스 불가리커스 YL18균주를 사용하여 상기 기재한 것과 동일한 방법으로 종래의 호형 요구르트를 제조하였다.

수득된 제품의 특성, 특히 4℃에서의 보관 동안 그것의 pH가 하기 표에 나타난다.

실시예	pH 4.65 로의 산성화 시간	제품의 pH (4℃, 1 일 이후)	제품의 pH (4℃, 24 일 이후)
실시예 2	8 시간 30 분	4.6	4.6
비교예	6 시간	4.34	4.3

[실시예 3]

모짜렐라 치즈를 스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주 배양을 사용하여 종래의 방법에 따라 제조한다.

[실시예 4]

스트렙토코커스 써모필러스 CNCM I-1351 균주를 1% 과당이 보충된 M17 배지 10 l에서, 42℃의 혐기성 조건으로 6시간 동안 배양한다. XAD-7수지 200g을 배양액에 직접 첨가하고, 전체를 4℃에서 1시간 동안 약하게 교반한다. 그 혼합물을 Schleicher Schvell filter No. 604(독일)로 여과한 뒤, 세균을 제거하기 위하여 pH 5.2의 50mM 아세트산 용액 10 l로 필터에 붙은 수지를 세척한다. 100% 에탄올 및 20mM 암모늄 아세테이트를 함유하는 용액 450ml을 그 수지에 첨가하고, 수지를 제거하기 위하여 전체를 여과하고, 그 여과액을 식품 산업에 사용될 수 있는 본 발명에 따른 박테리오신을 함유하는 분말을 수득할 수 있을 때까지 동결 건조한다.

이러한 분말의 항균 활성은 물에 희석하여, 상기 기재된 아가 홈 실험으로 측정한다. 이러한 분말은 10^7 au/g을 나타낸다.

마지막으로, 종래의 방법에 따른 육류 무스의 제조에 있어서 상기 분말 0.5 g/kg을 거기에 첨가한다. 그럼으로써, 병원성 세균, 특히 클로스트리디움의 발생을 완전히 억제할 수 있는 5×10^3 au/g의 박테리오신을 함유하는 육류 무스가 수득된다.

[실시예 5]

이 실시예는 실시예 4에서 기재된 0.05g/kg의 분말을 함유하는, 즉 달리말하면 피부의 바람직하지 않은 세균의 발생을 억제할 수 있는 5×10^2 au/g의 박테리오신을 함유하는, 피부 보호용 모이스처 크림의 제조에 관한 것이다.

이러한 유제를 제조하기 위하여, 지방상 A의 성분을 혼합하고, 75℃로 가열한다. 수용상 B를 제조하여 또한 75℃로 가열하고, 지방상 A에 첨가하여 천천히 혼합하고, 그 혼합물을 천천히 섞으면서 실온, 즉 25℃까지 냉각시킨다. 이러한 온도에서 성분 C는 식의 순서에 따라 천천히 첨가한다.

지방상 A

펙-6-스테아레이트, 글리세르에이트 및 펙-20-세틸 에테르 (펙: 폴리에틸렌글리콜)	15 %
바셀린 오일	5 %
0.1 % 페닐인단 (산화방지제) 및 1 % 콩 인지질로 안정화된 밀 종자 오일 (EP94109355.1 참조)	3 %
스위트 아몬드 오일	2 %
세틸 알콜	1 %
이소스테아릴 이소스테아레이트	2 %
2-옥틸-도데킬-미리스테이트	1 %
라놀린 왁스	1 %

수용상 B

메틸이소티아졸린	0.1 %
탈이온수	59.6 %
체혈장 단백질	2 %

첨가제 C

프로필렌글리콜 및 칼렌둘라 추출물	2 %
탈이온수중의 50% 가용성 콜라겐	5.8 %
방향제	0.3 %
탈이온수중의 실시예 4 에 따른 2.5 % 박테리오신 분말	0.2 %

[실시예 6]

실시예 4에서 기재된 0.5g/kg의 박테리오신 분말을 액상 치약에 첨가한다. 그럼으로써, 이러한 치약은 협강의 병원성 세균, 특히 스트렙토코커스 소브리너스의 발생을 억제할 수 있다.

[실시예 7]

포장하는 동안 후-오염을 방지하기 위하여, 1%의 양으로 물에 희석된 실시예 4의 박테리오신 분말을 함유하는 용액을 멸균하고자 하는 식품에 분무할 수 있다.

[서열목록]

(1) 일반 정보 :

(ⅰ) 출원인 :

(A) 성명 : 소시에떼 데 프로듀이 네슬레 소시에떼

(B) 거리 : 사서함 353호

(C) 도시 : 베베이

(E) 국가 : 스위스

(F) 우편 번호 (ZIP) : 1800

(G) 전화 번호 : (021) 924 47 60

(H) FAX 번호 : (021) 924 28 80

(ⅱ) 발명의 명칭 : 스트렙토코커스 써모필러스 기원 박테리오신

(ⅲ) 서열 수 : 8

(ⅳ) 컴퓨터 판독가능 형태 :

(A) 매체 형태 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환

(C) 운영 체계 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어 : Patentin Release #1.0, Version #1.25(EPO)

(ⅵ) 선출원 자료 :

(A) 출원 번호 : CH 2628/93-7

(B) 출원 일자 : 1993년 9월 3일

(2) SEQ ID NO: 1의 정보:

(ⅰ) 서열 특성 :

(A) 길이 : 62 아미노산

(B) 형 : 아미노산

(C) 토폴로지(Topology) : 선상

(ⅱ) 분자형 : 단백질

(ⅵ) 기원 :

(A) 생물명 : 스트렙토코커스 써모필러스

(B) 균주 : CNCM I-1351

(xi) 서열 설명 : 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) SEQ ID NO: 2의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 43 아미노산

(B) 형 : 아미노산

(C) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : 단백질

(vi) 기원 :

(A) 생물명 : 스트렙토코커스 써모필러스

(B) 균주 : CNCM I-1351

(xi) 서열 설명 : 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) SEQ ID NO: 3의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 770 염기쌍

(B) 형 : 핵산

(C) 스트랜드(strandness) : 단일

(D) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : DNA(genomic)

(vi) 기원 :

(A) 생물명 : 스트렙토코커스 써모필러스

(B) 균주 : CNCM I-1351

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : CDS

(B) 위치 : 221..475

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : sig_peptide

(B) 위치 : 221..289

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : mat_peptide

(B) 위치 : 290..475

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : CDS

(B) 위치 : 495..686

(D) 다른 정보 : /function = 써모필린 1 암호틀

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : sig_peptide

(B) 위치 : 495..557

(ix) 특징 :

(A) 이름/키 : mat_peptide

(B) 위치 : 558..686

(D) 다른 정보 : /function=써모필린 2 암호틀

(xi) 서열 설명 : 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 TTAGGTAGGA 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 GAG 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) SEQ ID NO: 4의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 85 아미노산

(B) 형 : 아미노산

(C) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 설명 : 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) SEQ ID NO: 5의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 64 아미노산

(B) 형 : 아미노산

(C) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 설명 : 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 Val Gly Ser Gly Lys Ala Ile Ile Asn Gly Leu
        30                  35                  40
```

(2) SEQ ID NO: 6의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 17 염기쌍

(B) 형 : 핵산

(C) 스트랜드 : 단일

(D) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : DNA(genomic)

(iii) 히포테티칼 : Yes

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO: 6:

GAYATGGGNG GNTAYGC

(2) SEQ ID NO: 7의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 17 염기쌍

(B) 형 : 핵산

(C) 스트랜드 : 단일

(D) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : DNA(genomic)

(iii) 히포테티칼 : Yes

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO: 7:

GCTATNFCNG CNACGTG

(2) SEQ ID NO: 8의 정보:

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 128 염기쌍

(B) 형 : 핵산

(C) 스트랜드 : 단일

(D) 토폴로지 : 선상

(ii) 분자형 : DNA(genomic)

(vi) 기원 :

(A) 생물명 : 스트렙토코커스 써모필러스

(B) 균주 : CNCM I-1351

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO: 8:

```
GATTGTTTAA AAGACATGGG AGGATATGCA TTGGCAGGAG CTGGAAGTGG AGCTCTGTGG      60
GGAGCTCCAG CAGGAGGTGT TGGAGCACTT CCAGGTGCAT TTGTCGGAGC TCATGTTGGG     120
GCAATTGC                                                              128
```

(57) 청구의 범위

청구항 1

아미노산 서열 SEQ ID NO : 1을 갖는 스트렙토코커스 써모필러스 박테리오신.

청구항 2

아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 갖는 스트렙토코커스 써모필러스 박테리오신.

청구항 3

제1항 및 제2항에 따른 박테리오신을 인코드하는 뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO: 3을 갖는 서열

청구항 4

제3항 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 221-475를 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 5

제4항 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 289-475를 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 6

제3항 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 495-686를 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 7

제6항 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 558-686를 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 8

제4항 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 221-228를 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 9

제6항에 있어서, 서열 SEQ ID NO: 3의 뉴클레오티드 495-557을 함유함을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 따른 뉴클레오티드 서열에 의하여 인코드되는 스트렙코커스 써모필러스의 신호 펩티드.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 박테리오신을 생산하는 스트렙코커스 써모필러스 균주(수탁번호 CNCM I-1351).

청구항 12

제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 박테리오신을 생산하는 스트렙코커스 써모필러스 균주를 스트벨토코커스 써모필러스 균주의 증식에 적당한 배지 및 조건하에서 배지 1ml당 균주 수가 10^7-10^9이 될 때까지 배양하고, 수득된 배양액을 원심 분리한 후에, 하나 이상의 상기 박테리오신을 함유하는 상층액의 추출물을 제조하는, 제1항 또는 제2항에 따른 박테리오신을 제조하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 상층액에 함유된 하나 이상의 상기 박테리오신 추출물을 제조하기 위하여, 상층액의 pH를 H_3PO_4 로 1.0-2.0으로 적정하고, 침전물을 제거하고, 트리클로로아세트산에 의한 한번 이상의 연속적인 침전법을 수행한 뒤에 트리플루오로아세트산의 수용성 현탁액에 재현탁하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 스트렙토코커스 써모필러스 균주가 상기 박테리오신을 생산하는 CNCM I-1351 균주인 방법.

청구항 15

식품 또는 화장품 제조에 사용되는 제1항 도는 제2항에 따른 하나 이상의 박테리오신을 생산하는 스트렙토코커스 써모필러스 균주 (수탁번호 CNCM I-1351).

청구항 16

제15항에 있어서, 치즈의 제조 또는 산성화된 우유의 제조에 있어서의 종균(starter)으로서 사용되는 하나 이상의 박테리오신을 생산하는 스트렙토코커스 써모필러스 균주 (수탁번호 CNCM I-1351).

청구항 17

제15항에 있어서, 무스와 같은 육류 제품의 제조에 있어서의 클로스트리디움 보툴리눔에 대한 유효제제, 크림 또는 로션의 제조에 있어서의 피부의 병원성 세균에 대한 유효제제 또는 구상 건강 제품의 제조에 있어서의 협강의 병원성 세균에 대한 유효제제와 같은, 병원성 세균에 대한 첨가제 또는 유효제제로 사용되는 하나 이상의 박테리오신을 생산하는 스트렙토코커스 써모필러스 균주 (수탁번호 CNCM I-1351).

청구항 18

형질전환에 의하여 세균, 이스트 또는 식물로 특정 세균을 억제할 수 있는 능력을 전달하는데 사용되는 제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 뉴클레오티드 서열.

청구항 19

형질전환에 의하여 스트렙토코커스 써모필러스 균주에 상기 유의한 유전자에 의하여 인코드되는 단백질을 방출할 수 있는 능력을 전달하는, 유의한 유전자에 유합된 신호 서열로서 사용되는 제8항 또는 제9항에 따른 뉴클레오티드 서열.

청구항 20

식품 또는 화장품 제조에 사용되는 제1항 또는 제2항에 따른 박테리오신.

청구항 21

제20항에 있어서, 무스와 같은 육류 제품의 제조에 있어서의 클로스트리디움 보툴리눔에 대한 유효제제. 크림 또는 로션의 제조에 있어서의 피부의 병원성 세균에 대한 유효제제 또는 구강 건강 제품의 제조에 있어서의 협강의 병원성 세균에 대한 유효제제와 같은 병원성 세균에 대한 첨가제 또는 유효제제로 사용되는 박테리오신.