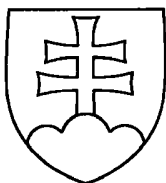


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 5. 2. 1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9-277949
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 26. 9. 1997
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: JP
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 10. 5. 2001
Vestník ÚPV SR č.: 05/2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/JP98/00481
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO99/16862

(21) Číslo dokumentu:

435-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

C12N 1/20
A23C 9/123
// (C12N 1/20
C12R 1:225)

(71) Prihlasovateľ: CALPIS CO., LTD., Tokyo, JP;

(72) Pôvodca: Yamamoto Naoyuki, Sagami-hara-shi, Kanagawa, JP;
Kawakami Natsue, Yokohama-shi, Kanagawa, JP;
Ishida Yuu, Sumida-ku, Tokyo, JP;
Yada Hirokazu, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP;

(74) Zástupca: Bezák Marián, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov: **Baktérie *Lactobacillus helveticus* produkujúce kyselinu mliečnu s vysokou produktivitou tripeptidu, fermentovaný mliečny výrobok a spôsob jeho výroby**

(57) Anotácia:

Je opísaný fermentovaný mliečny výrobok, ktorý obsahuje baktérie produkujúce kyselinu mliečnu, schopné vytvárať veľké množstvo laktotripeptidu a veľké množstvo účinnej zložky s hypotenzívnou aktivitou a protistresovým účinkom, a ktorý sa môže výhodne používať vo forme potravín alebo nápojov. Baktéria *Lactobacillus helveticus* produkujúca kyselinu mliečnu má špecifické bakteriologické vlastnosti, pričom tieto baktérie, ak sa kultivujú v médiu živočíšneho mlieka obsahujúcom 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka, produkujú tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množstve 60 µg v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na ml média a tieto baktérie prejavujú extracelulárnu proteázovú aktivitu nie nižšiu ako 400 U/OD₅₉₀. Opísaný fermentovaný mliečny výrobok sa získa fermentáciou živočíšneho mlieka týmito baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu.

SK 435-2000 A3

BAKTÉRIE *LACTOBACILLUS HELVETICUS* PRODUKUJÚCE KYSELINU MLIEČNU S VYSOKOU PRODUKTIVITOU TRIPEPTIDU, FERMENTOVANÝ MLIEČNY VÝROBOK A SPÔSOB JEHO VÝROBY

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka nových baktérií *Lactobacillus helveticus* produkujúcich kyselinu mliečnu, ktoré ak sa kultivujú v médiu živočíšneho mlieka, môžu vytvárať určitý tripeptid s vysokou účinnosťou a ktoré majú vysokú extracelulárnu proteázovú aktivitu, fermentovaného mliečneho výrobku obsahujúceho baktérie produkujúce kyselinu mliečnu a spôsobu výroby tohto výrobku.

Doterajší stav techniky

Lactobacillus helveticus sa pre mliečne výrobky dlho používa na výrobu fermentovaného mlieka ako iniciátor baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu. *Lactobacillus helveticus* má vysokú proteolytickú aktivitu, a hlavne jeho vysoká aktivita extracelulárnej proteázy má dôležitú úlohu pri fermentácii živočíšneho mlieka. To znamená, že extracelulárna proteáza trávi proteíny živočíšneho mlieka za vytvorenia rôznych fragmentov peptidov. Vytvorené peptidy sú ďalej podrobené pôsobeniu peptidáz, aby sa vytvorili peptidy s nižšou molekulovou hmotnosťou. Je známe, že časť peptidov vytvorených v médiu je vďaka pôsobeniu proteázových enzýmov prijatá bunkami baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu a utilizovaná ako zdroj dusíka. Ďalej sa publikovalo, že niektoré z peptidov produkovaných v médiu majú inhibičnú aktivitu k angiotenzín konvertujúcemu enzýmu (ACE), ktorý spôsobuje hypertenziu (J. Dairy Sci. 78, 777 - 783 (1995)).

Ako peptidy na inhibíciu aktivity ACE a potlačenie zvýšenia krvného tlaku sa publikovali rôzne účinné peptidy, ako napríklad také, ktoré boli odvodené od produktov degradácie mliečnych proteínov, sójových proteínov alebo proteínov rybieho mäsa. Napríklad Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro (skrátene ďalej ako VPP a

IPP, tieto peptidy sú spoločne ďalej uvedené ako laktotripeptidy) sú známe ako peptidy s ACE inhibičnou aktivitou prítomné v mlieku fermentovanom *Lactobacillus helveticus*. Pokusy s použitím spontánne hypertenzných krýs (SHR) potvrdili, že tieto laktotripeptidy majú silný hypotenzívny účinok (J. Dairy Sci., 78, 1253 - 1257 (1995)).

Avšak fermentované mlieko obsahujúce laktotripeptid produkovaný živočíšnym mliekom fermentovaným bežnými kmeňmi *Lactobacillus helveticus* sa môže ťažko použiť tak, ako je, lebo vďaka veľkému množstvu kyseliny mliečnej vytvorenej v priebehu fermentácie prejavuje vysokú aciditu. Zriedenie fermentovaného mlieka má za následok výrazné zníženie obsahu laktotripeptidov.

Teda je žiaduce vyrobiť fermentované mlieko s vyšším obsahom laktotripeptidov v porovnaní s obsahom kyseliny mliečnej vytvorenej vo fermentovanom mlieku. Výrobky s funkciou laktotripeptidov by sa mohli ľahko pripraviť a poskytnúť spotrebiteľom v prijateľnej forme na podávanie pridaním malého množstva takéhoto fermentovaného mlieka k rôznym potravinám a nápojom. Avšak žiadne zo známych kmeňov baktérii produkujúcich kyselinu mliečnu nevytvárajú laktotripeptid s vysokou účinnosťou.

Podstata vynálezu

Predmetom tohto vynálezu je poskytnúť nový kmeň baktérii produkujúcich kyselinu mliečnu, ktorý môže vytvárať veľké množstvo laktotripeptidu s vysokou účinnosťou vzhľadom k množstvu vytvorenej kyseliny mliečnej.

Ďalším predmetom tohto vynálezu je poskytnúť fermentovaný mliečny výrobok, ktorý obsahuje laktotripeptid s takými účinkami, ako napríklad hypotenzívnym účinkom a očakávaným protistresovým účinkom a kmeň baktérii produkujúcich kyselinu mliečnu schopný vytvárať veľké množstvo laktotripeptidu a ktorý sa môže prijateľne používať v podobe potravín alebo nápojov, a spôsob jeho prípravy.

Podľa tohto vynálezu sa poskytujú baktérie produkujúce kyselinu mliečnu *Lactobacillus helveticus* s týmito bakteriologickými vlastnosťami, pričom ak sa kultivujú dané baktérie v médiu živočíšneho mlieka obsahujúceho 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka, vytvárajú tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množstve nie menšom ako 60 µg v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na ml média a dané baktérie prejavujú aktivitu extracelulárnej proteázy nie menšiu ako 400 U/OD₅₀:

Morfologické vlastnosti:

1. tvar bunky: tyčinka
2. pohyblivosť: žiadna
3. tvorba spór: žiadna
4. gramovo farbenie: pozitívne

Fyziologické vlastnosti:

1. produkcia katalázy: negatívna
2. produkcia indolu: negatívna
3. redukcia nitrátu: negatívna
4. aeróbny rast: fakultatívne anaeróbne
5. tvorba DL-kyseliny mliečnej z glukózy homolaktickou fermentáciou bez tvorby plynov
6. degradácia uhľovodíkov
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - manóza: +
 - fruktóza: +
 - galaktóza: +
 - sacharóza: -
 - maltóza: -
 - xylóza: -
 - ramnóza: -
 - celobióza: -
 - trehalóza: -

- melibióza: -
- rafinóza: -
- stachyóza: -
- manitol: -
- sorbitol: -
- eskulín: -
- salicín: -.

Podľa tohto vynálezu sa tiež poskytujú baktérie produkujúce kyselinu mliečnu *Lactobacillus helveticus*, kde uvedenými baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu je kmeň *Lactobacillus helveticus* CM4 (uložený v Národnom inštitúte biologických vied a Agentúre pre humánne technológie priemyselných vied a technológie 15. augusta 1997 pod číslom uloženia FERM BP 6060).

Podľa tohto vynálezu sa ďalej poskytujú baktérie produkujúce kyselinu mliečnu *Lactobacillus helveticus* s chromozomálnou DNA, kde uvedená chromozomálna DNA pri trávení restriktčnými enzýmami PstI a EcoRI poskytuje DNA fragment s veľkosťou 15 až 17 kb.

Podľa tohto vynálezu sa tiež poskytuje fermentovaný mliečny výrobok, ktorý obsahuje fermentované mlieko obsahujúce vyššie uvedené baktérie produkujúce kyselinu mliečnu a tripeptid zvolený zo skupiny zahrňujúcej Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro a ich zmesi.

Podľa tohto vynálezu sa tiež poskytuje spôsob výroby fermentovaného mliečneho výrobku, ktorý zahrňuje fermentáciu média obsahujúceho výživnú látku zvolenú zo skupiny zahrňujúcej peptid, proteín a ich zmesi, zahrňujúce sekvencie Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro, baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 je fotografia ukazujúca spôsob elektroforézy na agarózovom géli fragmentov chromozomálnej DNA rôznych kmeňov *Lactobacillus helveticus* z príkladu 2.

Uprednostňované uskutočnenia vynálezu

Baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu patria k *Lactobacillus helveticus* a vyznačujú sa tým, že baktérie produkujúce kyselinu mliečnu pri kultivácii v médiu živočíšneho mlieka obsahujúceho 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka vytvárajú tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množstve nie menšom ako 60 µg a výhodne nie menšom ako 70 µg v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na ml média a prejavujú aktivitu extracelulárnej proteázy nie nižšiu ako 400 U/OD₅₉₀ a výhodne nie nižšiu ako 430 U/OD₅₉₀. Produktivita definovaného laktotripeptidu je ukazovateľ rozlíšenia týchto baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu od bežných baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu *Lactobacillus helveticus*. Týmto ukazovateľom sa napríklad definuje vlastnosť týchto baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu vytvárať pri kultivácii v médiu živočíšneho mlieka obsahujúcom 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka laktotripeptidy v množstve nie menšom ako 60 µg v zmysle obsahu VPP na ml média, ktorá sa nemohla uskutočniť bežnými baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu. Zvyčajne sa znížením obsahu sušiny netučného mlieka v médiu pre kultiváciu vytvorí menšie množstvo laktotripeptidov. Zvýšením obsahu sušiny netučného mlieka sa vytvorí väčšie množstvo laktotripeptidu.

Produktivita laktotripeptidov ako ukazovateľ sa meria krokmi inokulácie živočíšneho mlieka, ako napríklad kravského mlieka, kozieho mlieka, konského mlieka a z nich odstredeného mlieka obsahujúceho 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka, baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu, kultivácia týchto baktérií na prípravu fermentovaného mlieka 24 hodín pri teplote 37 °C, odstredovanie 1 ml fermentovaného mlieka pri frekvencii otáčok 15 000 za minútu počas 10 minút, podrobenie supernatantu meraniu množstva VPP a IPP a prevedenie týchto množstiev na množstvo VPP. Pretože ACE inhibičná aktivita IPP na jednotku hmotnosti je 1,7-násobná ako VPP, vypočíta sa prevedené množstvo laktotripeptidu v zmysle obsahu VPP týmto vzťahom:

prevedené množstvo laktotripeptidu (μg v zmysle obsahu VPP na ml) =
 množstvo IPP ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\times$ 1,7 + množstvo VPP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Maximálna produktivita laktotripeptidu nie je obzvlášť obmedzená, ale môže sa dosiahnuť, ak všetky zo sekvencií Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro začlenené v proteíne média sa trávením odštiepia ako tripeptidy.

Aktivita extracelulárnej proteázy sa meria spôsobom podľa Yamamoto a kol. (Yamamoto, N. a kol., J. Biochem., 114, 740 (1993)) založenom na spôsobe podľa Twininga a kol. (Twining, S., Anal. Biochem., 143, 3410 (1984)) a vyjadri sa definovaním, že množstvo enzýmu prejavujúce 1 % intenzitu fluorescencie má aktivitu 1 U/OD₅₉₀. Vyššie uvedený limit aktivity extracelulárnej proteázy tiež nie je obmedzený, ale zvyčajne je 800 U/OD₅₉₀.

Tieto baktérie produkujúce kyselinu mliečnu môžu vytvárať veľké množstvo laktotripeptidu vzhľadom na množstvo kyseliny mliečnej vytvorenej počas fermentácie. Teda fermentácia s použitím týchto baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu má za následok fermentované mlieko obsahujúce väčšie množstvo laktotripeptidu v porovnaní s fermentovaným mliekom obsahujúcim podobné množstvo kyseliny mliečnej, vytvoreným bežnými baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu. V dôsledku takejto fermentácie je táto kyselina mliečna kyselina DL-mliečna. Výhodne množstvo laktotripeptidu produkovaného fermentáciou týmito baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu nie je nižšie ako 30 μg v zmysle obsahu VPP na 1 ml výsledného fermentovaného mlieka obsahujúceho 0,01 g/ml kyseliny DL-mliečnej vytvorenej počas fermentácie. Horné limitné množstvo laktotripeptidu nie je obzvlášť obmedzené, ale tieto baktérie sú schopné vytvárať až približne 50 μg v zmysle obsahu VPP na 1 ml fermentovaného mlieka obsahujúceho 0,01 g kyseliny DL-mliečnej. Množstvo kyseliny DL-mliečnej je približne úmerné množstvu laktotripeptidu. Teda ak sa v fermentovanom mlieku vytvorí napríklad 0,02 g kyseliny DL-mliečnej, množstvo vytvoreného laktotripeptidu výhodne nie je menšie ako 60 μg , v zmysle obsahu VPP. Oproti tomu fermentáciou bežnými baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu je množstvo laktotripeptidu (maximálne) nižšie ako 30 μg v zmysle obsahu VPP na 0,01 g kyseliny DL-

mliečnej v 1 ml fermentovaného mlieka.

Príkladom týchto baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu je kmeň *Lactobacillus helveticus* CM4, ktorý je uložený ako FERM BP-6060 v Národnom inštitúte biologických vied a Agentúre pre humánne technológie priemyselných vied a technológie (uložený 15. augusta 1997). Kmeň *Lactobacillus helveticus* CM4 má tieto biologické vlastnosti:

Morfologické vlastnosti:

1. tvar bunky: tyčinka
2. pohyblivosť: žiadna
3. tvorba spór: žiadna
4. gramovo farbenie: pozitívne

Fyziologické vlastnosti:

1. produkcia katalázy: negatívna
2. produkcia indolu: negatívna
3. redukcia nitrátu: negatívna
4. aeróbny rast: fakultatívne anaeróbne
5. tvorba DL-kyseliny mliečnej z glukózy homolaktickou fermentáciou bez tvorby plynov
6. degradácia uhľovodíkov
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - manóza: +
 - fruktóza: +
 - galaktóza: +
 - sacharóza: -
 - maltóza: -
 - xylóza: -
 - ramnóza: -
 - celobióza: -
 - trehalóza: -

- melibióza: -
- rafinóza: -
- stachyóza: -
- manitol: -
- sorbitol: -
- eskulín: -
- salicín: -.

Ak sa hodnotí spôsobom podľa Mitsuoka a kol. (Rinshoukensa 18, 1163 (1974)), sú vyššie uvedené bakteriologické vlastnosti kmeňa CM4 rovnaké, ako verejne známeho kmeňa *Lactobacillus helveticus* NCDO-099. Avšak podľa týchto vlastností, ktoré Mitsuoka a kol. neopísal, sa kmeň CM4 jasne odlišuje od kmeňa NCDO-099:

7. aktivita extracelulárnej proteázy: nie menej ako 400 U/OD₅₉₀

8. produktivita laktotripeptidu, tvorba dvoch druhov tripeptidov (VPP a IPP) v množstve 60 µg alebo vyššom v zmysle obsahu VPP na 1 ml fermentovanej tekutiny pri kultivácii v médiu obsahujúcom 9 % hmotn. odstredeného mlieka 24 hodín pri teplote 37 °C.

Produktivita laktotripeptidu v bode 8. sa meria s použitím odstredeného mlieka ako sušiny netučného mlieka.

Kmeň baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu sa môže získať týmto skríningom a meraním aktivity extracelulárnej proteázy.

1. Primárny skríning

Selekcia kmeňa meraním vyššej ACE inhibičnej aktivity vo fermentovanom mlieku

Kmene pre skríning sa pri teplote 37 °C 24 hodín kultivujú v médiu s obsahom 9 % hmotn. odstredeného mlieka. Po skončení kultivácie sa meria počet baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu, acidita kyseliny mliečnej a ACE inhibičná aktivita. Vyberú sa kmene baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu

produkujúcich 1×10^8 buniek/ml alebo viac a prejavujúce aciditu kyseliny mliečnej 1,6 % hmotn. alebo viac a ACE inhibičnú aktivitu 40 U/ml. ACE inhibičná aktivita sa meria spôsobom podľa Cushmana a Cheunga (Cushman, D. W. a Cheung, H.S., Pharmacol. 20, 1637 (1971)).

2. Sekundárny skrining

Selekcia kmeňa s vysokou produktivitou laktotripeptidu

Kultivované tekutiny kmeňov vybraných primárnym skriningom sa 10 minút odstredujú pri frekvencii otáčok 15 000 za minútu a ich supernatanty sa podrobia HPLC kvôli kvantifikácii laktotripeptidu. Vyberú sa kmene, ktoré vytvorili nie menej ako 50 μg v zmysle obsahu VPP na 1 ml.

3. Meranie aktivity extracelulárnej proteázy

Každý z kmeňov vybraných sekundárnym skriningom sa kultivuje v médiu obsahujúcom 9 % hmotn. odstredeného mlieka, pričom jeho pH sa udržiava na hodnote 6. Vzorka sa odoberie uprostred logaritmickej fázy rastu a zmieša sa s 1 % hmotn. citrátu sodného, odstreduje sa 10 minút pri frekvencii otáčok 15 000 za minútu kvôli získaniu buniek. Získané bunky sa premyjú 50 mM kyselinou β -glycerolfosforečnou a suspendujú sa v 50 mM Tris-HCl pufru (pH = 7,8), aby sa turbidita (OD_{590}) upravila na hodnotu 1. Potom sa meria aktivita proteázy na bunkovom povrchu. Overí sa, že výsledok je korelatívny s produktivitou laktotripeptidu kmeňov meraných sekundárnym skriningom.

Kmeň baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu *Lactobacillus helveticus*, vybraný vyššie uvedeným spôsobom, sa môže identifikovať a rozlíšiť od ostatných kmeňov baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu napríklad vyššie uvedenou produktivitou tripeptidu a aktivitou extracelulárnej proteázy.

Baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu majú výhodne okrem vyššie uvedenej produktivity laktotripeptidu a aktivity extracelulárnej proteázy chromozomálnu DNA a táto chromozomálna DNA, ak je trávená restriktčnými enzýmami PstI a EcoRI, poskytuje fragment DNA s veľkosťou 15 až 17 kb. Teda môžu byť baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu jasne odlišené od iných kmeňov rovnakého druhu skúšaním, či tento kmeň má chromozomálnu DNA, ktorá poskytuje takýto fragment DNA.

Existencia fragmentu DNA s veľkosťou 15 až 17 kb môže byť potvrdená extrakciou chromozomálnej DNA z baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu spôsobom podľa Leenhoutsa a kol. (Leenhouts, K., Appl. Environ. Microbiol., 56, 2726 (1990)), trávením chromozomálnej DNA EcoI a PstI, vykonaním elektroforézy odštiepených fragmentov na 0,8 % agarózovom géli a analýzou výsledku elektroforézy. Po vykonaní elektroforézy sa prítomnosť DNA fragmentu jasne potvrdí tak, že sa ako ukazovateľ veľkosti podrobí λ fágová DNA trávená restriktčným enzýmom Hind III paralelnej elektroforéze.

Fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu obsahuje ako nevyhnutnú zložku fermentované mlieko obsahujúce baktérie produkujúce kyselinu mliečnu a tripeptid zvolený zo skupiny zahrňujúcej VPP, IPP a ich zmesi. To znamená, že fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu obsahuje fermentované mlieko obsahujúce laktotripeptid a baktérie produkujúce kyselinu mliečnu a pripraví sa fermentáciou média obsahujúceho výživnú látku zloženú z peptidov a/alebo proteínov, ktoré zahrňujú sekvenciu VPP a/alebo IPP baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu. Teda obsahy baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu a tripeptid sa môžu vhodne zvoliť v závislosti od druhu pripravovaného fermentovaného mliečného výrobku. Tento fermentovaný mliečny výrobok môže obsahovať získaný fermentovaný výrobok samotný alebo čistený fermentovaný výrobok.

Fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu obsahuje kyselinu DL-mliečnu vytvorenú počas fermentácie. Fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu výhodne obsahuje laktotripeptid v množstve 30 až 50 μg v

zmysle obsahu VPP vzhľadom na 0,01 g kyseliny DL-mliečnej. Množstvo kyseliny DL-mliečnej je približne úmerné množstvu laktotripeptidu. Teda ak fermentovaný mliečny výrobok obsahuje koncentrované fermentované mlieko a obsahuje napr. 0,02 g kyseliny DL-mliečnej, množstvo laktotripeptidu je výhodne v rozmedzí 60 až 100 μg v zmysle obsahu VPP. Ak fermentovaný mliečny výrobok obsahuje zriedené fermentované mlieko a obsahuje napr. 0,005 g kyseliny DL-mliečnej, množstvo laktotripeptidu je výhodne v rozmedzí 15 až 25 μg v zmysle obsahu VPP. Hoci môže fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu obsahovať kyselinu DL-mliečnu, ktorá je potravinovým doplnkom k úprave acidity, je táto kyselina L-mliečna odlišná od kyseliny DL-mliečnej vytvorenej počas fermentácie.

Baktérie produkujúce kyselinu mliečnu vo fermentovanom mliečnom výrobku podľa tohto vynálezu sa môžu buď sterilizovať po fermentácii alebo udržiavať živé bez sterilizácie.

Fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu môže byť jogurt, zakysané nápoje obsahujúce mlieko, syr, pripravené potraviny obsahujúce fermentované kyslé mlieko a zdraviu prospešné potraviny obsahujúce fermentované kyslé mlieko. Teda fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu môže obsahovať okrem fermentovaného mlieka ako nevyhnutné zložky rôzne látky, ktoré sa zvyčajne pridávajú k výrobe takejto škály výrobkov. Fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu môže byť v pevnej forme, ako napríklad prášky, granuláty a tablety, alebo tekutej, ako napríklad pasta, gél a kvapaliny.

Spôsob výroby fermentovaného mliečného výrobku podľa tohto vynálezu zahrňuje fermentáciu média obsahujúceho výživnú látku zvolenú zo skupiny, ktorá zahrňuje peptid, proteín a ich zmesi obsahujúce ako súčasť svoje sekvencie Val-Pro-Pro a/alebo Ile-Pro-Pro, baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu.

Výživnou látkou v médiu môže byť niektorý z typov podľa toho, ako dlhé obsahuje peptidy a/alebo proteíny, ktoré ako súčasť svojej sekvencie obsahujú VPP a/alebo IPP. Výživnou látkou môže byť napríklad živočíšne mlieko,

mliečny kazeín, kukurica, kukuričný proteín, pšenica, pšeničný proteín, sójové bôby, sójové mlieko, odtučnené sójové bôby, sójový proteín alebo ich zmesi. Obzvlášť je výhodné použiť výživnú látku obsahujúcu živočíšne mlieko, ako napríklad kravské mlieko, kozie mlieko, konské mlieko alebo z nich odstredené mlieka. Obsah sušiny netučného mlieka v živočíšnom mlieku nie je obzvlášť obmedzený, ale zvyčajne je v rozmedzí 5 až 20 % hmotn.

Množstvo baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu, ktorými sa médium inokuluje, nie je nijako zvlášť obmedzené. Množstvo na inokuláciu je zvyčajne približne 10^5 až 10^7 buniek baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu na 1 g vyššie uvedenej určitej výživnej látky v médiu.

Fermentácia sa môže vykonávať pri teplote v rozmedzí 25 až 50 °C, a výhodne pri teplote v rozmedzí 30 až 45 °C počas 6 až 30 hodín, a výhodne počas 10 až 24 hodín, v rozmedzí hodnôt pH výhodne 3,0 až 4,0 a výhodnejšie v rozmedzí 3,0 až 3,5.

Fermentácia sa výhodne vykoná tak, že množstvo laktotripeptidu nie je menšie ako 60 µg v zmysle obsahu VPP na ml výsledného fermentovaného mlieka. Hlavne ak sa ako médium použije kravské mlieko obsahujúce 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka, má fermentácia pri teplote 25 až 40 °C počas 12 až 48 hodín za následok fermentované mlieko obsahujúce laktotripeptid v množstve nie menšom ako 70 µg, v zmysle obsahu VPP na ml. Obsah sušiny netučného mlieka v médiu je približne úmerný vytvorenému laktotripeptidu. Napríklad ak obsahuje výživná látka 5 % hmotn. sušiny netučného mlieka, fermentácia podľa vyššie uvedených podmienok by mala mať za následok produkciu laktotripeptidu v množstve približne 33,3 µg v zmysle VPP obsahu na ml.

Fermentované mlieko získané vyššie uvedenou fermentáciou sa môže zmiešať s výrobkom tak, ako je. Ak je to nutné, môže sa fermentované mlieko pred zmiešaním podrobiť riedeniu alebo čisteniu. Fermentované mlieko sa môže ochladiť a skladovať pri teplote 5 °C a potom zmiešať s ostatnými zložkami, aby sa pripravil výrobok, ako napríklad mrazený výrobok. Alternatívne sa môže fermentované mlieko podrobiť tepelnej sterilizácii a ak je to nutné,

práškovať sušením rozprašovaním, aby sa pripravil výrobok na distribúciu pri teplote miestnosti.

Pretože fermentovaný mliečny výrobok podľa tohto vynálezu obsahuje fermentované mlieko získané fermentáciou baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu, môže sa použiť na ľahkú prípravu výrobkov s vysokým obsahom laktotripeptidu vzhľadom na obsah kyseliny mliečnej v prijateľnej forme na podávanie. Očakáva sa, že ak sa podáva človeku fermentovaný mliečny výrobok, prejaví sa hypotenzívny účinok a protistresový účinok laktotripeptidu.

Pretože baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa tohto vynálezu môžu svojou kultiváciou v určitej výživnej látke vytvárať veľké množstvo laktotripeptidu, sú baktérie a látky z nich užitočné na výrobu širokej škály fermentovaných mliečnych výrobkov, funkčných potravín, zdraviu prospešných potravín, potravín pre určené zdravotné použitie, potravín pre určené použitie staršími ľuďmi, s hypotenzívnym účinkom a stres zmierňujúcim účinkom laktotripeptidu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Tento vynález bude podrobnejšie opísaný ďalej s odkazom na príklady, ale tento vynález sa na ne neobmedzuje.

Medzi kmeňmi *Lactobacillus helveticus* použitými v príkladoch je kmeň CM4, uložený v Národnom inštitúte biologických vied a Agentúre pre humánne technológie priemyselných vied a technológie a bolo mu udelené prírastkové číslo FERM BP-6060. Verejne dostupné kmene sú ATCC15009, NCDO-099, JCM1006, ATCC10797, JCM1062, JCM1103, JCM1120 a JCM1004. Iné kmene ako vyššie uvedené kmene použité v príkladoch sú zvolené zo zbierky kmeňov prihlasovateľa.

Príklad 1

Selekcia kmeňov poskytujúcich fermentované mlieko s vysokou ACE inhibičnou aktivitou

Skrinovalo sa 36 kmeňov *Lactobacillus helveticus* izolovaných z rôznych mliečnych výrobkov. ACE inhibičná aktivita mlieka fermentovaného každým z kmeňov sa merala týmto spôsobom. Každý z kmeňov *Lactobacillus helveticus* sa kultivoval pri teplote 37 °C počas 24 hodín v médiu s 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka. Kultivačné médium sa pridalo do čerstvého média rovnakého typu v takom množstve, aby nové médium obsahovalo 3 % hmotn. kultivačného média. Fermentácia ďalej prebiehala 24 hodín pri teplote 37 °C. Po skončení fermentácie sa merala acidita kyseliny mliečnej (% hmotn.), množstvo peptidu v srvátke (mg/ml), počet buniek a ACE inhibičná aktivita (U/ml). Výsledky ukazuje tabuľka 1. 7 kmeňov z 36 kmeňov malo veľmi slabú schopnosť fermentácie. 15 kmeňov vytvorilo fermentované mlieko s aciditou vytvorenej kyseliny mliečnej nie menšou ako 1,6 % hmotn. Z 15 kmeňov sa vybralo 8 kmeňov s ACE inhibičnou aktivitou nie menšou ako 40 U/ml srvátky vo svojom fermentovanom mlieku.

Meranie ACE inhibičnej aktivity fermentovaného mlieka

ACE inhibičná aktivita sa merala spôsobom podľa Cushmana a Cheunga (Cushman, D. W. a Cheung, H. S., Pharmacol., 20, 1637 (1971)). To znamená, že každé fermentované mlieko sa odstreďovalo pri frekvencii otáčok 15 000 za minútu počas 5 minút, aby sa získal supernatant (srvátka). Srvátka sa kvôli meraniu vhodne zriedila. Do skúmavky sa vpravilo 80 µl zriedenej srvátky, zmiešalo sa s 0,2 ml 0,1 M kyseliny boritej ako pufru (obsahujúceho 0,3 M NaCl, pH = 7,3) obsahujúcim ako substrát 5 mM hipurylhistidínleucínu (Hip-His-Leu, vyrobený spoločnosťou Sigma Chemicals Co.) a ďalej sa zmiešalo s 20 µl roztoku enzýmu (0,1 U/ml, vyrobený spoločnosťou Sigma Chemicals Co.). Výsledná zmes sa nechala reagovať 30 minút pri teplote 37 °C a potom sa kvôli

ukončení reakcie zmiešala s 250 µl 1N kyseliny chlorovodíkovej. Následne sa zmes zmiešala s 1,7 ml etylacetátu, 20 sekúnd sa miešala a potom odstredovala 10 minút pri frekvencii otáčok 3 000 za minútu, aby sa znova získalo 1,4 ml etylacetátovej fázy (vrchná fáza). Vrchná fáza sa zahrievala 40 minút pri teplote 120 °C, aby sa odstránilo rozpúšťadlo, zmiešala sa s 1 ml destilovanej vody a miešala približne 20 sekúnd. U extrahovanej kyseliny hipurovej sa merala absorbancia pri 228 nm. Aktivita enzýmu v jednotkách sa vypočítala podľa ďalej uvedeného vzťahu s tým, že ako jedna jednotka sa definuje množstvo, ktoré poskytne 50 % inhibíciu ACE aktivity.

$$\text{množstvo enzýmu (jednotka)} = (A - B) / (A - C) \times 100 \times 1/50$$

kde:

A predstavuje absorbanciu pri 228 nm bez vzorky,

B predstavuje absorbanciu pri 228 nm so vzorkou a

C predstavuje absorbanciu pri 228 nm ako bez enzýmu, tak bez vzorky.

Kvantitatívna analýza množstva peptidov vo fermentovanom mlieku

Kvantitatívna analýza peptidov sa uskutočnila spôsobom OPA (Charch, F. C. a kol., J. Dairy Sci., 66, 1219 (1983)). Ako štandardná látka na vytvorenie kalibračnej krivky sa použil kazeín trávený trypsínom.

Tabuľka 1

Kmene	Acidita (% hmotn.)	Množstvo peptidov (mg/ml)	Počet buniek (x 10 ⁸ buniek/ml)	ACE inhibičná aktivita (U/ml)
Kmeň 1	-	-	-	-
Kmeň 2	-	-	-	-
Kmeň 3	-	-	-	-
Kmeň 4	-	-	-	-
Kmeň 5	-	-	-	-
Kmeň 6	-	-	-	-
Kmeň 7	-	-	-	-
Kmeň 8	0,498	1,59	0,29	26,4
Kmeň 9	2,022	1,99	9,53	34,5
Kmeň 10	1,709	2,10	8,53	24,5
Kmeň 11	0,615	1,76	1,28	29,1
Kmeň 12	0,411	1,35	0,38	17,6
Kmeň 13	0,917	1,57	3,63	19,9
Kmeň 14	1,026	1,71	5,78	9,4
Kmeň 15	0,517	1,59	0,56	26,9
Kmeň 16	1,532	4,69	5,97	102,5
Kmeň 17	2,101	2,01	6,09	98,9
Kmeň 18	1,783	1,94	5,38	21,9
Kmeň 19	1,955	1,69	5,31	100,6
Kmeň 20	2,095	1,74	7,16	61,4
Kmeň 21	1,963	2,03	6,05	125,3
Kmeň 22	1,798	2,85	6,19	54,2
Kmeň 23	1,604	2,32	6,81	36,6
Kmeň 24	1,932	1,77	7,97	47,7
Kmeň 25	1,885	1,51	4,91	18,3
Kmeň 26	1,862	1,46	5,69	26,2
Kmeň 27	1,063	3,01	2,78	76,9
Kmeň 28	0,457	1,98	0,50	52,4

Kmene	Acidita (% hmotn.)	Množstvo peptidov (mg/ml)	Počet buniek (x 10 ⁸ buniek/ml)	ACE inhibičná aktivita (U/ml)
Kmeň 29	0,516	2,55	1,13	92,6
JCM1006	1,872	2,35	6,97	48,5
JCM1062	1,109	2,60	8,50	78,4
JCM1103	1,244	1,36	3,69	31,0
ATCC10797	1,359	2,11	8,56	13,8
ATCC15009	1,454	1,81	5,16	16,6
NCDO-099	1,769	2,76	6,59	25,5
CM4	1,635	3,12	4,44	130,0

Selekcia kmeňov s vysokou produktivitou laktotripeptidu

Následne sa u 8 vyššie vybraných kmeňov s vysokou ACE inhibičnou aktivitou, ktoré poskytli fermentované mlieko, meral obsah VPP a IPP v nimi fermentovanom mlieku.

1 ml fermentovaného mlieka sa odstreďoval 10 minút pri frekvencii otáčok 15000 za minútu. Nazhromaždil sa jeho supernatant, to znamená srvátka. 0,3 ml srvátky sa podrobilo adsorpcii na Sep-Pak Cartridge (vyrobený Waters Inc.), premyla sa destilovanou vodou a potom eluovala 5 ml metanolu. Eluát sa vysušil odstreďovaním a za zníženého tlaku. Vysušený produkt sa rozpustil v 0,3 ml 0,05 % vodného roztoku kyseliny trifluóroctovej a podrobil HPLC analýze (vysoko účinná kvapalinová chromatografia) za týchto podmienok:

Výsledky ukazuje tabuľka 2.

Použitý prístroj:

Hitachi L4000 UV detektor (pri 215 nm)

programovateľná pumpa L6200

vyhrievaná kolóna L5030 (35 °C)

Podmienky elúcie: rýchlosť prúdenia 0,5 ml/min.

Eluent: vodný roztok obsahujúci 0,3 M NaCl a 0,05 % kyseliny trifluóroctovú

Kolóna: Asahipak GS320 (Φ 3,9 x 600 mm)

Pretože ACE inhibičná aktivita IPP na jednotku hmotnosti je 1,7-násobná ako VPP, vypočítal sa obsah laktotripeptidov v zmysle obsahu VPP z meraných množstiev IPP a VPP podľa ďalej uvedeného vzťahu.

Výsledky ukazuje tabuľka 2.

$$\text{prevedené množstvo laktotripeptidu } (\mu\text{g v zmysle obsahu VPP na ml}) = \text{množstvo IPP } (\mu\text{g/ml}) \times 1,7 + \text{množstvo VPP } (\mu\text{g/ml})$$

Tabuľka 2

Kmene	Množstvo peptidu $\mu\text{g/ml}$ srvátky			Acidita (% hmotn.)
	VPP	IPP	Množstvo laktotripeptidu v zmysle obsahu VPP	
Kmeň 17	15,2	11,1	34,0	1,5
Kmeň 19	11,2	7,3	23,7	1,4
Kmeň 20	13,0	8,1	26,8	1,6
Kmeň 21	16,6	11,4	36,0	1,6
Kmeň 22	15,8	12,1	36,3	1,5
Kmeň 24	12,6	8,7	27,4	1,6
JCM1006	12,9	9,3	28,6	1,3
CM4	38,5	23,5	78,5	1,9

Mlieko fermentované kmeňom CM4 obsahovalo najväčšie množstvo laktotripeptidu v zmysle obsahu VPP, to znamená 78,5 $\mu\text{g/ml}$ srvátky. Ostatných sedem kmeňov poskytlo priemerné množstvo 34,2 $\mu\text{g/ml}$ srvátky.

Meranie aktivity extracelulárnej proteázy

Aktivita extracelulárnej proteázy sa merala u 16 kmeňov, ktoré poskytli relatívne dobré výsledky schopnosti fermentácie ukázané v tabuľke 1. Meranie sa vykonávalo spôsobom podľa Yamamoto a kol. (Yamamoto, N. a kol., J. Biochem., 114, 740 (1993)), založeného na spôsobe Twininga a kol. (Twining, S., Anal. Biochem., 143, 3410 (1984)). To znamená, že každý kmeň sa kultivoval v médiu s obsahom 9 % hmotn. sušiny mlieka, ktorého pH sa udržiavalo na hodnote 6,0. Vzorka sa odoberala uprostred logaritmickej fázy rastu a kvôli vyjasneniu mliečneho média sa zmiešala s citrátom sodným tak, že konečná koncentrácia bola 1 % hmotn. Zmes sa odstreďovala 10 minút pri frekvencii otáčok 5 000 za minútu, aby sa zhromaždili bunky. Bunky sa premyli 50 mM roztokom kyseliny β -glycerolfosforečnej a suspendovali v 50 mM Tris-HCl pufru (s hodnotou pH = 7,8), aby sa upravila turbidita (OD_{590} , to znamená, že sa merala absorbancia pri 590 nm) na hodnotu 1. 30 μ l suspenzie sa zmiešalo s 20 μ l 0,4 % fluoresceín-kazeínu (vyrobený spoločnosťou Sigma Chemicals Co.) a inkubovalo sa 1 hodinu pri teplote 42 °C. Zmes sa ďalej zmiešala so 120 μ l 5 % roztoku kyseliny trichlóroctovej, nechala sa 20 minút stáť a 10 minút sa odstreďovala pri frekvencii otáčok 15 000 za minútu, 60 μ l supernatantu sa pridalo k 3 ml 500 mM Tris-HCl pufru (s hodnotou pH = 8,3) a merala sa jeho intenzita fluorescence detekciou fluorescence pri 525 nm vytvorenej pri excitačnej vlnovej dĺžke 490 nm. Vypočítala sa aktivita extracelulárnej proteázy v jednotke s tým, že jedna jednotka sa definuje ako množstvo enzýmu, ktoré za vyššie uvedených podmienok prejavuje 1 % intenzitu fluorescence. Výsledky ukazuje tabuľka 3.

Tabuľka 3

Kmene	U/OD ₅₉₀
Kmeň 17	136,7
Kmeň 18	102,8
Kmeň 19	103,2
Kmeň 20	89,9
Kmeň 21	80,1
Kmeň 22	243,3
Kmeň 23	116,6
Kmeň 24	116,6
Kmeň 25	192,6
Kmeň 26	108,4
JCM1006	185,7
JCM1062	96,5
JCM1103	176,3
ATCC15009	168,1
ATCC10797	106,5
NCDO-099	229,7
CM4	452,6

Aktivita kmeňa CM4 *Lactobacillus helveticus* bola najvyššia, to znamená 450 U/OD₅₉₀. Priemerná aktivita ostatných 16 kmeňov bola 141 U/OD₅₉₀, ktorá je približne tretinou aktivity kmeňa CM4.

Príklad 2

Z 11 kmeňov vybraných v príklade 1 z 36 kmeňov *Lactobacillus helveticus* sa extrahovala chromozomálna DNA spôsobom podľa Leenhoutsa a kol. (Leenhouts, K., Appl. Environ. Microbiol., 56, 2726 (1990)), bola trávená rôznymi restriktčnými enzýmami a podrobila sa elektroforéze v 0,8 % agarózovom géli kvôli analýze spôsobom elektroforézy.

Ako výsledok bol medzi fragmentmi DNA chromozómu kmeňa CM4 pozorovaný charakteristický fragment trávený EcoRI a PstI (ukazuje šípka 1 na obr. 1). Takýto fragment u fragmentov chromozómov iných kmeňov ako CM4 sa nepozoroval, a u väčšiny iných kmeňov sa pozorovali kratšie fragmenty ako charakteristický fragment kmeňa CM4 (ukazuje šípka 2 na obr. 1). Molekulová hmotnosť charakteristického fragmentu sa merala porovnávacou elektroforézou tak, že ukazovateľmi veľkosti boli produkty λ fágovej DNA trávenej Hind III (23,1 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,4 kb, 2,3 kb a 2,0 kb v zmysle rastúcej pohyblivosti) a našlo sa približne 16 kb. Teda sa overilo, že kmeň CM4 má chromozomálnu DNA, ktorá trávením EcoRI a PstI poskytuje DNA fragment s molekulovou hmotnosťou asi 16 kb. Tiež sa overilo, že iné kmene ako CM4 majú chromozomálnu DNA, ktorá poskytuje bežný fragment DNA s molekulovou hmotnosťou okolo 13 kb.

Príklad 3

Fermentované mlieko bolo vytvorené kmeňom CM4 *Lactobacillus helveticus* vybraným v príklade 1. Kmeň CM4 sa kultivoval 12 hodín pri teplote 37 °C v 100 g 9 % hmotn. odstredeného mlieka. Následne sa 3 kg čerstvého média inokulovali kultivovaným odstredeným mliekom a kultivovali sa 12 hodín pri teplote 37 °C. Po skončení fermentácie sa všetko fermentované mlieko (počet buniek kmeňa CM4: $6,3 \times 10^8$ buniek/ml) použilo ako iniciátor fermentácie 100 kg 9 % hmotn. odstredeného mlieka počas 20 hodín pri teplote 32 °C. Po skončení fermentácie bolo vo fermentovanom mlieku obsiahnutých

74,8 µg/ml laktotripeptidu. Obsah kyseliny mliečnej bol 1,9 % hmotn.

43 kg získaného fermentovaného mlieka sa zmiešalo so 4 kg kryštálového cukru, 3 kg vody a 0,15 kg silného metoxypektínu a homogenizovalo sa, aby sa získalo 50 kg jogurtového nápoja. Jogurtový nápoj mal výhodnú jemnú chuť, hodnotu pH = 3,6 a obsahoval živé bunky kmeňa CM4 v množstve $4,6 \times 10^8$ buniek/g.

Príklad 4

26,5 kg fermentovaného mlieka získaného v príklade 3 sa zmiešalo so 45,0 kg kryštálového cukru, 4,7 kg silného maltózového sirupu a 13,8 kg vody. 10 kg 3 % hmotn. silného roztoku metoxypektínu sa za miešania pridalo k zmesi. Výsledná zmes sa homogenizovala použitím laboratórneho homogenizátora (vyrobený ATV Gaulin, Inc., model 15M-8BA) za podrobenia tlaku 150 kg/cm^2 a rýchlosti prúdenia 2500 ml/min. Homogenizovaná tekutina sa miešala s vanilkovou príchuťou a sterilizovala zahriatím na 85 °C. Týmto spôsobom sterilizované fermentované mlieko sa za horúca nalialo do 200 ml sklenených fliaš. Zisťoval sa obsah laktotripeptidu v sterilizovanom fermentovanom mliečnom výrobku. Zistilo sa, že obsah laktotripeptidu zodpovedal takému, aký bol vo fermentovanom mlieku pred sterilizáciou. Tiež sa zistilo, že obsah kyseliny mliečnej bol 0,5 % hmotn.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Baktérie *Lactobacillus helveticus* produkujúce kyselinu mliečnu, ktoré majú ďalej uvedené bakteriologické vlastnosti, pričom tieto baktérie, ak sa kultivujú v médiu živočíšneho mlieka obsahujúceho 9 % hmotn. sušiny netučného mlieka, vytvárajú tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množstve nie menšom ako 60 µg v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na ml média a tieto baktérie prejavujú aktivitu extracelulárnej proteázy nie menšiu ako 400 U/OD₅₉₀:

morfologické vlastnosti:

1. tvar bunky: tyčinka
2. pohyblivosť: žiadna
3. tvorba spór: žiadna
4. gramovo farbenie: pozitívne

fyziologické vlastnosti:

1. produkcia katalázy: negatívna
2. produkcia indolu: negatívna
3. redukcia nitrátu: negatívna
4. aeróbny rast: fakultatívne anaeróbny
5. tvorba DL-kyseliny mliečnej z glukózy homolaktickou fermentáciou bez tvorby plynov
6. degradácia uhľovodíkov
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - manóza: +
 - fruktóza: +
 - galaktóza: +
 - sacharóza: -
 - maltóza: -
 - xylóza: -
 - ramnóza: -

- celobióza: -
- trehalóza: -
- melibióza: -
- rafinóza: -
- stachyóza: -
- manitol: -
- sorbitol: -
- eskulín: -
- salicín: -.

2. Baktérie *Lactobacillus helveticus* produkujúce kyselinu mliečnu podľa nároku 1, kde uvedené baktérie *Lactobacillus helveticus* produkujúce kyselinu mliečnu sú z kmeňa CM4, uloženého v Národnom inštitúte biologických vied a Agentúre pre humánne technológie priemyselných vied a technológie pod prírastkovým číslom FERM BP-6060.

3. Baktérie *Lactobacillus helveticus* produkujúce kyselinu mliečnu podľa nároku 1, kde uvedené baktérie produkujúce kyselinu mliečnu majú chromozomálnu DNA, ktorá, ak je trávená restričnými enzýmami PstI a EcoRI, poskytuje fragment DNA s veľkosťou 15 až 17 kb.

4. Fermentovaný mliečny výrobok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa nároku 1 a tripeptid zvolený zo skupiny zahrňujúcej Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro a ich zmesi.

5. Fermentovaný mliečny výrobok podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že ďalej obsahuje kyselinu DL-mliečnu, kde tento výrobok obsahuje 30 až 50 µg uvedeného tripeptidu v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na 0,01 g uvedenej kyseliny DL-mliečnej.

6. Fermentovaný mliečny výrobok podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že baktérie produkujúce kyselinu mliečnu podľa nároku 1 sú živé.

7. Fermentovaný mliečny výrobok podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že uvedený fermentovaný mliečny výrobok je zvolený zo skupiny zahrňujúcej jogurt, zakysané mliečne nápoje, syr, upravené potraviny obsahujúce

fermentované kyslé mlieko a zdraviu prospešné potraviny obsahujúce fermentované kyslé mlieko.

8. Spôsob výroby fermentovaného mliečneho výrobku podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje fermentáciu média baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu podľa nároku 1, ktorá obsahuje výživnú látku zvolenú zo skupiny zahrňujúcej peptid, proteín a ich zmesi obsahujúce sekvencie Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro.

9. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým**, že uvedená výživná látka je zvolená zo skupiny zahrňujúcej živočíšne mlieko, mliečny kazeín, kukuricu, kukuričný proteín, pšenicu, pšeničný proteín, sójové bôby, sójové mlieko, odtučnené sójové bôby, sójový proteín a ich zmesi.

10. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým**, že fermentácia sa vykonáva 6 až 60 hodín pri teplote 25 až 50 °C.

11. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým**, že fermentácia sa vykonáva za podmienok, kedy množstvo tripeptidov Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro vytvorené vo vytvorenom fermentovanom mlieku je 60 µg v zmysle obsahu Val-Pro-Pro na ml.

Obr. 1

