

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.10.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.11.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19992360**

(33) Země priority: **FI**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**
(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/FI00/00942**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/32905**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1431

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 21/02

A 61 K 38/06

/(C 07 K 5/08)

(71) Přihlašovatel:
VALIO LTD, Helsinky, FI;

(72) Původce:
Tossavainen Olli, Espoo, FI;
Suomalainen Tarja, Helsinky, FI;
Sahlstein Janne, Helsinky, FI;
Mäyrä-Mäkinen Annika, Helsinky, FI;

(74) Zástupce:
**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob výroby produktu obsahujícího
antihypertenzivní tripeptidy**

(57) Anotace:

Způsob přípravy produktu obsahujícího antihypertenzivní
peptidy fermentací kasein obsahující výchozí látky bakteriemi
mléčného kvašení. Použití získaného funkčního produktu jako
takového nebo jako složky nebo doplňku poživatelých látek.

Způsob výroby produktu obsahujícího antihypertenzivní tripeptidy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy produktu obsahujícího antihypertenzivní tripeptidy. Vynález se týká získaného produktu, jeho použití jako takového nebo jako složky či doplňku požitelných látek.

Dosavadní stav techniky

V současnosti jsou kardiovaskulární onemocnění zahrnuta mezi nejběžnější onemocnění ve vyvinutých zemích a jejich výskyt bude stárnutím populace dále stoupat. Vysoký krevní tlak značně přispívá k vývoji těchto onemocnění. Léčba hypertenze je jedním z nejdůležitějších zaměření s ohledem jak na prevenci tak na efektivní léčbu.

Při sledování krevního tlaku na úrovni buněk má hlavní funkci konvertující enzym angiotensin I, ACE. Enzym ACE způsobuje jednak přeměnu angiotensinu I na angiotensin II, který je látkou silně zvyšující krevní tlak zúžením cév a také inaktivuje bradykinin, který má naopak vasodilatační efekt. Obě funkce enzymu vedou ke zvyšování krevního tlaku. Inhibitory ACE zabraňují tomuto efektu a následkem toho fungují jako antihypertenzivní činidla. Mnoho farmaceutických činidel používaných v léčbě hypertenze jsou ACE inhibitory. Jeden z nich je captoril (D-2-methyl-3-merkaptopropanoyl-L-prolin), který je komerčně dostupný ve Finsku pod názvy Capoten (produkt Bristol-Myers Squibb) a Captopril (produkt Merc Generics).

Ostatní způsoby snižování krevního tlaku jsou také žádoucí, jako alternativa k lékům nebo i jako samostatně působící. Zahrnují například redukci obezity, zvýšení cvičební

aktivity a konzumaci diet s nízkým obsahem sodíku. Jedna z nejnovějších cest je použití funkčních potravin jako podílu normální diety, která je konzumenty označena jako přijatelná alternativa.

Bylo uvedeno, že kvašené mléčné výrobky obsahují peptidy vykazující antihypertenzivní efekt. Předpokládá se, že peptidy jsou produkovány mléčnými výrobky jako výsledek hydrolýzy mléčné bílkoviny způsobené bakteriemi mléčného kvašení a částečně její extracelulární proteinázou. Čištění a charakterizace proteinázy odvozené od mikroorganismu *Lactobacillus helveticus* CP790 je popsáno v *J. Biochem.* 114 (1993) 740, Yamamoto a kol. V této publikaci je podána zpráva o studii, kde byl α_{s1} - a β -kasein hydrolyzován touto proteinázou a získané peptidy byly studovány pro jejich ACE-inhibiční efekt (*J Dairy Sci* 77 (1994) 917). Celkem bylo studováno 25 peptidů, jejich molekulové rozměry a efekty byly značně rozdílné. Největší aktivitu vykazovaly tři peptidy získané z β -kaseinu, obsahující 8, 18 a 27 aminokyselin. Studie obsahuje porovnání ACE-aktivity mléka fermentovaného kmenem *Lactobacillus helveticus* CP790 a jeho varianty CP791 s narušenou proteinázovou aktivitou, kde první byl nalezen účinným u spontánně hypertenzních krys SHR, ne u běžných krys a druhý nevykazoval žádnou aktivitu.

Použití zákvasu obsahujícího *Lactobacillus helveticus* a *Saccharomyces cerevisiae* pro přípravu dvou ACE inhibitorů je popsáno v *J Dairy Sci* 78 (1995) 777-783, Nakamura a kol. Netučné mléko bylo fermentováno těmito zákvasy, poté byly inhibitory ACE chromatograficky čištěny a analyzovány. Aktivními složkami byly oba tripeptidy, Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro. V publikaci není popsán jejich antihypertenzivní efekt in vivo ani příprava kvašeného mléka ze zákvasu, ale jak je v této publikaci uvedeno, bude to předmětem dalšího výzkumu.

US Patent 5 449 661 (Nakumura a kol.) uvedl ve známost přípravu peptidu obsahujícího tripeptidovou sekvenci Val-Pro-Pro a jeho použití pro snižování krevního tlaku. Peptid byl připraven fermentací odtučněného mléka poháněnou kmenem *Lactobacillus helveticus* JCM-1004, poté byl peptid chromatograficky čištěn a lyofilizován.

V mezinárodní žádosti o udělení patentu WO99/16862 (Yamamoto a kol.) je popsán kmen *Lactobacillus helveticus* CM4, FERM BP-6060, který je schopen produkovat velké množství tripeptidu Val-Pro-Pro a/nebo Ile-Pro-Pro a vykazuje extracelulární proteinázovou aktivitu. V této publikaci je také popsána fermentace mléčných produktů obsahující tyto tripeptidy a bakterie a způsob jejich přípravy fermentací produktů obsahujících tripeptidové sekvence těmito bakteriemi.

K produktům připravených fermentací bakteriemi mléčného kvašení, obsahujících antihypertenzivní tripeptidy jsou vztaženy dvě nevýhody. Hlavním produktem kvašení je kyselina mléčná, která je produkována účinnými fermentačními reakcemi. Jak je zřejmé z názvu samotného, kyselina mléčná je kyselá a dává hořkou příchuť produktům obsahujícím antihypertenzivní tripeptidy, kromě toho mnoho konzumentů nachází vysokou kyselost a nízké pH nepříjemným. Velké množství jednomocných kovů, obzvláště sodných iontů je přítomno v produktech obsahujících antihypertenzivní peptidy připravených fermentací. U těchto iontů je známo, že zvyšují krevní tlak a z čehož vyplývá, že působí proti požadovaným antihypertenzivním peptidům.

V předešlých publikacích byly zveřejněny způsoby čištění peptidů, produkováných fermentací. Tyto způsoby částečně dovolují vyvarovat se výše zmíněným nevýhodám, zatímco je získán koncentrovaný produkt. Tyto způsoby čištění v předešlých publikacích poskytují čisté produkty, které jsou

vhodné pro analýzy a zkoušky aktivity. Tyto způsoby jsou několika krokové a obsahují různé chromatografické čistící metody a nejsou vhodné pro výrobu ve velkém objemu.

Proto je nutné vytvářet funkční produkty, které mají antihypertenzevní efekt a které budou konzumenti shledávat příjemným a dobře známým a které mohou být snadno použity jako součást normální diety. Je důležité, aby tyto produkty neobsahovaly nepříjemné nebo škodlivé složky a aby byly snadno produkovatelné v průmyslovém měřítku.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález zahrnuje produkty o vysokém obsahu antihypertenzevních peptidů, které vykazují antihypertenzevní efekt.

Produkty předkládaného vynálezu, jednak obsahující vysoký obsah antihypertenzevních peptidů mají také výhodný obsah solí, neboť obsah škodlivých jednomocných kationtů je nízký a obsah prospěšných dvojmocných kationtů je vysoký ve srovnání se známými produkty tohoto typu.

Předkládaný vynález zahrnuje způsob pro přípravu těchto produktů. Tento způsob je jednoduchý a snadný pro provedení a vhodný pro výrobu v průmyslovém měřítku.

Předkládaný vynález zahrnuje produkt pro použití jako antihypertenzevní činidlo nebo pro výrobu požitelných funkčních pokrmů nebo farmaceutik.

Předkládaný vynález zahrnuje použití perorálně přijímaných produktů, jako jsou funkční pokrmy nebo farmaceutika, které obsahují výše popsané produkty jako jednu z aktivních složek.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález zahrnuje nové způsoby pro přípravu těchto produktů založených na nových vynálezeckých kombinacích: preparát obsahující antihypertenzivní peptidy je produkován fermentací, poté je koncentrován a složení je výsledně upraveno nanofiltrací. Kombinace podle předkládaného vynálezu zahrnuje znamenité možnosti v použití výchozích látek různých typů a modifikaci složení konečného produktu na požadovaný typ, který bude popsán podrobněji dále.

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy produktu obsahujícího antihypertenzivní peptidy. Tento způsob je charakterizován složením fermentačního kroku výchozí sloučeniny, obsahující kasein, bakteriemi mléčného kvašení a filtrací získaného peptidy obsahujícího fermentačního produktu.

Předkládaný vynález se také týká produktů obsahujících antihypertenzivní peptidy, které jsou charakterizovány vysokým obsahem antihypertenzivních peptidů a jsou připraveny způsobem, kde je kasein obsahující výchozí látka fermentována bakteriemi mléčného kvašení a získaný peptid obsahující fermentační produkt je filtrován.

Předkládaný vynález se také týká použití výše popsaného produktu jako antihypertenzivního činidla.

Předkládaný vynález se dále týká použití výše popsaného produktu ve výrobě požitelných látek.

Předkládaný vynález se dále týká požitelných produktů obsahujících výše popsané koncentrované produkty s vysokým obsahem peptidů a obvyklých složek těchto produktů.

V prvním kroku způsobu výroby podle předkládaného vynálezu je fermentací produkován preparát obsahující antihypertenzivní peptidy. Pro fermentaci je jako použitelná výchozí látka jakákoliv látka, obsahující požadované antihypertenzivní peptidy jako část jejich vlastní peptidové nebo proteinové sekvence. Mléčný protein, zejména kasein, je výhodně použit jako takový nebo ve formě různých úprav. Vhodný výchozí materiál také zahrnuje různé kasein obsahující mléčné produkty, jako jsou netučné mléko, nebo mléko s různým obsahem tuku, nebo ve formě odpovídajícího mléčného prášku a fermentovaných mléčných produktů, jako jsou kyselé mléko, podmásli, jogurt, sražené mléko a nedozrálý sýr atd.

Fermentace nemůže být provedena bez bakterií mléčného kvašení, které jsou schopné produkovat antihypertenzivní tripeptidy z výchozího materiálu. Vhodné bakterie mléčného kvašení byly nalezeny mezi odrůdou druhu např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. *Laktobacillus helveticus* je nejvíce proteolytická z bakterií mléčného kvašení a je proto považována za obzvláště vhodnou pro tento účel. Výhodný kmen *Laktobacillus helveticus* je *L. helveticus* LBK-16H. Bakterie mléčného kvašení byly použity jako čisté kultury nebo jako smíšené kultury, použité samostatně nebo s obvyklými a komerčně dostupnými zákvasy. Bakterie mléčného kvašení může být také použita s dalšími mikroorganismy. Pokud jde o kombinaci mikrobů, vhodnou kombinací jsou vybrané podle efektu, jako je nejlepší možná příchutí dosažená v konečném produktu a zamezení nebezpečí kontaminace.

Podmínky fermentace byly zvoleny podle požadavků použitého kmene při fermentaci jako je dostačující množství antihypertenzivních peptidů vzniklých k poskytnutí požadovaného efektu. Výběr vhodných podmínek, jako je teplota,

pH a provzdušňování je součástí znalostí odborníků. Teplota může být například 30 až 45 °C.

Fermentace pokračuje tak dlouho, dokud nevznikne požadované množství antihypertenzivních peptidů. Délka fermentace je 20 až 30 hodin, výhodně 22 až 24 hodin.

Při fermentaci vzniká směs různých peptidů. Pokud trvá fermentace dostatečně dlouho, pak jsou získány hlavně relativně malé di- a tripeptidy jako jsou Val-Pro-Pro (VPP) a Ile-Pro-Pro (IPP).

Po fermentaci je buněčná suspenze regenerována. Regenerace může být použita také v dalším kroku, například pro separaci nebo koncentraci peptidů. Buněčná suspenze může být také koncentrována, například odpařením za sníženého tlaku, nebo sušením, ať již částečně nebo kompletně, jako je roztírání po desce, sušení a konečné rozmělnění na suchý prášek.

V některých případech, může být vhodné fermentovaný produkt předčistit, například odstranit kasein nebo všechny mléčné proteiny nanofiltrací. Způsob vhodný pro přečištění je známý a zahrnuje například různé srážecí a filtrační metody. Jedna použitelná metoda zahrnuje úpravu pH fermentačního produktu na oblast, ve které se kasein vysráží, například při pH 4,6 a teplotě kolem 37 °C. Poté je kasein oddělen separátorem tvarohu, separačními síty, dekantací nebo použitím jiné metody. Druhá metoda zahrnuje ultrafiltraci fermentačního produktu při pH 3 až 3,5, při kterém jsou všechny proteiny uchovány v membráně a získaný parmeát je blízký bezbílkovinné syrovátce. Srážení, které produkuje blízkou bezbílkovinnou nebo peptidy obsahující syrovátku je dosaženo například přidávkou CaCl_2 , zahřátím nebo přidáním kyseliny. Pokud je nezbytné, je kaseinový prášek odstraněn centrifugací. Ostatní

substance jako je laktoza, může být také odstraněna nanofiltrací, například enzymatickou hydrolýzou nebo fermentací.

Fermentační produkt, který může být předběžně zpracován vhodným způsobem, jako je syrovátka získána výše, je poté filtrován. Konvenční NF membrána, jako je Nanomax-50 (Millipore) nebo Desal 5 (Desal Inc., USA) může být použita jako nanofiltrační membrána. Podmínky byly vybrány k uspokojení požadavků a instrukcí výrobců membrán. Výběr nanofiltrační membrány a podmínek přispívá značně ke složení výsledné peptidové frakce, především ke složení solí a cukrů.

Podle předkládaného vynálezu je nanofiltrace prováděna pro požadovaný obsah sušiny nebo na poměr objemových koncentrací, který je obvykle nejvýše možný. Obsah sušiny je řádově mezi 20 až 40 % (objemově) a poměr objemových koncentrací je mezi 5 až 20. Koncentrát syrovátky může být zředěn vodou, kde je mnoho solí a mléčná kyselina odstraněna z koncentráту nanofiltrací. Toto je jednoduchá a efektivní cesta úpravy množství solí v koncentráту na požadovanou úroveň.

Malé peptidy, jako jsou tripeptidy IPP a VPP s okolo 350 D (molekulární váha), vzniklé fermentací a vykazující efekt na krevní tlak, jsou kompletně zachyceny nanofiltrační membránou.

Způsob podle předkládaného vynálezu také umožňuje kompletní odstranění laktozy: předchází nanofiltračnímu kroku, laktoza může být enzymaticky degradována, přičemž je hlavní část monosacharidů odstraněna. Při nanofiltraci, zahrnuté do předkládaného vynálezu, prostoupí kyselina mléčná, malé molekuly obsahující dusík (močovina) a jednovazné kovy membránou. Obsah peptidů v produktu vzrůstá ve smyslu nanofiltrace. Následkem koncentrace vzrůstá obsah dvojevazných iontů, zvláště požadovaných vápennatých a hořečných iontů,

zatímco relativní poměr jednovazných iontů, jako jsou sodné, draselné a chloridové ionty klesají. Zvláště sodné ionty vykazují významný efekt na rovnováhu tekutin a na krevní tlak v lidském těle, a tím snížení množství těchto škodlivých iontů může být považováno za značnou výhodu. Vápennaté a hořečnaté ionty, jak je známo, přispívají ke snižování krevního tlaku a vysoký obsah těchto iontů je značně žádoucí.

Tabulka 1 ukazuje složky preparátu jak vznikají ve fermentačním kroku procesu podle předkládaného vynálezu a jak jsou zachovány v nanofiltračním kroku. Složení je reprezentováno prostřednictvím příkladů k ilustraci vynálezu a je produkováno fermentací odtučněného mléka kmenem *Lactobacillus helveticus*. Jak je ukázáno výše, také ostatní produkty mohou být použity jako výchozí materiály. Kromě toho, fermentační podmínky, nanofiltrace, ostatní přečištění a další úprava, pokud je požadována, přispívá k výslednému složení. Složení a výsledky nanofiltrace konečného produktu mohou být odlišné od zde prezentovaných.

Tabulka 1: *Průběh nanofiltrace složek syrovátky obsahující antihypertenzivní peptidy*

Membrána: Nanomax 50; podmínky: 40 °C, 30×10^5 Pa, poměr objemových koncentrací $C = 9$, pH = 4,6

	Molekulová váha D	Retence (%)
IPP	361,4	100
VPP	347,4	100
mléčná kyselina	90,1	24
Ca	40,1	68
Mg	24,3	72
K	39,1	11
Na	23,0	10
Cl	35,5	9
PO ₄	95,0	47
močovina	60,1	10
laktoza	342,3	63

Produkt koncentrovaný na antihypertenzivní peptidy a získaný způsobem podle předkládaného vynálezu může být použit sám o sobě jako antihypertenzivní činidlo. Produkt může být sušen a použit ve formě prášku nebo lyofilizovaného přípravku. Podle předkládaného vynálezu může být produkt výhodně použit při výrobě funkčních potravin nebo dalších produktů.

V předkládaném dokumentu, je termín potrava používán v širokém významu, zahrnující požitelné produkty, které mohou být v pevné, v gelovité nebo kapalně formě a zahrnuje jak hotové potraviny tak i produkty, kde je předmět vynálezu přidán v souvislosti se spotřebou, jako aditivní nebo podstatná složka produktu. Například, potraviny mohou být produktem mléčného průmyslu, masného průmyslu, potravinářského průmyslu, průmyslu vyrábějícího nápoje a cukrovarnického průmyslu. Typické produkty zahrnují mléčné produkty, jako jsou

jogurty, sražené mléko, měkký tvaroh, kvašené mléko, podmásli a další fermentované mléčné nápoje, nezralý sýr, zralý sýr, lehká plniva atd. Nápoje, jako jsou syrovátkové nápoje, ovocné nápoje a piva, tvoří další významnou skupinu.

Produkt získaný podle předkládaného vynálezu je použit v množství postačujícím k poskytnutí požadovaného, antihypertenzivního efektu. Použité množství podstatně závisí na koncentračním stupni syrovátky, který je například 0,1 až 30 % (hmotnostně), výhodněji 5 až 15 % (hmotnostně), počítaný z váhy konečného produktu.

Způsob výroby podle předkládaného vynálezu, obzvláště pak nanofiltrací krok poskytuje základ pro přípravu produktu požadovaného typu a je možné redukovat obsah složek, které mají nepříznivý efekt na chuť nebo odstranit tyto složky úplně a následkem toho uchovat nebo vylepšit chuť produktu.

Produkt obsahující antihypertenzivní peptidy může být přidán do potravin během výrobního procesu nebo do již hotových potravin. Tyto produkty obsahují výše popsané koncentrované produkty obsahující antihypertenzivní peptidy spolu s ostatními složkami které jsou obvyklé v potravinách a jejich chuť a použití úplně odpovídá konvenčním produktům.

Tento dvojstupňový proces podle předkládaného vynálezu poskytuje produkty, obsahující značně vysoký obsah antihypertenzivních peptidů, pouze pokud jsou produkty připravovány fermentací. Nezávisle na obsahu peptidů, dovoluje tento proces snadno upravovat obsah solí a jejich vzájemné poměry na požadovanou úroveň. Především je možné zvýšit obsah požadovaných dvojmocných iontů a redukovat obsah škodlivých jednomocných iontů. Proces je jednoduchý a laciný, což je vhodné pro výrobu ve velkém měřítku a tím se po této stránce liší od dříve používaných procesů.

Proteinová frakce získaná oddělením kaseinu nebo celkových proteinů může být použita stejně tak při výrobě antihypertenzivních peptidů, jako jsou například výše popsané mléčné produkty. Způsob výroby je celkově vysoce ekonomický.

Dále je předkládaný vynález popsán podrobněji, ve smyslu uvedení příkladů. Tyto příklady jsou prezentovány pro ilustraci předkládaného vynálezu a v žádném případě neomezují jeho dosah.

Příklady provedení vynálezu

Srovnávací příklad 1: Antihypertenzivní efekt produktu předkládaného vynálezu

ACE inhibiční aktivita byla stanovena pro peptidy IPP a VPP a pro známý ACE inhibitor, lisinopril, na základě inhibiční konstanty (Holmquist B., Bunning P., Riordan J. F. Kontinuální spektrofotometrická analýza konvertovacího enzymu angiotensinu, *Analytical Biochemistry* 95 (1979) 540-548). Čím nižší číslo, tím je účinnější ACE inhibitor. Výsledky byly následující: IPP $4,4 \times 10^{-6}$, VPP $1,8 \times 10^{-5}$ a lisinipril $7,5 \times 10^{-9}$. Jak bylo shledáno, IPP a VPP vykazovaly jasnou ACE inhibiční aktivitu.

Antihypertenzivní efekt produktu podle předkládaného vynálezu byl prostudován od počátku, od kyselého mléčného produktu předkládaného vynálezu popsaného v Příkladu 5 k samovolnému hypertenzivnímu SHR u krys. Kontroly byly provedeny na třech odpovídajících skupinách krys, kterým byla podána voda, mléko a komerčně dostupné kyselé mléko. Jako srovnávací skupina byla použita stejná skupina krys, které byl

podán Japanease Calpis kyselý mléčný produkt (Calpis Food Industry Company Ltd.) Krevní tlak všech krys byl měřen v týdenních intervalech po dobu třinácti týdnů. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 1 jako vzrůst systolického tlaku v závislosti na čase. Jak je zřejmé z výsledku, produkt předkládaného vynálezu je schopen značně předcházet zvýšení hladiny krevního tlaku, jak je srovnáno s kontrolní skupinou a srovnávací skupinou.

Srovnávací příklad 2: Antihipertenzivní efekt produktu předkládaného vynálezu

Antihipertenzivní efekt předkládaného vynálezu může být také studován na lidských bytostech. V předběžných testech byla testovací skupina 12 nahodile vybraných osob, které denně přijmuly 1,5 dl produktu předkládaného vynálezu popsáného v Příkladu 5 a kontrolní skupina se skládala z 11 nahodile vybraných osob, které denně přijmuly stejné množství komerčně dostupného odtučněného kyselého mléka. Krevní tlak byl měřen v týdenních intervalech po dobu osmi týdnů. Krevní tlak devíti osob v testovací skupině byl zřejmě redukován: systolický tlak okolo 13 % v průměru a diastolický okolo 12 % v průměru, u jedné osoby byla pozorována menší redukce tlaku, okolo 5 % a u tří osob nebyly pozorovány žádné změny. V kontrolní skupině, bylo u dvou osob pozorováno zřejmé snížení krevního tlaku, kdežto u sedmi osob nebyly pozorovány žádné změny. Výsledky dvou osob nebyly zahrnuty. Výsledky předběžných testů jasně ukazovaly, že produkt předkládaného vynálezu je schopen značně předcházet zvýšení hladiny krevního tlaku u lidských bytostí.

Příklad 1: Příprava produktu obsahujícího antihypertenzevní peptidy

Kmen *Lactobacillus helveticus* LBK 16-H byl kultivován v živné půdě při teplotě 37 °C po dobu 24 h a byl inokulován do rekonstituovaného mléka (10 %, objemových) pro přípravu inokulua. Po dvou kultivačních cyklech bylo inokulum (15 %, objemových) inokulováno do fermentačního prostředí, které bylo tvořeno 9 až 10 % (objemových) mléka z odtučněného mléčného prášku a které bylo sterilizováno při 100 °C 10 minut. Fermentace byla provedena při 37 °C po dobu 22 až 24 hodin, za silného míchání. Produkt byl poté sušen a rozemlet nebo převeden jako takový na nanofiltraci zpráckování.

U fermentovaného kyselého mléka získaného v množství (viz výše) bylo upraveno pH na 4,6 hydroxidem draselným a kasein byl odstraněn na nakloněné přepážce. Zbytkový kaseinový prášek byl odstraněn centrifugací. GLL koncentrovaná laktáza (Biocon Ltd., Japan) byla přidána k syrovátce, která byla hydrolyzována při 5 °C po dobu 24 hodin, pro degradaci laktozy na monosacharidy. Získané množství syrovátky bylo předběžně upraveno nanofiltrací skrz Nanomax-50 membránu (Millipore).

Filtrace byla provedena při 10 °C a tlaku 30×10^{-5} Pa. Surovátka byla filtrována tak, aby poměr objemových koncentrací byl roven 9. Složení získaného koncentrátu a suchého prášku z něho získaného je podáno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složení koncentrátu a suchého prášku obsahujícího antihypertenzevní peptidy

Peptidový koncentrát		Suchý prášek
Sušina	30,0	94,5
Popel	3,69	13,3
Na (mg/kg)	130	470
K (mg/kg)	1600	5600
Ca (mg/kg)	10000	36000
Mg (mg/kg)	1700	6300
Cl (mg/kg)	550	2000
P (mg/kg)	6700	24500
IPP (mg/l)	510	2500
VPP (mg/l)	540	2700

Odstraněný kasein byl neutralizován na směs kaseinu s kovem a vysušen.

Příklad 2: Příprava produktu obsahujícího antihypertenzivní peptidy

Fermentace popsaná v Příkladu 1 byla opakována za použití (a) mléka obsahujícího tuk a (b) podmáslí místo odtučněného mléka. pH produktu z Příkladu 2 (b) bylo upraveno na pH 4,5 a kasein byl odstraněn koagulačním odstředivkou. K syrovátce byla přidána laktáza a prášek byl odstraněn. Syrovátka byla poté nanofiltrována skrz NF membránu (Desal-5, Desal Inc.), odpařena za sníženého tlaku a sušena. Složení získaného nanofiltračního koncentrátu bylo velmi podobné složení, které je uvedeno v Tabulce 2. Odstraněný kasein obsahoval velké množství syrovátky, ve kterém byl obsah antihypertenzivních peptidů stejný jako ve fermentovaném kyselém mléce. Kasein byl použit jako takový v měkkém tvarohu, do kterého byly antihypertenzivní peptidy zavedeny v tomto množství.

Příklad 3: Příprava produktu obsahujícího antihypertenzivní peptidy

Kmen *Lactobacillus helveticus* LBK 16-H byl kultivován v MRS živné půdě při 37 °C po dobu 24 hodin pro přípravu inokulua jak je popsáno v Příkladu 1. Inokulum bylo inokulováno do fermentačním prostředí, které se skládalo z vodného roztoku kaseinu, sraženého kyselinou (2,8 %, objemových) a glukozou (2,5 %, objemových). Kasein byl rozpuštěn zvýšením pH na 6,7 roztokem 10% KOH (objemově). Kultivace byla provedena při 37 °C po dobu 24 hodin. Touto cestou byly produkovány antihypertenzivní peptidy (VPP, IPP) v množství odpovídajícím produkci za použití fermentovaného mléka, avšak zde je možno snadněji oddělit peptidy z kaseinového roztoku než z mléka. pH fermentované živné půdy bylo zvýšeno na pH = 4,6 roztokem hydroxidu draselného při teplotě 37 °C, kdy se kasein vysráží. Kasein byl oddělen koagulační odstředivkou a získaná syrovátka byla regenerována. Syrovátka obsahovala peptidy, kyselinu mléčnou a soli, ale ne laktozu. Hlavní část kyseliny mléčné, jednovazných iontů a glukozy v syrovátce bylo odstraněno nanofiltrací. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na koncentrát nebo sušen na hodně koncentrovaný prášek, čímž byl získán konzervovaný preparát, obsahující antihypertenzivní peptidy.

Příklad 4: Příprava produktu obsahujícího antihypertenzivní peptidy

Fermentace byla opakována za použití (a) a směsi několika kmenů, tj. *L. helveticus* LB161, *L. helveticus* LBK-16 H a *L. helveticus* LB230, (b) a směsi kmenů *L. helveticus* LBK-16 H, *L. rhamnosus* LC705 a (c) směsi kmenů *L. helveticus* LBK-16 H a *Streptococcus thermophilus* T101. Všechny tyto kmeny byly dostupné ze sbírky mikroorganismů Valio Oy. Použité kultivační prostředí obsahovalo 9 % (objemových) mléka a bylo

sterilizováno při 100 °C po dobu 15 minut. Pro přípravu inokulua byly kultivovány kmeny *L. helveticus* a *L. rhamnosus* LC705 v MRS živné půdě po dobu 24 hodin, při 37 °C, z čehož bylo 1 % (objemově) převedeno do mléka. Kmen *thermophilus* T101 byl kultivován v LM17 živné půdě po dobu 18 h a při 37 °C, odkud bylo inokulum převedeno do mléka. První kultivace byla provedena kultivací všech kmenů odděleně v mléce, inkubací při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro druhou kultivaci bylo 1 % (objemově) kmenů z každé směsi pipetováno do mléka, poté byla společná kultivace provedena při 37 °C po dobu 24 hodin. Třetí kultivace, 5 až 10 % (objemově) dříve získané společné kultivace bylo pipetováno do mléka a inkubováno při 37 °C po dobu 24 hodin. Množství VPP a IPP produkovaných kmeny *L. helveticus* LBK-16 H a rozdílnými směsemi mikroorganismů a koncentrace některých bakterií jsou uvedeny v Tabulce 3. Žádné rozdíly mezi směsemi nebo kmenem LBK-16 H nebyly pozorovány. Ostatní kmeny nezasahovaly do proteolýzy.

Tabulka 3: IPP a VPP množství produkované směsemi mikroorganismů

Mikroorganismus (směs)	VPP mg/l	IPP mg/l	Koncentra ce cfu/ml
L161+LBK-16+LB230, 5 % (objemově)	13-14	6-7	
L161+LBK-16+LB230, 10 % (objemově)	13-14	6-7	
LBK16H+LC705, 5 % (objemově)	13-14	6-7	
LBK16H+LC705, 10 % (objemově)	13-14	6-7	
LBK16H+Str. T101, 10 % (objemově)	13-15	6-8	1×10^8
LBK16H (dno)	13-15	6-8	1×10^7

Příklad 5: Příprava fermentovaného mléčného produktu

Kyselé mléko obsahující antihypertenzivní peptidy bylo připraveno přidáním 3,5 % (objemově) peptidového koncentrátu získaného v Příkladu 3 ke komerčně dostupnému kyselému mléčnému produktu. Složení získaného produktu je uvedeno v Tabulce 4, která současně ukazuje složení komerčně dostupného kyselého mléčného produktu, AB kyselé mléko (Valio Oy) pro srovnání.

Tabulka 4: Složení produktu podle předkládaného vynálezu a komerčně dostupného fermentovaného mléčného produktu

	AB kyselé mléko	Biopep-produkt předkládaného vynálezu
Sušina (%)	9,0	9,8
Na (mg/kg)	390	380
K (mg/kg)	1700	1700
Ca (mg/kg)	1200	1510
Mg (mg/kg)	114	170
Cl (mg/kg)	1000	980
VPP (mg/l)	0	19
IPP (mg/l)	0	18

29.05.02

PV 2002-1431
40893

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob pro přípravu produktu obsahujícího antihypertenzivní peptidy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se fermentuje výchozí látka obsahující kasein bakteriemi mléčného kvašení a provede se nanofiltrace získaného, peptidy obsahujícího fermentačního produktu.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je výchozí látkou kasein.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že výchozí látkou je mléko nebo produkt založený na mléce.
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je směs bakterií mléčného kvašení nebo dalších mikroorganismů použita při fermentaci.
5. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je mikroorganismus *Lactobacillus helveticus* použit při fermentaci.
6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganismus je kmen *Lactobacillus helveticus* LBK-16H.
7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc zahrnuje odstranění kaseinu z fermentačních produktů předcházející nanofiltraci.
8. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc zahrnuje odstranění všech mléčných proteinů z fermentačních produktů předcházející nanofiltraci.
9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc zahrnuje odstranění laktozy z fermentačních produktů předcházející nanofiltraci.
10. Produkt obsahující antihypertenzivní peptidy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má vysoký obsah antihypertenzivních peptidů a je připraven procesem kde se

fermentuje kasein obsahující výchozí látka bakteriemi mléčného kvašení a kde je provedena nanofiltrace pro získání peptidu z fermentačního produktu.

11. Produkt podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se skládá ze směsi peptidů a krátkými řetězci.
12. Produkt podle nároku 10 nebo 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidy jsou di- nebo tri peptidy.
13. Produkt podle kteréhokoliv z nároků 10 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vysoký obsah tripeptidů, obzvláště Ile-Pro-Pro a/nebo Val-Pro-Pro.
14. Produkt podle kteréhokoliv z nároků 10 až 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vysoký obsah dvojmocných kationtů.
15. Produkt podle kteréhokoliv z nároků 10 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nízký obsah jednomocných kationtů.
16. Produkt podle kteréhokoliv z nároků 10 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vykazuje obsah sušiny 20 až 60 % objemových.
17. Produkt podle kteréhokoliv z nároků 10 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vysušen na prášek a vykazuje obsah sušiny přesahující 90 % objemových.
18. Použití produktu podle kteréhokoliv z nároků 10 až 16 jako antihypertenzivního činidla.
19. Použití produktu podle kteréhokoliv z nároků 10 až 17 při výrobě požitelných látek.
20. Použití produktu podle nároku 19 v mlékařském průmyslu, potravinářském průmyslu, masném průmyslu, cukrovarnickém průmyslu, v průmyslu výroby nápojů a v pekařství.
21. Požitelný produkt, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje produkt podle kteréhokoliv nároku 10 až 20.
22. Požitelný produkt podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že existuje ve fermentovaných mléčných produktech.

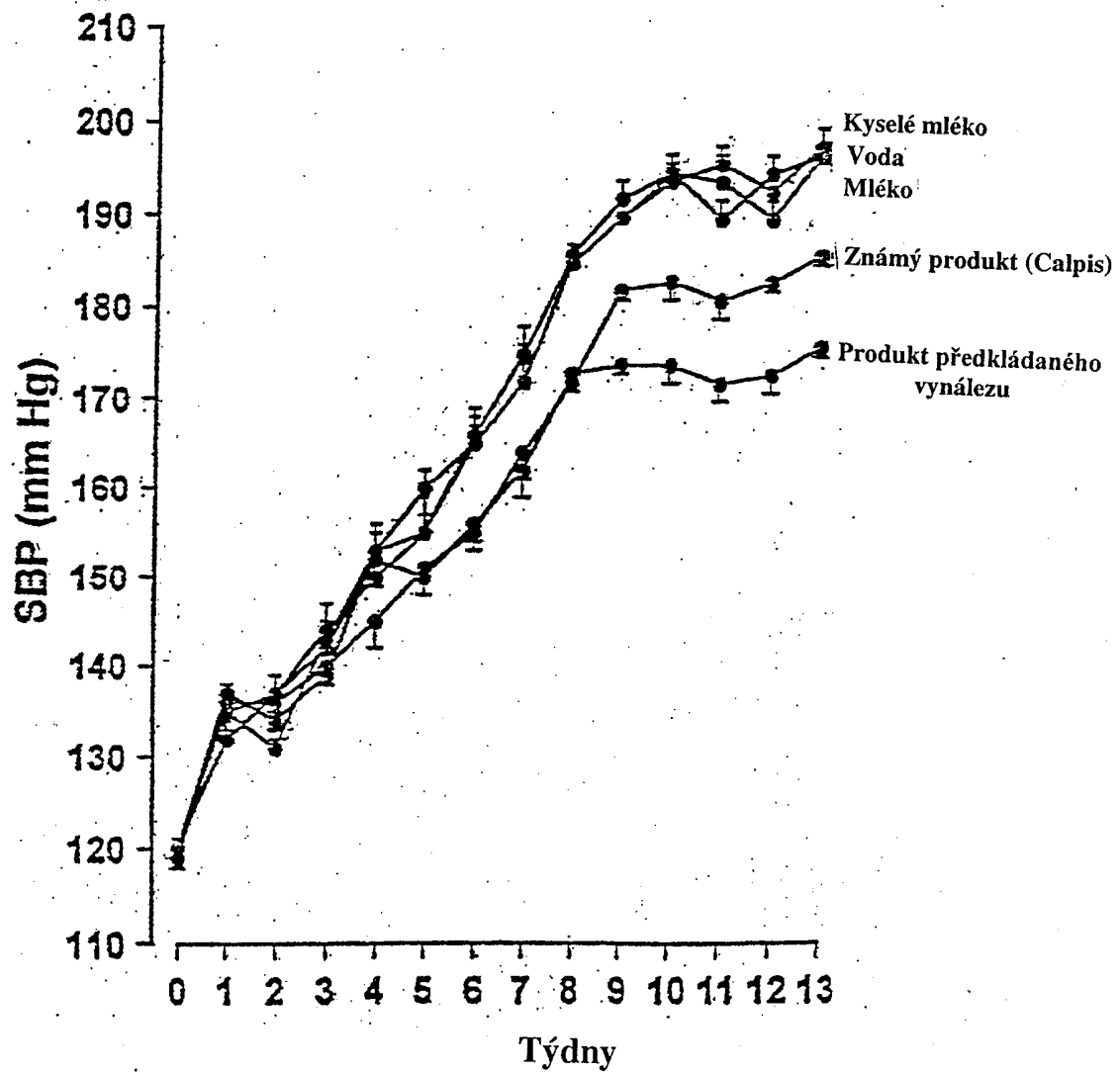
29.05.02

23. Požívatelný produkt podle nároku 21, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že existuje v nápojích, výhodněji v
syrovátkových nápojích, ovocných nápojích nebo pivě.

29.05.02

PV 2002-1431

40893



obr.
Figure 1