

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2013-28

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.01.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **23.07.2014**

(Věstník č. 30/2014)

C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A23L 2/02 (2006.01)
A23L 2/84 (2006.01)
A23L 1/105 (2006.01)
C12G 3/02 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, CZ

(72) Původce:
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov 1, CZ
RNDr. Jana Olšovská, Ph.D., Praha 5, CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, CZ
RNDr. Karel Kosař, CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Cejl 38, 602 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
Kmen bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2-108 a jeho použití při výrobě nealkoholických a nízkoalkoholických nápojů z ovocných a/nebo obilných substrátů

(57) Anotace:
Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-108, který fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu, melezitózu, sorbózu, manitol, sorbitol, N-acetylglukozamin, celobiózu, trehalózu a glukonát, za vzniku kyseliny mléčné nebo směsi kyseliny mléčné, kyseliny octové a etanolu, a nefermentuje rafinózu, arabinózu, xylózu a glycerol. Způsob výroby nealkoholických a nízkoalkoholických nápojů, při kterém se fermentuje ovocný a/nebo obilný substrát, který obsahuje alespoň jeden cukr ze skupiny glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, galaktóza, melezitóza, manitol, sorbitol, N-acetylglukozamin, celobióza, trehalóza, glukonát, přičemž fermentace probíhá kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-108, nebo jeho směsí s alespoň jedním jiným kmenem.

Kmen bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 a jeho použití při výrobě nealkoholických a nízkoalkoholických nápojů z ovocných a/nebo obilných substrátů

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108.

Vynález se dále týká použití tohoto kmene bakterií při výrobě nealkoholických a nízkoalkoholických nápojů z ovocných a/nebo obilných substrátů.

10

Dosavadní stav techniky

Nealkoholické nápoje se v současné době běžně získávají ředěním ovocných či zeleninových šťáv nebo sirupů pitnou vodou. Mohou se upravovat sycením oxidem uhličitým, pasterací, přidávkem cukrů a různých přísad (např. 15 kyseliny citronové, karamelu, přírodních aromat, výluhů bylin, vitamínů, minerálních látek, atd.).

Alkoholické nápoje, jako je např. pivo a cider, a případně i jejich nízkoalkoholické varianty, se pak běžně získávají kvašením ovocných a/nebo obilných substrátů prostřednictvím kvasinek druhů *Saccharomyces cerevisiae*, 20 *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces bayanus*.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je kmen *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108, což je kmen grampozitivní, heterofermentativní mezofilní nesporulující tyčinkovité bakterie, 25 který je charakteristický tím, že fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu, melezitózu, sorbózu, manitol, sorbitol, N-acetylglukozamin, celobiózu, trehalózu, a glukonát, avšak nefermentuje rafinózu, arabinózu, xylózu a glycerol, a dle použitého kultivačního média a podmínek fermentace je schopený produkovat kyselinu mléčnou nebo směs kyseliny mléčné, kyseliny 30 octové a etanolu.

Tento kmen, který se jako zástupce řádu *Lactobacillales* přirozeně vyskytuje v kvašených potravinách, jogurtech, nezpracovaném mléku, ve fermentovaném rostlinném materiálu, apod. se izoloval z kefirových zrn, což jsou, jak je popsáno např. v práci Withuhn a kol.: „Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation“, Int. Dairy J. 15: 383-389, 2005, symbiotické kultury bakterií mléčného kvašení, octových bakterií, kvasinek a vláknitých hub v bílkovinách, tukách a cukrech. Při izolaci kmene bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2-108 se naočkovalo 0,1 ml homogenátu kefirového zrna ve sterilní destilované vodě na Petriho misku obsahující MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar. Pro inhibici růstu konkurenčních kvasinek a hub přítomných v kefirovém zrně se do tohoto substrátu přidalo antibiotikum cykloheximid (známý také jako aktidion) v koncentraci 25 mg/l, a pro inhibici růstu konkurenčních gramnegativních bakterií β -fenyletanol v konečné koncentraci 0,3 objemových %. Kultivace následně probíhala anaerobně v mikrobiologickém inkubátoru při teplotě 28 °C (nejvhodnější teplota je cca 26 až 30 °C) po dobu 5 až 7 dní. Po nárůstu kultury bakterií na povrchu agaru se tato kultura přenesla sterilizovanou očkovací kličkou na novou Petriho misku s MRS agarem a rozočkovala se tzv. křížovým roztěrem, při kterém se ředí koncentrace bakterií na agaru. Tento postup se opakoval do doby, než kultura bakterií narostla do podoby viditelně oddělených kolonií. Následná izolace kmene bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2-108 se pak provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující MRS agar.

Izolovaný kmen byl poté charakterizován biochemickými testy a druhově-specifickou PCR. Kmen však nebylo možné blíže určit do žádného známého druhu rodu *Lactobacillus*, neboť genotypové i fenotypové určení je u některých mléčných bakterií značně problematické – viz např. Sedláček I.: „Taxonomie prokaryot“, Masarykova univerzita Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9. V dalších variantách je možné pro izolaci tohoto kmene bakterií využít také postup popsáný v publikaci Withuhn a kol.: „Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation“, Int. Dairy J. 15: 383-389, 2005, u kterého se jako izolační médium použije MRS agar obsahující etanol v koncentraci 30 g/l a antibiotikum

cykloheximid v koncentraci 5 g/l. Petriho misky se následně anaerobně inkubují po dobu 5 až 10 dní při teplotě 30 °C.

Kromě toho je možné použít i postup popsany v práci Simova a kol.: „Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them“, J.

- 5 Industrial Microbiol. Biotechnol. 28: 1-6, 2002, u kterého kde se použije MRS agar a Rogosa agar obsahující syrovátku, načež se naočkované Petriho misky inkubují 3 až 7 dní při teplotě 30 °C (pro izolaci mezofilních laktobacilů) a 37 °C (pro izolaci termofilních laktobacilů), v obou teplotních režimech aerobně a anaerobně.

- 10 Kmen je uložen ve Sbírce mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. – RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem RIBM 2-108.

- Tento kmen bakterií má překvapivé výhodné vlastnosti pro využití při přípravě nealkoholických, a nízkoalkoholických nápojů, neboť zkvašuje široké spektrum cukrů z různých zdrojů – např. ovoce, obilovin, případně jejich směsí v různém poměru, apod., a přitom současně vytváří příhodné množství kyselin, které snižují pH nápoje na hodnotu 3,40 až 3,75, což má příznivý vliv na jeho výslednou chuť, bez nutnosti jeho další úpravy a bez vzniku nežádoucích vůní nebo příchutí. Kromě toho vytváří také malé množství
- 15 20 alkoholu – v závislosti na použitém kultivačním substrátu a podmínkách kvašení cca 0,05 až 1 objemové %.

Kmen bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2-108 dobře přežívá v běžných tekutých substrátech (např. MRS, YPD, apod.), a to i ve zmrazeném stavu, takže je vhodný pro krátkodobé i dlouhodobé skladování.

- 25 Pro výrobu nápojů se pak tento kmen bakterií použije s výhodou zejména ve formě bakteriálního koncentráту, a to buď samostatně nebo ve směsi s jinými kmeny, s výhodou pak např. s kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107 v libovolném poměru.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava bakteriálního koncentrátu

Jako substrát pro pomnožení kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 se použije roztok obsahující alespoň jeden zdroj zkvasitelného cukru (glukózu a/nebo sacharózu) a zdroj proteinů, vitamínů a minerálů, které jsou pro růst mléčných bakterií vyžadovány. Běžně lze připravit např. bujón obsahující glukózu, bakteriologický pepton a kvasničný extrakt. Poté se tento kmen bakterií kultivuje při teplotě cca 26 až 30 °C, přičemž doba kultivace se stanoví v závislosti na požadovaném výsledném množství bakterií, resp. dle požadavků na zakvašení nápoje. Po ukončení kultivace je výhodné, pokud se vytvořená kultura bakterií pro odstranění kultivačního substrátu opakovaně centrifuguje a promývá sterilní vodou, neboť přítomnost složek substrátu v nápoji by mohla negativně ovlivnit jeho výsledné organoleptické vlastnosti.

Tímto způsobem se dle potřeby připraví koncentrát obsahující 100 milionů až 10 miliard, případně jiný vhodný počet, živých buněk kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108, který je možné bez dalšího použít přímo pro výrobu požadovaného nápoje. Přitom se pro fermentaci substrátu použije buď výhradně kmen bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 (který způsobuje silnou kyselou chuť nápoje) nebo jeho směs s jinými kmeny, s výhodou pak např. s kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107.

Příklad 2: Příprava nealkoholického jablečného nápoje s použitím kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108

Nealkoholický jablečný nápoj se připravil z 20 litrů jablečného moštu, do kterého se přidal zcentrifugovaný bakteriální koncentrát kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 připravený postupem podle příkladu 1 v koncentraci 3 g na 1 litr moštu. Následná fermentace probíhala v sudu z nerezové oceli při teplotě 21 °C po dobu 7 dní. Po této době se měřilo pH, prokvašení a obsah alkoholu, Kromě toho se dále provedlo jeho senzorické hodnocení degustační komisí. Vybrané parametry takto připraveného nápoje jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Měřený parametr	Hodnota
Alkohol (% obj.)	0,15
Prokvašení (%)	6,24
Extrakt (% hm.)	8,90
pH	3,12

V nápoji byla vedle jablečné vůně přítomná silná kyselá vůně i chuť. Celkový subjektivní dojem byl spíše podprůměrný.

- 5 Vzhledem k tomu, že takto připravený nápoj obsahoval 0,15 objemového % alkoholu, jedná se dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 115/2011 Sb. o nealkoholický nápoj.

Příklad 3: Příprava nealkoholického ovocného nápoje se sladovou příchutí s použitím kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 v kombinaci s kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107

- 15 Nápoj se připravil stejně jako v příkladu 2, s tím rozdílem, že místo jablečného moštu se použila směs jablečného moštu a pivovarské sladiny v poměru 1:1, do které se přidalo 1,5 g zcentrifugované kultury bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 a 1,5 g kultury *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107 na 1 litr směsi. Fermentace, plnění a sledování trvanlivosti probíhaly za stejných podmínek, jako v předcházejících příkladech provedení. Vybrané parametry hotového nápoje jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Měřený parametr	Hodnota
Alkohol (% obj.)	0,26
Prokvašení (%)	12,50
Extrakt (% hm.)	7,98

pH	3,28
Diacetyl (µg/l)	173
Pentandion (µg/l)	105

Nápoj byl vyhodnocen jako osvěžující, s příjemnou sladovou příchutí. Celkový subjektivní dojem byl nadprůměrný.

Nápoj byl stabilní i po 6 měsících skladování při teplotě 20 °C, kdy
5 nedošlo ke změně jeho zbarvení ani jeho senzorických vlastností.

Vzhledem k tomu, že takto připravený nápoj obsahoval 0,26 objemového % alkoholu, jedná se dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 115/2011 Sb. o nealkoholický nápoj.

10 Dle požadavků na prokvašení nápoje a/nebo výsledný objem alkoholu a/nebo dle vlastností a složení použitého substrátu se použije cca 1 až 5 g koncentráту kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 nebo jeho směsi s jiným kmenem na 1 litr substrátu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108, který fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu, melezitózu, sorbózu, manitol, sorbitol,
5 N-acetylglukozamin, celobiózu, trehalózu a glukonát, za vzniku kyseliny mléčné nebo směsi kyseliny mléčné, kyseliny octové a etanolu, a nefermentuje rafinózu, arabinózu, xylózu a glycerol.
2. Způsob výroby nealkoholických a nízkoalkoholických nápojů, při kterém se fermentuje ovocný a/nebo obilný substrát, který obsahuje alespoň
10 jeden cukr ze skupiny glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, galaktóza, melezitóza, sorbóza, manitol, sorbitol, N-acetylglukozamin, celobióza, trehalóza, glukonát, **vyznačující se tím**, že fermentace probíhá kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-108 podle nároku 1.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že fermentace probíhá
15 směsí alespoň dvou kmenů bakterií, z nichž jeden je kmen bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 podle nároku 1.
4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím, že** fermentace probíhá směsí kmene bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2-108 podle nároku 1 a kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107.