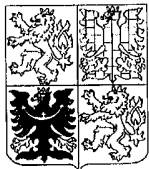


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.09.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/277949**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/JP98/00481**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/16862**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1082

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 1/20

A 23 C 9/123

//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:225)

(71) Přihlašovatel:

CALPIS CO., LTD., Tokyo, JP;

(72) Původce:

Yamamoto Naoyuki, Sagamihara-shi, JP;

Kawakami Natsue, Yokohama-shi, JP;

Ishida Yuu, Tokyo, JP;

Yada Hirokazu, Kawasaki-shi, JP;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Bakterie Lactobacillus helveticus produkující
kyselinu mléčnou s vysokou produktivitou
tripeptidu, fermentovaný mléčný výrobek a
způsob jeho výroby**

(57) Anotace:

Poskytuje se fermentovaný mléčný výrobek, který obsahuje bakterie produkující kyselinu mléčnou schopné vytvářet velké množství laktotripeptidu a velké množství účinné složky s hypotenzivní aktivitou a protistresovým účinkem, a který se může výhodně užívat ve formě potravin nebo nápojů. Bakterie Lactobacillus helveticus produkující kyselinu mléčnou má specifické bakteriologické vlastnosti, kteréžto bakterie, kultivují-li se v médiu živočišného mléka obsahujícím 9 % hmot. sušiny netučného mléka, produkují tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množství 60mg ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na ml média, a tyto bakterie projevují extracelulární proteázou aktivitu ne nižší než 400 U/OD₅₉₀. Kmen Lactobacillus helveticus CM4 je uložen v Národním institutu biologických věd a Agentuře pro humánní technologie průmyslových věd a technologie pod přírůstkovým číslem FERM BP-6060. Fermentovaný mléčný výrobek se získá fermentací živočišného mléka těmito bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou.

**BAKTERIE LACTOBACILLUS HELVETICUS PRODUKUJÍCÍ KYSELINU
MLÉČNOU S VYSOKOU PRODUKTIVITOU TRIPEPTIDU, FERMENTOVANÝ
MLÉČNÝ VÝROBEK A ZPŮSOB JEHO VÝROBY**

Oblast techniky

Tento vynález se týká nových bakterií *Lactobacillus helveticus* produkujících kyselinu mléčnou, které kultivují-li se v mediu živočišného mléka, mohou vytvářet určitý tripeptid s vysokou účinností, a které mají vysokou extracelulární proteázovou aktivitu, fermentovaného mléčného výrobku obsahujícího bakterie produkující kyselinu mléčnou a způsobu výroby tohoto výrobku.

Dosavadní stav techniky

Lactobacillus helveticus se pro mléčné výrobky dlouho používá k výrobě fermentovaného mléka jako iniciátor bakterií produkujících kyselinu mléčnou. *Lactobacillus helveticus* má vysokou proteolytickou aktivitu, a zejména jeho vysoká aktivita extracelulární proteázy hraje důležitou roli při fermentaci živočišného mléka. To znamená, že extracelulární proteáza tráví proteiny živočišného mléka za vytvoření různých fragmentů peptidů. Vytvořené peptidy jsou dále podrobeny působení peptidáz, aby se vytvořily peptidy o nižší molekulové hmotnosti. Je známo, že část peptidů vytvořených v mediu je díky působení proteázových enzymů přijata buňkami bakterií produkujících kyselinu mléčnou a využívána jako zdroj dusíku. Dále bylo publikováno, že některé z peptidů produkovaných v mediu mají inhibiční

aktivitu k angiotenzin konvertujícímu enzymu (ACE), který způsobuje hypertenzi /J. Dairy Sci., 78, 777-783 (1995)/.

Jako peptidy k inhibici aktivity ACE a potlačení zvýšení krevního tlaku byly publikovány různé účinné peptidy, jako například takové, které byly odvozeny od produktů degradace mléčných proteinů, sójových proteinů nebo proteinů rybího masa. Například Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro (zkrácené dále jako VPP a IPP, tyto peptidy jsou společně dále uvedeny jako laktotripeptidy) jsou známy jako peptidy s ACE inhibiční aktivitou přítomné v mléce fermentovaném *Lactobacillus helveticus*. Pokusy s použitím spontánně hypertenzních krys (SHR) potvrdily, že tyto laktotripeptidy mají silný hypotenzivní účinek /J. Dairy Sci., 78, 1253-1257 (1995)/.

Avšak fermentované mléko obsahující laktotripeptid produkovaný živočišným mlékem fermentovaným běžnými kmeny *Lactobacillus helveticus* se může těžko použít tak, jak je, neboť díky velkému množství kyseliny mléčné vytvořené v průběhu fermentace projevuje vysokou aciditu. Zředení fermentovaného mléka má za následek výrazné snížení obsahu laktotripeptidů.

Tudíž je žádoucí vyrobit fermentované mléko s vyšším obsahem laktotripeptidů v porovnání s obsahem kyseliny mléčné vytvořené ve fermentovaném mléce. Výrobky s funkcí laktotripeptidů by mohly být snadno připraveny a poskytnuty spotřebitelům v přijatelné formě k podávání přidáním malého množství takového fermentovaného mléka k různým potravinám a nápojům. Avšak žádné ze známých kmenů bakterií produkujících kyselinu mléčnou nevytvářejí laktotripeptid s vysokou účinností.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout nový kmen bakterií produkujících kyselinu mléčnou, který může vytvářet velké množství laktotripeptidu s vysokou účinností vzhledem k množství vytvořené kyseliny mléčné.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je poskytnout fermentovaný mléčný výrobek, který obsahuje laktotripeptid s takovými účinky, jako například hypotenzivním účinkem a očekávaným protistresovým účinkem, a kmen bakterií produkujících kyselinu mléčnou schopný vytvářet velké množství laktotripeptidu, a který se může přijatelně užívat v podobě potravin nebo nápojů, a způsob jeho přípravy.

Podle tohoto vynálezu se poskytují bakterie produkující kyselinu mléčnou *Lactobacillus helveticus* s těmito bakteriologickými vlastnostmi, přičemž kultivují-li se řečené bakterie v mediu živočišného mléka obsahujícího 9 % hmot. sušiny netučného mléka, vytvářejí tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množství ne menším než 60 µg ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na ml media, a řečené bakterie projevují aktivitu extracelulární proteázy ne menší než 400 U/OD₅₉₀:

morfologické vlastnosti

1. tvar buňky: tyčinka
2. pohyblivost: žádná
3. tvorba spor: žádná
4. gramovo barvení: pozitivní

fyziologické vlastnosti

1. produkce katalázy: negativní
2. produkce indolu: negativní

3. redukce nitrátu: negativní
4. aerobní růst: fakultativně anaerobní
5. tvorba DL-kyseliny mléčné z glukózy homolaktickou fermentací bez tvorby plynů
6. degradace uhlovodíků
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - mannóza: +
 - fruktóza: +
 - galaktóza: +
 - sacharóza: -
 - maltóza: -
 - xylóza: -
 - rhamnóza: -
 - cellobióza: -
 - trehalóza: -
 - melibióza: -
 - rafinóza: -
 - stachyóza: -
 - mannitol: -
 - sorbitol: -
 - eskulín: -
 - salicin: -.

Podle tohoto vynálezu se také poskytují bakterie produkující kyselinu mléčnou *Lactobacillus helveticus*, kde řečenými bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou je kmen *Lactobacillus helveticus* CM4 (uložen v Národním institutu biologických věd a Agentuře pro humánní technologie průmyslových věd a technologie 15.srpna 1997 pod číslem uložení FERM BP 6060).

Podle tohoto vynálezu se dále poskytují bakterie produkující kyselinu mléčnou *Lactobacillus helveticus*

s chromozomální DNA, kdy řečená chromozomální DNA při trávení restriktčními enzymy PstI a EcoRI poskytuje DNA fragment o velikosti 15 až 17 kb.

Podle tohoto vynálezu se také poskytuje fermentovaný mléčný výrobek, který obsahuje fermentované mléko obsahující výše zmíněné bakterie produkující kyselinu mléčnou a tripeptid zvolený ze skupiny zahrnující Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro a jejich směsi.

Podle tohoto vynálezu se také poskytuje způsob výroby fermentovaného mléčného výrobku, který zahrnuje fermentaci media obsahujícího výživnou látku zvolenou ze skupiny zahrnující peptid, protein a jejich směsi, zahrnující sekvence Val-Pro-pro a Ile-Pro-Pro, bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou.

Stručný popis k obrázkům

Obrázek 1 je fotografie ukazující způsobem elektroforézy na agarózovém gelu fragmenty chromozomální DNA různých kmenů *Lactobacillus helveticus* z příkladu 2.

Upřednostňovaná ztělesnění vynálezu

Bakterie produkující kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu patří k *Lactobacillus helveticus*, a vyznačují se tím, že bakterie produkující kyselinu mléčnou při kultivaci v mediu živočišného mléka obsahujícího 9 % hmot. sušiny netučného mléka vytvářejí tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množství ne menším než 60 µg, a výhodně ne menším než 70 µg ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na ml media, a projevují aktivitu extracelulární proteázy ne nižší než 400 U/OD₅₉₀, a

výhodně ne nižší než 430 U/OD₅₉₀. Produktivita definovaného laktotripeptidu je ukazatelem k rozlišení těchto bakterií produkujících kyselinu mléčnou od běžných bakterií produkujících kyselinu mléčnou *Lactobacillus helveticus*. Tímto ukazatelem se například definuje vlastnost těchto bakterií produkujících kyselinu mléčnou vytvářet při kultivaci v mediu živočišného mléka obsahujícím 9 % hmot. sušiny netučného mléka laktotripeptidy v množství ne menším než 60 µg ve smyslu obsahu VPP na ml media, která se nemohla uskutečnit běžnými bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou. Obvykle se snížením obsahu sušiny netučného mléka v mediu pro kultivaci vytvoří menší množství laktotripeptidů. Zvýšením obsahu sušiny netučného mléka se vytvoří větší množství laktotripeptidu.

Produktivita laktotripeptidů jako ukazatel se měří kroky inokulace živočišného mléka, jako například kravského mléka, kozího mléka, koňského mléka a z nich odstředěného mléka obsahujícího 9 % hmot. sušiny netučného mléka, bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou, kultivace těchto bakterií k přípravě fermentovaného mléka 24 h při teplotě 37 °C, odstřeďování 1 ml fermentovaného mléka při frekvenci otáček 15 000 za min po dobu 10 min, podrobení supernatantu měření množství VPP a IPP a převedení těchto množství na množství VPP. Protože ACE inhibiční aktivita IPP na jednotku hmotnosti je 1,7násobná než VPP, vypočítá se převedené množství laktotripeptidu ve smyslu obsahu VPP tímto vztahem:

převedené množství laktotripeptidu (µg ve smyslu obsahu VPP na ml) = množství IPP (µg/ml) x 1,7 + množství VPP (µg/ml)

Maximální produktivita laktotripeptidu není zvláště omezena, ale může být dosažena, jestliže všechny ze sekvencí Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro začleněné v proteinu media se

trávením odštěpí jako tripeptidy.

Aktivita extracelulární proteázy se měří způsobem podle Yamamoto a kol. /Yamamoto N. a kol., J. Biochem., 114, 740 (1993)/ založeném na způsobu podle Twininga a kol. /Twining S., Anal. Biochem., 143, 3410 (1984)/ a vyjádří se definováním, že množství enzymu projevující 1% intenzitu fluorescence má aktivitu 1 U/OD₅₉₀. Výše uvedený limit aktivity extracelulární proteázy také není omezen, ale obvykle je 800 U/OD₅₉₀.

Tyto bakterie produkující kyselinu mléčnou mohou vytvářet velké množství laktotripeptidu vzhledem k množství kyseliny mléčné vytvořené během fermentace. Tudíž fermentace s použitím těchto bakterií produkujících kyselinu mléčnou má za následek fermentované mléko obsahující větší množství laktotripeptidu v porovnání s fermentovaným mlékem obsahujícím podobné množství kyseliny mléčné vytvořeným běžnými bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou. V důsledku takové fermentace je tato kyselina mléčná kyselina DL-mléčná. Výhodně množství laktotripeptidu produkovaného fermentací těmito bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou není nižší než 30 µg ve smyslu obsahu VPP na 1 ml výsledného fermentovaného mléka obsahujícího 0,01 g/ml kyseliny DL-mléčné vytvořené během fermentace. Horní limitní množství laktotripeptidu není zvláště omezeno, ale tyto bakterie jsou schopny vytvářet až přibližně 50 µg ve smyslu obsahu VPP na 1 ml fermentovaného mléka obsahujícího 0,01 g kyseliny DL-mléčné. Množství kyseliny DL-mléčné je přibližně úměrné množství laktotripeptidu. Tudíž jestliže se v fermentovaném mléce vytvoří například 0,02 g kyseliny DL-mléčné, množství vytvořeného laktotripeptidu výhodně není menší než 60 µg, ve smyslu obsahu VPP. Naproti tomu fermentací běžnými bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou je množství laktotripeptidu

(maximálně) nižší než 30 µg ve smyslu obsahu VPP na 0,01 g kyseliny DL-mléčné v 1 ml fermentovaného mléka.

Příkladem těchto bakterií produkujících kyselinu mléčnou je kmen *Lactobacillus helveticus* CM4, který je uložen jako FERM BP-6060 v Národním institutu biologických věd a Agentuře pro humánní technologie průmyslových věd a technologie (uložen 15.srpna 1997). Kmen *Lactobacillus helveticus* CM4 má tyto biologické vlastnosti:

morfologické vlastnosti:

1. tvar buňky: tyčinka
2. pohyblivost: žádná
3. tvorba spór: žádná
4. gramovo barvení: pozitivní

fyziologické vlastnosti

1. produkce katalázy: negativní
2. produkce indolu: negativní
3. redukce nitrátu: negativní
4. aerobní růst: fakultativně anaerobní
5. tvorba DL-kyseliny mléčné z glukózy homolaktickou fermentací bez tvorby plynů
6. degradace uhlovodíků
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - mannóza: +
 - fruktóza: +
 - galaktóza: +
 - sacharóza: -
 - maltóza: -

- xylóza: -
- rhamnóza: -
- cellobióza: -
- trehalóza: -
- melibióza: -
- rafinóza: -
- stachyóza: -
- mannitol: -
- sorbitol: -
- eskulin: -
- salicin: -

Jestliže se hodnotí způsobem podle Mitsuoka a kol. /Rinshoukensa 18, 1163 (1974)/, jsou výše uvedené bakteriologické vlastnosti kmene CM4 stejné, jako veřejně známého kmene *Lactobacillus helveticus* NCDO-099. Nicméně podle těchto vlastností, které Mitsuoka a kol. nepopsal, se kmen CM4 jasně odlišuje od kmene NCDO-099:

7. aktivita extracelulární proteázy: ne méně než 400 U/OD₅₉₀
8. produktivita laktotripeptidu, tvorba dvou druhů tripeptidů (VPP a IPP) v množství 60 µg nebo vyšším ve smyslu obsahu VPP na 1 ml fermentované tekutiny při kultivaci v mediu obsahujícím 9 % hmot. odstředěného mléka 24 h při teplotě 37 °C.

Produktivita laktotripeptidu v bodě 8. se měří s použitím odstředěného mléka jako sušiny netučného mléka.

Kmen bakterií produkujících kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu se může získat tímto screeningem a měřením aktivity extracelulární proteázy.

1. Primární screening

Selekce kmene měřením výše ACE inhibiční aktivity ve fermentovaném mléce

Kmeny pro screening se při teplotě 37 °C 24 h kultivují v mediu s obsahem 9 % hmot. odstředěného mléka. Po skončení kultivace se měří počet bakterií produkujících kyselinu mléčnou, acidita kyseliny mléčné a ACE inhibiční aktivita. Vyberou se kmeny bakterií produkujících kyselinu mléčnou produkující 1×10^8 buněk/ml nebo více a projevující aciditu kyseliny mléčné 1,6 % hmot. nebo více a ACE inhibiční aktivitu 40 U/ml. ACE inhibiční aktivita se měří způsobem podle Cushmana a Cheunga /Cushman D.W. a Cheung H.S., Pharmacol., 20, 1637 (1971)/.

2. Sekundární screening

Selekce kmene s vysokou produktivitou laktotripeptidu

Kultivované tekutiny kmenů vybraných primárním screeningem se 10 min odstřeďují při frekvenci otáček 15 000 za min a jejich supernatanty se podrobí HPLC ke kvantifikaci laktotripeptidu. Vyberou se kmeny, které vytvořily ne méně než 50 µg ve smyslu obsahu VPP na 1 ml.

3. Měření aktivity extracelulární proteázy

Každý z kmenů vybraných sekundárním screeningem se kultivuje v mediu obsahujícím 9 % hmot. odstředěného mléka, přičemž jeho pH se udržuje na hodnotě 6. Vzorek se odebere uprostřed logaritmické fáze růstu a smísí se s 1 % hmot. citrátu sodného odstřeďuje se 10 min při frekvenci otáček 15 000 za min ke získání buněk. Získané buňky se promyjí 50mM kyselinou β-glycerolfosforečnou a suspendují v 50mM

Tris-HCl pufru (pH = 7,8), aby se turbidita (OD_{590}) upravila na hodnotu 1. Potom se měří aktivita proteázy na buněčném povrchu. Bude ověřeno, že výsledek je korelativní s produktivitou laktotripeptidu kmenů měřených sekundárním screeningem.

Kmen bakterií produkujících kyselinu mléčnou *Lactobacillus helveticus* vybraný výše uvedeným způsobem se může identifikovat a rozlišit od ostatních kmenů bakterií produkujících kyselinu mléčnou například výše uvedenou produktivitou tripeptidu a aktivitou extracelulární proteázy.

Bakterie produkující kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu mají výhodně vedle výše uvedené produktivity laktotripeptidu a aktivity extracelulární proteázy chromozomální DNA, a tato chromozomální DNA, je-li trávena restrikcí enzymy PstI a EcoRI, poskytuje fragment DNA o velikosti 15 až 17 kb. Tudiž mohou být bakterie produkující kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu jasně odlišeny od jiných kmenů stejného druhu zkoušením, zda tento kmen má chromozomální DNA, která poskytuje takový fragment DNA.

Existence fragmentu DNA o velikosti 15 až 17 kb může být potvrzena extrakcí chromozomální DNA z bakterií produkujících kyselinu mléčnou způsobem podle Leenhoutse a kol. /Leenhouts K., Appl. Environ. Microbiol., 56, 2726 (1990)/, trávením chromozomální DNA EcoI a PstI, provedením elektroforézy odštěpených fragmentů na 0,8% agarózovém gelu a analýzou výsledku elektroforézy. Po provedení elektroforézy se přítomnost DNA fragmentu jasně potvrdí tak, že se jako ukazatel velikosti podrobí λ fágová DNA trávená restrikcí enzymem Hind III paralelní elektroforéze.

Fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu obsahuje jako nepostradatelnou složku fermentované mléko

obsahující bakterie produkující kyselinu mléčnou a tripeptid zvolený ze skupiny zahrnující VPP, IPP a jejich směsi. To znamená, že fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu obsahuje fermentované mléko obsahující laktotripeptid a bakterie produkující kyselinu mléčnou a připraví se fermentací media obsahujícího výživnou látku složenou z peptidů a/nebo proteinů, které zahrnují sekvenci VPP a/nebo IPP bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu. Tudíž se mohou obsahy bakterií produkujících kyselinu mléčnou a tripeptidu vhodně zvolit v závislosti na druhu připravovaného fermentovaného mléčného výrobku. Tento fermentovaný mléčný výrobek může obsahovat získaný fermentovaný výrobek samotný, nebo čištěný fermentovaný výrobek.

Fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu obsahuje kyselinu DL-mléčnou vytvořenou během fermentace. Fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu výhodně obsahuje laktotripeptid v množství 30 až 50 μg ve smyslu obsahu VPP vzhledem k 0,01 g kyseliny DL-mléčné. Množství kyseliny DL-mléčné je přibližně úměrné množství laktotripeptidu. Tudíž jestliže fermentovaný mléčný výrobek obsahuje koncentrované fermentované mléko a obsahuje např. 0,02 g kyseliny DL-mléčné, množství laktotripeptidu je výhodně v rozmezí 60 až 100 μg ve smyslu obsahu VPP. Jestliže fermentovaný mléčný výrobek obsahuje zředěné fermentované mléko a obsahuje např. 0,005 g kyseliny DL-mléčné, množství laktotripeptidu je výhodně v rozmezí 15 až 25 μg ve smyslu obsahu VPP. Ačkoliv může fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu obsahovat kyselinu L-mléčnou, která je potravinovým doplňkem k úpravě acidity, je tato kyselina L-mléčná odlišná od kyseliny DL-mléčné vytvořené během fermentace.

Bakterie produkující kyselinu mléčnou ve fermentovaném

mléčném výrobku podle tohoto vynálezu se mohou buďto sterilizovat po fermentaci, nebo udržovat živé bez sterilizace.

Fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu může být jogurt, zakysané nápoje obsahující mléko, sýr, připravené potraviny obsahující fermentované kyselé mléko a zdraví prospěšné potraviny obsahující fermentované kyselé mléko. Tudíž fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu může obsahovat vedle fermentovaného mléka jako nepostradatelné složky různé látky, které se obvykle přidávají k výrobě takové škály výrobků. Fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu může být ve formě pevné, jako například prášků, granulátů a tablet, nebo tekuté, jako například pasty, gelu a kapaliny.

Způsob výroby fermentovaného mléčného výrobku podle tohoto vynálezu zahrnuje fermentaci media obsahujícího výživnou látku zvolenou ze skupiny, která zahrnuje peptid, protein a jejich směsi obsahující jako součást své sekvence Val-Pro-Pro a/nebo Ile-Pro-Pro, bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou.

Výživná látka v mediu může být některého z typů podle toho, jak dlouhé obsahuje peptidy a/nebo proteiny, které jako součást své sekvence obsahují VPP a/nebo IPP. Výživou látkou může být například živočišné mléko, mléčný kasein, kukuřice, kukuřičný protein, pšenice, pšeničný protein, sójové boby, sójové mléko, odtučněné sójové boby, sójový protein nebo jejich směsi. Zvláště je výhodné použít výživnou látku obsahující živočišné mléko, jako například kravské mléko, kozí mléko, koňské mléko, nebo z nich odstředěná mléka. Obsah sušiny netučného mléka v živočišném mléce není zvláště omezen, ale obvykle je v rozmezí 5 až 20 % hmot.

Není žádné zvláštní omezení množství bakterií

produkujících kyselinu mléčnou, kterými se medium inokuluje. Množství k inokulaci je obvykle přibližně 10^5 až 10^7 buněk bakterií produkujících kyselinu mléčnou na 1 g výše uvedené určité výživné látky v mediu.

Fermentace se může provádět při teplotě v rozmezí 25 až 50 °C, a výhodně při teplotě v rozmezí 30 až 45 °C po dobu 6 až 30 h, a výhodně po dobu 10 až 24 h, v rozmezí hodnot pH výhodně 3,0 až 4,0, a výhodněji v rozmezí 3,0 až 3,5.

Fermentace se výhodně provede tak, že množství laktotripeptidu není menší než 60 µg ve smyslu obsahu VPP na ml výsledného fermentovaného mléka. Zejména jestliže se jako medium použije kravské mléko obsahující 9 % hmot. sušiny netučného mléka, má fermentace při teplotě 25 až 40 °C po dobu 12 až 48 h za následek fermentované mléko obsahující laktotripeptid v množství ne menším než 70 µg, ve smyslu obsahu VPP na ml. Obsah sušiny netučného mléka v mediu je přibližně úměrný vytvořenému laktotripeptidu. Například obsahuje-li výživná látka 5 % hmot. sušiny netučného mléka, fermentace podle výše uvedených podmínek by měla mít za následek produkci laktotripeptidu v množství přibližně 33,3 µg ve smyslu VPP obsahu na ml.

Fermentované mléko získané výše uvedenou fermentací se může smísit s výrobkem tak, jak je. Je-li to nutné, může se fermentované mléko před smísením podrobit ředění nebo čištění. Fermentované mléko se může ochladit a skladovat při teplotě 5 °C, a potom smísit s ostatními složkami, aby se připravil výrobek, jako například mražený výrobek. Alternativně se může fermentované mléko podrobit tepelné sterilizaci a je-li to nutné, práškovat sušením rozprašováním, aby se připravil výrobek k distribuci při teplotě místnosti.

Protože fermentovaný mléčný výrobek podle tohoto vynálezu obsahuje fermentované mléko získané fermentací

bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou, může se použít ke snadné přípravě výrobků s vysokým obsahem laktotripeptidu vzhledem k obsahu kyseliny mléčné v přijatelné formě k podávání. Očekává se, že podává-li se člověku fermentovaný mléčný výrobek, projeví se hypotenzivní účinek a protistresový účinek laktotripeptidu.

Protože bakterie produkující kyselinu mléčnou podle tohoto vynálezu mohou svou kultivací v určité výživné látce vytvářet velké množství laktotripeptidu, jsou bakterie a látky z nich užitečné k výrobě široké škály fermentovaných mléčných výrobků, funkčních potravin, zdraví prospěšných potravin, potravin pro určené zdravotní použití, potravin pro určené použití staršími lidmi, s hypotenzivním účinkem a stres zmírňujícím účinkem laktotripeptidu.

Příklady provedení vynálezu

Tento vynález bude podrobněji popsán dále s odkazem na příklady, ale tento vynález se na ně neomezuje.

Mezi kmeny *Lactobacillus helveticus* použitými v příkladech, je kmen CM4 uložen v Národním institutu biologických věd a Agentuře pro humánní technologie průmyslových věd a technologie a bylo mu uděleno přírůstkové číslo FERM BP-6060. Veřejně dostupné kmeny jsou ATCC15009, NCDO-099, JCM1006, ATCC10797, JCM1062, JCM1103, JCM1120 a JCM1004. Jiné kmeny, než výše uvedené kmeny použité v příkladech jsou zvoleny ze sbírky kmenů přihlašovatele.

PŘÍKLAD 1

Selekce kmenů poskytujících fermentované mléko s vysokou ACE inhibiční aktivitou

Screenovalo se 36 kmenů *Lactobacillus helveticus* izolovaných z různých mléčných výrobků. ACE inhibiční aktivita mléka fermentovaného každým z kmenů se měřila tímto způsobem. Každý z kmenů *Lactobacillus helveticus* se kultivoval při teplotě 37 °C po dobu 24 h v mediu s 9 % hmot. sušiny netučného mléka. Kultivační medium se přidalo do čerstvého media stejného typu v takovém množství, aby nové medium obsahovalo 3 % hmot. kultivačního media. Fermentace dále probíhala 24 h při teplotě 37 °C. Po ukončení fermentace se měřila acidita kyseliny mléčné (% hmot.), množství peptidu v syrovátce (mg/ml), počet buněk a ACE inhibiční aktivita (U/ml). Výsledky ukazuje tabulka 1. 7 kmenů z 36 kmenů mělo velmi slabou schopnost fermentace. 15 kmenů vytvořilo fermentované mléko s aciditou vytvořené kyseliny mléčné ne menší než 1,6 % hmot. Z 15 kmenů bylo vybráno 8 kmenů s ACE inhibiční aktivitou ne menší než 40 U/ml syrovátky ve svém fermentovaném mléce.

Měření ACE inhibiční aktivity fermentovaného mléka

ACE inhibiční aktivita se měřila způsobem podle Cushmana a Cheunga /Cushman D. W. a Cheung H. S., Pharmacol., 20, 1637 (1971)/. To znamená, že každé fermentované mléko se odstřeďovalo při frekvenci otáček 15 000 za min po dobu 5 min, aby se dostal supernatant (syrovátka). Syrovátka se k měření vhodně zředila. Do zkumavky se vpravilo 80 µl zředěné syrovátky, smísilo se s 0,2 ml 0,1M kyseliny borité jako pufru (obsahujícího 0,3 M NaCl, pH = 7,3) obsahujícím jako substrát 5 mM hippurylhistidinleucinu (Hip-His-Leu, vyrobený společností Sigma Chemicals Co.), a dále se smísilo s 20 µl roztoku enzymu (0,1 U/ml, vyrobený společností Sigma Chemicals Co.). Výsledná směs se nechala reagovat 30 min při teplotě 37 °C a

potom se k ukončení reakce smísila s 250 μ l 1N kyseliny chlorovodíkové. Následně se směs smísila s 1,7 ml ethylacetátu, 20 s mísila a potom odstřeďovala 10 min při frekvenci otáček 3 000 za min, aby se znovu získalo 1,4 ml ethylacetátové fáze (vrchní fáze). Vrchní fáze se zahřívala 40 min při teplotě 120 °C, aby se odstranilo rozpouštědlo, smísila se s 1 ml destilované vody a mísila přibližně 20 s. U extrahované kyseliny hippurové se měřila absorbance při 228 nm. Aktivita enzymu v jednotkách se vypočítala podle dále uvedeného vztahu s tím, že jako jedna jednotka se definuje množství, které poskytne 50% inhibici ACE aktivity.

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

kde

A představuje absorbanci při 228 nm bez vzorku,

B představuje absorbanci při 228 nm se vzorkem a

C představuje absorbanci při 228 nm jak bez enzymu, tak bez vzorku.

Kvantitativní analýza množství peptidů ve fermentovaném mléce

Kvantitativní analýza peptidů se uskutečnila způsobem OPA /Charch F. C. a kol., J. Dairy Sci., 66, 1219 (1983)/. Jako standardní látka k vytvoření kalibrační křivky se použil kasein trávený trypsinem.

Tabulka 1

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

Tabulka 1-pokračování

Kmeny	Acidita (% hmot.)	Množství peptidů (mg/ml)	Počet buněk ($\times 10^8$ buněk/ml)	ACE inhibiční aktivita (U/ml)
Kmen 27	1,063	3,01	2,78	76,9
Kmen 28	0,457	1,98	0,50	52,4
Kmen 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

Selekce kmenů s vysokou produktivitou laktotripeptidu

Následně se u 8 výše vybraných kmenů s vysokou ACE inhibiční aktivitou, které poskytly fermentované mléko, měřil obsah VPP a IPP v jimi fermentovaném mléce.

1 ml fermentovaného mléka se odstřeďoval 10 min při frekvenci otáček 15 000 za min. Nashromáždil se jeho supernatant, to znamená syrovátka. 0,3 ml syrovátky se podrobilo adsorpci na Sep-Pak Cartridge (vyrobena Waters Inc.), promyla se destilovanou vodou a potom eluovala 5 ml methanolu. Eluát se vysušil odstřeďováním a za sníženého tlaku. Vysušený produkt se rozpustil v 0,3 ml 0,05% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové, a podrobil HPLC analýze (vysokoučinná kapalinová chromatografie) za těchto podmínek: Výsledky ukazuje tabulka 2.

Použitý přístroj:

Hitachi L4000 UV detektor (při 215 nm)

programovatelná pumpa L6200

vyhřívána kolona L5030 (35 °C)

Podmínky eluce: rychlost proudění 0,5 ml/min

Eluent: vodný roztok obsahující 0,3M NaCl a 0,05% kyselinu
trifluoroctovou

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

Protože ACE inhibiční aktivita IPP na jednotku hmotnosti je 1,7násobná než VPP, vypočítal se obsah laktotripeptidů ve smyslu obsahu VPP z měřených množství IPP a VPP podle dále uvedeného vztahu.

Výsledky ukazuje tabulka 2.

převedené množství laktotripeptidu (μg ve smyslu obsahu VPP na ml) = množství IPP (μg/ml) x 1,7 + množství VPP (μg/ml)

Tabulka 2

Kmeny	Množství peptidu μg/ml syrovátky			Acidita (% hmot.)
	VPP	IPP	Množství laktotripeptidu ve smyslu obsahu VPP	
Kmen 17	15,2	11,1	34,0	1,5
Kmen 19	11,2	7,3	23,7	1,4
Kmen 20	13,0	8,1	26,8	1,6
kmen 21	16,6	11,4	36,0	1,6
kmen 22	15,8	12,1	36,3	1,5
kmen 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

Mléko fermentované kmenem CM4 obsahovalo největší množství laktotripeptidu ve smyslu obsahu VPP, to znamená 78,5 $\mu\text{g/ml}$ syrovátky. Ostatních sedm kmenů poskytlo průměrné množství 34,2 $\mu\text{g/ml}$ syrovátky.

Měření aktivity extracelulární proteázy

Aktivita extracelulární proteázy se měřila u 16 kmenů, které poskytly relativně dobré výsledky schopnosti fermentace ukázané v tabulce 1. Měření se provádělo způsobem podle Yamamoto a kol. /Yamamoto N. a kol., J. Biochem. 114, 740 (1993)/, založeného na způsobu Twininga a kol. /Twining S., Anal. Biochem. 143, 3410 (1984)/. To znamená, že každý kmen se kultivoval v mediu s obsahem 9 % hmot. sušiny mléka, jehož pH se udržovalo na hodnotě 6,0. Vzorek se odebral uprostřed logaritmické fáze růstu a k vyjasnění mléčného media se smísil s citrátem sodným tak, že konečná koncentrace byla 1 % hmot. Směs se odstřeďovala 10 min při frekvenci otáček 5 000 za min, aby se shromáždily buňky. Buňky se promyly 50mM roztokem kyseliny β -glycerolfosforečné a suspendovaly v 50mM Tris-HCl pufru (s hodnotou pH = 7,8), aby se upravila turbidita (OD_{590} , to znamená, že se měřila absorbance při 590 nm) na hodnotu 1. 30 μl suspenze se smísilo s 20 μl 0,4% fluorescein-kaseinu (vyroben společností Sigma Chemicals Co.) a inkubovalo se 1 h při teplotě 42 °C. Směs se dále smísila se 120 μl 5% roztoku kyseliny trichloroctové, nechala se 20 min stát a 10 min se odstřeďovala při frekvenci otáček 15 000 za min. 60 μl supernatantu se přidalo ke 3 ml 500mM Tris-HCl pufru (s hodnotou pH = 8,3) a měřila se jeho intenzita fluorescence detekcí fluorescence při 525 nm vytvořené při excitační vlnové délce 490 nm. Vypočítala se aktivita extracelulární

proteázy v jednotce s tím, že jedna jednotka se definuje jako množství enzymu, které za výše uvedených podmínek projevuje 1% intenzitu fluorescence. Výsledky ukazuje tabulka 3.

Tabulka 3

Kmeny	U/OD ₅₉₀
kmen 17	136,7
Kmen 18	102,8
kmen 19	103,2
kmen 20	89,9
kmen 21	80,1
kmen 22	243,3
kmen 23	116,6
kmen 24	116,6
kmen 25	192,6
kmen 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 kmene CM4 *Lactobacillus helveticus* byla nejvyšší, to znamená 450 U/OD₅₉₀. Průměrná aktivita ostatních 16 kmenů byla 141 U/OD₅₉₀, která je přibližně třetinou aktivity kmene CM4.

PŘÍKLAD 2

Z 11 kmenů vybraných v příkladu 1 ze 36 kmenů *Lactobacillus helveticus* se extrahovala chromozomální DNA způsobem podle Leenhoutse a kol. /Leenhouts K., Appl. Environ. Microbiol. 56, 2726 (1990)/, byla trávena různými restriktčními enzymy a podrobila se elektroforéze v 0,8% agarózovém gelu k analýze způsobem elektroforézy.

Jako výsledek byl mezi fragmenty DNA chromozomu kmene CM4 pozorován charakteristický fragment trávený EcoRI a PstI (ukazuje šipka 1 v obr. 1). Takový fragment u fragmentů chromozomů jiných kmenů než CM4 nebyl pozorován, a u většiny jiných kmenů byly pozorovány kratší fragmenty než charakteristický fragment kmene CM4 (ukazuje šipka 2 v obr. 1). Molekulová hmotnost charakteristického fragmentu se měřila srovnávací elektroforézou tak, že ukazateli velikosti byly produkty λ fágové DNA trávené Hind III (23,1 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,4 kb, 2,3 kb a 2,0 kb ve smyslu rostoucí pohyblivosti) a byla nalezena přibližně 16 kb. Tudiž bylo ověřeno, že kmen CM4 má chromozomální DNA, která trávením EcoRI a PstI poskytuje DNA fragment s molekulovou hmotností asi 16 kb. Také bylo ověřeno, že jiné kmeny než CM4 mají chromozomální DNA, která poskytuje běžný fragment DNA s molekulovou hmotností okolo 13 kb.

PŘÍKLAD 3

Fermentované mléko bylo vytvořeno kmenem CM4 *Lactobacillus helveticus* vybraným v příkladu 1. Kmen CM4 se kultivoval 12 h při teplotě 37 °C ve 100 g 9% hmot. odstředěného mléka. Následně se 3 kg čerstvého media inokulovaly kultivovaným odstředěným mlékem a kultivovaly

12 h při teplotě 37 °C. Po ukončení fermentace se všechno fermentované mléko (počet buněk kmene CM4: $6,3 \times 10^8$ buněk/ml) použilo jako iniciátor fermentace 100 kg 9% hmot. odstředěného mléka po dobu 20 h při teplotě 32 °C. Po ukončení fermentace bylo ve fermentovaném mléce obsaženo 74,8 µg/ml laktotripeptidu. Obsah kyseliny mléčné byl 1,9 % hmot.

43 kg získaného fermentovaného mléka se smísilo se 4 kg krystalového cukru, 3 kg vody a 0,15 kg silného methoxypektinu a homogenizovalo se, aby se dostalo 50 kg jogurtového nápoje. Jogurtový nápoj měl výhodnou jemnou chuť, hodnotu pH = 3,6 a obsahoval živé buňky kmene CM4 v množství $4,6 \times 10^8$ buněk/g.

PŘÍKLAD 4

26,5 kg fermentovaného mléka získaného v příkladu 3 se smísilo se 45,0 kg krystalového cukru, 4,7 kg silného maltóзовého sirupu a 13,8 kg vody. 10 kg 3 % hmot. silného roztoku methoxypektinu se za mísení přidalo ke směsi. Výsledná směs se homogenizovala použitím laboratorního homogenizátoru (vyroben ATV Gaulin, Inc., model 15M-8BA) za podrobení tlaku 150 kg/cm^2 a rychlosti proudění 2500 ml/min. Homogenizovaná tekutina se smísila s vanilkovou příchutí a sterilizovala zahřátím na 85 °C. Tímto způsobem sterilizované fermentované mléko se za horka nalilo do 200ml skleněných lahví. Zjišťoval se obsah laktotripeptidu ve sterilizovaném fermentovaném mléčném výrobku. Bylo nalezeno, že obsah laktotripeptidu odpovídal takovému, jaký byl ve fermentovaném mléce před sterilizací. Také bylo nalezeno, že obsah kyseliny mléčné byl 0,5 % hmot.

26 25 12.10.00

PV 2070-1082

PATENTOVÉ NÁROKY

7082

1. Bakterie *Lactobacillus helveticus* produkující kyselinu mléčnou mající dále uvedené bakteriologické vlastnosti, přičemž tyto bakterie, kultivují-li se v mediu živočišného mléka obsahujícího 9 % hmot. sušiny netučného mléka vytvářejí tripeptidy Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro v množství ne menším než 60 µg ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na ml media a tyto bakterie projevují aktivitu extracelulární proteázy ne menší než 400 U/OD₅₉₀:

morfologické vlastnosti:

1. tvar buňky: tyčinka
2. pohyblivost: žádná
3. tvorba spór: žádná
4. gramovo barvení: pozitivní

fyziologické vlastnosti

1. produkce katalázy: negativní
2. produkce indolu: negativní
3. redukce nitrátu: negativní
4. aerobní růst: fakultativně anaerobní
5. tvorba DL-kyseliny mléčné z glukózy homolaktickou fermentací bez tvorby plynů
6. degradace uhlovodíků
 - glukóza: +
 - laktóza: +
 - mannóza: +
 - fruktóza: +

-galaktóza: +
-sacharóza: -
-maltóza: -
-xylóza: -
-rhamnóza: -
-cellobióza: -
-trehalóza: -
-melibióza: -
-rafinóza: -
-stachýóza: -
-mannitol: -
-sorbitol: -
-eskulin: -
-salicin: -.

2. Bakterie *Lactobacillus helveticus* produkující kyselinu mléčnou podle nároku 1, kde uvedené bakterie *Lactobacillus helveticus* produkující kyselinu mléčnou jsou z kmene CM4, uloženého v Národním institutu biologických věd a Agentuře pro humánní technologie průmyslových věd a technologie pod přírůstkovým číslem FERM BP-6060.

3. Bakterie *Lactobacillus helveticus* produkující kyselinu mléčnou podle nároku 1, kde uvedené bakterie produkující kyselinu mléčnou mají chromozomální DNA, která je-li trávena restriktčními enzymy PstI a EcoRI, poskytuje fragment DNA o velikosti 15 až 17 kb.

4. Fermentovaný mléčný výrobek, **vyznačující se tím**, že obsahuje bakterie produkující kyselinu mléčnou podle nároku

1 a tripeptid zvolený ze skupiny zahrnující Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro a jejich směsi.

5. Fermentovaný mléčný výrobek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje kyselinu DL-mléčnou, kdy tento výrobek obsahuje 30 až 50 µg řečeného tripeptidu ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na 0,01 g uvedené kyseliny DL-mléčné.

6. Fermentovaný mléčný výrobek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že bakterie produkující kyselinu mléčnou podle nároku 1 jsou živé.

7. Fermentovaný mléčný výrobek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že uvedený fermentovaný mléčný výrobek je zvolený ze skupiny zahrnující jogurt, zakysané mléčné nápoje, sýr, upravené potraviny obsahující fermentované kyselé mléko a zdraví prospěšné potraviny obsahující fermentované kyselé mléko.

8. Způsob výroby fermentovaného mléčného výrobku podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že zahrnuje fermentaci media bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou podle nároku 1, které obsahuje výživnou látku zvolenou ze skupiny zahrnující peptid, protein a jejich směsi obsahující sekvence Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro.

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že uvedená výživná látka je zvolena ze skupiny zahrnující živočišné

2818 12.10.00

mléko, mléčný kasein, kukuřici, kukuřičný protein, pšenici, pšeničný protein, sójové boby, sójové mléko, odtučněné sójové boby, sójový protein a jejich směsi.

10. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že fermentace se provádí 6 až 60 h při teplotě 25 až 50 °C.

11. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že fermentace se provádí za podmínek, kdy množství tripeptidů Val-Pro-Pro a Ile-Pro-Pro vytvořené ve vytvořeném fermentovaném mléce je 60 µg ve smyslu obsahu Val-Pro-Pro na ml.

12.10.00

PVL000-1082

72082

Obr. 1

