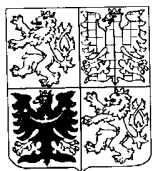


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9806456**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/FR99/01165**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/61627**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4359

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/56

A 23 C 9/123

C 12 N 1/20

C 12 N 9/38

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

(71) Přihlašovatel:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE, Levallois-Perret,
FR;

(72) Původce:

Benbadis Laurent, Anthony, FR;
Brignon Pierre, Strasbourg, FR;
Gendre François, Strasbourg, FR;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Mutantní kmen *Lactobacillus bulgaricus*

(57) Anotace:

Řešení se týká mutantních kmenů *L.bulgaricus* nesoucích nesmyslnou mutaci v alespoň jedné ze sekvencí kódujících laktózoový operon a postrádající β -galaktosidázovou aktivitu. Tyto kmeny a zákvasy obsahující uvedené kmeny mohou být použity k získání zakvašených mléčných výrobků z mléka, doplněného glukózou.

Mutantní kmen *Lactobacillus bulgaricus*

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových variant *L. bulgaricus* a jejich použití k výrobě kvašených mléčných výrobků. Uvedené kmeny a kvas lze použít k získání kvašených mléčných výrobků z mléka doplněného glukózou.

Dosavadní stav techniky

Jogurty se běžně získávají kvašením mléka kombinací kmenů *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. Během kvašení, které se provádí při teplotě přibližně 40 až 45°C, používají tyto bakterie jako energetický substrát především laktózu a produkují kyselinu mléčnou, která působí srážení mléka. Tento krok kvašení (nazývaný také "acidifikace, okyselování") je ukončen ochlazením výrobku, jakmile jeho pH dosáhne hodnoty přibližně 4,8 až 4,5. Výrobek se pak během zbylého výrobního procesu, procesu balení a až do doby konzumace uchovává v chladu.

Ochlazení samozřejmě nezastaví kvašení mléčné kyseliny úplně; dokonce i pokud je výrobek uchováván při 4°C, je v průběhu času pozorováno postupné zvyšování jeho kyselosti.

Tento jev, známý jako postacidifikace, dodatečné okyselování, je zodpovědný za degradaci organoleptických kvalit (týkajících se chuti a vůně) výrobku během jeho uchovávání.

Dodatečné okyselování je výsledkem zejména toho, že bakterie, zvláště *L. bulgaricus*, využívají laktózu, zbývající ve výrobku na konci řízeného kroku okyselování. K odstranění tohoto jevu bylo navrženo použití kmenů *L. bulgaricus*, které kvasí laktózu jen obtížně nebo vůbec.

Jedním z enzymů, které jsou pro kvašení laktózy nezbytné, je β -galaktosidáza, která hydrolyzuje laktózu na glukózu a galaktózu. Pro získání kmenů *L. bulgaricus*, nevytvářejících dodatečné okyselování, bylo proto navrženo vyrobit umělé mutanty, nebo vybrat přírodní mutanty, u nichž je aktivita tohoto enzymu nepříznivě ovlivněna.

Například patent EP 402 450 (Genencor) popisuje výrobu, prováděnou umístěnou mutagenezí genu β -galaktosidázy, podmíněných mutantů *L. bulgaricus*, u nichž β -galaktosidáza, která je aktivní během kvašení při 40°C, ztrácí svou aktivitu při teplotě anebo při pH, které odpovídají podmínkám uchovávání kvašených mléčných výrobků.

Patentová přihláška JP 90053437 popisuje výrobu umělého mutantu *L. bulgaricus*, který zcela ztratil schopnost kvasit laktózu, a výběr přírodního mutantu se sníženou schopností kvasit laktózu; tyto mutanty jsou ovšem oba schopné normálního vývoje a okyselování v přítomnosti *S. thermophilus*, pod podmínkou, že je médium doplněno glukózou. Vedlejší kultury takových mutantů zachovávají jejich charakteristiky okyselování, v mléku postrádajícím glukózu, i po deseti pasážování (subkultivacích).

Patent EP 0518 096 (Société des Produits Nestlé) navrhuje použít pro výrobu jogurtu chabě dodatečně okyselující mutanty *L. bulgaricus*, které byly předem vybrány podle kriteria delece (vypadnutí) fragmentu β -galaktosidázového genu. Plošné testování (screening) a charakterizace těchto mutantů je usnadněno skutečností, že přítomnost této delece může být snadno ověřena na restričních profilech. Navíc jsou delece známé jako nezvratné mutace, což umožňuje snadné získání stálých mutantních kmenů z rodičovského kmenu. Patent 0518 096 popisuje dva typy slabě dodatečně okyselujících mutantů, vybraných tímto způsobem. První vykazuje deleci, ovlivňující pouze gen β -galaktosidázy; pokud jsou takové mutanty kombinovány se *S. thermophilus* a kultivovány na mléce, vykazují i bez

přídavku glukózy růstové a okyselující vlastnosti, které jsou srovnatelné s týmiž vlastnostmi u divokých kmenů, z nichž pocházejí. Druhý typ vykazuje širší delecí, prostírající se po genu β -galaktosidázy v rozsahu nejméně 1kb; pokud jsou takové mutanty kombinovány se *S. thermophilus*, rostou mnohem pomaleji a mnohem méně okyselují než divoké kmeny, z nichž pocházejí. Přidání glukózy do kultivačního média mělo na jejich okyselující a dodatečně okyselující vlastnosti pouze slabý vliv.

Přírodní mutanty, u nichž je β -galaktosidáza neaktivní, je mnohem obtížnější vybrat a udržovat jako čisté kultury v případě bodových mutací než v případě delečních mutací; to se vysvětluje nižší pravděpodobností bodových mutací, vytvářejících neaktivní bílkovinu, větší obtížností lokalizace a charakterizace bodových mutací za použití restričních profilů a velmi vysokou rychlostí zvratu.

Podstata vynálezu

Autoři vynálezu nyní našli jiné přírodní mutanty *L. bulgaricus*, které nenesou delecí v genu kódujícím β -galaktosidázu a které mají výhodné technické charakteristiky. V souvislosti s předkládaným vynálezem byl z kultury divokého typu *L. bulgaricus* izolován nonsensní mutant, neschopný asimilovat glukózu. Pokud je kombinován se *S. thermophilus*, při kultivaci na mléce, roste a okyseluje mnohem pomaleji než kmen divokého typu, ze kterého byl získán. Pokud je mléko doplněno glukózou, jsou naopak jeho růst a schopnost okyselování vlastně normální.

Předmětem předkládaného vynálezu je mutantní kmen *L. bulgaricus* postrádající aktivitu β -galaktosidázy, vyznačující se tím, že nese mutaci, která zavádí nonsensní kodon do jedné z kódujících sekvencí laktóзовého operonu, a zvláště do sekvence kódující β -galaktosidázu.

Kmen *L. bulgaricus* podle vynálezu byl uložen, podle Budapešťské smlouvy, 14. ledna 1998 v CNCM (Collection Nationale de Cultures de Mikroorganismes, Národní sbírce kultur mikroorganismů), uchovávané Pasteurovým ústavem v Paříži (Pasteur Institute, 25 rue du Docteur Roux, Paris) pod číslem I-1968.

Tento kmen má následující morfologické a biochemické charakteristiky:

- morfologie: Gram-positivní mikroorganismus, nepohyblivý, izolovaný nebo o krátkém řetězci, asporogenní, pleomorfní, tenké bacily;
- metabolismus: homofermentativní (samokvasný), kataláza (-);
- kvašení cukrů: D-glukóza (+), D-fruktóza (-), (D-mannóza (+), eskulin (+).

Autoři vynálezu sekvenovali laktóзовý operon mutantu I-1968. Odpovídající sekvence je představována v připojeném seznamu sekvencí pod označením sekvence identifikačního čísla 1 (sekv. id. č. 1). Sekvence translačních produktů (permeáza a β -galaktosidáza) jsou představovány pod označením sekv. id. č. 2 a sekv. id. č. 3.

Analýza této sekvence odkryla dvě bodové mutace: jedna, v permeázovém genu (poloha 122 na sekvenci id. č. 1), indukuje výměnu aminokyselin (Lys $\rightarrow$ Asn); druhá, v genu β -galaktosidázy, (poloha 4519 na sekvenci id. č. 1) vkládá tzv. "stop-kodon". Třebaže zachovává svá aktivní místa (polohy 464 a 531), je β -galaktosidáza produkovaná tímto mutantem inaktivní. Autoři vynálezu rovněž zaznamenali, že tato mutace zůstává stálá po několika sériích pasážování, v kultivačním médiu obsahujícím glukózu. Na druhé straně v kultivačním médiu bez obsahu glukózy se tato nonsensní mutace velmi rychle navrácí do původního stavu (revertuje) tempem přibližně 10^{-6} .

Předkládaný vynález rovněž zahrnuje mutantní kmeny, které jsou neschopné asimilovat laktózu a které jsou odvozeny od kmene I-1968. Takové

kmeny mohou být například získány indukováním jiných mutací na laktózovém operonu kmene I-1968, místně řízenou mutagenezí.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž mléčný zákvas, konkrétně jogurtový zákvas, který se vyznačuje tím, že zahrnuje alespoň jeden kmen *L. bulgaricus* podle vynálezu jak byl výše definován, s výhodou v kombinaci s alespoň jedním kmenem *S. thermophilus*.

K produkci zákvasu podle vynálezu může být použit jakýkoli kmen *S. thermophilus*, hodící se pro výrobu jogurtu; výběr jednoho nebo více kmenů *S. thermophilus* může být činěn jako funkce přídatných charakteristik, které je volitelně žádoucí poskytnout konečnému výrobku.

Jako příklad kmenů *S. thermophilus*, jež mohou být použity v kombinaci s kmenem *L. bulgaricus* podle vynálezu, lze zmínit následující kmeny, uložené v CNCM (Collection Nationale de Cultures de Mikroorganismes, Národní sbírce kultur mikroorganismů), uchovávané Pasteurovým ústavem v Paříži (Pasteur Institute, 25 rue du Docteur Roux, Paris):

- kmen uložený 25. srpna 1994 pod číslem I-1470 a kmen uložený 23. srpna 1995 pod číslem I-1620; tyto dva kmeny jsou popsány v Evropské patentové přihlášce, zveřejněné pod číslem 96/06924;

- kmeny uložené 30. prosince 1994 pod čísly I-1520 a I-1521; tyto dva kmeny jsou popsány v PCT mezinárodní přihlášce WO 96/20607;

- kmen uložený 24. října 1995 pod číslem I-1630; charakteristiky tohoto kmene jsou popsány v PCT mezinárodní přihlášce WO 96/01701.

Tyto kmeny mohou být kombinovány spolu navzájem anebo s jedním či více z dalších průmyslových kmenů *S. thermophilus*.

Kmen (kmeny) *S. thermophilus* je (jsou) kombinován (kombinovány) s kmenem (kmeny) *L. bulgaricus* podle vynálezu, stejným způsobem a ve stejných poměrech jako v běžných jogurtových zákvasech; populace bakterie *L. bulgaricus* podle vynálezu může například představovat 10 až 90 % a lépe 20 až 50 % celkové bakteriální populace.

Předmětem předkládaného vynálezu je také způsob výroby kvašeného mléčného výrobku, který se vyznačuje tím, že zahrnuje krok, během něhož se mléko kvasí za použití zákvasu, zahrnujícího alespoň jeden kmen *L. bulgaricus* podle vynálezu, v přítomnosti alespoň jednoho cukru, který může být asimilován uvedeným kmenem; zvláště se může jednat o fruktózu, mannózu, a s výhodou glukózu. Uvedený kvašený výrobek je s výhodou jogurt.

Způsob podle vynálezu je podobný běžným způsobům výroby jogurtu s ohledem na hlavní způsoby provedení kroku řízeného okyselování; konkrétně se toto okyselování provádí při teplotě mezi 20 a 45°C a s výhodou mezi 30 a 45°C, vsádkově, tj. v jediném kroku a za použití jednoho kvasného tanku.

Trvání tohoto kroku řízeného okyselování je obecně 6 až 24 hodin a s výhodou 6 až 16 hodin; je tedy delší než v případě běžných způsobů výroby jogurtů (kde je to 3 až 5 hodin při 44°C). Kmeny *L. bulgaricus* podle tohoto vynálezu, i v kombinaci se *S. thermophilus*, rostou a okyselují mnohem pomaleji než kmeny divokého typu.

Navíc se rychlost růstu a okyselování kmenů *L. bulgaricus* podle tohoto vynálezu liší velmi významně v závislosti na množství glukózy přidané do mléka. Tato vlastnost umožňuje řídit jejich růst a okyselování jednoduchým přidáním požadovaného množství glukózy na počátku kvašení.

Autoři vynálezu rovněž pozorovali, že pokud jsou použity kmeny *L. bulgaricus* nebo zákvas podle tohoto vynálezu, okyselování se značně zpomaluje, pokud pH dosáhne hodnot v rozmezí 4,8 až 4,5 (což odpovídá

rozmezí hodnot pH, v němž je okyselování zastaveno v případě běžných způsobů) a stabilizuje se, i když se mléko udržuje při teplotě kvašení, na minimálním pH. Hodnota tohoto minimálního pH zásadně závisí na množství přidané glukózy.

Tato vlastnost umožňuje snížit, nebo dokonce odstranit, fázi chlazení, používanou v běžných způsobech výroby jogurtů k zastavení kvašení. Odstraňuje také nutnost měření pH pro stanovení optimálního okamžiku k zastavení kvašení; u daného zákvasu a za daného množství přidané glukózy je možné, bez rizika překyselení, zastavit kvašení na konci daného časového období, vypočítaného jako funkce času, požadovaného pro dosažení minimálního pH. To umožňuje lepší kontrolu pravidelnosti konečného pH a struktury výrobku na konci kvašení.

Pro uskutečnění způsobu podle vynálezu a v závislosti na stupni okyselení, kterého je žádoucí dosáhnout, činí výhodně množství glukózy přidávané do mléka před kvašením 0,5 až 10 g.l⁻¹ a lépe 0,5 až 5 g.l⁻¹.

Kvašený výrobek získaný tímto způsobem může být uchováván po několik hodin při teplotě blízké teplotě kvašení, bez poklesu pH, což umožňuje odstranit zařízení pro uchovávání meziprojektu v chladu a zvýšit kapacity kvasných tanků.

Uplatňování způsobu podle vynálezu umožňuje snížení dodatečného okyselení v kvašených výrobcích během jejich delší doby uchovávání. Stupeň dodatečného okyselení se může lišit v závislosti na složení zákvasu a na množství použité glukózy. Ovšem dodatečné okyselení je vždy jasně nižší než to, které je pozorováno v případě jogurtů, získaných s běžným zákvasem a běžnými způsoby.

Například pokusy, prováděné autory vynálezu, ukázaly, že za stejných podmínek uchovávání (28 dnů uchovávání při 10°C) je Δ pH (rozdíl mezi pH v

den 0, tj. D0 a pH v den 28, tj. D28) mezi 0,05 a 0,4 v případě výrobků získaných za použití zákvasu podle vynálezu, zatímco v případě kontrolního zákvasu, kdy je kmen *L. bulgaricus* podle vynálezu nahražen kmenem divokého typu, je Δ pH vždacký větší než 0,7.

Toto slabé dodatečné okyselování je doprovázeno dobrým přežíváním kmenů zahrnutých v zákvasu; populace *L. bulgaricus* je v kvašeném výrobku získaném podle vynálezu na konci uchovávání pouze mírně menší než v kontrolním výrobku.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou také kvašené mléčné výrobky, které mohou být získány prováděním způsobu podle vynálezu.

Tyto výrobky mohou být uchovávány po dlouhou dobu a při vyšších teplotách než výrobky získané za použití běžných metod, a jejich organoleptické vlastnosti zůstávají během uchovávání stálé.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Biochemické testování β -galaktosidázové aktivity mutantu podle vynálezu

Aktivita β -galaktosidázy kmene I-1968 byla srovnána s toutéž aktivitou u kmene divokého typu *L. bulgaricus* (dále zde označovaného LbS), od něhož byl odvozen.

Bakterie se kultivují přes noc na MRS agarovém médiu (Merck) při 37°C, v anaerobní nádobě (Merck) v přítomnosti zprostředkovatele kyslíku (AnaerocultA, Merck).

Klička bakterií, mající objem 10 μ l (Nunc), byla resuspendována v 1 ml sterilní vody. Bakterie byly lyzovány 2 cykly důkladného protřepávání, 20 sekund při rychlosti otáčení 5000 otáček za minutu v přítomnosti skleněných perliček (0,5 mm v průměru, BIOSPEC PRODUCTS) a poté přidáním 0,15 ml chloroformu. Směs byla protřepávána 30 minut při 37°C a objem byl upraven na 2 ml sterilní vodou při 4°C. Poté byla měřena aktivita β -galaktosidázy. Reakce byla započata tak, že k 0,2 ml buněčné suspenze bylo přidáno 1,2 ml 0,067 mol.l⁻¹ NaH₂PO₄ pufru o pH 6,8, poté 0,05 ml L-cysteinu (SIGMA) a v čase t=0 0,05 ml o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidu (SIGMA). Enzymová reakce byla zastavena po 0, 2, 5 nebo 10 minutách přidáním 1 ml 10% Na₂CO₃ pufru a po odstředění reakčního média bylo v supernatantu prováděno měření OD (optické hustoty) při 400 nm.

Galaktosidázové aktivity u LbS rodičovského kmene a u mutantu I-1968 podle vynálezu, měřené jako funkce času, jsou uvedeny na obr. 1.

Tyto výsledky ukazují, že β -galaktosidáza je u mutantu podle vynálezu zcela inaktivní.

Příklad 2

Stálost I-1968 mutantního kmene *L. bulgaricus*

Stálost mutantu I-1968 byla testována v médiu, obsahujícím jako zdroj uhlíku buď směs glukózy a laktózy, nebo pouze laktózu.

Kultura I-1968, získaná v médiu MRS obsahujícím glukózu, byla pěstována ve vedlejší kultuře na sterilizovaném mléku, doplněném kvasnicovým autolyzátem (2 g/l), která mohla nebo nemusela být doplněna glukózou (20 g/l). Po dosažení pH v hodnotě 5,2 (srážení mléka) byly z každé vedlejší kultury odebrány vzorky, z nichž se určovala schopnost bakterií kvasit

cukry a přítomnost β -galaktosidázové aktivity (X-gal deskové stanovení: bílé kolonie = β -galaktosidáza mínus; modré kolonie = β -galaktosidáza plus).

Výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 1.

Tabulka 1

médium	mléko + glukóza (20 g/l)	mléko
dobu k dosažení pH 5,2	6 hodin	20 hodin
kvašení cukrů	glukóza, fruktóza, mannóza	laktóza, glukóza, fruktóza, mannóza
X-gal deskové stanovení	100 % bílých kolonií	20 % bílých kolonií 80 % modrých kolonií

Tyto výsledky ukazují, že v přítomnosti glukózy se kmen I-1968 nemění na kmen, schopný využívat laktózu. Naproti tomu v médiu, obsahujícím laktózu jako jediný zdroj uhlíku, byl pozorován rychlý zvrát kmene I-1968 do původního stavu.

Příklad 3

Okyselování, dodatečné okyselování a podmínky přežití varianty I-1968 *L. bulgaricus* v symbióze se *S. thermophilus*: Způsob výroby stabilizovaného jogurtu (kvašení ve větrané sušárně).

Jogurtové zákvasy byly připraveny spojením kmene I-1968 podle vynálezu s různými průmyslovými kmeny *S. thermophilus* (použité kmeny *S. thermophilus* jsou zde dále nazývány ST1, ST2 a ST3).

Pro srovnání byly zákvasy připraveny také spojením LbS rodičovského kmene a stejných kmenů *S. thermophilus*.

Pro přípravu zákvasů byly kmeny zakvašeny odděleně na 1% na následující směsi:

složení pro 1 litr:

135 g práškového odstředěného mléka
2 g kvasnicového autolyzátu
920 ml destilované vody
20 g glukózy (pouze pro kmen I-1968)
hydratace: 10 minut
pasterizace: 30 minut při 95°C

Mléko bylo poté ochlazeno na 44°C a zaočkováno a následně inkubováno při teplotě 44°C až k dosažení kyselosti 85°D (Dornicovy stupně) pro streptokoky a 80°D pro laktobacily.

Kultury pak byly ochlazeny k zisku zákvasu, obsahujícího 80 % *Streptococcus thermophilus* a 20 % *Lactobacillus bulgaricus*.

Takto připravené zákvasy byly použity k zaočkování následujícího přípravku:

složení pro 1 litr:

99 % mléka
0, 1 nebo 2 g/l glukózy
hydratace: 10 minut
pasterizace: 10 minut při 95°C

Mléko pak bylo ochlazeno na 44°C a zaočkováno na 1%.

Složení zákvasu a množství přidané glukózy je pro každý pokus uvedeno níže v Tabulce II.

Tabulka II

pokus	glukóza (g/l)	kmeny	procenta
1	0	ST3	64 %
		ST2	16 %
		LbS	20 %
2	0	ST3	64 %
		ST2	16 %
		I-1968	20 %
3	1	ST3	64 %
		ST2	16 %
		I-1968	20 %
4	0	ST1	80 %
		LbS	20 %
5	0	ST1	80 %
		I-1968	20 %
6	2	ST1	80 %
		I-1968	20 %

Po zaočkování bylo mléko umístěno do baněk s kulatým dnem a inkubováno při teplotě 44°C. Během inkubace byl monitorován profil okyselování. Výrobky byly při pH 4,6 zachovány nesražené ochlazením v chladicí jednotce (16 hodin při 4°C).

Poté byly výrobky podrobeny testu uchovávání při 10 °C. V tomto testu byla měřena hodnota pH a Dornicova kyselost po 1, 14, 21 a 28 dnech uchovávání.

Výsledky okyselování (doba k dosažení pH 4,6 a hodnota pH v čase 24 hodin) jsou uvedeny níže v Tabulce III:

Tabulka III

pokus	doba k dosažení pH 4,6 (min)	doba k dosažení pH 4,5 (min)	pH v čase 24 hodin
1	215	236	3,67
2	550	778	4,33
3	416	507	4,26
4	225	241	3,67
5	660	> 1500	4,54
6	390	465	4,35

Výsledky testu uchovávání při 10 °C (monitorování pH a Dornicovy kyselosti) a testu přežití (populace *S. thermophilus* a *L. bulgaricus*) po 28 dnech jsou uvedeny níže v Tabulce IV:

Tabulka IV

pokus	doba skladování (dny)	pH	Dornicova kyselost	<i>S. thermophilus</i> (buňky/ml)	<i>L. bulgaricus</i> (buňky/ml)
1	1	4,41	101	7,25E+08	3,35E+08
	14	3,98	140	ND	ND
	21	3,95	145	ND	ND
	28	3,9	148	7,35E+08	3,30E+08
2	1	4,5	93	5,60E+08	2,90E+07
	14	4,23	110	ND	ND
	21	4,18	112	ND	ND
	28	4,19	114	5,65E+08	1,87E+07
3	1	4,49	96	6,90E+08	7,45E+07
	14	4,14	115	ND	ND
	21	4,15	117	ND	ND
	28	4,15	120	8,65E+08	6,30E+07
4	1	4,39	105	6,30E+07	4,40E+08
	14	3,91	145	ND	ND
	21	3,9	151	ND	ND
	28	3,85	157	4,70E+08	6,30E+08
5	1	4,6	85	9,05E+08	6,70E+07
	14	4,58	80	ND	ND
	21	4,53	80	ND	ND
	28	4,61	79	9,40E+08	7,00E+07
6	1	4,51	89	1,05E+09	1,96E+08
	14	4,38	90	ND	ND
	21	4,39	96	ND	ND
	28	4,42	90	1,62E+09	1,91E+08

ND = nestanoveno

Tyto výsledky ukazují, že jogurty, vyráběné za použití symbiózy, spojující kmen I-1968 s jedním nebo dvěma kmeny *S. thermophilus*, vykazují výrazně snížené dodatečné okyselování vzhledem ke stejné symbióze s rodičovským kmenem LbS, a současně uchovávají bohatou populaci až do konce kvašení a dobré přežívání po 28 dní při 10° C.

Zastavení okyselování a udržování pH kolem 4,6 až 4,5 po alespoň 24 hodin při 44°C umožňuje, v kontextu výroby míchaného jogurtu, snížit nebo dokonce odstranit běžně používanou fázi ochlazování v tanku.

~~Zastupuje:~~

SEZNAM SEKVENCÍ

12.00.01

<110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE
 GENDRE, François
 BENBADIS, Laurent
 BRIGNON, Pierre

<120> MUTANTNÍ KMENY *LACTOBACILLUS BULGARICUS*
 POSTRÁDAJÍCÍ β -GALAKTOSIDÁZOVOU AKTIVITU

<130> MJPcb191/143

<140>

<141>

<150> FR9806456

<151> 1998-05-22

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5059

<212> DNA

<213> *Lactobacillus bulgaricus*

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(1873)

<220>

<221> CDS

<222> (1877)..(4519)

<400> 1

gcttgtctca cgcttgctgt acgcggccgg tgcctttggc aacgacgtct tctacgcgac 60

tctgtcaacc tactttatcg tcttcgtcac caccacctc tttaatgccg gtgaccacaa 120

g atg atc ttt atc atc acc aac ttg atc acc gcc atc cgg atc ggg gaa 169

Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly Glu
 1 5 10 15

gtc ctg ctc gac ccc ttg atc ggt aac gcc atc gac cgg acc gaa agc 217
 Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu Ser
 20 25 30

cgg tgg ggg aag ttc aag ccc tgg gtt gtg ggc ggg ggg atc atc agc 265
 Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Gly Ile Ile Ser
 35 40 45

tca tta gcc ctc tta gcc ctc ttt acc gac ttt ggc ggc att aac caa 313
 Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln
 50 55 60

agc aac ccc gtt gtt tac tta gta atc ttc ggt att gtt tac ttg att 361
 Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu Ile
 65 70 75 80

atg gat atc ttc tac tca ttt aaa gac act ggc ttc tgg gcc atg atc 409
 Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Lys Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met Ile
 85 90 95

ccg gcc ttg tcc ctg gat tcc cgg gaa aga gag aag acc tcc acc ttc 457
 Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr Phe
 100 105 110

gcc aga gtc ggc tcc acc atc ggg gcc aac ctg gtc ggg gta gtc atc 505
 Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Gly Val Val Ile

120001

115	120	125	
acc cca atc atc ctc ttc ttc tgc gcc agc aag gcc aac ccc aac ggg			553
Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn Gly			
130	135	140	
gat aag cag ggc tgg ttc ttc ttt gcc ttg atc gtg gcc att gtc ggc			601
Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Phe Ala Leu Ile Val Ala Ile Val Gly			
145	150	155	160
atc ttg acc tca att acc gtt ggt ctt ggt act cac gaa gta aaa tcc			649
Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly Leu Gly Thr His Glu Val Lys Ser			
165	170	175	
gcc ctg cgg gaa agc aat gaa aag acc act ttg aag cag gtc ttt aag			697
Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe Lys			
180	185	190	
gtc ctg ggg caa aac gac cag ctc ctc tgg ctg gcc ttt gcc tac tgg			745
Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr Trp			
195	200	205	
ttt tac ggc ctg ggt atc aac acc ctg aac gct ctg caa ctt tac tac			793
Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Tyr			
210	215	220	
ttc tca tac atc tta ggc gat gcc cgc ggc tac agc ctg ctt tac acc			841
Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr			
225	230	235	240
atc aac acc ttt gtc ggt tta atc tct gca tcc ttc ttc cca tca ctg			889
Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser Leu			
245	250	255	
gcc aag aag ttc aac aga aat cgc ctc ttc tac gcc tgc atc gcg gtg			937
Ala Lys Lys Phe Asn Arg Asn Arg Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala Val			
260	265	270	
atg ctg tta ggg atc ggg gtc ttc tcc gtg gcc agc ggt tct ctg gcc			985
Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu Ala			
275	280	285	
ctg tcc ctt gtt ggg gca gaa ttc ttc ttt att ccg cag cct ctg gcc			1033
Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala			
290	295	300	
ttc ctg gtc gtt ttg atg atc atc tct gac gct gtt gaa tac ggc cag			1081
Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln			
305	310	315	320
ctg aaa act ggc cac aga gac gaa gct ttg acc ctg tct gtc cgg cca			1129
Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro			
325	330	335	
ttg gtc gat aag ctg ggc ggg gcc ttg tcc aac tgg ttt gtt tcc ttg			1177
Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu			
340	345	350	
att gcc tta act gcc ggc atg acc act ggg gcg act gcc tca aca att			1225
Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile			
355	360	365	
aca gct cat ggc cag atg gtc ttc aag tta gct atg ttt gcc tta ccg			1273
Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro			
370	375	380	
gca gtc atg ctc ttg atc gct gtt tct att ttc gcc aaa aag gtc ttc			1321
Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe			
385	390	395	400

120001

ttg act gaa gaa aag cac gcg gaa atc gtc gac cag ctg gaa act caa	1369
Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln	
405 410 415	
ttc agc caa agc cat gcc caa aag ccg gcg caa gct gaa agc ttc act	1417
Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr	
420 425 430	
ttg gcc agc cca gtc tcc gga caa tta atg aac ctg gac atg gtt gac	1465
Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp	
435 440 445	
gac ccg gtc ttt gcc gac aaa aag tta ggc gac gcc ttt gcc ctg gtg	1513
Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val	
450 455 460	
cca gca gac ggt aag gtc tac gcg cca ttt gcc ggt act gtc cgc cag	1561
Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln	
465 470 475 480	
ctg gcc aag acc cgg cac tcg atc gtc ctg gaa aat gaa cat ggg gtc	1609
Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val	
485 490 495	
ttg gtc ttg att cac ott ggc ctg ggc acg gtc aaa tta aac ggg act	1657
Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr	
500 505 510	
ggc ttt gtc agc tat gtt gaa gag ggc agc cag gta gaa gcc ggc cag	1705
Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln	
515 520 525	
cag atc ctg gaa ttc tgg gac ccg gcg atc aag cag gcc aag ctg gac	1753
Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp	
530 535 540	
gac acg gta atc gtg acc gtc atc aac agc gaa act ttc gca aat agc	1801
Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser	
545 550 555 560	
cag atg ctc ttg ccg atc ggc cac agc gtc caa gcc ctg gat gat gta	1849
Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val	
565 570 575	
ttc aag tta gaa ggg aag aat tag aaa atg agc aat aag tta gta aaa	1897
Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn Met Ser Asn Lys Leu Val Lys	
580 585 590	
gaa aaa aga gtt gac cag gca gac ttg gcc tgg ctg act gac ccg gaa	1945
Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu	
595 600 605	
gtt tac gaa gtc aat aca att ccc ccg cac tcc gac cat gag tcc ttc	1993
Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro His Ser Asp His Glu Ser Phe	
610 615 620	
caa agc cag gaa gaa ctg gag gag ggc aag tcc agt tta gtg cag tcc	2041
Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser	
625 630 635	
ctg gac ggg gac tgg ctg att gac tac gct gaa aac ggc cag gga cca	2089
Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro	
640 645 650 655	
gtc aac ttc tat gca gaa gac ttt gac gat agc aat ttt aag tca gtc	2137
Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp Ser Ser Asn Phe Lys Ser Val	
660 665 670	
aaa gta ccc ggc aac ctg gaa ctg caa ggc ttt ggc cag ccc cag tat	2185
Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr	

120201

675

680

685

gtc aac gtc caa tat cca tgg gac ggc agt gag gag att ttc ccg ccc	2233
Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro	
690 695 700	
caa att cca agc aaa aat ccg ctc gct tct tat gtc aga tac ttt gac	2281
Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp	
705 710 715	
ctg gat gaa gct ttc tgg gac aag gaa gtc agc ttg aag ttt gac ggg	2329
Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly	
720 725 730 735	
gcg gca aca gcc atc tat gtc tgg ctg aac ggc cac ttc gtc ggc tac	2377
Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly His Phe Val Gly Tyr	
740 745 750	
ggg gaa gac tcc ttt acc cca agc gag ttt atg gtt acc aag ttc ctc	2425
Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Met Val Thr Lys Phe Leu	
755 760 765	
aag aaa gaa aat aac cgc ctg gca gtg gct ctc tac aag tat tct tcc	2473
Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser	
770 775 780	
gcc tcc tgg ctg gaa gac cag gac ttc tgg cgc atg tct ggt ttg ttc	2521
Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe	
785 790 795	
aga tca gtg act ctt cag gcc aag ccg cgt ctg cac ttg gag gac ctt	2569
Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro Arg Leu His Leu Glu Asp Leu	
800 805 810 815	
aag ctt acg gcc agc ttg acc gat aac tac caa aaa gga aag ctg gaa	2617
Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu	
820 825 830	
gtc gaa gcc aat att gcc tac cgc ttg cca aat gcc agc ttt aag ctg	2665
Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu	
835 840 845	
gaa gtg cgg gat agt gaa ggt gac ttg gtt gct gaa aag ctg ggc cca	2713
Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro	
850 855 860	
atc aga agc gag cag ctg gaa ttc act ctg gct gat ttg cca gta gct	2761
Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala	
865 870 875	
gcc tgg agc gcg gaa aag cct aac ctt tac cag gtc cgc ctg tat tta	2809
Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu	
880 885 890 895	
tac cag gca ggc agc ctc tta gag gtt agc cgg cag gaa gtg ggt ttc	2857
Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe	
900 905 910	
cgc aac ttt gaa cta aaa gac ggg att atg tac ctt aac ggc cag cgg	2905
Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg	
915 920 925	
atc gtc ttc aag ggg gcc aac cgg cac gaa ttt gac agt aag ttg ggc	2953
Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly	
930 935 940	
cgg gct atc aca gaa gag gat atg atc tgg gat atc aag acc atg aag	3001
Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys	
945 950 955	

120001

cga agc aac atc aat gct gtc cgc tgc tct cac tac ccg aac cag tcc 3049
 Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser 975
 960 965 970

ctc ttt tac cgg ctc tgt gac aag tac ggc ctt tac gtc att gat gaa 3097
 Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu 990
 980 985

gct aac ctg gaa agc cac ggc acc tgg gaa aaa gtg ggg ggg cac gaa 3145
 Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His Glu 1005
 995 1000

gat cct agc ttc aat gtt cca ggc gat gac cag cat tgg ctg gga gcc 3193
 Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly Ala 1020
 1010 1015

agc tta tcc cgg gtg aag aac atg atg gct cgg gac aag aac cat gct 3241
 Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His Ala 1035
 1025 1030

tca atc ctg atc tgg tct tta ggc aat gag tct tac gcc ggc act gtc 3289
 Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val 1055
 1040 1045 1050

ttt gcc caa atg gct gat tac gtc cgg aag gct gat ccg acc cgg gtt 3337
 Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val 1070
 1060 1065

cag cac tat gaa ggg gtg acc cac aac cgg aag ttt gac gac gcc acc 3385
 Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr 1085
 1075 1080

cag att gaa agc cgg atg tat gct ccg gcc aag gta att gaa gaa tac 3433
 Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr 1100
 1090 1095

ttg acc aat aaa cca gcc aag cca ttt atc tca gtt gaa tac gct cac 3481
 Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala His 1115
 1105 1110

gcc atg ggc aac tcc gtc ggt gac ctg gcc gcc tac acg gcc ctg gaa 3529
 Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu 1135
 1120 1125 1130

aaa tac ccc cac tac cag ggc ggc ttc atc tgg gac tgg att gac caa 3577
 Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln 1150
 1140 1145

gga ctg gaa aaa gac ggg cac ctg ctt tat ggg ggc gac ttc gat gac 3625
 Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp 1165
 1155 1160

cgg cca acc gac tat gaa ttc tgc ggg aac ggc ctg gtc ttt gct gac 3673
 Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp 1180
 1170 1175

cgg act gaa tcg ccg aaa ctg gct aat gtc aag gcc ctt tac gcc aac 3721
 Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn 1195
 1185 1190

ctt aag tta gaa gta aaa gat ggg cag ctc ttc ctc aaa aac gac aat 3769
 Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn 1215
 1200 1205 1210

tta ttt acc aac agc tca tct tac tac ttc ttg act agt ctt ttg gtc 3817
 Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val 1230
 1220 1225

gat ggc aag ttg acc tac cag agc cgg cct ctg acc ttt ggc ctg gag 3865
 Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu

10001

1235	1240	1245	
cct ggc gaa tcc ggg acc ttt gcc ctg cct tgg ccg gaa gtc gct gat			3913
Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp			
1250	1255	1260	
gaa aaa gga gag gtc gtc tac cgg gta acg gcc cac tta aaa gaa gac			3961
Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu Asp			
1265	1270	1275	
ttg cct tgg gcg gat gag ggc ttc act gtg gct gaa gca gaa gaa gta			4009
Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu Val			
1280	1285	1290	1295
gct caa aag ctg ccg gaa ttt aag ccg gaa ggg ccg cca gat tta gtt			4057
Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val			
1300	1305	1310	
gat tcc gac tac aac cta ggc ctg aaa gga aat aac ttc caa att ctc			4105
Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu			
1315	1320	1325	
ttc tcc aag gtc aag ggc tgg ccg gtt tcc ctc aag tat gcc ggt agg			4153
Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg			
1330	1335	1340	
gaa tac ttg aag ccg ctg ccg gaa ttt acc ttc tgg ccg gcc ctg acg			4201
Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr			
1345	1350	1355	
gac aac gac ccg gga gct ggt tac ggc tat gat ctg gcc ccg tgg gaa			4249
Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu			
1360	1365	1370	1375
aat gcc ggc aag tat gcc cgc ttg aaa gac atc agc tgc gag gtc aag			4297
Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys			
1380	1385	1390	
gaa gac tcc gtt ttg gtc aag act gcc ttt acg ttg cct gtc gcc tta			4345
Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu			
1395	1400	1405	
aag ggt gat tta act gtg acc tat gaa gtc gat gga ccg ggc aag att			4393
Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile			
1410	1415	1420	
gct gta aca gct gac ttc cca ggc gcg gaa gaa gcc ggt ctc ttg cca			4441
Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro			
1425	1430	1435	
gcc ttt ggc ttg aac ctg gcc ctg cca aaa gaa ctg acc gat tac cgc			4489
Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg			
1440	1445	1450	1455
tac tat ggt ctg gga cct aat gag agc taa ccagaccgct tggaaggtaa			4539
Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser			
1460	1465		
ttacctgggc atctaccagg gagcggtaaa aaagaacttt agcccatacc tgcgtccgca			4599
ggaaacgggc aaccggagca aggttcgctg gtaccagctc tttgatgaaa agggcggcctt			4659
ggaatttacg gccaatgggg cagacttgaa cttgtctgct ttgccatatt ctgccgccca			4719
aattgaagca gcggaccacg cttttgaact gactaacaat tacacttggg ttagagcctt			4779
aagcgcgccag atgggggtcg gcggggatga ctctggggg cagaaggtec acccggaatt			4839
ctgcctggat gtcaaaaag ccgcgcagct ccgcctggtg attcagcccc ttttactaaa			4899

100201

ataaatgcta caattgactt aacaggatga aatttttagta aaagcaaagc gagtgaggaa 4959
 gatggcaacg atcagagaag tgccaaggca gccggcgtgt cgctagcgac ggtttcccgc 5019
 gtcttgaact atgaccagac cctgtcagtc aatgaggcaa 5059

<210> 2
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus bulgaricus

<400> 2

Met	Ile	Phe	Ile	Ile	Thr	Asn	Leu	Ile	Thr	Ala	Ile	Arg	Ile	Gly	Glu	
1				5					10					15		
Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Ala	Ile	Asp	Arg	Thr	Glu	Ser	
			20					25					30			
Arg	Trp	Gly	Lys	Phe	Lys	Pro	Trp	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Ile	Ile	Ser	
		35					40					45				
Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Gly	Gly	Ile	Asn	Gln	
	50					55					60					
Ser	Asn	Pro	Val	Val	Tyr	Leu	Val	Ile	Phe	Gly	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	
	65				70					75					80	
Met	Asp	Ile	Phe	Tyr	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Gly	Phe	Trp	Ala	Met	Ile	
				85					90					95		
Pro	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	Arg	Glu	Lys	Thr	Ser	Thr	Phe	
			100					105					110			
Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Ala	Asn	Leu	Val	Gly	Val	Val	Ile	
		115					120					125				
Thr	Pro	Ile	Ile	Leu	Phe	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ala	Asn	Pro	Asn	Gly	
	130					135					140					
Asp	Lys	Gln	Gly	Trp	Phe	Phe	Phe	Ala	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Gly	
	145				150					155					160	
Ile	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	His	Glu	Val	Lys	Ser	
				165					170					175		
Ala	Leu	Arg	Glu	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Phe	Lys	
			180					185					190			
Val	Leu	Gly	Gln	Asn	Asp	Gln	Leu	Leu	Trp	Leu	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp	
		195					200					205				
Phe	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Ala	Leu	Gln	Leu	Tyr	Tyr	
	210					215					220					
Phe	Ser	Tyr	Ile	Leu	Gly	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr	
	225				230					235				240		
Ile	Asn	Thr	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Phe	Pro	Ser	Leu	
				245					250					255		
Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Arg	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Val	
			260					265					270			
Met	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Val	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	
		275					280					285				
Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Glu	Phe	Phe	Phe	Ile	Pro	Gln	Pro	Leu	Ala	
						295					300					

120201

Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln
 305 310 315 320

Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro
 325 330 335

Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu
 340 345 350

Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile
 355 360 365

Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro
 370 375 380

Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe
 385 390 395 400

Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln
 405 410 415

Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr
 420 425 430

Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp
 435 440 445

Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val
 450 455 460

Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln
 465 470 475 480

Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val
 485 490 495

Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr
 500 505 510

Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln
 515 520 525

Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp
 530 535 540

Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser
 545 550 555 560

Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val
 565 570 575

Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn
 580

<210> 3
 <211> 880
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus bulgaricus

<400> 3
 Met Ser Asn Lys Leu Val Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro
 20 25 30

His Ser Asp His Glu Ser Phe Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly
 35 40 45

120201

Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr
50 55 60

Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp
65 70 75 80

Asp Ser Asn Phe Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly
100 105 110

Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala
115 120 125

Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu
130 135 140

Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu
145 150 155 160

Asn Gly His Phe Val Gly Tyr Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu
165 170 175

Phe Met Val Thr Lys Phe Leu Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val
180 185 190

Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe
195 200 205

Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro
210 215 220

Arg Leu His Leu Glu Asp Leu Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn
225 230 235 240

Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu
245 250 255

Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu
260 265 270

Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr
275 280 285

Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu
290 295 300

Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val
305 310 315 320

Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile
325 330 335

Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His
340 345 350

Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile
355 360 365

Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys
370 375 380

Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr
385 390 395 400

Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp
405 410 415

Glu Lys Val Gly Gly His Glu Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp

120001

420

425

430

Asp	Gln	His	Trp	Leu	Gly	Ala	Ser	Leu	Ser	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Met
	435						440					445			
Ala	Arg	Asp	Lys	Asn	His	Ala	Ser	Ile	Leu	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn
	450					455					460				
Glu	Ser	Tyr	Ala	Gly	Thr	Val	Phe	Ala	Gln	Met	Ala	Asp	Tyr	Val	Arg
465					470					475					480
Lys	Ala	Asp	Pro	Thr	Arg	Val	Gln	His	Tyr	Glu	Gly	Val	Thr	His	Asn
				485					490					495	
Arg	Lys	Phe	Asp	Asp	Ala	Thr	Gln	Ile	Glu	Ser	Arg	Met	Tyr	Ala	Pro
			500					505					510		
Ala	Lys	Val	Ile	Glu	Glu	Tyr	Leu	Thr	Asn	Lys	Pro	Ala	Lys	Pro	Phe
		515					520					525			
Ile	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	His	Ala	Met	Gly	Asn	Ser	Val	Gly	Asp	Leu
	530					535					540				
Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Gln	Gly	Gly	Phe
545					550					555					560
Ile	Trp	Asp	Trp	Ile	Asp	Gln	Gly	Leu	Glu	Lys	Asp	Gly	His	Leu	Leu
				565					570					575	
Tyr	Gly	Gly	Asp	Phe	Asp	Asp	Arg	Pro	Thr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Cys	Gly
			580					585					590		
Asn	Gly	Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Arg	Thr	Glu	Ser	Pro	Lys	Leu	Ala	Asn
		595					600					605			
Val	Lys	Ala	Leu	Tyr	Ala	Asn	Leu	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Asp	Gly	Gln
	610					615					620				
Leu	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Asn	Leu	Phe	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr
625					630					635					640
Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Gln	Ser	Arg
				645					650					655	
Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu
			660					665					670		
Pro	Trp	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Val	Tyr	Arg	Val
		675					680					685			
Thr	Ala	His	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Pro	Trp	Ala	Asp	Glu	Gly	Phe	Thr
	690					695					700				
Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Pro	Glu	Phe	Lys	Pro
705					710					715					720
Glu	Gly	Arg	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Gly	Leu	Lys
				725					730					735	
Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Ile	Leu	Phe	Ser	Lys	Val	Lys	Gly	Trp	Pro	Val
			740					745					750		
Ser	Leu	Lys	Tyr	Ala	Gly	Arg	Glu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Glu	Phe
		755					760					765			
Thr	Phe	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Asn	Asp	Arg	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gly
		770				775					780				
Tyr	Asp	Leu	Ala	Arg	Trp	Glu	Asn	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ala	Arg	Leu	Lys
785					790					795					800

120001

Asp	Ile	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Ala
				805					810					815	
Phe	Thr	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Thr	Tyr	Glu
			820					825					830		
Val	Asp	Gly	Arg	Gly	Lys	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Asp	Phe	Pro	Gly	Ala
		835					840					845			
Glu	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	Leu	Asn	Leu	Ala	Leu	Pro
		850				855					860				
Lys	Glu	Leu	Thr	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Pro	Asn	Glu	Ser
865					870					875				880	

12.02.01

PV 2000-4359

4286

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mutantní kmen *Lactobacillus bulgaricus* postrádající β -galaktosidázovou aktivitu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nese nonsensní mutaci na alespoň jedné z kódujících sekvencí laktóзовého operonu.

2. Mutantní kmen *Lactobacillus bulgaricus* podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou kódující sekvenci je sekvence, kódující β -galaktosidázu.

3. Mutantní kmen *Lactobacillus bulgaricus* podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že byl uložen 14. ledna 1998 v CNCM, Collection Nationale de Cultures de Mikroorganismes, pod číslem I-1968.

4. Mléčný zákvas, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje alespoň jeden kmen *L. bulgaricus* podle kteréhokoli z nároků 1 až 3.

5. Mléčný zákvas podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený kmen *L. bulgaricus* je spojen s alespoň jedním kmenem *S. thermophilus*.

6. Způsob výroby zakvašeného mléčného výrobku, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje krok, během něhož se mléko kvasí za použití mléčného zákvasu, zahrnujícího alespoň jeden kmen *L. bulgaricus* podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, v přítomnosti alespoň jednoho cukru, který může být asimilován uvedeným kmenem.

7. Způsob výroby podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným cukrem, který může být asimilován, je glukóza.

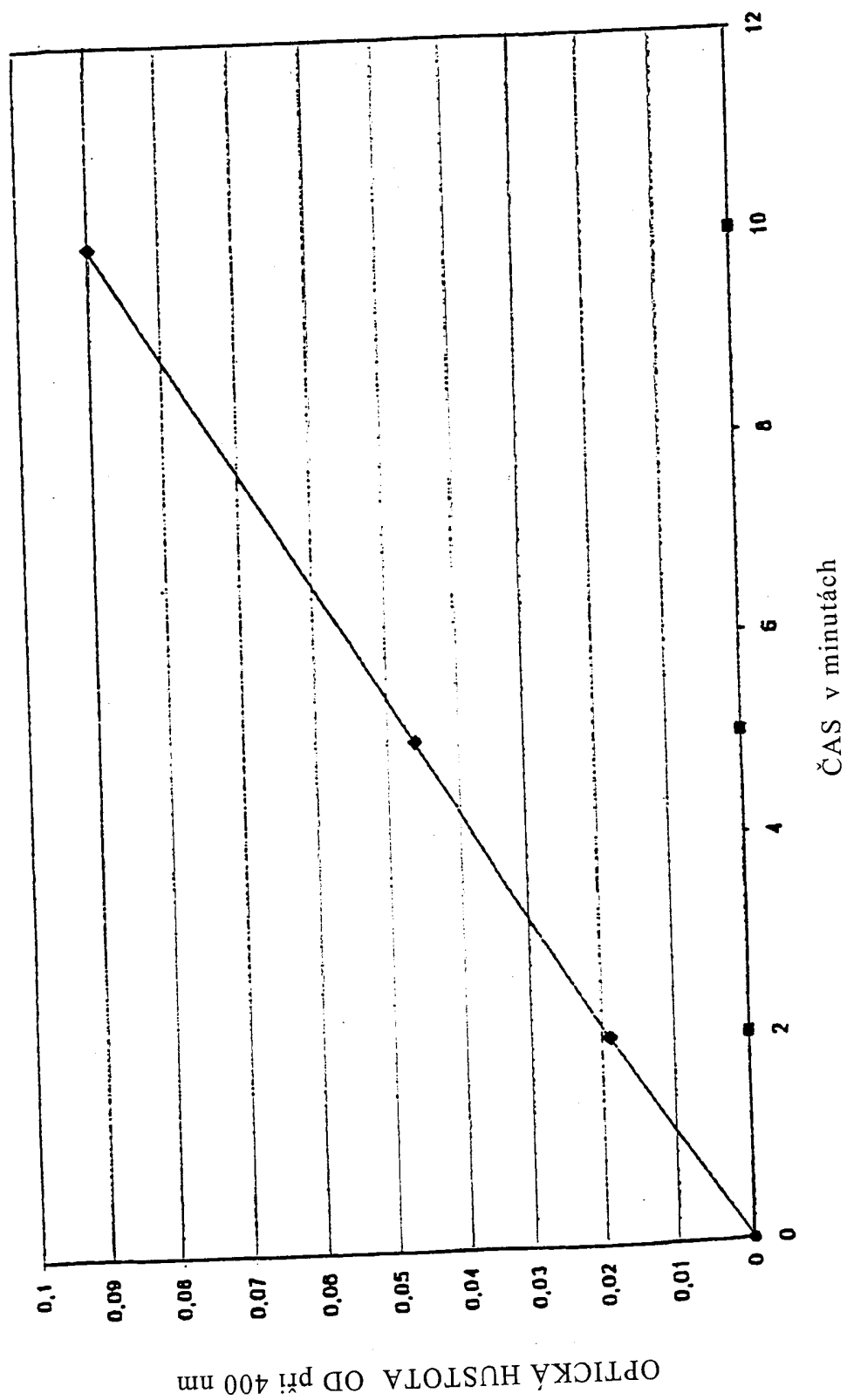
8. Způsob výroby podle kteréhokoli z nároků 6 a 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zastavení kvašení se provádí bez ochlazení uvedeného mléčného výrobku.

9. Zakvašený mléčný výrobek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že může být získán za použití způsobu podle kteréhokoli z nároků 6 až 8.

10. Zakvašený mléčný výrobek podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným výrobkem je jogurt.

Zastupuje:

Obr. 1



—◆— LbS
—■— I-1968

12.02.01

PV 6070-4359

~~11286~~