

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 304 725

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-27**  
(22) Přihlášeno: **15.01.2013**  
(40) Zveřejněno: **10.09.2014**  
**(Věstník č. 37/2014)**  
(47) Uděleno: **30.07.2014**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **10.09.2014**  
**(Věstník č. 37/2014)**

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

(56) Relevantní dokumenty:

CZ 300 143 B6; US 2005095318; US 0 980 859; EP 0 978 481; EP 0 861 905.

(73) Majitel patentu:  
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 vynálezu:

**Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei*  
RIBM 2-107 a jeho použití při výrobě  
nealkoholických a nízkoalkoholických  
nápojů z ovocných a/nebo obilných  
substrátů**

(57) Anotace:

Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107, který fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu, melezitózu, rafinózu a glukonát za vzniku kyseliny mléčné nebo směsi kyseliny mléčné, kyseliny octové a etanolu, a nefermentuje sorbózu, manitol, sorbitol, glycerol a N-acetylglukozamin. 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, rafinóza, arabinóza, xylóza, glukonát, přičemž fermentace probíhá kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2-107, nebo jeho směsí s alespoň jedním jiným kmenem.

CZ 304725 B6

**Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 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 paracasei* RIBM 2–107.

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

Dosavadní stav techniky

15 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. kyseliny citronové, karamelu, přírodních aromat, výluhů bylin, vitamínů, minerálních látek, atd.).

20 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*, *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces bayanus*.

25 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je kmen *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107, což je kmen grampozitivní, fakultativně heterofermentativní mezofilní nesporulující tyčinkovité bakterie, který je charakteristický tím, že fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu melezitózu, rafinózu, arabinózu, xylózu a glukonát, avšak nefermentuje sorbózu, manitol, sorbitol, glycerol a N-acetylglukozamin, a dle použitého kultivačního média a podmínek fermentace je schopný produkovat kyselinu mléčnou nebo směs kyseliny mléčné, kyseliny octové a etanolu.

35 Tento kmen, který se přirozeně vyskytuje v kvašených potravinách, jogurtech, nezpracovaném mléku, ve fermentovaném rostlinném materiálu a např. i lidském zažívacím traktu, se izoloval z keřirových zrn, což jsou, jak je popsáno např. v práci Witthuhn 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, tucích a cukrech. Při izolaci kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 se naočkovalo 0,1 ml homogenátu keřirového zrna ve sterilní destilované vodě na Petriho misku obsahující MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar. Pro inhibici růstu konkurenčních kvasinek a hub přítomných v keřirovém zrně se do tohoto substrátu přidalo antibiotikum cykloheximid (známý také jako aktidion) v koncentraci 25 mg/l, a pro inhibici růstu konkurenčních gramnegativních bakterií  $\beta$ -fenyletanol v konečné koncentraci 0,3 objemových  
45 %. 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 agarů 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  
50 oddělených kolonií. Následná izolace kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 se pak provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující MRS agar.

Izolovaný kmen byl poté charakterizován biochemickými testy a druhově-specifickou PCR.

V dalších variantách je možné pro izolaci tohoto kmene bakterií využít také postup popsany v publikaci Witthuhn 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. Industr. Microbiol. Biotechnol. 28: 1–6, 2002, 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.

Kmen je uložen ve Sbírce mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. – RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem RIBM 2–107.

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 a příchutí. Kromě toho vytváří také malé množství alkoholu – v závislosti na použitém kultivačním substrátu a podmínkách kvašení cca 0,05 až 1 objemové %.

Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 dobře přežívá v běžných tekutých substrátech (např. MRS, YPD, apod.), a to ve zmrazeném stavu, takže je vhodný pro krátkodobé i dlouhodobé skladování.

Pro výrobu nápojů se pak tento kmen bakterií použije s výhodou zejména ve formě bakteriálních koncentrátů, a to buď samostatně nebo ve směsi s jinými kmeny, s výhodou pak např. s kmenem bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2–108 v libovolném poměru.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Příklad 1: Příprava bakteriálního koncentráту

Jako substrát pro pomnožení kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 se použije roztok obsahující alespoň jeden zdroj kvasitelného 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. Pro 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 paracasei* RIBM 2–107, který je možné bez dalšího použít přímo pro výrobu požadovaného nápoje. Přitom se pro fermentaci substrátu použije buď výhradně kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 nebo jeho směs s jinými kmeny, s výhodou pak např. s kmenem bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2–108.

Příklad 2: Příprava nízkoalkoholického jablečného nápoje s použitím kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107

Nízkoalkoholický jablečný nápoj se připravil z 20 litrů jablečného moštu, do kterého se přidal zcentrifugovaný bakteriální koncentrát kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 připravený postupem podle příkladu 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 fermentace přerušila a vytvořený nápoj se pasterizoval, načež se měřilo jeho pH, prokvašení, obsah alkoholu, koncentrace diacetylu, pentandionu, acetaldehydu, kyseliny mléčné, kyseliny jablečné, kyseliny citronové a kyseliny octové. Kromě toho se dále provedlo jeho senzoričké hodnocení degustační komisí. Vybrané parametry takto připraveného nápoje jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Měřený parametr	Hodnota
Alkohol (% obj.)	0,62
Prokvašení (%)	7,65
Extrakt (% hm.)	9,43
pH	3,70
Diacetyl (µg/l)	128
Pentandion (µg/l)	113
Acetaldehyd (mg/l)	7,9
Jablečná kyselina (mg/l)	991,33
Mléčná kyselina (mg/l)	5830,256
Citronová kyselina (mg/l)	366,161
Octová kyselina (mg/l)	352,529

Nápoj nevykazoval žádné senzoričké závady, pouze byla vedle jablečné vůně přítomná také slabá citronová až grepová vůně, která byla vyhodnocena jako osvěžující a příjemná. Celkový subjektivní dojem byl nadprůměrný.

Poté se tento nápoj stočil do lahví, z nichž se část uložila při teplotě 4 °C a část při teplotě 20 °C, přičemž se sledovala jeho trvanlivost, resp. jeho vzhled a chuťové parametry. Nápoj byl stabilní i po 6 měsících skladování při teplotě 20 °C, kdy nedošlo ke změně jeho zbarvení ani jeho senzoričských vlastností.

Vzhledem k tomu, že takto připravený nápoj obsahoval 0,62 objemového % alkoholu, jedná se dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 115/2011 Sb. o nízkoalkoholický nápoj.

Příklad 3: Příprava nealkoholického hroznového nápoje s použitím kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107

- 5 Nápoj se připravil stejně jako v příkladu 2, s tím rozdílem, že místo jablečného moštu se použil hroznový mošt smíchaný v poměru 3:1 s pitnou vodou. Vybrané parametry hotového nápoje jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

10

Měřený parametr	Hodnota
Alkohol (% obj.)	0,12
Prokvašení (%)	6,50
Extrakt (% hm.)	8,12
pH	3,75
Diacetyl (µg/l)	92
Pentandion (µg/l)	80

Nápoj nevykazoval žádné senzorické závady, byl vyhodnocen jako osvěžující s příjemnou ovocnou vůní. Celkový subjektivní dojem byl nadprůměrný.

15

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

20

Vzhledem k tomu, že takto připravený nápoj obsahoval 0,12 objemového % alkoholu, jedná se dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 115/2011 Sb. o nealkoholický nápoj.

25

Příklad 4: Příprava nealkoholického ovocného nápoje se sladovou příchutí s použitím kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 v kombinaci s kmenem bakterií *Lactobacillus sp.* RIBM 2–108

30

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 paracasei* RIBM 2–107 a 1,5 g kultury *Lactobacillus sp.* RIBM 2–108 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 3.

Tabulka 3

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

5

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

10

Nápoj byl stabilní i po 6 měsících skladování při teplotě 20 °C, kdy 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.

15

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 paracasei* RIBM 2–107 nebo jeho směsi s jiným kmenem na 1 litr substrátu.

20

## PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107, který fermentuje glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu, galaktózu, melezitózu, rafinózu, arabinózu, xylózu a glukonát za vzniku kyseliny mléčné nebo směsi kyseliny mléčné, kyseliny octové a etanolu, a nefermentuje sorbózu, manitol, sorbitol, glycerol a N-acetylglukozamin.

30

2. 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, rafinóza, arabinóza, xylóza, glukonát, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že fermentace probíhá kmenem bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 podle nároku 1.

35

3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že fermentace probíhá směsí alespoň dvou kmenů bakterií, z nichž jeden je kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 podle nároku 1.

4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že fermentace probíhá směsí kmene bakterií *Lactobacillus paracasei* RIBM 2–107 podle nároku 1 a kmene bakterií *Lactobacillus* sp. RIBM 2–108.

5

---

Konec dokumentu

---

10