



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95443** (13) **C2**  
(51) **МПК**  
**C12N 1/38 (2006.01)**  
**C12N 1/20 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

1

2

(21) a200708976  
(22) 05.01.2006  
(24) 10.08.2011  
(86) PCT/DK2006/050001, 05.01.2006  
(31) 60/641,133  
(32) 05.01.2005  
(33) US  
(31) PA 2005 00020  
(32) 05.01.2005  
(33) DK  
(31) PA 2005 01259  
(32) 09.09.2005  
(33) DK  
(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.  
(72) КРІНГЕЛУМ БЕРГЕ ВІНДЕЛЬ, DK, СЕРЕНСЕН  
НІЛЬС МАРТІН, DK, ГАРРІГ КРІСТЕЛЬ, DK, ПЕ-  
ДЕРСЕН МАРТІН Б., DK, ГРЕН СУСАННЕ, DK  
(73) КР. ХАНСЕН А/С, DK  
(56) EP A 1038951, 27.09.2000  
EP A1 1048215, 02.11.2000  
WO A 00/05342, 03.02.2000  
WO A2 00/39281, 06.07.2000  
WO A2 01/52668, 26.07.2001  
EP A 1493806, 05.01.2005  
STOKES J. L.: "Substitution of Thymine for "Folic  
Acid" in the Nutrition of Lactic Acid Bacteria" JOURNAL  
OF BACTERIOLOGY, vol.48, no.2, August 1944,  
pages 201-209, XP002408510  
SNELL E. E. ET AL.: "Purine and Pyrimidine as  
Growth Substances for Lactic Acid Bacteria"  
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF  
SCIENCES OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA, vol.27, no.1, 15.01.1941, pages 1-7,  
XP002408511  
NYGAARD A. P. ET AL.: "Nutrition studies of two  
variants of Lactobacillus gayoni" JOURNAL OF  
BACTERIOLOGY, vol.61, no.4, April 1951, pages  
497-505, XP002408512  
WEINMAN D. E. ET AL.: "Unidentified growth factor  
for a lactic acid bacterium" JOURNAL OF  
BACTERIOLOGY, vol. 87, February 1964, pages  
263-269, XP002408513  
(57) 1. Спосіб отримання культур молочнокислих  
бактерій, ферментованих при аерації, де згаданий  
спосіб включає стадії:  
і) культивування молочнокислих бактерій в культу-  
ральному середовищі, що включає:

щонайменше один агент, який підвищує вихід, ви-  
браний з групи, яка містить пуринову основу, піри-  
мідінову основу, нуклеозид, нуклеотид і їх похідні,  
в концентрації, яка забезпечує вміст в культураль-  
ному середовищі щонайменше 1 мкМ вказаного  
щонайменше одного агента, що підвищує вихід,  
при завершенні ферментації; і  
щонайменше одну порфінову сполуку;  
і  
іі) збір вказаних молочнокислих бактерій для  
отримання культури молочнокислих бактерій,  
де агент, який підвищує вихід, приводить до під-  
вищеного виходу зібраних молочнокислих бактерій  
в порівнянні з культивуванням мікроорганізму в  
ідентичних умовах і в схожому середовищі, яке  
містить менше ніж 1 мкМ кожного агента, що під-  
вищує вихід, при завершенні ферментації.  
2. Спосіб за п. 1, в якому вказане культуральне  
середовище початково містить щонайменше 1 мМ  
щонайменше одного агента, що підвищує вихід,  
вибраного з групи, яка містить одну або більше  
сполук, залучених до біосинтезу нуклеїнових кис-  
лот, або одне або більше похідних будь-якої з та-  
ких сполук.  
3. Спосіб за п. 1, в якому вказане культуральне  
середовище являє собою комплексне середовище  
ферментації, до якого додано щонайменше 0,2 г  
на л щонайменше одного агента, що підвищує  
вихід.  
4. Спосіб за п. 1, в якому вказаний щонайменше  
один агент, який підвищує вихід, додається в ході  
ферментації.  
5. Спосіб за п. 1, в якому вказані умови високої  
оптичної густини характеризуються OD<sub>600</sub> вище 15  
при завершенні ферментації.  
6. Спосіб за п. 1, в якому вказаний підвищений  
вихід підвищений щонайменше в 1,2 разу.  
7. Спосіб за п. 1, в якому вказаний агент, який під-  
вищує вихід, вибраний з групи, яка містить пури-  
нову основу, піримідинову основу, нуклеозид, нук-  
леотид і їх похідні.  
8. Спосіб за п. 7, в якому вказаний агент, який під-  
вищує вихід, являє собою пуринову основу, і пури-  
нова основа, переважно, вибрана з групи, яка міс-  
тить аденін, гуанін, ксантин і гіпоксантин.  
9. Спосіб за п. 7, в якому вказаний агент, який під-  
вищує вихід, являє собою піримідинову основу.

(13) **C2**

(11) **95443**

(19) **UA**

10. Спосіб за п. 9, в якому вказана піримідинова основа вибрана з групи, яка містить цитозин, тимін і урацил.

11. Спосіб за п. 1, в якому вказаний агент, який підвищує вихід, являє собою нуклеозид.

12. Спосіб за п. 11, в якому вказаний нуклеозид вибраний з групи, яка містить аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, інозин, дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимідин, дезоксицитидин і дезоксиінозин.

13. Спосіб за п. 12, в якому вказаний нуклеозид вибраний з групи, яка містить аденозин, гуанозин, уридин, цитидин і інозин.

14. Спосіб за п. 13, в якому вказаний нуклеозид являє собою інозин.

15. Спосіб за п. 1, в якому вказаний агент, який підвищує вихід, являє собою нуклеотид.

16. Спосіб за п. 15, в якому вказаний нуклеотид вибраний з групи, яка містить аденілат (АМФ), гуанілат (ГМФ), уридилат (УМФ), цитидилат (ЦМФ), ксантилат (КМФ), інозинат (ІМФ), дезоксиаденілат (дАМФ), дезоксигуанілат (дГМФ), дезокситимідилат (дТМФ), дезоксицитидилат (дЦМФ), дезоксиксантилат (дКМФ) і дезоксиінозинат (дІМФ).

17. Спосіб за п. 16, в якому вказаний нуклеотид вибраний з групи, яка містить АМФ, ГМФ, УМФ, ЦМФ, КМФ і ІМФ.

18. Спосіб за п. 17, в якому вказаний нуклеотид являє собою ІМФ.

19. Спосіб за п. 1, в якому вказане культуральне середовище містить щонайменше два агенти, що підвищують вихід, вибраних з групи, яка містить пуринову основу, піримідинову основу, нуклеозид, нуклеотид і їх похідні.

20. Спосіб за п. 19, в якому вказане культуральне середовище містить щонайменше два агенти, що підвищують вихід, вибраних з групи, яка містить нуклеозид і нуклеотид.

21. Спосіб за п. 20, в якому вказаний нуклеозид являє собою інозин, а згаданий нуклеотид являє собою ІМФ.

22. Спосіб за п. 1, в якому вказане культуральне середовище початково містить від 1 до 70 мМ кожного з агентів, що підвищують вихід.

23. Спосіб за п. 22, в якому вказане культуральне середовище початково містить від 1 до 60 мМ кожного з агентів, що підвищують вихід, зокрема, від 1,3 до 60 мМ, наприклад, від 1,5 до 50 мМ, переважно - від 2 до 40 мМ, зокрема, від 2,5 до 30 мМ, наприклад, від 3 до 20 мМ, більш переважно - від 3 до 15 мМ, зокрема, від 4 до 10 мМ, наприклад, близько 7 мМ.

24. Спосіб за п. 1, в якому  $OD_{600}$  культурального середовища досягає  $OD$  від  $OD_{600}=10$  до  $OD_{600}=200$ , більш переважно -  $OD$  від  $OD_{600}=15$  до  $OD_{600}=100$ , а найбільш переважно -  $OD$  від  $OD_{600}=20$  до  $OD_{600}=80$ .

25. Спосіб за п. 1, в якому культивування виконують в ферментері великого об'єму, що містить від 5 л до 100000 л культурального середовища, переважно від 300 л до 20000 л культурального середовища.

26. Спосіб за п. 1, в якому культивування включає в себе контроль температури і/або pH.

27. Спосіб за п. 1, в якому культура містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка містить *Bifidobacterium spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, включаючи в себе *Lactococcus lactis* підвид *lactis* і *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Lactobacillus spp.*, включаючи в себе *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* і *Oenococcus spp.*

28. Спосіб за п. 1, в якому культура містить один або більше мезофільних організмів, що мають температурний оптимум зростання при більш ніж 30 °C.

29. Спосіб за п. 1, в якому культура містить один або більше мезофільних організмів, вибраних з групи, яка містить *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* підвид *lactis* біовар *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* підвид *casei* і *Lactobacillus paracasei* підвид *paracasei*.

30. Спосіб за п. 1, в якому культура містить один або більше термофільних організмів, що мають температурний оптимум зростання при від близько 40 °C до близько 45 °C.

31. Спосіб за п. 1, в якому культура містить один або більше термофільних організмів, вибраних з групи, яка містить *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *bulgaricus* і *Lactobacillus acidophilus*.

32. Спосіб за п. 1, в якому культура являє собою LD-культуру, яка містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка містить *Lactococcus lactis* підвид *lactis*, *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Lactococcus lactis* підвид *lactis* біовар *diacetylactis* і *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris*.

33. Спосіб за п. 1, в якому культура являє собою О-культуру, яка містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка містить *Lactococcus lactis* підвид *lactis* і *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*.

34. Спосіб за п. 1, в якому культура являє собою культуру, що містить *Lactococcus lactis*.

35. Спосіб за п. 1, де вказаний спосіб додатково включає:

iii) заморожування вказаного зібраного мікроорганізму для отримання заморожених мікробних клітин.

36. Спосіб за п. 35, де вказаний спосіб додатково включає:

iv) сублимацію води з вказаних клітин для отримання заморожених-висушених клітин.

37. Спосіб за п. 35 або 36, де вказаний спосіб додатково включає:

v) упакування вказаних клітин, отриманих на стадії iii) або iv).

38. Спосіб за п. 34, в якому до зібраних мікроорганізмів доданий щонайменше один криопротектор.

Даний винахід належить до галузі мікробних стартових культур. Більш конкретно, даний винахід представляє спосіб приготування стартових культур молочнокислих бактерій (LAB), в якому молочнокислі бактерії інокуються в культуральне середовище, що містить щонайменше один агент, який збільшує вихід, вибраний з групи, яка містить одну або більше сполук (сполук), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот, або одне або більше похідне (похідних) якої-небудь з таких сполук. Такі стартові культури застосовні у виробництві харчових, кормових і фармацевтичних продуктів.

Мікробні культури широко використовуються в харчовій, кормовій і фармацевтичній промисловості у виробництві ферментованих продуктів, що включають в себе більшість молочних продуктів, таких як сир, йогурт і масло, але також і м'ясні, хлібобулочні, винні і овочеві продукти. Крім того, мікробні культури також застосовують для отримання білків, що включають в себе ферменти і різні види корисних сполук. Такі мікробні культури звичайно позначаються як стартові культури і виробляються на фабриках по промислового розмноженню і розповсюджуються в ферментаційній промисловості, такій як молочні фабрики, де стартова культура використовується у відповідних виробничих процесах. Зокрема, культури молочнокислих бактерій широко використовуються як стартові культури.

Так, як це використовується в даному документі, термін «молочнокисла бактерія» (LAB) означає грам-позитивну, мікроаерофілну або анаеробну бактерію, яка ферментує цукри з утворенням кислот, що включають в себе молочну кислоту (як головним чином кислоту, що утворюється), оцтову кислоту і пропіонову кислоту. Найбільш використовувані в промисловості молочнокислі бактерії включають в себе *Lactococcus species* (spp.), *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. і *Propionibacterium* spp. Додатково, бактерії, які продукують молочну кислоту і належать до групи суворого анаеробних бактерій, *bifidobacteria*, тобто *Bifidobacterium* spp., які часто використовуються як стартові культури окремо або в комбінації з молочнокислими бактеріями, загалом включаються в групу молочнокислих бактерій. Навіть певні бактерії видів *Staphylococcus* (наприклад: *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* і *S. xylosus*) належать до LAB (Mogensen et al. (2002) Bulletin of the IDF No. 377, 10-19).

Виробництво стартових культур LAB залучає інокуляцію клітин LAB до специфічного ферментаційного середовища з відповідним числом клітин, які розмножуються при відповідних умовах ферментації. У промислових установках великі зусилля прикладаються до того, щоб добитися високої концентрації клітин, які розмножуються до закінчення процесу ферментації. Це робить важкими вимоги до умов ферментації і середовища ферментації, які повинні підтримувати зростання клітин з метою отримати бажаний високий вихід біомаси.

Оптична густина рідкого середовища при 600 нм ( $OD_{600}$ ) є точним засобом оцінки густини бактерійних клітин в зразку культури. Терміном «умови високої оптичної густини» позначаються ферментації, які характеризуються достатньо високою концентрацією клітин, що розмножуються, яка дає  $OD_{600}$ , що дорівнює 10 або більше в кінці процесу ферментації.

Щоб підтримувати низьку вартість, промислові ферментації звичайно, проводяться з використанням комплексних середовищ ферментації несуворо визначеного складу. Основними компонентами таких середовищ можуть бути екстракт дріжджів, кукурудзяний крохмаль, сироватковий білок або інші середовища, основані на молоці, які всі мають складний склад. Для деяких ферментацій використовують середовища хімічно визначеного складу, які часто виготовляють з хімічно чистих речовин. Хімічно чисті речовини, такі як специфічні джерела енергії або джерела вуглецю, також часто додають в комплексні середовища ферментації для специфічних цілей. У будь-якому випадку, композиція середовища ферментації може бути оптимальною для життєздатності мікробних клітин, але не оптимальною для отримання великого виходу біомаси мікроорганізмів.

Більшість сполук, які потрібні для клітинного зростання, для своєї продукції вимагають енергії. Часто потрібно, щоб експресувались гени, які кодують відповідні біосинтетичні ферменти. Синтез таких ферментів потрібен і для енергії амінокислот. Це накладає на клітину «білковий тягар», оскільки вона повинна синтезувати відносно велику кількість ферментів для того, щоб мати можливість зростання. Попередники, що вимагаються для утворення клітинних компонентів, крім того, повинні братися з інших шляхів, що знов-таки веде до додаткового навантаження на клітину.

Було виявлено, що певні сполуки, залучені до біосинтезу нуклеїнових кислот, діють як так звані кріопротекторні агенти і зменшують ушкоджуючі ефекти на життєздатність живих клітин при процедурах заморожування і відтавання. WO 00/39281 описує використання інозинату (ІМФ) і інших сполук, залучених до біосинтезу ДНК, для стабілізації метаболічної активності рідкої стартової культури, при зберіганні.

Добре відомо, що LAB має складні вимоги до факторів росту і що сполуки, залучені до біосинтезу ДНК і/або РНК, стимулюють ріст LAB в хімічно визначених середовищах. Однак деякі повідомлення показують, що хоч додання таких сполук приводить до укорочення лаг-фази або більш високої первинної швидкості зростання, додання не приводить до підвищення виходу або приводить до лише слабого підвищення виходу (Klisterup (2005) FEMS Microbiol Rev. 29, 555-590; Nygaard (1951) J Bact 61, 497-505; Weinman (1964) J Bact 87, 263-269). Додання сполук, залучених до біосинтезу ДНК, можуть навіть інгібувати вихід (Weinman (1964) J Bact 87, 263-269).

Як проілюстровано в Прикладах 3 і 4, додання додаткових сполук, залучених до біосинтезу ДНК,

також не збільшує вихід біомаси після ферментації, виконаної в умовах високої оптичної густини.

Відповідно, існує необхідність отримання нових підходів до підвищення виходу мікробної біомаси при ферментації в умовах високої оптичної густини.

Проблема, яку повинен вирішити даний винахід, полягає в отриманні способу приготування мікробної культури LAB для отримання підвищеного виходу в умовах високої оптичної густини.

У 1936 р. Richardson (Biochem J. 30, 2186) повідомив, що урацил є істотним для анаеробного *Staphylococcus*, але не для аеробного зростання того ж самого організму. Таким чином, було дивно виявити, що можна збільшити вихід біомаси при аеробному культивуванні або продукуванні стартової культури LAB шляхом додання сполуки, залученої до біосинтезу нуклеїнових кислот, до комплексного середовища ферментації.

Відповідно, перший аспект даного винаходу належить до способу отримання підвищеного виходу культури молочнокислих бактерій, ферментованої при аерації і в умовах високої оптичної густини, де згаданий спосіб включає стадії:

i) культивування молочнокислих бактерій в культуральному середовищі і в умовах, які дозволяють протікати ферментації при виміряній на 600 нм ( $OD_{600}$ ) оптичній густині вище 10, де вказане культуральне середовище включає щонайменше один агент, який збільшує вихід, вибраний з групи, яка складається з пуринової основи, піримідинової основи, нуклеозиду, нуклеотиду і їх похідних в концентрації, яка забезпечує те, що культуральне середовище містить щонайменше 1 мкМ вказаного щонайменше одного агента, що підвищує вихід, при завершенні ферментації; і

ii) збір вказаних молочнокислих бактерій для отримання культури молочнокислих-бактерій, де агент, який підвищує вихід, приводить до підвищення виходу зібраних молочнокислих бактерій в порівнянні з культивуванням мікроорганізму при ідентичних умовах і в схожому середовищі, яке містить менше ніж 1 мкМ кожного агента, що підвищує вихід, при завершенні ферментації.

Переважно, вказане культуральне середовище містить щонайменше 5 мкМ щонайменше одного агента, що підвищує вихід, зокрема щонайменше 10 мкМ, наприклад щонайменше 50 мкМ щонайменше одного агента, що підвищує вихід. Зокрема, вказане культуральне середовище містить щонайменше 5 мкМ агента (агентів), які вибрані з групи ІМФ, ГМФ, інозину і гуаніну.

Переважно, вказане схоже середовище містить менше ніж 5 мкМ кожного агента, що підвищує вихід, зокрема, менше ніж 1 мкМ, наприклад, менше ніж 0,5 мкМ кожного агента, що підвищує вихід. Зокрема, згадане схоже середовище містить менше ніж 5 мкМ агента (агентів), який (які) вибрані з групи ІМФ, ГМФ, інозину і гуаніну.

Другий аспект даного винаходу належить до стартової культури, яка може бути отримана способом відповідно до першого аспекту даного винаходу і варіантів його реалізації, як описано в даному документі.

Третій аспект даного винаходу належить до культурального середовища, яке містить щонайменше один агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка містить пуринову основу, піримідинову основу, нуклеозид, нуклеотид і їх похідні.

Четвертий аспект даного винаходу належить до способу виготовлення харчового продукту, кормового продукту, фармацевтичного продукту, продукту з молочним смаком і продукту зі смаком сиру, де вказаний спосіб включає додання ефективною кількості мікробної стартової культури відповідно до другого аспекту даного винаходу і варіантів його реалізації, як описано в даному документі, в вихідний матеріал харчових, кормових і фармацевтичних продуктів і підтримці таким чином інокульованого вихідного матеріалу в умовах, в яких мікроорганізм є метаболічно активним.

П'ятий аспект даного винаходу, належить до ферментованих харчових, кормових або фармацевтичних продуктів, які можуть бути отримані способом за четвертим аспектом даного винаходу і варіантів його реалізації, як описано в даному документі.

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Перед обговоренням докладних варіантів реалізації даного винаходу надані наступні визначення специфічних термінів, використаних в даному документі.

У даному документі термін «пуринову основа» призначений охоплювати циклічні азотвмісні основи, які мають основну структуру пурину. Таким чином, в даному контексті термін «пуринова основа» призначений означати можливо заміщений пурин. Конкретні приклади пуринових основ включають в себе аденін, гуанін, ксантин і гіпоксантин.

Аналогічним чином, термін «піримідинова основа» призначений охоплювати циклічні азотвмісні основи, що мають основну структуру піримідину. Таким чином, в даному контексті термін «піримідинова основа» призначений позначати можливо заміщений піримідин. Конкретні приклади піримідинових основ включають в себе цитозин, тимін і урацил.

У даному контексті термін «нуклеотид» означає мономер 2-дезоксирибози (в ДНК) або мономер рибози (в РНК), який пов'язаний через свій атом вуглецю в першому положенні з пуриною основою, такою як аденін, гуанін, ксантин або гіпоксантин, або який пов'язаний через свій атом вуглецю в першому положенні з піримідиною основою, такою як цитозин, тимін або урацил. Далі, мономер ДНК або РНК пов'язаний через свій атом вуглецю в п'ятому положенні з фосфатною групою. Конкретні приклади нуклеотидів включають в себе аденозин монофосфат (АМФ), гуанозин монофосфат (ГМФ), уридин монофосфат (УМФ), цитидин монофосфат (ЦМФ), ксантин монофосфат (КМФ), інозин монофосфат (ІМФ), дезоксиденозин монофосфат (дАМФ), дезоксигуанозин монофосфат (дГМФ), тимідин монофосфат (дТМФ), дезоксицитидин монофосфат (дЦМФ), дезокси-ксантин монофосфат (дКМФ) і дезоксиінозин монофосфат (дІМФ). ІМФ є особливо переважним.

Використання в даному документі терміну «нуклеозид» призначено позначати мономер 2-

дезоксирибози (в ДНК) або мономер рибози (в РНК), який пов'язаний через свій атом вуглецю в першому положенні з гуриновою основою, такою як аденін, гуанін, ксантин або гіпоксантин, або який пов'язаний через свій атом вуглецю в першому положенні з піримідиновим основою, такою як цитозин, тимін або урацил. Конкретні приклади нуклеозидів включають в себе аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, інозин, дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимідин, дезоксцитидин і дезоксиінозин. Інозин є особливо переважним.

З вищенаведених визначень термінів «нуклеозид» і «нуклеотид» зрозуміло, що нуклеотид можна розглядати як нуклеозид, що містить фосфатну групу, пов'язану через атом вуглецю в п'ятому положенні залишку цукру. Відповідно, нуклеотиди, описані в даному документі, також можуть згадуватися як «нуклеозид»-5'-монофосфат. Наприклад, інозинат (ІМФ) може згадуватися як інозин-5'-монофосфат, дезоксиінозинат (дІМФ) може згадуватися як дезоксиінозин-5'-монофосфат і т. д.

У даному контексті термін «похідне», коли він використовується в зв'язку з термінами «нуклеотид» або «нуклеозид», призначений означати, що нуклеотид, який розглядається, або нуклеозид модифікований в своєму цукровому залишку (тобто 2-дезоксирибозі або рибозі), або що нуклеотид, що розглядається, або нуклеозид модифікований в своїй циклічній азотвмісній основі, або що нуклеотид, який розглядається, або нуклеозид модифікований і в цукровому залишку, і в своїй, циклічній азотвмісній основі. Наприклад, 2'-Н група дезоксирибозного залишку або 2'-ОН група рибозного залишку можуть бути модифіковані, наприклад, шляхом включення в себе 2'-F групи, 2'-О-метильної групи і подібних до них. Аналогічно, циклічна азотвмісна основа може містити один або більше замісників, звичайно не присутніх в аденіні, гуаніні, ксантині, гіпоксантині, цитозині, тиміні і урацилі. Конкретні приклади включають в себе 5-метилцитозин (<sup>Me</sup>C), ізоцитозин, псевдоізоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропінілурацил, 5-пропініл-6-фторурацил, 5-метилтіазолурацил, '6-амінопурин, 2-амінопурин, 2,6-діамінопурин, 7-пропін-7-дезааденін, 7-пропін-7-дезагуанін і 2-хлор-6-амінопурин.

Так, як він використовується в даному документі, термін «ферментація» належить до процесу розмноження або культивування мікробних клітин в аеробних або анаеробних умовах.

Термін «стартова культура» належить до препаратів, що містять мікробні клітини, які призначені для інокуляції в середовище, яке належить ферментувати.

У даному контексті термін «вихід» належить до кількості біомаси, яка продукується при ферментації даного об'єму. Вихід може бути виміряний великою кількістю способів; тут вихід виміряний двома різними шляхами; 1) як біомаса на одиницю об'єму, виміряна °Са вирахуванням фону) по оптичній густині на 600 нм (OD<sub>600</sub>) при світловому шляху 1 см в середовищі ферментації в кінці ферментації або 2) в кг культури F-DVS із «закислювальною активністю» 4,8-5,1 відповідно до тесту Пір-

са, описаного в Прикладі 2: аналітична процедура QAm-043 в кінці ферментації:

Термін «F-DVS» належить до так званої заміреної культури Direct Vat Set, як описано в Прикладі 1.

Термін «порфіринова сполука» належить до циклічних тетрапірольних похідних, чия структура походить від такої порфірину шляхом заміщення атомів вуглецю, розташованих на вершинах пірольного скелета, різними функціональними групами. Він також належить до комплексів згаданих похідних з атомом металу, який утворює координаційний зв'язок з двома з чотирьох атомів азоту порфіринового кільця. Це визначення охоплює, але не обмежується ними: уропорфірини, копропорфірини, протопорфірини і гематопорфірини, так само як їх солі і ефіри, і їх комплекси з атомами металу. Особливо переважними порфіриновими сполуками є протопорфірин IX і його комплекси з атомом заліза, зокрема, гем і гемін, і похідні хлорофілу, такі як хлорофіліни.

У даному контексті вираз «молочнокислі бактерії» (LAB) означає групу, грам-позитивних, катализа-негативних, нерухомих, мікроаерофільних або анаеробних бактерій, які ферментують цукор з утворенням кислот, які включають в себе молочну кислоту як кислоту, що утворюється головним чином, оцтову кислоту, мурашину кислоту і пропіонову кислоту. Найбільш придатні в промисловості молочнокислі бактерії виявляються серед *Lactococcus species* (spp.), *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. і *Propionibacterium* spp. Крім того, бактерії, які продукують молочну кислоту, належать до групи суворого анаеробних бактерій, *bifidobacteria*, тобто *Bifidobacterium* spp., які часто використовуються як харчові стартові культури окремо або в комбінації з молочнокислими бактеріями, загалом включені в групу молочнокислих бактерій. Навіть певні бактерії видів *Staphylococcus* (наприклад: *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* і *S. xylosus*) віднесені до LAB (Mogensen et al. (2002) Bulletin of the IDF No. 377, 10-19).

Звичайний використовуваний в стартових культурах штами молочнокислих бактерій, загалом, поділяються на мезофільні організми, що мають температурний оптимум зростання близько 30°C, і термофільні організми, що мають температурний оптимум зростання в діапазоні близько 40 до 45°C. Звичайні організми, що належать до мезофільної групи, включають в себе *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* підвид *lactis* біовар *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* підвид *casei* і *Lactobacillus paracasei* підвид *paracasei*. Види термофільних молочнокислих бактерій включають в себе як приклади *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *bulgaricus* і *Lactobacillus acidophilus*.

Внаслідок того факту, що кількість і, отже, концентрація агента, що підвищує вихід, в середовищі

може змінюватися протягом часу, наприклад, внаслідок включення в мікробні клітини, необхідно згадати конкретний момент часу, коли концентрація агента, що підвищує вихід, повинна бути виміряна або визначена. Отже, термін «початково», коли він використовується в зв'язку з концентрацією агента, що підвищує вихід, в середовищі, належить до концентрації агента, що підвищує вихід, представленого в середовищі безпосередньо перед доданням мікробних клітин, що культивуються в середовищі або, як альтернатива, до концентрації агента, що підвищує вихід, представленого в середовищі безпосередньо після того, як мікробні клітини, які культивуються, були додані в середовище.

Значним застосуванням стартової культури відповідно до даного винаходу є так звана протобіотика. У даному контексті термін «протобіотичний» потрібно розуміти як мікробні культури, які, будучи поглиненими в формі життєздатних клітин, людиною або тваринами, приносять поліпшення стану здоров'я, наприклад, шляхом придушення шкідливих мікроорганізмів в шлунково-кишковому тракті, за рахунок зміцнення імунної системи або поліпшення переварювання поживних речовин. Типовим прикладом такого протобіотично активного продукту є «солодкий ацидофілія».

Варіанти реалізації даного винаходу описані нижче тільки за допомогою прикладів.

Відповідно до даного винаходу розв'язання проблеми розробки способу приготування мікробної культури LAB з отриманням підвищеного виходу в умовах високої оптичної густини складається в ферментувати культури в аеробних умовах в середовищі, яке містить щонайменше один агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка складається з однієї або більше сполуки (сполук), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот, або одного або більше похідного (похідних) будь-якої такої сполуки.

Не обмежуючись конкретною теорією, передбачається, що підвищений вихід пов'язаний з ситуацією, в якій щонайменше один агент, який підвищує вихід, постійно з'являється в середовищі ферментації протягом всієї ферментації. Спостерігається, що виснаження агентів, які підвищують вихід, в середовищі приводить до запуску різних ферментних систем синтезу *de novo* (дивись приклад 6), і передбачається, що такий вимагаючий витрати енергії синтез *de novo* приводить до зменшення виходу.

Ситуація, в якій щонайменше один агент, який підвищує вихід, постійно з'являється в середовищі ферментації в ході всієї ферментації, може бути отримана шляхом культивування LAB в середовищі, яке початково містить достатню кількість агента, що підвищує вихід, щоб забезпечити збереження в середовищі щонайменше одного такого агента в ході всієї ферментації. Одним з таких середовищ є культуральне середовище, що початково містить щонайменше 1 мМ, переважно щонайменше 3 мМ, і навіть більш переважно - щонайменше 3 мМ щонайменше одного агента, що підвищує вихід, вибраного з групи, яка складається з однієї або більше сполуки (сполук), залу-

чених до біосинтезу нуклеїнових кислот або одного або більше похідного (похідних) якої-небудь з таких сполук.

Таке середовище може бути отримане шляхом приготування середовища з використанням компонентів, які особливо багаті агентами, що підвищують вихід, вибраними з групи, яка складається з однієї або більше сполуки (сполук), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот, або одного або більш похідного (похідних) якої-небудь з таких сполук. Одним з таких компонентів може бути екстракт дріжджів, зокрема так звані препарати «збагаченого» або «поширеного» екстракту дріжджів, які особливо багаті пуринами і/або піримідинами.

Замість приготування середовища з використанням препаратів, які особливо багаті агентами, що підвищують вихід, очищені агенти можуть бути додані в форми стандартних в інших відношеннях середовищ. Наприклад, культуральним середовищем може бути комплексне середовище ферментації, до якого додано (на л) щонайменше 0,2 г, переважно щонайменше 0,8 г і навіть більш переважно щонайменше 2 г щонайменше одного агента, що підвищує вихід.

Також можливо забезпечити, щоб щонайменше один агент, який підвищує вихід, залишався в середовищі в ході всієї ферментації шляхом одного або більше додатків згаданого щонайменше одного агента, що підвищує вихід, при ферментації.

Даний винахід особливо корисний в умовах високої оптичної густини, яка потрібна для багатьох промислових установок. У вибраному варіанті реалізації даного винаходу, згадані умови високої оптичної густини характеризуються OD<sub>600</sub> вище 15, переважно вище 20, більш переважно - вище 30, ще більш переважно - більш 40, а найбільш переважно - більш 50 при завершенні ферментації.

У переважному варіанті реалізації, в якому згаданий підвищений вихід зібраних мікроорганізмів за способом по першому аспекту даного винаходу підвищений щонайменше в 1,2 рази, переважно щонайменше в 1,3 рази, більш переважно щонайменше в 1,4 рази, ще більш переважно щонайменше в 1,5 рази, а найбільш переважно щонайменше в 1,6 рази.

Відповідно до даного винаходу мікроорганізм ферментується в аеробних умовах. Переважно, ферментація мікробної культури виконується при аерації і в поживному середовищі, в якому присутня або додана щонайменше одна порфіринова сполука. У переважному варіанті реалізації LAB культивуються при аерації в порфіринвмісному поживному середовищі, як описано в WO 00/0542, в якій вказане середовище також містить щонайменше один агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка складається з однієї або більше сполуки (сполук), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот або одного або більш похідного (похідних) якої-небудь з таких сполук. WO 00/0542, таким чином, включена по посиланню. Аерація може бути досягнута яким-небудь засобом, відомим фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, шляхом струшування або перемішування культурального середовища або пропускання газової

суміші, що містить кисень, наприклад, повітря через культуральне середовище.

У переважному варіанті реалізації вказаний агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка складається з пуринової основи, піримідинової основи, нуклеозиду, нуклеотиду і їх похідних.

Вказаний агент, який підвищує вихід, може бути пуриною основою, переважно, пуринова основа вибрана з групи, яка складається з аденіну, гуаніну, ксантину і гіпоксантину.

Вказаний агент, який підвищує вихід, може бути піримідиною основою, переважно піримідинова основа вибрана з групи, яка складається з цитозину, тиміну і урацилу.

Вказаний агент, який підвищує вихід, може бути нуклеозидом, переважно, вказаний нуклеозид вибраний з групи, яка складається з аденозину, гуанозину, уридину, цитидину, дезоксиаденозину, дезоксигуанозину, дезокситимідину, дезоксицитидину і дезоксиінозину.

У переважному варіанті реалізації вказаний нуклеозид вибраний з групи, яка складається з аденозину, гуанозину, уридину, цитидину, тимідину і інозину. Найбільш переважним з вказаних нуклеозидів є інозин.

Вказаний агент, який підвищує вихід, може бути нуклеотидом, переважно вказаний нуклеотид вибраний з групи, яка складається з аденозин монофосфату (АМФ), гуанозин монофосфату (ГМФ), уридин монофосфату (УМФ), цитидин монофосфату (ЦМФ), ксантин монофосфату (КМФ), інозин монофосфату (ІМФ), дезоксиаденозин монофосфату (дАМФ), дезоксигуанозин монофосфату (дГМФ), тимідин монофосфату (дТМФ), дезоксицитидин монофосфату (дЦМФ), дезоксиксантин монофосфату (дКМФ) і дезоксиінозин монофосфату (дІМФ).

У переважному варіанті реалізації вказаний нуклеотид вибраний з групи, яка складається з АМФ, ГМФ, УМФ, ЦМФ, КМФ і ІМФ. Найбільш переважно, коли вказаний нуклеотид є ІМФ.

Переважним варіантом реалізації є такою, в якому вказане культуральне середовище містить щонайменше два агенти, що підвищують вихід, переважно вибраних з групи, яка складається з пуринової основи, піримідинової основи, нуклеозиду, нуклеотиду і їх похідних.

Переважно, вказане культуральне середовище містить щонайменше два агенти, що підвищують вихід, вибраних з групи, яка складається з нуклеозиду і нуклеотиду. Найбільш переважно, коли вказаний нуклеозид являє собою інозин, а вказаний нуклеотид являє собою ІМФ.

Переважним варіантом реалізації є такою, в якому вказане культуральне середовище початково містить від 1 до 70 мМ кожного з агентів,» що підвищують вихід.

Більш переважно, коли вказане культуральне середовище початково містить від 1 до 60 мМ кожного агента, що підвищує вихід, зокрема, від 1,3 до 60 мМ, наприклад, від 1,5 до 50 мМ, переважно від 2 до 40 мМ, зокрема, від 2,5 до 30 мМ, наприклад, від 3 до 20 мМ, більш переважно від 3 до 15 мМ, зокрема, від 4 до 10 мМ, наприклад, близько 7 мМ.

На подив, способом за даним винаходом несподівано виявилось можливим отримати культури LAB, які досить концентровані, щоб бути використаними для виробництва F-DVS без концентрування культури. Однак, навіть коли застосовується даний спосіб, більшість культур потребує концентрування, щоб отримати стартові культури, які представляють комерційний інтерес. Такі культури переважно можуть бути зібрані і концентровані з допомогою центрифугування або ультрафільтрації.

У переважному варіанті реалізації культивування мікроорганізму проводиться в умовах, в істотних рисах, що відповідають промисловим, в умовах високої оптичної густини.

Відповідно, переважний варіант реалізації, в якому оптична густина (OD) культури на 600 нм і довжині світлового шляху 1 см в середовищі досягає OD від  $OD_{600}=10$  до  $OD_{600}=200$ , більш переважно - OD від  $OD_{600}=15$  до  $OD_{600}=100$ , ще більш переважно - OD від  $OD_{600}=20$  до  $OD_{600}=90$ , а найбільш переважно - OD від  $OD_{600}=25$  до  $OD_{600}=80$ .

Далі, переважний варіант реалізації - це такий, в якому культивування проводиться в ферментері великого об'єму, що містить від 5 л до 100 000 л культурального середовища, переважно від 300 л до 20 000 л культурального середовища.

Переважний варіант реалізації - це такий, в якому культивування включає в себе контроль температури і/або pH.

Переважно культура містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка складається з *Bifidobacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Lactococcus* spp., включаючи в себе *Lactococcus lactis* підвид *lactis* і *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Lactobacillus* spp., включаючи в себе *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. і *Oenococcus* spp.

Культура може містити один або більше мезофільних організмів, що мають оптимальну температуру росту близько 30°C, переважно один або більше мезофільних організмів вибраних з групи, яка складається з *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* підвид *lactis* біовар *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* підвид *casei* і *Lactobacillus paracasei* підвид *paracasei*.

Культура може містити один або більше термофільних організмів, що мають температурний оптимум зростання вище 40°C до близько 45°C, переважно один або більше термофільних організмів вибраних з групи, яка складається з *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* підвид *bulgaricus* і *Lactobacillus acidophilus*.

Переважно культура є, LAB-культурою, яка містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка складається з *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. і *Bifidobacterium* spp.

Культура може бути LD-культурою, яка містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка складається з *Lactococcus lactis* підвид *lactis*, *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Lactococcus lactis* підвид *lactis* біовар *diacetylactis* і *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris*.

Культура може бути O-культурою, яка містить один або більше організмів, вибраних з групи, яка складається з *Lactococcus lactis* підвид *lactis* і *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*.

У переважному варіанті реалізації культура є культурою, що містить *Lactococcus lactis*.

Комерційні стартові культури можуть звичайно постачатися у вигляді заморожених культур. При низьких температурах, при яких звичайно містять такі заморожені культури, метаболічна активність в клітинах в основному припиняється, а клітини можуть міститися в такому загальмованому, але життєздатному, стані протягом тривалих періодів часу.

Концентровані заморожені культури представляють великий комерційний інтерес, оскільки такі культури можуть бути інокульовані безпосередньо у виробничий контейнер. Шляхом використання таких концентрованих заморожених культур споживач усуває необхідні в іншому випадку, які вимагають часу, проміжні стадії ферментації, в ході яких стартова культура ампліфікується, і споживач, до того ж, зменшує ризик небезпечної контамінації. Такі концентровані культури можуть бути позначені як культури DVS - direct vat set™.

Як альтернатива концентрованим замороженим культурам можуть бути приготовані концентровані заморожуванням-висушуванням культури direct vat set™, FD-DVS™. Такі культури мають додаткову перевагу, яка полягає в тому, що вони можуть постачатися без охолодження.

Таким чином, в переважному варіанті реалізації, спосіб виготовлення мікробної культури з підвищеним виходом, як описано в даному документі, додатково включає:

iii) заморожування згаданих зібраних мікроорганізмів з отриманням заморожених мікробних клітин.

Згаданий спосіб може також включати:

iv) сублімацію води із згаданих заморожених клітин, щоб отримати заморожені-висушені клітини.

Іншими словами, зібрана культура мікроорганізмів перетворюється в заморожену-висушену культуру.

Спосіб може також включати:

v) упакування клітин, отриманих на стадії iii) або iv).

Часто спостерігаються ушкоджуючі ефекти заморожування і відтавання на життєздатність живих клітин. Загалом, вони приписуються зневодненню клітини і утворенню кристалів льоду в цитозолі при заморожуванні.

Однак, виявлена велика кількість кріопротекторних агентів, що забезпечують, щоб заморожування проходило контрольованим і мінімально ушкоджуючим чином, наприклад, забезпеченням того, що кристалізація льоду в цитозолі при заморожуванні запобігається або мінімізується.

Переважно до зібраних мікроорганізмів додають щонайменше один кріопротектор.

Переважно, кріопротекторний агент (агенти) вибраний (вибрані) з групи, яка містить одну або більше речовину (речовин), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот, або одне або більше похідне (похідних) якої-небудь з цих сполук. Приклади переважного кріопротекторного агента (агентів), прийнятих, для додання до зібраних мікроорганізмів, в основному відповідають переважному агенту (агентам), що підвищує вихід, як описано в даному документі. Додання такого кріопротекторного агента (агентів) до зібраних мікроорганізмів описане в раніше поданій патентній заявці номер PCT/DK2004/000477. Переважний кріопротекторний агент (агенти), описаний (описані) в PCT/DK2004/000477, також є переважним кріопротекторним агентом (агентами) за даним винаходом. Повний опис PCT/DK2004/000477 включений в даний документ у вигляді посилання.

Альтернативним варіантом реалізації даного винаходу є спосіб виготовлення мікробних культур з підвищеними виходами, як описано в даному документі, і який також містить стадію висушування зібраних мікроорганізмів шляхом висушування розпиленням, вакуумного висушування, сушіння повітрям або якого-небудь процесу висушування, який придатний для висушування бактерійних культур.

Переважно, стартова культура по другому предмету даного винаходу готується як концентрат стартової культури, оскільки містить щонайменше 10<sup>8</sup> колонієутворювальних одиниць (CFU) організмів стартової культури.

Третій аспект за винаходом належить до культурального середовища, яке містить щонайменше один агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка складається з пуринової основи, піримідинової основи, нуклеозиду, нуклеотиду і їх похідних. Незважаючи на те, що велика кількість агента, який підвищує вихід, витрачається в ході ферментації, мабуть, велика кількість його залишається в супернатанті культури, що забезпечує можливість ідентифікувати, що концентрована культура є продуктом середовища за даним способом (дивись приклад 5 або 6).

Переважно, харчовий продукт за четвертим аспектом даного винаходу являє собою такий, вибраний з групи, яка містить продукт, оснований на молоці, овочевий продукт, м'ясний продукт, напій, фруктовий сік, вино і хлібобулочний продукт.

Переважно, продукт, оснований на молоці, являє собою такий, вибраний з групи, яка містить сир, йогурт, масло, інокульоване свіже молоко і рідкий ферментований молочний продукт.

У окремому аспекті даного винаходу надається спосіб отримання підвищеного виходу (виходів) мікробно продукуючої сполуки (сполук), де вказаний спосіб включає стадії:

i) культивування мікроорганізму в культуральному середовищі, що містить щонайменше один агент, який підвищує вихід, вибраний з групи, яка складається з однієї або більше сполуки (сполук), залучених до біосинтезу нуклеїнових кислот або

одного або більш похідного (похідних) якої-небудь з таких сполук; і

ii) отримання згаданої мікробно продукованої сполуки (сполук),

в якому агент, який підвищує вихід, приводить до підвищеного виходу мікробно продукованої сполуки (сполук) в порівнянні з культивуванням мікроорганізму в ідентичному середовищі без визначних кількостей агента, що підвищує вихід.

Сполуки, продуковані мікробними організмами, як описано, включають, але не обмежуються ними, ферменти, білки, метаболіти, гліколіпіди, антибіотики, бактеріоцини, амінокислоти, смакові речовини, леткі речовини. Такі сполуки можуть продукуватися за допомогою технології рекомбінантної ДНК або загальноприйнятими засобами.

Даний винахід далі проілюстрований нижченаведеними необмежуваними прикладами і малюнками, в яких:

Фіг. 1. Показує виходи трьох ферментацій *S. Thermophilus*, виконаних в анаеробних умовах. Графік показує біомасу, виміряну як  $OD_{600}$ , неконцентрованих зразків середовища ферментації в ферментері як функції часу (години). Заповнені трикутники означають додання 0,2% ваг/ваг ІМФ, заповнені кружки означають додання 0,2% ваг/ваг інозину, а заповнені квадрати означають, що ніяких агентів, які підвищують вихід, не було додано. 0,2% ваг/ваг інозину приблизно становить 7 мМ інозину.

Фіг. 2. Рівень різних нуклеосполук і оптична густина в ході ферментації в збагаченому комплексному середовищі, що містить порівняно високі кількості пуринів. Стикло, *Lactococcus lactis* (штам CHCC2862) вирощували аеробно в комплексному середовищі, що містить екстракт дріжджів і інші комплексні компоненти. Концентрація в мкМ (ліва

вісь ординат) і  $OD_{600}$  (права вісь ординат) нанесені відносно часу. Скорочення: G, гуанін; A, аденін; Hx, гіпоксантин; X, ксантин; IR, інозин; GR, гуанозин; GdR, дезоксигуанозин; AR, аденозин.

Фіг. 3. Рівень пуринових сполук в ході ферментації з 2 г/л інозину, доданого в середовище. Стикло, *Lactococcus lactis* (штам CHCC2862) вирощували аеробно в такому ж комплексному середовищі, як використане на Фіг. 2, за винятком того, що додано 2 г інозину на л середовища. Концентрація в мкМ (ліва вісь ординат) і  $OD_{600} \times 100$  (права вісь ординат) нанесені відносно часу. Потрібно зазначити, що рівень інозину позначений правою віссю ординат. Скорочення: G, гуанін; A, аденін; Hx, гіпоксантин; X, ксантин; IR, інозин; GR, гуанозин; GdR, дезоксигуанозин; AR, аденозин і IR, інозин (відмітити різні осі для інозину).

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Вихід ферментацій, виконаних в трьох різних типах культуральних середовищ

Щоб проілюструвати ефект додання додаткових пуриновмісних сполук до вже збагачених і оптимізованих середовищ трьох різних типів культур промислового масштабу, їх порівнювали.

Всі три типи культур вели при аерації в поживному середовищі, в якому присутня або додана щонайменше одна порфіринова сполука, як описано в міжнародній патентній заявці WO 00/05342 (процедура EML), і у всіх випадках це була так звана «О-культура», що містить *Lactococcus lactis* підвид *lactis* і *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*. Окультури звичайно використовують для виготовлення сиру без дірок (cheder, чешир, фета). Конкретна культура комерційно доступна під найменуванням R 604 фірми Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Данія (каталожний № 200113).

Три середовища описані в Таблиці 1.

Таблица 1

Позначення культур	Основне культуральне середовище	Доданий екстракт дріжджів	Інші добавки
Old EMIL	BD-5-ex3*	1,7% ваг/ваг стандартний екстракт дріжджів**	
New EMIL	BD-5-ex3*	1,7% ваг/ваг новий екстракт дріжджів**	
Super EMIL	BD-5-ex3*	1,7% ваг/ваг новий екстракт дріжджів**	0,2% ваг/ваг ІМФ*** 0,2% ваг/ваг інозин <sup>00</sup>

\*BD-5-ex3 є оптимізованим порфіринвмісним культуральним середовищем відповідно до WO 00/05342 і WO 01/52668.

\*\* стандартний екстракт дріжджів і новий дріжджовий екстракт являють собою два комерційно доступних екстракти дріжджів.

\*\*\* ІМФ - це інозин-5'-монофосфат (ІМФ (фірма Alsiano A/S, Birkerød, Данія).)

<sup>00</sup> інозин - це інозин (фірма Alsiano A/S, Birkerød, Данія).

Культивування виконували в 550 л або 10 000 л промислових ферментаційних ємностях при 30°C з використанням 0,5 % (ваг/ваг) культури, згаданої вище як інокулят. Ферментації проходили в аеробних умовах, як описано в WO 00/05342. Культурам дозволяли закислення до pH 6,2. pH потім підтримували на рівні 6,2 шляхом контролюваного додання 13,4 N  $NH_4OH$ .

Коли споживання основи переставало виявлятися, відповідну культуру охолоджували до близько 10°C.

Після охолодження, бактерії в культуральному середовищі концентрували 6=18 разів шляхом центрифугування і подальшого заморожування у вигляді осаду в рідкому азоті при тиску в одну атмосферу для отримання так званої замороженої

культури Direct Vat Set (F-DVS). Осади F-DVS зберігали при -50°C до подальшого аналізу.

Виходи ферментацій визначали двома різними шляхами: 1) по вимірюванню оптичної густини отриманої біомаси на 600 нм ( $OD_{600}$ ), 2) по кг куль-

тури F-DVS із «закислювальною активністю» 4,8-5,1 по відповідному тесту Пірса, описаному в Прикладі 2: Аналітична процедура QAm-043.

Результати показані нижче в Таблиці 2.

Таблиця 2

Виходи ферментацій, виміряні як  $OD_{600}$

Позначення культури	Підсилювальний агент	Біомаса ( $OD_{600}$ )	Вихід в кг F-DVS на 100 л середовища*
Old EMIL		32	5,56
New EMIL		45	8,33
Super EMIL	0,2% ваг/ваг ІМФ 0,2% ваг/ваг інозин	76	16,67

\* закислювальна активність F-DVS становить 4,8-5,1 по тесту Пірса

#### Висновок:

З цих результатів ясно, що додання підсилювального агента, що складається з 0,2% ваг/ваг ІМФ і 0,2% ваг/ваг інозину, які додані до культурального середовища перед початком аеробної ферментації, приводить до підвищення виходів.

Приклад 2: Аналітична процедура QAm-043, закислювальна активність «Програмований температурний профіль» Chr. Hansen A/S (Данія).

#### ЗАСТОСОВНІСТЬ

Цей спосіб використаний для визначення закислювальної активності відповідно до тесту Пірса. Тест Пірса включений по стандарту IDF (міжнародний стандарт молочної промисловості).

#### ПРИНЦИП

Закислення виконували відповідно до температурного профілю, що відображає зміни, які звичайно зазнає культура при використанні в молочній промисловості для виробництва даного молочного продукту.

Для тесту Пірса - це температура виготовлення сиру при виробництві чедера.

pH вимірювали в фіксований час. Для культур, в які не додавали сичуг в ході аналізу, могли застосовувати безперервне вимірювання pH.

#### ПАРАМЕТРИ АНАЛІЗУ

Параметри аналізу, які залежать від продукту, дані в LIMS. Визначення температурного профілю (для продуктів, де тест Пірса не використовується).

Повинні бути використані контрольні стандарти.

Тип вимірювання pH.

Процент інокуляції на зразок і контрольні стандарти.

Розведення молока: 206,9 г холодного (4°C) LAB-молока (тобто, УНТ-стерилізованого відновленого стерилізованого збираного молока (RSM), що містить 9,5% (ваг/ваг) твердої речовини і нагрітого до 99°C протягом 30 хвилин).

Активність молока: 200 г холодного (4°C) низькопастеризованого незбираного молока з жирністю 3,5%.

Сичуг: Natureno standard 190 розбавлений 1:40 водою.

#### ПРИЛАДИ І РЕАГЕНТИ

pH-метр/pH-метр для напівбезперервного вимірювання pH, модель Radiometer® PHM92. pH-електрод Radiometer® PFC2401.

Буфери: pH 7,00±0,01 і pH 4,01±0,01.

Водяна баня з термостатом, запрограмованим на нагрівання відповідно до попередньо визначеного температурного профілю ±0,2°C.

Сенсор температури.

Вага з точністю 0,01 г, мінімум з двома десятичними розрядами.

Години.

Магнітна мішалка.

Магніти.

Бюкси, 50 мл.

Маленькі пластикові чашки.

Ротаційний апарат.

#### ПРОЦЕДУРА

Підготовка аналізу

Всі пляшки повинні бути з однієї партії, тобто з однією і тією ж датою.

Водяна баня (бані) доведена (доведені) до вихідної температури використовуюваного температурного профілю.

Пляшки для розбавлення (= перше дозування) і для активності (друге дозування) містили при 4°C безпосередньо до використання.

Буфери pH 4,01 і pH 7,00 вміщували у водяну баню при конкретній температурі вимірювання ±0,2°C щонайменше за 30 хв. до калібрування pH-метра.

Приготування зразків перед аналізом.

Заморожені культури:

заморожені зразки/контрольні стандарти перед першим дозуванням вміщували у випарну камеру з сухим льодом і утримували там до закінчення всіх дозувань.

Заморожені культури, які піддають відтаванню перед використанням:

у випадку заморожених продуктів, коли використовується вся упаковка, продукт піддають відтаванню відповідно до діючих інструкцій.

Після відтавання зразок можна утримувати при 4°C протягом максимум 30 хвилин перед використанням.

Заморожені-висушені культури:

заморожені-висушені зразки і контрольні стандарти акліматизували при кімнатній температурі протягом щонайменше 15 хв. перед початком аналізу.

При умові, що зразок мають намір використати для повторного тесту на наступний день, його можна зберігати при +8°C.

Процедура інокуляції:

дозування продукту/контрольного стандарту виконують безпосередньо в молоці.

Фактична кількість інокуляту (1-е дозування) вводиться з точністю до двох десятиричних розряду.

Заморожені і розморожені продукти обережно перевертали близько 4 разів, після чого пляшки ставили на приблизно 50 сек.

Для заморожених-висушених продуктів повинен бути використаний ротаційний апарат. Він повинен рухатися з великою швидкістю протягом 5 хвилин або доти, поки продукт не розчиниться повністю. Це контролюється шляхом залишення пляшки на столі на невеликий час і потім перевірки розчину шляхом огляду дна пляшки.

Відмітити:

якщо для робочих операцій зручний холод, перше дозування може залишатися при кімнатній температурі максимум протягом 15 хвилин перед другим дозуванням.

2-е дозування:

пляшки розведення перевертали перед проведнням 2-го дозування.

Фактична кількість інокуляту (2-е дозування) робиться щонайменше з точністю до двох десятиричних розряду.

Пляшки «для активності» перевертали і процедуру інокуляції повторювали для зразків/контрольного стандартів.

Пляшки «для активності», які інокуються з того ж 1-го дозування, інокуються послідовно.

2 мл сичуга додавали в кожну пляшку до або після 2-го дозування. Після цього пляшки перевертали так, щоб сичуг розподілився.

Пляшки потім інкубували одночасно, як описано в 6.

На завершення двічі інокульовані пляшки з молоком вміщували у водяну баню; одну для вимірювання температури водяної бані і одну для вимірювання pH упакованого молока.

ІНКУБАЦІЯ

Відмітити: якщо потрібно більше водяних бань, контрольні стандарти повинні інкубуватися в тій же самій бані з відповідними зразками.

Всі пляшки для активності інкубували одночасно в попередньо нагрітій водяній бані при визначеній по температурному профілю вихідній температурі.

Температурний профіль запускається в той же самий час, коли пляшки вміщують у водяну баню.

Потім температура інкубації контролюється термостатом, запрограмованим на подальший температурний профіль. Тест Пірса див. в Таблиці 3.

Рівень води у водяній бані повинен бути мінімум на 2 см вищий, ніж поверхня молока.

Таблиця 3

Температурна програма  
для профілю Пірса (відповідно до IDF)

Час, хвилини	Температура, °C	Відхилення
0	31,0	±0,2°C
50	31,0	±0,2°C
54	31,7	±0,5°C
58	32,2	±0,5°C
62	32,8	±0,5°C
66	33,3	±0,5°C
70	33,9	±0,5°C
73	34,4	±0,5°C
76	35,0	±0,5°C
79	35,6	±0,5°C
82	36,1	±0,5°C
85	36,7	±0,5°C
87,5	37,2	±0,5°C
90	37,8	±0,2°C
360	37,8	±0,2°C

#### КАЛІБРУВАННЯ pH ЕЛЕКТРОДА

Калібрування проводили при вихідній температурі відповідно до діючих інструкцій, що стосуються калібрування електрода і його вмісту.

#### ВИМІРЮВАННЯ pH

Після інкубації пляшки ґрунтовно струшували і вимірювали pH.

Вимірювання pH виконували в пляшці або в зразку, який зливали в 50 мл лабораторну склянку з магнітним перемішуванням.

pH визначали щонайменше до 2 десятиричних розрядів.

Вводили можливі зауваження при вимірюванні.

Процедуру вимірювання продовжували доти, поки всі зразки, контрольні стандарти і інокульоване молоко не будуть виміряні.

Нарешті, вимірювали і реєстрували pH буферів.

#### Безперервне вимірювання pH

Значення pH знімали з моменту початку температурного профілю. Після завершення інкубації реєстрували виміряні значення pH в обох буферах при вихідній температурі.

Приклад 3: Вихід ферментацій *Lactococcus lactis*, виконаних при стандартних анаеробних умовах високої OD

Щоб проілюструвати ефект додання сполук, що містять додатковий пурин, до вже збагачених і оптимізованих середовищ, порівнювали два різних типи ферментації промислового масштабу, один - з доданням 0,3 % ваг/ваг інозину, один - без додання.

Культура:

Даний експеримент виконували з використанням комерційно доступної культури R 604, яка доступна на фірмі Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Данія (каталожний № 200113).

Середовище ферментації:

Культури культивували в середовищі, що має наступну композицію: гідролізат казеїну (фірма

Oxoid, Basingstoke, Великобританія, код продукту L41), 30 г/л; Primatone RL (фірма Quest, Naarden, Нідерланди, код продукту 5X59051), 30 г/л; соєвий пептон (фірма Oxoid, Basingstoke, Великобританія, код продукту L44), 30 г/л; екстракт дріжджів (фірма Oxoid, Basingstoke, Великобританія, код продукту L21), 15 г/л;  $MgSO_4$ , 1,5 г/л; аскорбат Na, 3 г/л і лактозу 50 г/л.

Середовище стерилізували обробкою надвисокою температурою (УНТ) (143°C протягом 8 сек.). Отримане середовище мало рН 6,5.)

Умови ферментації культур:

Ферментацію проводили в 550 л промисловій ферментаційній місткості без аерації при 30°C з використанням 1% (ваг/ваг) культури, згаданої вище як інокулят. В умовах високої OD ферментація, загалом, є анаеробною. Культурі дозволяли закислюватися до рН 6,0. Потім рН підтримували на рівні 6,0 контрольованим доданням 13,4 N  $NH_4OH$ .

Коли перестає виявлятися подальше споживання основи, відповідну культуру охолоджували до близько 10°C.

Після охолодження бактерії в культуральному середовищі концентрували 6-18 разів шляхом центрифугування і подальшого заморожування осаду в рідкому азоті при тиску в одну атмосферу з отриманням так званої замороженої культури Direct Vat Set (F-DVS). Осади F-DVS зберігали при -50°C до подальшого аналізу.

Виходи ферментацій визначали двома різними шляхами:

1) по отриманій біомасі, виміряній як оптична густина на 600 нм ( $OD_{600}$ ), або

2) по кг культури F-DVS на 100 л середовища ферментації, в якому культура F-DVS має «закислювальну активність» 4,8-5,1 відповідно до тесту Пірса, описаного в Прикладі 2: Аналітична процедура QAm-043.

Результати показані нижче в Таблиці 4.

Таблиця 4

Позначення культури	Додаткова добавка до середовища ферментації	Вихід по $OD_{600}$	Вихід по Пірсу
PP11145	Немає	25,1	4,95
PP11146	0,3% ваг/ваг інозину <sup>@</sup>	25,2	4,98

<sup>@</sup>інозин - це інозин (фірма Alsiano A/S, Birkerød, Данія).

Висновок:

з цих результатів ясно, що додання підсилювального агента, що складається з 0,3% ваг/ваг інозину, який додавали до анаеробного культурального середовища перед початком ферментації, не приводило до підвищення виходів.

Приклад 4: Вихід ферментації *Streptococcus thermophilus*, проведеної при стандартних анаеробних умовах при високій OD

Цей експеримент виконували з метою дослідити ефект додання сполук, що містять додатковий пурин, до вже збагачених і оптимізованих середовищ при використанні для анаеробної ферментації в умовах високої OD. У даному експерименті приготувляли три культури *Streptococcus thermophilus*, в одну додавали 0,2% ваг/ваг інозину, в іншу додавали 0,2% ваг/ваг ІМФ, а в середовище третьої культури сполук, що містять додатковий пурин, не додавали.

Культура:

даний експеримент виконували з використанням комерційно доступної культури *Streptococcus thermophilus* CHQ-18, яка доступна на фірмі Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Данія.

Середовище ферментації:

Культури культивували в збагаченому середовищі, основаному на комплексних компонентах середовища, екстракті дріжджів BioSpringer 207, порошку збираного молока Arla (Milex 240) і лактозі.

Середовище стерилізували обробкою УНТ (143 °C протягом 8 сек). Середовище, що вийшло, мало рН 6,0.

Умови ферментації культур:

Ферментацію виконували в 3 л перемішувальній ферментаційній місткості при 40°C з використанням 0,1% (ваг/ваг) згаданої вище як інокулят культури. рН підтримували на рівні 6,0 шляхом додання 13,4 N  $NH_4OH$ . Анаеробні умови забезпечували шляхом подачі азоту у вільний простір над продуктом (1,5 л/хв). Перемішування проводили при 300 об/хв.

Виходи ферментацій визначали по отриманій біомасі, виміряній по оптичній густині неконцентрованих зразків на 600 нм ( $OD_{600}$ ), взятих в ході ферментації.

Результати трьох ферментацій показані на Фіг.

1.

Висновок: з цих результатів витікає, що додання підсилювального агента, що складається з або 0,2% ваг/ваг інозину, або 0,2% ваг/ваг ІМФ не приводить до підвищення виходів.

Приклад 5: Використання хімічного аналізу для виявлення присутності надлишку нуклеосполуки при ферментації

Незважаючи на те, що молочнокислі бактерії, загалом, є прототрофними відносно пуринів і піримідинів і, таким чином, можуть синтезувати ці сполуки, клітини при ферментації утилізовують доступні джерела екзогенного пурину і піримідину. Конкретно, всі звичайні пуринові нуклеосполуки можуть бути повністю виснажені вже при OD близько 15 (дивись Фіг. 2). Цікаво, що накопичення біомаси продовжується при OD близько 45, незважаючи на те, що пуринова сполука виснажена. Схожий результат отриманий для піримідинових сполук (дані не показані). Це означає, що бульйон ферментації (тобто середовище ферментації без

клітин) в кінці зростання позбавлений пуринових і піримідинових сполук.

Якщо, з іншого боку, наприклад, до середовища росту доданий інозин в надлишку, ця сполука і/або відповідна нуклеосонова гіпоксантин (присутній внаслідок гідролізу інозину), він буде бути присутнім в ферментаційному бульйоні в кінці зростання (див. Фіг. 3). Такий надлишок нуклеосполуки легко може бути виявлений в ферментаційному бульйоні.

Для виробництва, наприклад, F-DVS, клітини в середовищі ферментації концентрують в декілька разів. Хоч клітини в F-DVS присутні в декілька разів більшої кількості, ніж в середовищі ферментації, істотні кількості ферментаційного бульйону все ще присутні в F-DVS. Цей чистий бульйон ферментації може бути отриманий шляхом подальшого центрифугування клітин. Придатними способами виділення бульйону можуть бути розмороження F-DVS, а потім використання фільтра або застосування високих прискорень при центрифугуванні при виробництві F-DVS.

При таких малих доступних кількості чистого бульйону можна перевірити, чи присутні які-небудь нуклеосполуки в середовищі ферментації і, таким чином, чи були такі сполуки додані до середовища ферментації в надлишку. Таким способом виявлення може бути загальноприйнята хроматографія високого розрізнення (HPLC) (див., наприклад, <http://www.laubscherlabs.com/Presentation/YMC%20ODS-AQ.pdf>), де звичайні нуклеотидні основи і нуклеозиди (цитозин, цитидин, урацил, дезоксицитидин, гуанін, аденін, гіпоксантин, уридин, ксантин, тимін, інозин, гуанозин, дезоксиінозин, дезоксигуанозин, ксантинозин, тимідин, аденозин і дезоксиаденозин) можуть бути легко виявлені. Можуть бути використані і інші доступні способи для виявлення відповідних нуклеотидів. Присутність будь-якої з таких сполук в бульйоні чітко показує, що ферментація була виконана відповідно до даного винаходу.

Приклад 6: Використання протеоміки для виявлення присутності надлишку нуклеосполук при ферментації

У ході зростання клітинам потрібен безперервний потік пуринових і піримідинових нуклеотидів для синтезу РНК і ДНК. Ці нуклеотиди можуть бути отримані або як екзогенні з середовища (захопленням) або синтезовані *de novo* з більш простих сполук. Для синтезу *de novo* повинні експресуватися специфічні гени синтезу *de novo*. Навпаки, гени не повинні експресуватися, коли присутнє екзогенне джерело.

У випадку синтезу пурину *de novo* залучається близько 10 генних продуктів. Раніше було виявлено, що оперон *purDEK*, залучений до пуринового синтезу *de novo* в *L. lactis*, регулюється приблизно в 35 разів в залежності від присутності/відсутності екзогенного джерела пурину (Nilsson & Kilstrup 1998). Також, за присутності/відсутності декількох білків синтезу пурину синтез *de novo* на двовимірному білковому гелі виявляється в залежності від доступності екзогенних пуринів (Gitton et al. 2005).

Для встановлення специфічного способу виявлення присутності/відсутності екзогенних пуринів в середовищі автори інокулювали *L. lactis* підвид *lactis* CHCC2862 у визначене середовище SA з 1% глюкози. Це середовище не містить нуклеосполук (Jensen & Hammer 1993). Культуру утримували при 30°C з 0,2% інозину і без нього і інкубували протягом ночі. Потім експонентно зростаючі клітини інокулювали в свіже середовище при OD<sub>600</sub> близько 0,1. При OD 0,8 (експонентне зростання) і в стаціонарній фазі клітини збирали і отримували двовимірний білковий гелі.

Загалом можна було виявити близько 3-400 білкових плям на гелі при діапазоні pH 4-7. При OD 0,8 було менше ніж 10 плям в матеріалі з культури без інозину, і вони були відсутніми (або були дуже слабкими) з культури з інозином. Тип набору цих плям за присутності/відсутності екзогенного пурину показує, що відповідні білки присутні тільки, коли відсутнє екзогенне джерело пуринів. Чотири з найбільш виражених плям, які присутні тільки на гелі, отриманому з культури без пуринів, піддавались переварюванню в гелі і мас-спектрометричній ідентифікації. Білки були ідентифіковані як: *purH* (біфункціональний білок біосинтезу пурину), *purM* (фосфорибозиламіноімідазолсинтаза), *urpH* (фосфорибозилформілгліцинамідинсинтаза *PurS*) і *fhs* (формілтетрагідрофолатсинтаза). Генні продукти трьох генів *purH*, *purM* і *urpH* (*purS*) безпосередньо залучені до пуринового біосинтезу *de novo*, тоді як *fhs* залучений до формування одновуглецевих одиниць, які використовуються в синтезі пурину *de novo*. Для клітин, що знаходяться в стаціонарній фазі, яка схожа з ситуацією, виявленою в F-DVS, отриманий схожий тип набору плям за відсутності/присутності пурину. Загалом, це показує, що присутність надлишку нуклеосполуки в середовищі може бути виявлена з використанням протеоміки.

При тому, що дані приклади ілюструють виявлення пуринів, що посилюють вихід, схоже виявлення присутності надлишку піримідинів може бути проведене без ускладнень. Таким чином, протеоміка може бути використана для отримання дуже чіткого свідчення того, що ферментація була виконана відповідно до даного винаходу.

#### МАТЕРІАЛИ І СПОСОБИ

Способи, описані нижче, ґрунтуються на стандартних способах, опублікованих раніше (Fey et al. 1998; Vido et al. 2004; Gitton et al. 2005).

Приготування безклітинного екстракту. Клітини збирали центрифугуванням і двічі відмивали в крижаному 10 mM Tris-HCl, pH 7, 0,25 M сахарози. Клітини переносили в 2 мл пробірки Eppendorf, що містять приблизно 1,0 г скляних кульок (0,25-0,50 мм) і струшували в млині типу міксера два рази по 6 хв. Потім екстракти центрифугували при 10 000 об/хв протягом 5 хв, і 250-300 мкл супернатанту переносили в нову пробірку Eppendorf. Супернатант центрифугували ще один раз при 15 000 об/хв протягом 5 хв, і вміст за винятком 10-20 мкл біля дна пробірки переносили в ще одну нову пробірку Eppendorf. DTT (дитіотреїтол) додавали з 1 M

маточного розчину до кінцевої концентрації 10 мМ, а лізат зберігали замороженим при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Двовимірний гель-електрофорез (ізоелектрофокусування і гель-електрофорез. Для кожного гелю за допомогою хлороформ/метанольної процедури преципітували між 75 і до 300 мкг білка і ресуспендували в 190 мкл регідруючого буфера (8 М сечовина, 50 мМ DTT, 4% CHAPS, 0,2% амфолітів-носіїв). Перше вимірювання проводили на 11 см смужках IPG pH 4-7 і pH 4,7-5,9 фірми Bio-Rad при активній регідрації протягом 12 годин, після чого слідували стандартній програмі для 11 см смужок в осередку ізоелектрофокусування (IEF) Protean фірми Bio-Rad. На смужки pH 3,9-5,1 білки завантажували через лійку після того, як смужки регідрувались. Після IEF електрофорезу смужки або зберігали замороженими при  $-20^{\circ}\text{C}$  або безпосередньо готували до електрофорезу у другому вимірюванні.

Смужки врівноважували в SDS-буфері перед електрофорезом в поліакриламідному гелі (PAGE) другого вимірювання протягом  $2 \times 15$  хв, перший раз в присутності DTT, другий - в надлишку IAA. Після цього смужки прикріплювали до 10-20% і 12,5% поліакриламідним гелям (Criterion Tris-HCl фірми Bio-Rad) агарозним клесм, і запускали друге вимірювання при 200 В на одну годину в Criterion Dodeca Cell. Гелі забарвлювали за допомогою BioSafe Coomassie і сканували на денситометрі GS-800 фірми Bio-Rad.

Ідентифікація білків. Ідентичність білків у вибраних плямах визначали переварюванням в гелі і аналізом пептидного профілю, а також вмісту амінокислот за допомогою мас-спектрометрії. Отримані дані потім використовували для пошуку в загальнодоступних базах даних білків зі схожими властивостями (Alphalyse A/S, Оденсе, Данія).

#### ЛІТЕРАТУРА

Fey, S. J., A. Nawrocki, M. R. Larsen, A. Gorg, P. Roepstorff, G. N. Skews, R. Williams, and P. M. Larsen. 1997. Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae*: a methodological outline. *Electrophoresis* 18:1361-1372.

Gitton, 3, M. Meyrand, J. Wang, C. Caron, A. Trubuil, A. Guillot, and M. Y. Mistou. 2005. Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCD0763 cultivated in milk. *Appl Environ Microbiol* 71:7152-7163.

Jensen, P. R. and Hammer, K. 1993. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. and Env. Microbiol.* 59:4363-4366.

Nilsson D. and Kilstrup M. 1998. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* purDEK genes, required for growth in milk. *Appl Environ Microbiol.* 64:4321-4327.

Vido, K., D. Le Bars, M. Y. Mistou, P. Anglade, A. Gruss, and P. Gaudu. 2004. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *J Bacteriol* 186:1648-1657.

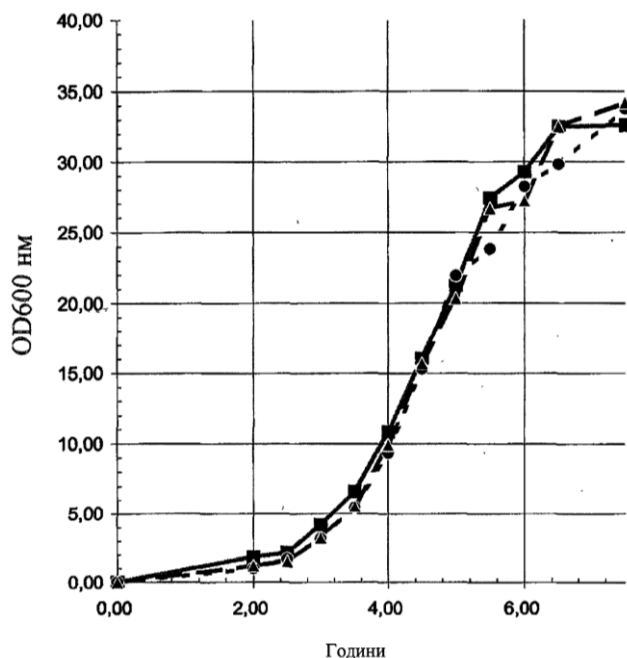
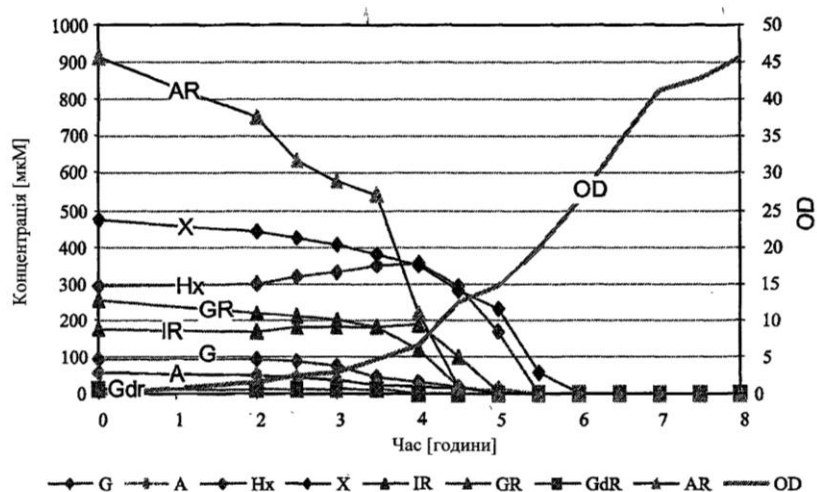
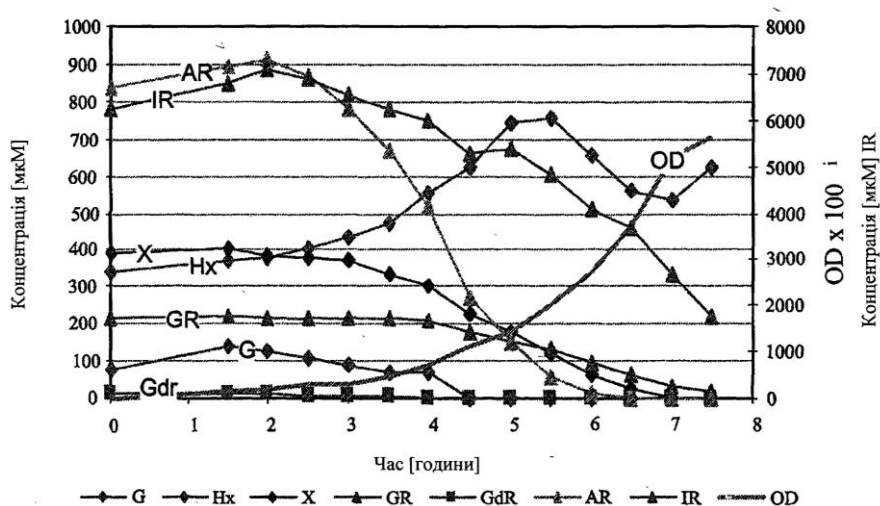


Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3