

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2014-81

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.02.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.08.2015**
(Věstník č. 32/2015)

(71) Přihlašovatel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
Výzkumný ústav mlékárenský, s. r. o., Praha 6, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc., Brno- Přízřenice, CZ
doc. RNDr. Alena Španová, CSc., Brno-
Řečkovice, CZ
Ing. Jan Drbohlav, CSc., Praha 5, CZ
Ing. Šárka Havlíková, Soběslav, CZ
Ing. Eva Kvasničková, Tábor, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob zpracování odpadních vod z výroby
sýrů**

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje nové kmeny bakterií
Clostridium butyricum CCM 8499 a *Clostridium*
tyrobutyricum CCM 8498, či fragmenty jejich buněk
(geny, enzymy nebo jejich části). Dále vynález popisuje
použití těchto kmenů, a to zejména k produkci vodíku.

Nové kmeny bakterií a způsob produkce vodíku

Oblast techniky

Předkládané řešení se týká nových kmenů bakterií *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 a způsobu výroby vodíku využívajícího těchto bakterií.

Dosavadní stav techniky

Současný trend v energetické politice prosazuje vyrovnaný "energetický mix" jednotlivých druhů zdrojů. Kromě primárních zdrojů energie (klasické a jaderné elektrárny) je pozornost věnována alternativním zdrojům energie, což je jedním z klíčových bodů energetické politiky Evropské unie.

Vodík není klasické palivo, ale energetický vektor neboli nosič energie (nelze jej těžit, ale musí se vyrábět). V současné době je vodík vyráběn z fosilních paliv a biomasy, elektrolýzou vody a fermentací biomasy. Pro produkci vodíku lze použít biofotolýzu vody cyanobakteriemi. Tento postup je závislý na době osvitlu slunečním světlem (je tedy periodický a v noci vyžaduje dodávání energie). Dále jsou pro produkci vodíku používány anaerobní bakterie, mezi kterými mají důležitou roli bakterie rodu *Clostridium*. V mnoha studiích (Chen W. M., Tseng Z. J., Lee K. S., Chang, J. S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. Int. J. Hydrogen Energ. 30 (2005) 1063-1070; Wang J., Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. Int. J. Hydrogen Energ. 34 (2009) 799-811; Ferchichi M., Crabbe E., Gwang-Hoon Gil G.H., Hintz W., Almadidy A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. J. Biotechnol. 120 (2005) 402-409) bylo potvrzeno, že některé druhy tohoto rodu produkují vodík ve vyšších množstvích než ostatní bakterie a také jsou schopny fermentovat širokou škálu organických materiálů. Mezi významné producenty vodíku patří druhy *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermolacticum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium thermocellum* a *Clostridium paraputrificum*. Tyto bakterie využívají většinou dva způsoby tvorby vodíku: octové a máselné kvašení. Teoreticky jsou z jednoho molu glukosy produkovány až 4 moly vodíku při octovém kvašení a 2 moly

vodíku při máselném kvašení. Produkce vodíku je katalyzována enzymem hydrogenasou. Bakterie rodu *Clostridium* obvykle využívají obou typů fermentace a množství vzniklého vodíku z glukosy je určeno poměrem výsledných produktů butyrát/acetát.

Anaerobní bakterie rodu *Clostridium* izolované z vadných sýrů produkují vodík kontinuálně ve fermentačním procesu (oproti cyanobakteriím bez přístupu světla). Bakterie rodu *Clostridium* jsou schopné využít nejen sacharolytické substráty, ale i potravinářské odpady, odpadní vody a kaly a lignocelulózové materiály. Mezi substráty používané pro produkci vodíku patří i syrovátka. Syrovátka je odpadní produkt, který vzniká v mlékárenském průmyslu jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, kaseinu a tvarohů. Jednou z možností zpracování syrovátky z mlékáren je biologická produkce vodíku. Při reakci s kyslíkem je vodík za uvolnění energie spalován pouze na vodu. Tato reakce neprodukuje žádné emise, jako je tomu například v případě spalování uhlíku.

Při vsádkové kultivaci za anaerobních podmínek některé druhy rodu *Clostridium* během fáze exponenciálního růstu (acidogenní fáze) vedle vodíku a oxidu uhličitého tvoří acetát a butyrát. Když růst buněk dosáhne stacionární fáze, jejich metabolismus se může změnit z produkce vodíku a kyselin na produkci organických rozpouštědel. Tvorba kyselin způsobuje pokles pH kultivačního média, což vede k zahájení sporulace, a buňky v tomto stadiu mění svůj metabolismus (aceton-butanolové kvašení, solventogenní fáze). Kritickou hodnotou pH pro růst buněk je pH 4,0 (Lipovský J., Patáková P., Rychtera M., Čížková H., Melzoch M. Perspektivy produkce butanolu ze škrobnatých a celulosových materiálů, Chem. listy 103 (2009) 479-483).

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu jsou nové bakteriální kmeny *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 produkující vodík. Tyto kmeny jsou uloženy v České sbírce mikroorganismů (CCM Brno).

Vynález zahrnuje i fragmenty buněk těchto nových bakteriálních kmenů, včetně sekvencí nukleových kyselin (tj. genů nebo jejich částí) kódujících enzymy zodpovědné za produkci vodíku, a enzymů zodpovědných za produkci vodíku a jejich částí.

Identita těchto dvou bakteriálních kmenů byla potvrzena mikroskopicky pomocí typické morfologie buněk, kultivačních a molekulárně biologických metod (včetně rodově a druhově specifických PCR).

V rámci předkládaného vynálezu bylo zjištěno, že při použití médií obsahujících glukosu nebo laktosu nebo jejich směs nebo jiné substráty obsahující výše uvedené komponenty dochází ve fermentoru činností uvedených bakteriálních kmenů k vysoké produkci vodíku. Hodnoty produkce vodíku byly naměřeny v rozmezí 35,8 až 47,5 % (% vyjadřuje objemový podíl vodíku ve volně odcházejících plynech) v čase 18 až 60 hodin od počátku inokulace.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob výroby vodíku, a popřípadě i kyseliny octové a/nebo máselné a/nebo jejich solí, ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu, jehož podstata spočívá v tom, že se na substrát působí alespoň jedním bakteriálním kmenem vybraným z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498.

Substráty obsahující glukosu a/nebo laktosu zahrnují média obsahující glukosu a/nebo laktosu, syrovátku, odpadní vody z výroby sýrů a další odpadní produkty z mlékárenského průmyslu.

S výhodou se výroba vodíku provádí při pH v rozmezí 4 až 7,5, s výhodou 5 až 7, nejvýhodněji pro *Clostridium butyricum* CCM 8499 je pH 5 až 7 a pro *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 je pH 6 až 7.

S výhodou se výroba vodíku provádí při teplotě v rozmezí 30 až 40 °C, výhodněji 35 až 39 °C.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 k produkci vodíku ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 k fermentaci

(zpracování) odpadních vod z výroby sýrů, které obsahují glukosu a/nebo laktosu, syrovátku a další odpadní produkty z mlékárenského průmyslu. Produktem fermentace jsou odpadní voda s nižším obsahem organického podílu; dále vodík a mastné kyseliny, které mohou být rovněž využity.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 k produkci kyseliny octové nebo kyseliny máselné nebo jejich směsi nebo jejich solí, ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu.

Ve výhodném provedení se k produkci vodíku použije kombinace obou kmenů *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498.

Kmeny bakterií, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být dodávány a používány ve formě volné, imobilizované, lyofilizované, ve formě fragmentů buněk (např. DNA, enzymů).

Objasnění výkresů

Obr. 1. Produkce vodíku kmenem *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 v médiu s laktosou (RCML) při pH 5,6 a pH 6,9 (37 °C), příklad 1.

Obr. 2. Produkce vodíku kmenem *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 při použití syrovátky z pokusných výrob sýrů eidamského typu (37 °C), příklad 2.

Obr. 3. Produkce vodíku kmenem *Clostridium butyricum* CCM 8499 v médiu s laktosou (RCML) při 37 °C, příklad 3.

Obr. 4. Produkce vodíku kmenem *Clostridium butyricum* CCM 8499 při použití obnovené syrovátky jako média (37 °C), příklad 4.

Obr. 5. Produkce vodíku směsí kmenů *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 (1:1) při použití obnovené syrovátky jako fermentačního média (37 °C), příklad 5.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Bakteriální kmeny *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 produkující vodík byly vybrány ze souboru kmenů bakterií rodu *Clostridium*, které byly průběžně izolovány při sledování kvality sýrů při jejich výrobě. Kmen *Clostridium butyricum* CCM 8499 byl izolován ze sýru eidamského typu. Pro jeho izolaci byl použit RCM agar (Oxoid CM0151, UK) s přidavkem 10 ml roztoku neutrální červení na 1000 ml (0,5% v 60% ethanolu); kultivace probíhala anaerobně při 37 °C po dobu 5 dní. Kultivace izolátu byla provedena anaerobně v tekutém RCMB médiu při 37 °C po dobu 3 dní. Kmen *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 byl izolován z měkkého zrajícího sýru (Romadur). Pro jeho izolaci byl použit RCM agar (Oxoid CM0151, UK) s přidavkem 10 ml roztoku neutrální červení na 1000 ml (0,5% v 60% ethanolu); kultivace probíhala anaerobně při 37 °C po dobu 5 dní. Kultivace izolátu byla provedena anaerobně v tekutém RCMB médiu při 37 °C po dobu 3 dní. Při použití média RCML s laktosou (složení je uvedeno v Tabulce 1) byla sledována produkce vodíku a růst buněk. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2. Vybrány byly kmeny s vysokou produkcí vodíku a nejvyšším nárůstem buněk.

Fermentace probíhala v laboratorním fermentoru, který sestával z dvouplášťové skleněné nádoby o obsahu 2 litry a analyzátorů plynů pro CO₂ a H₂. Kultivace probíhala za anaerobních podmínek při 37 °C. Očkovací dávka byla 5 % (obj). pH bylo udržováno na konstantní hodnotě pomocí alkalické pumpy – její dávkování bylo řízeno podle signálu pH elektrody. Během fermentace byl udržován konstantní objem fermentačního média.

Tabulka 1: Složení médií RCM a RCML

Složka	Hmotnost (g)	
	RCM ^a	RCML ^b
kvasničný extrakt	3,0	3,0
Lab-Lemco prášek	10,0	10,0
bakteriologický pepton	10,0	5,0
škrob	1,0	1,0
chlorid sodný	5,0	5,0

octan sodný	3,0	3,0
glukosa	5,0	0
laktosa	0	5,0

^a standardní médium (kontrola) (Oxoid CM01),

^b pokusné médium

Tabulka 2 Výběr kmenů v závislosti na produkci vodíku (%) a růstu (cfu/ml)

Kmen	Druh	H ₂ (%)	CFU/ml
S29	<i>C. tyrobutyricum</i>	0,0	2.10E+03
CCM 8498	<i>C. tyrobutyricum</i>	47,5	2.60E+06
CCM 8499	<i>C. butyricum</i>	35,8	1.40E+05
L3	<i>C. tyrobutyricum</i>	30,9	nestanoveno
1030	<i>C. butyricum</i>	27,4	1.10E+04
12-15-1A	<i>C. tyrobutyricum</i>	45,8	2.00E+02
V51-RCM-3C	<i>C. tyrobutyricum</i>	1,3	1.26E+05
SMR 184	<i>C. tyrobutyricum</i>	0,0	2.28E+03
SP 112	<i>C. tyrobutyricum</i>	54,5	>1,00E+03

Příklad produkce vodíku kmenem *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 při použití média obsahujícího laktosu (RCML, viz Tabulka 1) při teplotě 37 °C je uveden na Obr. 1. Při použití média obsahujícího laktosu docházelo v laboratorním fermentoru k produkci vodíku při hodnotě pH 6,9; podíl vodíku ve volně odcházejících plynech činil 47,5 % při pH 6,9.

Příklad 2

Příklad produkce vodíku kmenem *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 při použití syrovátky z pokusných výrob sýrů eidamského typu při teplotě 37 °C je uveden na Obr. 2. Při použití uvedeného média docházelo v laboratorním fermentoru k produkci vodíku při hodnotě pH 6,9 jako v případě použití média s laktosou (RCML).

Při kultivaci za laboratorní teploty (20 °C) kmen neprodukoval významnější množství vodíku.

Příklad 3

Příklad produkce vodíku kmenem *Clostridium butyricum* CCM 8499 při použití média obsahujícího laktosu (RCML, viz Příloha 1) je při teplotě 37 °C uveden na Obr. 3. Při použití média obsahujícího laktosu docházelo v laboratorním fermentoru k produkci vodíku při hodnotách pH 5,6 a 6,9. U fermentace při použití pH 5,6 došlo k výraznému časovému posunu produkce vodíku.

Příklad 4

Příklad produkce vodíku kmenem *Clostridium butyricum* CCM 8499 při použití obnovené syrovátky jako média (byla použita sušená syrovátka; hmotnost použité syrovátky byla přepočtena na stejný obsah laktosy jako u média RCML) při teplotě 37 °C je uveden na Obr. 4. Produkce vodíku byla vyšší při pH 5,6 než při pH 6,9. Podíl vodíku ve volně odcházejících plynech činil až 28 % při pH 5,6; zatímco při pH 6,9 nepřesáhl hodnotu 15 %. Při kultivaci za laboratorní teploty (20 °C) kmen neprodukoval významnější množství vodíku.

Příklad 5

Vzhledem k tomu že sladká syrovátka má pH v rozmezí hodnot 6,5 až 6,9, přítomnost kmene *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 umožňuje produkovat vodík i při vyšších hodnotách pH. Tvorba kyselin způsobuje pokles pH kultivačního média, což umožňuje využití kmene *Clostridium butyricum* CCM 8499. Při fermentaci je kmen *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 po 42 hodinách nedetekovatelný a při produkci vodíku se uplatňuje kmen *Clostridium butyricum* CCM 8499.

Při fermentaci syrovátky směsí klostridií při teplotě 37 °C byl podíl kmene *C. butyricum* CCM 8499 u obou směsí pro produkci vodíku rozhodující. Při poměru kmenů (1:1) metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) nebyla prokázána přítomnost kmene *C. tyrobutyricum* CCM 8498 po více než 18 hodinách fermentace.

Příklad 6

Produkce kyselin

Při vsádkové kultivaci při použití glukosy, laktosy, nebo jejich směsi jako substrátu, testované druhy rodu *Clostridium* za anaerobních podmínek během fáze exponenciálního růstu vedle vodíku a oxidu uhličitého tvořily acetát a butyrát. Produkce těkavých mastných kyselin testovanými bakteriálními kmeny v RCM médiu (s glukosou) je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3 Produkce těkavých mastných kyselin testovanými bakteriálními kmeny - plynová chromatografie (RCM médium)

Druh	Kmen	Kyselina/(koncentrace (mg/L))				
		octová	propionová	i-máselná	n-máselná	n-valerová
<i>C. tyrobutyricum</i>	CCM 8498	828	0	0	2123	0
<i>C. butyricum</i>	CCM 8499	1557	0	0	0	0

Průmyslová využitelnost

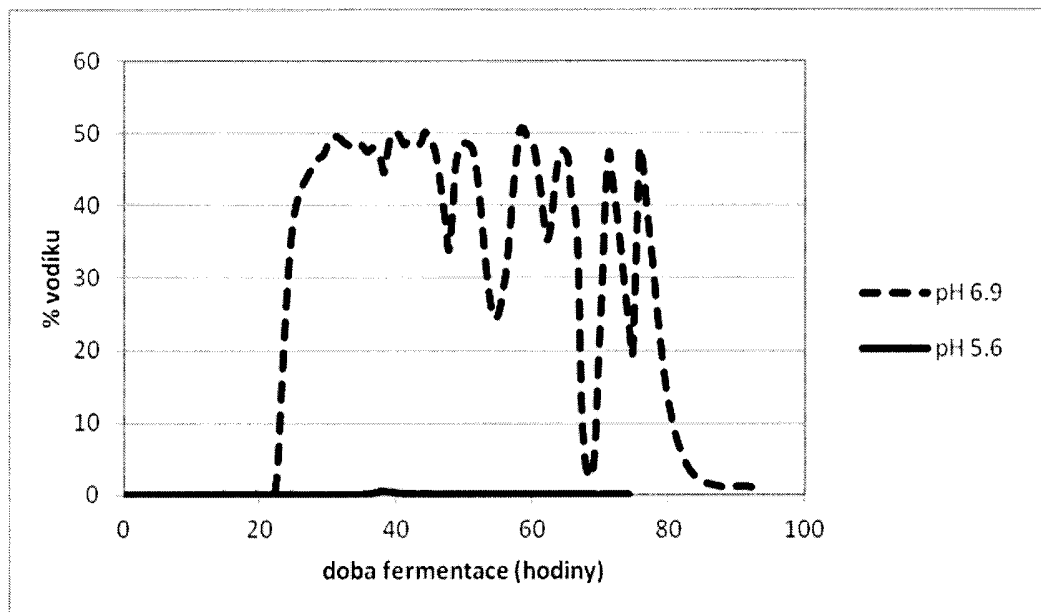
V České republice se zpracovává ročně asi 2,5 miliardy litrů mléka a z výroby sýrů je produkováno asi 900 milionů litrů syrovátky jako vedlejšího produktu. Lze odhadovat, že dvě třetiny produkované syrovátky jsou s nulovým ziskem prodávány ke krmným účelům nebo nežádoucím způsobem unikají do životního prostředí. V Evropě se většina syrovátky velkokapacitně zpracovává ve specializovaných podnicích, kam se syrovátka sváží v zahuštěném stavu i z velkých vzdáleností. Tento způsob zpracování syrovátky je energeticky velmi náročný a stále obtížněji udržitelný v důsledku rostoucích cen pohonných hmot. Navrhovaný způsob zpracování syrovátky z mlékáren umožňuje biologickou produkci vodíku. Vodík lze využít jako nízkotlaký lokální zdroj energie. Při fermentaci vznikají těkavé mastné kyseliny (kyselina octová a máselná), které lze po vhodném zpracování dále využít jako biologicky nezávadná konzervační činidla v potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

PATENTOVÉ NÁROKY

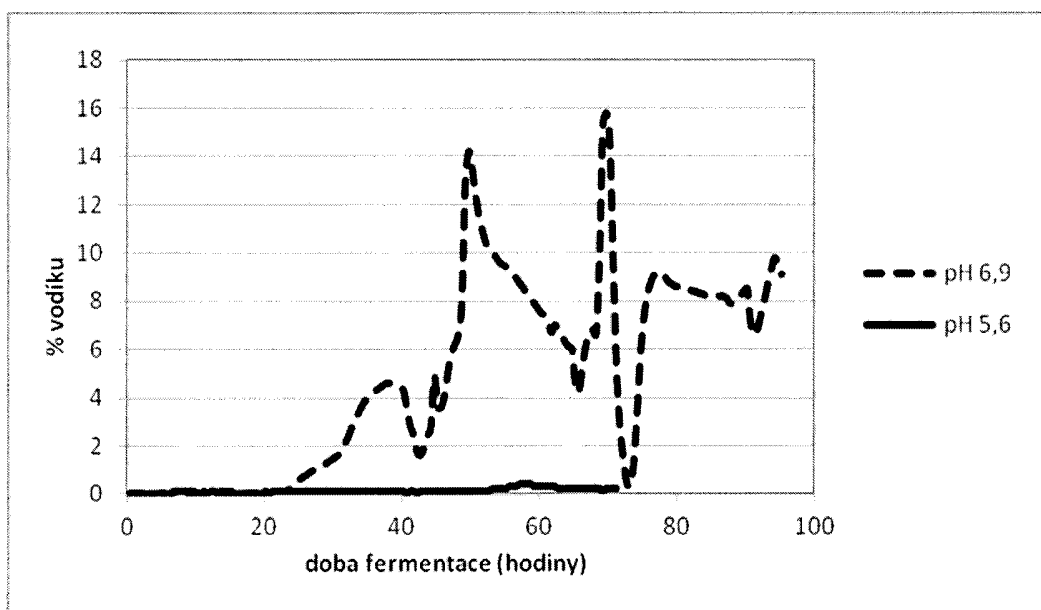
1. Bakteriální kmeny *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 produkující vodík, a fragmenty buněk těchto bakteriálních kmenů, zejména vybrané ze sekvencí nukleových kyselin, které kódují enzymy zodpovědné za produkci vodíku, a jejich částí, a enzymů zodpovědných za produkci vodíku a jejich částí.
2. Způsob produkce vodíku, a popřípadě i kyseliny octové a/nebo máselné a/nebo jejich solí, ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu, vyznačený tím, že se na substrát působí alespoň jedním bakteriálním kmenem vybraným z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498.
3. Způsob podle nároku 2, vyznačený tím, že se na substrát působí alespoň jedním bakteriálním kmenem při pH v rozmezí 4 až 7,5, s výhodou 5 až 7.
4. Způsob podle nároku 2 nebo 3, vyznačený tím, že se na substrát působí alespoň jedním bakteriálním kmenem při teplotě v rozmezí 30 až 40 °C, výhodněji 35 až 39 °C.
5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4, vyznačený tím, že substrát obsahující glukosu a/nebo laktosu je vybrán ze skupiny zahrnující média obsahující glukosu a/nebo laktosu, syrovátku, odpadní vody z výroby sýrů a odpadní produkty z mlékárenského průmyslu.
6. Použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 a/nebo fragmentů buněk těchto kmenů k produkci vodíku ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu.
7. Použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 a/nebo fragmentů buněk těchto kmenů k fermentaci odpadních vod vznikajících při výrobě sýrů, které obsahují glukosu a/nebo laktosu.
8. Použití alespoň jednoho kmene vybraného z *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 a/nebo fragmentů buněk těchto kmenů k produkci

kyseliny octové a/nebo kyseliny máselné a/ nebo jejich solí, ze substrátu obsahujícího glukosu a/nebo laktosu.

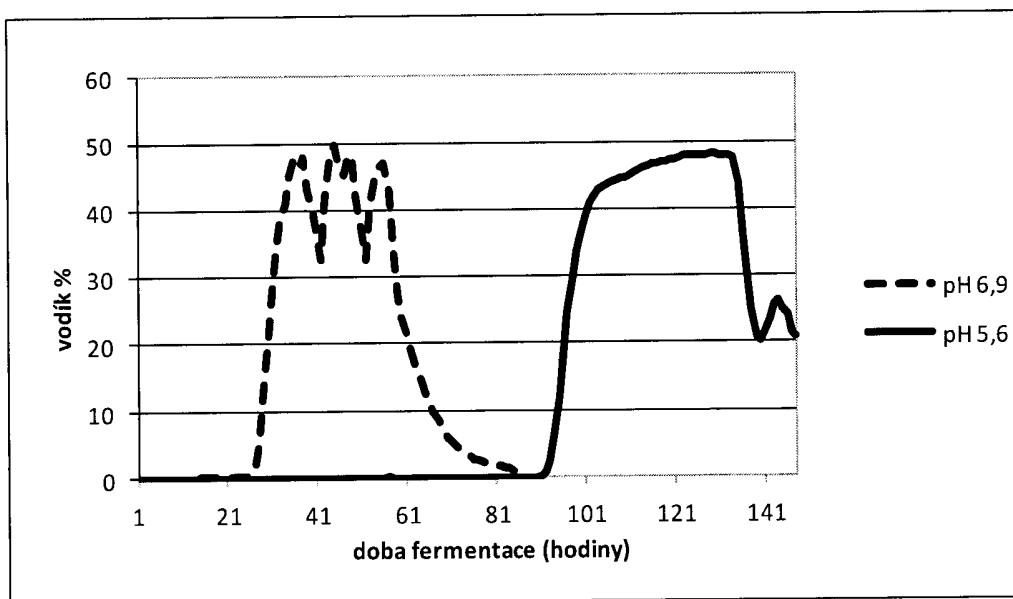
9. Použití podle kteréhokoliv z nároků 6 až 8, vyznačené tím, že se použije směs obou kmenů *Clostridium butyricum* CCM 8499 a *Clostridium tyrobutyricum* CCM 8498 a/nebo fragmentů buněk těchto kmenů.



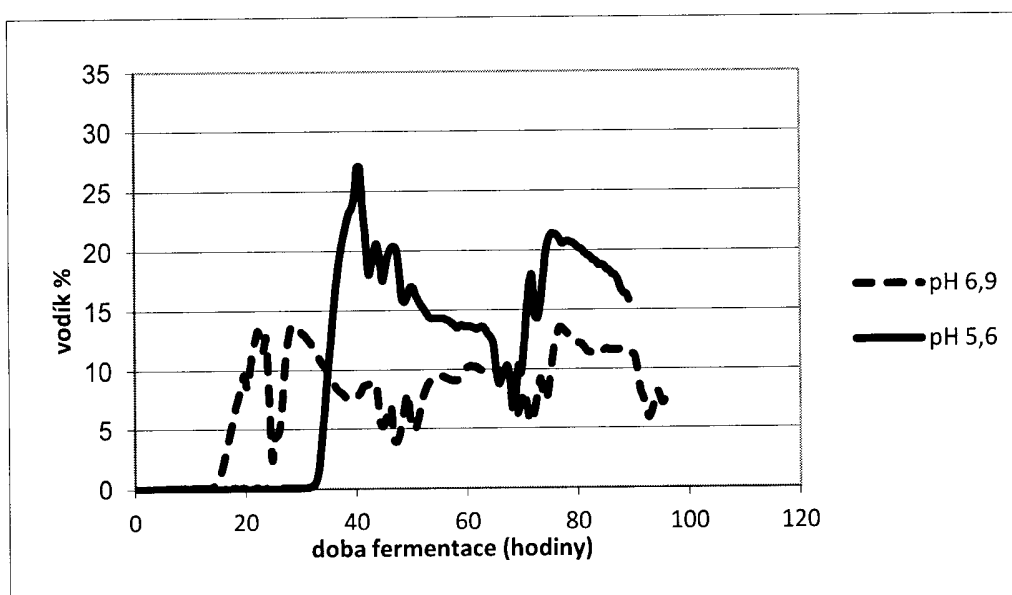
Obr.1



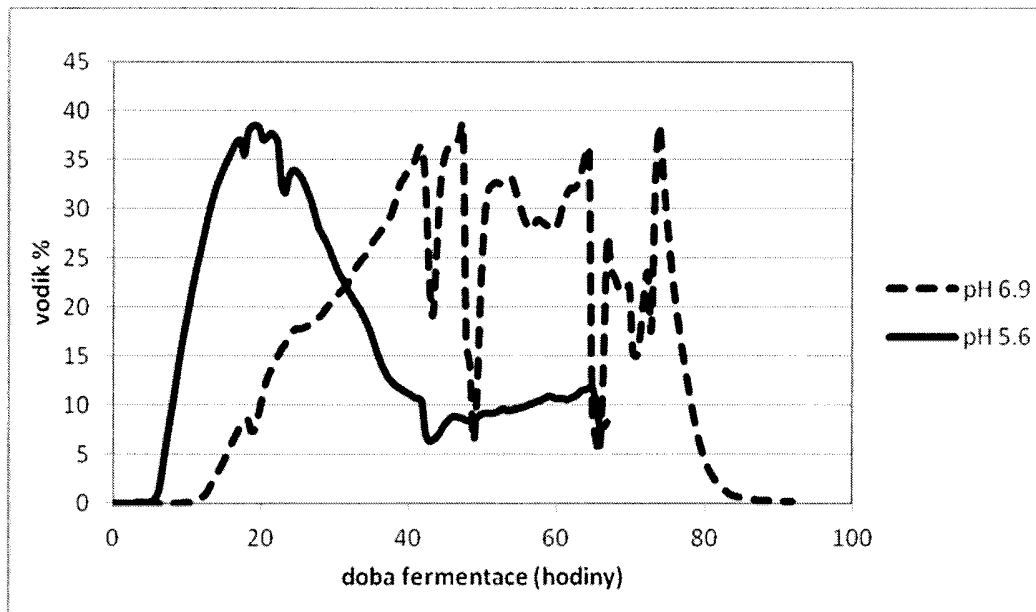
Obr.2



Obr.3



Obr.4



Obr.5