

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 300

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
A23C 21/02 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-335**
(22) Přihlášeno: **21.05.2012**
(40) Zveřejněno: **04.12.2013**
(Věstník č. 49/2013)
(47) Uděleno: **11.04.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.05.2018**
(Věstník č. 21/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
CZ 303827 B6 & PV 2012-171, Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.i.i., 15.5.2013; CZ 299782 & PV 2006-19, Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., 18.7.2007; S. Grba et al.: Selection of Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass Production on Whey 2002 Chem. Biochem. Eng. Q. 16 (1) 13–16; Sansonetti, Sascha et al.: Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology 2010 Bioresour Technol. 101(23):9156-62, Epub 2010 Jul 13, ISSN: 0960-8524.; Sansonetti, S., et al.: A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study 2011 Bioresource Technology 102, 16, 7513-7520, ISSN: 0960-8524.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Praha,
CZ

(72) Původce:
Ing. Marian Urban, Praha 7, CZ
RNDr. Lubomír Adámek, Praha 4, CZ

(74) Zástupce:
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název vynálezu:
Průmyslový mikrobiální kmen
***Kluyveromyces marxianus* CCM 8390**
Urban et Adamek (2011/1)

(57) Anotace:
Průmyslový mikrobiální kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban and Adamek (2011/1), který je využitelný zejména k produkci etanolu ze substrátů obsahujících laktózu např. syrovátky, dále pak jako vysoce hodnotná biomasa v potravinářském, farmaceutickém a krmivářském průmyslu. Je uložen v České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Tvrďého 14, 602 00 Brno, CZ.

CZ 307300 B6

Průmyslový mikrobiální kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban et Adamek (2011/1)

5 Oblast techniky

Řešení se týká průmyslového mikrobiálního kmene *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban and Adamek (2011/1), který je využitelný zejména k produkci etanolu ze substrátů obsahujících laktózu a to v průmyslových podmínkách za kontinuálních či diskontinuálních podmínek.

10

Dosavadní stav techniky

15

Syrovátka obsahující přibližně 5 % w/v laktózy, vznikající při výrobě sýrů, tvarohu a kaseinu, už dávno přestala být jen obtížným vedlejším produktem a její použití se posouvá od užití v krmivářství k užití v lidské výživě.

20

Snaha o lepší možnosti využití syrovátky spolu s ekonomicko-ekologickými důvody vedly k rozvoji nových technologií směřujících k výrobě etanolu pro potravinářské užití. První patent udělený pro využití syrovátky k výrobě etanolu byl udělen v roce 1939 (patent U.S. 2183141).

25

Mezi první významné zpracovatele patří Irská společnost Carbery Milk Products Ltd., počátek produkce spadá do roku 1978, v současné době vůdčí roli hrají Spojené Státy s 37 miliónů litrů etanolu ročně a Nový Zéland s 23 miliónů ročně. V České republice v současné době výroba etanolu ze syrovátky neprobíhá.

Vhodnost některých kmenů kvasinky *Kluyveromyces marxianus* ke komerční produkci etanolu je známa, hledisko k posouzení je především tvorba žádaného produktu.

30

Vhodností kmenů k produkci etanolu se zabývá např. práce uveřejněná v publikaci Chem. Biochem. Eng. Q. 16 (1) 13–16 (2002), dále Thammasat Int. J. Sc. Tech., Vol.13 Special Edition, November 2008. Dosavadní využití cenné syrovátky však stále je ještě nedostatečné.

35

Podstata vynálezu

40

Uvedené nevýhody odstraňuje nový průmyslový mikrobiální kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban et Adamek (2011/1) produkující etanol v potravinářské kvalitě a dále vysoce hodnotnou biomasu využitelnou v průmyslu potravinářském, farmaceutickém a krmivářském, který je uložený v České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Tvrdého 14, 602 00 Brno, CZ.

45

Nový kmen je schopný produkovat relativně vysoké koncentrace etanolu ze substrátů obsahujících laktózu, přičemž jeho biomasa je velice cenná.

50

Autor izolace původního kmene je Jorgensen, místo izolace VÚKPS v roce 1976, autor identifikace kmene je Kudrjacev. Původní kvasinka je uložena ve sbírce mikroorganismů pod jménem *Fabospora fragillis* RIFIS 228 a CCY 5111. Kmen mikroorganismu je taxonomicky zařazen do skupiny Ascomycetes, čeleď Saccharomycetaceae *Kluyveromyces marxianus*. Podle National Collection of Yeast Cultures (Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, United Kingdom) <http://www.ncyc.co.uk> bývá tato kvasinka nazývána 73 synonymy, např. *Fabospora fragilis*, *Fabospora macedoniensis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces kefir* var. *kefir atd.* Společné všem zástupcům tohoto druhu je asexuální stádium nazývané *Candida kefir*.

Morfologické znaky kmene podle vynálezu: Tvar a velikost vegetativních buněk [μm]: Buňky jsou elipsoidní, či kulaté, samotné nebo v párech či řetízích s rozměry d-š (5-4) min., d-š (3-10) max., vytváří pseudomycelium, pravé mycelium ne. Vzhled a konzistence kolonií: na tuhých půdách jsou krémové až světle hnědé, ploché, ohraničené ve středu vyvýšené, matné, v agaru tvoří diskovité útvary. Charakter nárůstu v kapalném médiu: Na kapalinách nevytváří mázdu ani kožku, vykazuje významný sedimentační efekt, netvoří zákal.

Fyziologické znaky kmene podle vynálezu:

Semi-anearobní fermentace: glukóza:+, galaktóza:+, sacharóza:+, maltóza:-, cellobióza:-, trehalóza:-, lactóza:+, melibióza:-, raffinóza:+, inulin:+, rozpustný škrob:-
Aerobní utilizace a růst: glukóza:+, galaktóza:+, sorbóza:-, sacharóza:+, maltóza:-, cellobióza:+, trehalóza:-, lactóza:+, melibióza:-, raffinóza:+, melizitóza:-, inulin:+, rozpustný škrob:-, xylóza:slabě/latentně, L-arabinóza:+, D-arabinóza:-, ribóza:-, rhamnóza:-, etanol:+, glycerol:+, erythritol:-, ribitol:slabě/latentně, galactitol:-, mannitol:+, sorbitol:+, A M D glucosid:-, salicin:+, kyselina mléčná:+, kyselina jantarová:+, kyselina citronová:+, inositol:-, glukonolakton:-, glukosamin:-, metanol:-, xylitol:+

Optimální teplota kultivace 35 °C, maximální 48 °C.

Kmen podle vynálezu je uchováván v lyofilizovaném stavu na mezinárodním ukládacím místě pod přírůstkovým číslem CCM 8390 (Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Tvrdeho 14, 602 00 Brno). Startovací mikrobiální kultura je uchována na půdě CM 0041 Sabouraud dextrose agar (Oxoid LTD, England).

Kmen podle vynálezu byl připraven několikastupňovým selekčním postupem, a to metodou přirozené selekce v podmínkách krajně nepříznivých pro optimální růst (vysoké koncentrace etanolu, přísné aerobní či anaerobní podmínky, vysoké teploty, kompetice s bakteriemi mléčného kvašení). Narostlé kolonie byly přeočkovány na agarové médium, po statické fázi kultivace byly hodnoceny růstové a produkční schopnosti při submerzní kultivaci na médiu obsahujícím laktózu. Vlastnosti nového kmene podle vynálezu byly ověřovány v laboratorních a poloprovozních podmínkách.

Vyizolovaný a ustálený kmen podle vynálezu se vyznačuje především:

Schopností zkvašovat laktózu i v semi-anaerobních podmínkách
Schopností přežít v podmínkách s 16 % hmotn. etanolu ve fyziologickém roztoku při teplotě 18 až 23 °C po dobu 24 h.
Schopností snášet vyšší osmotický tlak
Schopností snášet maximální teplotu až 48 °C
Schopností výrazného sedimentačního efektu
Schopností utilizace kyseliny mléčné
Schopností vyšší produkce etanolu ze substrátů obsahujících laktózu
Schopností vysokých výtěžků etanolu i za nesterilních podmínek
Nepatogenita, možnost využití v potravinářském průmyslu
Výše zmíněné vlastnosti (přednosti) výrazně ovlivňují široké možnosti průmyslového využití kmene podle vynálezu, který je vysokoprodukční.

Následující příklady provedení kmene podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezují. Jeho schopnosti a účinky byly úspěšně ověřeny původci v laboratořích ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha, v.v.i., CZ.

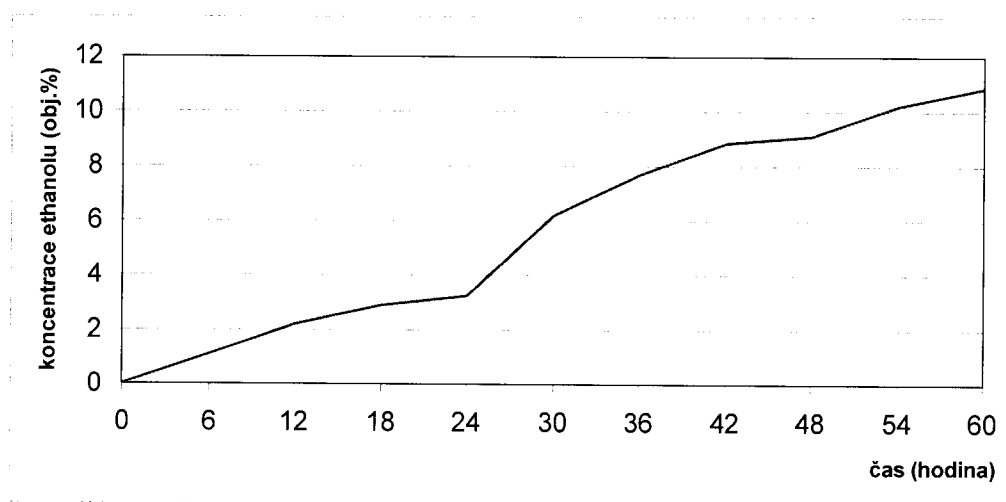
Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Startovací mikrobiální kultura uchovaná na půdě CM 0041 Sabouraud dextrose agar (Oxoid LTD, England) byla spláchnuta ze 3 zkumavek (šikmý agar), celková sušina činila 0,171 g inokulační kultury, do 2 litrů 20% hmotn. sterilní (121 °C, 10min.) sladké syrovátky ve dvou Erlenmayerových baňkách. Doba kultivace činila 48 hodin při teplotě 35 °C za soustavného míchání 200 RPM na třepačce (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific.CO., INC. USA).

Připraveným inokulem byl zaočkován 100l fermentor (VÚCHZ, Brno) obsahující 30 l sladké syrovátky o koncentraci 20 % hmotn. Vlastní kultivace probíhala při teplotě 35 °C a za stálého míchání 350 otáček/min. po dobu 60 hodin v semi-anaerobních podmínkách, v průběhu byly odebírány vzorky ke stanovení množství etanolu v médiu. Maximální koncentrace etanolu bylo dosaženo po 60 hodinách fermentace, a to 86,2 g/l, produkční rychlost tvorby etanolu činila 1,44 g.h⁻¹.l⁻¹, jak znázorňuje následující Graf 1.

Graf 1

Průmyslová využitelnost

20

Kmen *mikroorganismu Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban et Adamek (2011/1) lze využít při průmyslové produkci etanolu ze substrátů obsahujících laktózu, dále pak k produkci vysoce hodnotné biomasy v potravinářském, farmaceutickém či krmivářském průmyslu.

PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Průmyslový mikrobiální kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 Urban et Adamek (2011/1) produkující etanol v potravinářské kvalitě a dále vysoce hodnotnou biomasu využitelnou v průmyslu potravinářském, farmaceutickém a krmivářském, který je uložený v České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Tvrdeho 14, 602 00 Brno, CZ.