

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2015-102

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.02.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **24.08.2016**
(Věstník č. 34/2016)

C12P 7/10 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
B09B 3/00 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, CZ
BRIKLIS, spol. s r.o., Malšice, CZ
EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha 9, CZ

(72) Původce:
doc. Dr. Ing. Petra Patáková, Praha 9, CZ
Ing. Barbora Branská, Ph.D., Praha 9, CZ
Dr. Ing. Leona Paulová, Roztoky, CZ
Ing. Hana Stiborová, Ph.D., Praha 6, CZ
Ing. Petra Lovecká, Ph.D., Praha 6, CZ
Mgr. Jan Kolek, Kolín, CZ
prof. Ing. Karel Melzoch, CSc., Karlštejn, CZ
Ing. Petr Kaštánek, Ph.D., Praha 2, CZ
Ing. Miroslav Šmejkal, Tábor, CZ
Aleš Svátek, Borotín, CZ
Ing. Václav Čabelka, Planá nad Lužnicí, CZ
Ing. Miroslav Medek, Malšice, CZ

hydrolyzátu upraví na hodnotu v rozmezí 4,5 – 5,5 a celulóza obsažená v hydrolyzátu se enzymaticky rozloží zpracováním hydrolyzátu celulolytickým enzymem. Hydrolyza a zpracování obou složek hydrolyzátu se také mohou provádět odděleně a potom se výsledné kultivační médium získá jejich smísením. Způsobu výroby etanolu fermentací výše uvedeného kultivačního média, například za použití kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Způsob výroby butanolu fermentací tohoto kultivačního média, například za použití bakterie *Clostridium pasteurianum*. Popsané kultivační médium se skládá pouze z odpadních surovin a zároveň pokrývá všechny nutriční nároky mikroorganismů produkujících etanol a butanol, takže není nutno přidávat žádné další přísady.

(54) Název přihlášky vynálezu:
Úplné kultivační médium pro mikrobiální produkci etanolu nebo butanolu, způsoby jeho výroby a způsoby výroby etanolu a butanolu

(57) Anotace:
Úplné kultivační médium pro mikrobiální produkci etanolu nebo butanolu, které se skládá z hydrolyzátu odpadu rostlinného původu zpracovaného celulolytickým enzymem a hydrolyzátu odpadu živočišného původu v hmotnostním poměru 0,5 - 1 (hydrolyzát rostlinného původu):0,06 – 0,25 (hydrolyzát živočišného původu). Odpadem rostlinného původu jsou přednostně nedřevnaté nadzemní části bylin, nepoužitelné pro lidskou výživu, jako drcená obilná nebo kukuřičná sláma a odpadem živočišného původu jsou přednostně živočišné tkáně obsahující keratin, jako kuřecí peří. Způsob výroby média uvedeného výše, při němž se směs odpadu rostlinného původu a odpadu živočišného původu podrobí alkalické hydrolyze při pH v rozmezí 12,0 – 13,0 následně se pH

Úplné kultivační médium pro mikrobiální produkci etanolu nebo butanolu, způsoby jeho výroby a způsoby výroby etanolu a butanolu

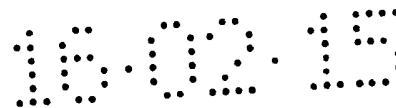
Oblast techniky

Vynález se týká úplného kultivačního média pro mikrobiální produkci etanolu nebo butanolu, způsobů jeho výroby a jeho použití pro mikrobiální výrobu etanolu a butanolu

Dosavadní stav techniky

Výzkum mikrobiální produkce chemikálií, jako jsou alkoholy, z obnovitelných zdrojů je v současnosti soustředěn na využití surovin tzv. druhé generace tj. surovin nepoužitelných pro lidskou výživu. K těmto surovinám patří zemědělské a lesnické odpady (obilná a kukuřičná sláma, piliny, dřevní štěpka atd.) a dále cíleně pěstované tzv. energetické rostliny jako jsou např. ozdobnice (*Miscanthus*), šťovík nebo rychle rostoucí dřeviny, v podmínkách ČR, topol a vrba. Jako ekonomicky výhodnější se jeví zejména využití zemědělských a lesnických odpadů nebo přebytků. Tyto suroviny obsahují mikrobiálně využitelné sacharidy ve vázané podobě buď v celulóze nebo v tzv. hemicelulóze. Celulóza je polysacharid, ve kterém jsou glukózové monomery vázány mezi sebou převážně β -1,4 vazbami, zatímco jako hemicelulóza se označují heteropolymery složené z různých monomerních sacharidů, jak hexóz (glukóza, manóza, galaktóza) tak pentóz (xylóza, arabinóza) i dalších látek. V rostlinných buňkách se oba tyto polysacharidy vyskytují vázány s ligninem v podobě tzv. lignocelulózového komplexu. Tento komplex je však velmi obtížně a velmi pomalu využitelný mikroorganismy, a proto se při mikrobiálním využití surovin, obsahujících lignocelulózový komplex, přistupuje k různým typům rozkladu pomocí mechanických, fyzikálních, chemických a enzymových způsobů nebo jejich kombinací, viz například patent č. US 2014273108 (A1). Výsledkem tohoto rozkladu je získání tzv. hydrolyzátu dané suroviny, který obsahuje směs mikrobiálně využitelných sacharidů, pocházejících jak z celulózy, tak z hemicelulózy, spolu s řadou dalších látek.

Mikrobiální využití těchto hydrolyzátů k produkci etanolu nebo butanolu je známé, viz například patent č. US 2014134692 (A1). Ve většině případů je však k hydrolyzátu potřeba přidávat další látky, sloužící jako zdroj dusíku (amoniak, amonné sole, dusičnany, močovina),



fosforu (fosforečnany), minerálních látek (hořečnaté sole a sole dalších prvků) a také komplexní zdroje esenciálních aminokyselin a vitaminů (kvasničný extrakt, pepton), protože samotný hydrolyzát nekryje dostatečně nároky mikroorganismů na výživu. Avšak nutnost přidávat k hydrolyzátu jak čisté chemikálie, tak komplexní látky mikrobiální produkci jakéhokoliv produktu zdražuje.

Nejdražší složkou kultivačního média, kterou je často nutné k lignocelulózovému hydrolyzátu přidávat, je komplexní zdroj dusíku, který je potřebný pro tzv. auxotrofní mikroorganismy. Auxotrofní mikroorganismy, ke kterým patří i technologicky významní producenti butanolu, vybrané bakteriální druhy rodu *Clostridium*, nemají schopnost syntetizovat si některé aminokyseliny nebo vitaminy. Jako komplexní zdroje dusíku pro růst těchto mikroorganismů se nejčastěji používají hydrolyzáty nebo extrakty z kvasinek nebo různé typy tzv. peptonů, což jsou enzymové hydrolyzáty bílkovin, obsahující směs peptidů a aminokyselin. Takto je možné použít jako složku kultivačního média pro mikroorganismy i pepton z odpadního kuřecího peří, jehož výhodou je jak vysoký obsah proteinu, keratinu, tak vysoký obsah minerálních látek, viz například Taskin M., Kurbanoglu E.B. (2011) Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. J. Appl. Microbiol. 111 (4): 826-834, .

Pepton z kuřecího peří, používaný jako složka kultivačního média pro mikroorganismy, byl však dosud ve všech případech připravován jako enzymový hydrolyzát tj. k jeho výrobě bylo nutné použít enzym s proteolytickou aktivitou. Neexistuje žádná zmínka o tom, že by byl někdy tento pepton připravován pouze alkalickou hydrolyzou ani, že by byl používán společně s hydrolyzátem materiálu, obsahujícího celulózu. Rovněž není známo, že by bylo někdy peří hydrolyzováno společně s rostlinným materiálem pro přípravu úplného kultivačního média.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je společné zpracování a/nebo využití odpadů z rostlinné a živočišné výroby, které je výhodnější než jejich zpracování a využití oddělené. Oba typy odpadů, zpracované buď jednotlivě, nebo společně, se použijí jako substrát pro vhodné mikroorganismy, produkující alkoholy. Hlavní výhodou tohoto řešení je skutečnost, že odpady z rostlinné a živočišné výroby se vzájemně doplňují z hlediska nutričních nároků mikroorganismů a k jejich směsi není nutné pro růst mikroorganismů a produkci žádaných metabolitů přidávat žádné další čisté chemikálie.

Prvním aspektem předmětu vynálezu v hlavním provedení i) je úplné kultivační médium pro mikrobiální produkci etanolu nebo butanolu, které se skládá z hydrolyzátu odpadu rostlinného původu zpracovaného celulolytickým enzymem a alkalického hydrolyzátu odpadu živočišného původu v hmotnostním poměru sušiny obou hydrolyzátů 0,5-1 (rostlinný hydrolyzát) : 0,06-0,25 (živočišný hydrolyzát).

Přednostní provedení tohoto aspektu vynálezu zahrnují zejména

ii) médium podle provedení i), kde odpadem rostlinného původu jsou nedřevnaté nadzemní části bylin;

iii) médium podle provedení i), kde nedřevnaté nadzemní části bylin zahrnují drcenou obilnou nebo kukuřičnou slámu;

iv) médium podle kteréhokoliv z provedení i) až iii), kde odpadem živočišného původu jsou živočišné tkáně obsahující keratin; a

v) médium podle kteréhokoliv z provedení i) až iii), kde živočišnou tkání obsahující keratin je kuřecí peří. Druhým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu vi)) je způsob výroby média podle kteréhokoliv z provedení i) až v), při němž se směs odpadu rostlinného původu a odpadu živočišného původu podrobí alkalické hydrolyze při pH v rozmezí 12,0-13,0, následně se pH hydrolyzátu upraví na hodnotu v rozmezí 4,5-5,5 a celulóza obsažená v hydrolyzátu se enzymaticky rozloží zpracováním hydrolyzátu celulolytickým enzymem.

Třetím aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu vii)) je způsob výroby média podle kteréhokoliv z provedení i) až v), při němž se v kroku

a) odpad rostlinného původu podrobí alkalické hydrolyze při pH v rozmezí 12,0-13,0, následně se pH hydrolyzátu upraví na hodnotu rozmezí 4,5-5,5 a celulóza obsažená v hydrolyzátu se enzymaticky rozloží zpracováním hydrolyzátu celulolytickým enzymem; odděleně se v kroku

b) odpad živočišného původu podrobí alkalické hydrolyze za analogických podmínek jako při postupu podle a) a po úpravě jeho pH na hodnotu v rozmezí 4,5-5,5 se

c) produkty získané v krocích a) a b) smísí.

Přednostní provedení způsobů představujících druhý a třetí aspekt předmětu vynálezu (provedení vynálezu viii)) představuje způsob podle provedení vi) nebo vii), při němž se alkalická hydrolyza provádí při pH 12,0-13,0 při teplotě 60-80°C po dobu 12-24h za současného třepání nebo míchání.

Jiné přednostní provedení způsobů představujících druhý a třetí aspekt předmětu vynálezu (provedení vynálezu ix)) představuje způsob podle kteréhokoliv z provedení vi) až viii), při němž se rozklad celulózy provádí přidáním 1-2% hmotn. celulolytického enzymu, který se nechá působit 12-24h, při teplotě 45-55°C, za současného třepání nebo míchání.

Čtvrtým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu x) je způsob výroby etanolu fermentací kultivačního média mikroorganismem produkujícím etanol jako kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, při němž se jako kultivačního média použije úplného kultivačního média podle kteréhokoliv z provedení i) až ix), prostého jakýchkoliv dalších přísad.

Konečně, pátým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu xi)) je způsob výroby butanolu fermentací kultivačního média mikroorganismem produkujícím butanol jako bakterie *Clostridium pasteurianum*, při němž se jako kultivačního média použije úplného kultivačního média podle kteréhokoliv z provedení i) až xi), prostého jakýchkoliv dalších přísad.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 Společná hydrolyza slámy a kuřecího peří a využití hydrolyzátu k produkci etanolu

Společná hydrolyza: Množství 7,5 g pšeničné slámy o sušině 94 % hm. se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA) (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s) na částice, které propadnou sítím o velikosti ok 3 mm. Množství 1 g vysušeného a odmaštěného peří se také namele na střížném mlýnku (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s). Uvedená množství namleté slámy a namletého peří se smíchají a přelijí se 100 ml 0,6%-roztoku hydroxidu draselného v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá společná alkalická hydrolyza obou materiálů na rotační třepačce (otáčky 150 min⁻¹) při teplotě 70°C po dobu 24 h. Dále se upraví pH na hodnotu 5,0 ± 0,2 přidávkem 4 ml 10% roztoku H₃PO₄ a přidá se 1,5 ml

celulolytického enzymu Cellic CTec2 (Novozymes A/S, Dánsko). Enzymová hydrolýza celulózy probíhá 24 h, při teplotě 50°C, na rotační třepačce (otáčky 150 min⁻¹).

Příprava inokula: Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se skladuje v podobě tzv. kryokonzerv v Ependorfových mikrozkušavkách při teplotě -70°C. Jedna kryokonzerva o objemu 1 ml se použije na přípravu inokula tím způsobem, že se po rozmražení přelije v očkovacím boxu do 100 ml sterilního YPD média (složení média v g/l: kvasničný extrakt 10, pepton 20, glukóza 20) v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Inokulum se kultivuje v termostatu při teplotě 30°C po dobu 24 h.

Fermentace: Hodnota pH hydrolyzátu se upraví na $6,0 \pm 0,2$ pomocí 20% roztoku NaOH. Obsah baňky se zaočkuje 10 ml inokula kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a inkubuje se v termostatu při teplotě 30°C, po dobu 48 h. Po skončení kultivace se odebere vzorek, ve kterém se po odstředění a filtraci, stanoví koncentrace etanolu jako produktu fermentace a glukózy jako zbytkového substrátu. Stanovení se provádí pomocí HPLC (podmínky HPLC analýzy: H⁺ kolona temperovaná na 60°C, mobilní fáze 5mM H₂SO₄ o průtoku 0,5 ml/min, refraktometrický detektor). Koncentrace etanolu po fermentaci je 10 g/l, koncentrace zbytkové glukózy 0 g/l.

Příklad 2 Společná hydrolýza slámy a kuřecího peří a využití hydrolyzátu k produkci butanolu

Společná hydrolýza: Množství 7,5 g pšeničné slámy o sušině 94 % hm. se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA) (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s) na částice, které propadnou sítím o velikosti ok 3 mm. Množství 1 g vysušeného a odmaštěného peří se také namele na střížném mlýnku (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s). Uvedená množství namleté slámy a namletého peří se smíchají a přelijí se 100 ml 0,6% roztoku hydroxidu draselného v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá společná alkalická hydrolýza obou materiálů na rotační třepačce (otáčky 150 rpm) při teplotě 70°C po dobu 24 h. Dále se upraví pH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ přidávkem 4 ml 10% roztoku H₃PO₄ a přidá se 1,5 ml celulolytického enzymu Cellic CTec2 (Novozymes A/S, Dánsko). Enzymová hydrolýza celulózy probíhá 24 h, při teplotě 50°C, na rotační třepačce (otáčky 150 rpm).

Příprava inokula: Bakterie *Clostridium pasteurianum* se skladuje v podobě tzv. sporových konzerv v Ependorfových mikrozkušavkách, v lednici, při teplotě 4°C. Jedna sporová konzerva o objemu 1 ml se použije na přípravu inokula tím způsobem, že se po tepelném šoku (80°C, 30s) přelije v očkovacím boxu do 100 ml sterilního TYA média

(složení média v g/l: kvasničný extrakt 2, trypton 6, glukóza 20, KH_2PO_4 0,5, octan amonný 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01) v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Inokulum se kultivuje v anaerobní komoře při teplotě 37°C po dobu 24 h.

Fermentace: Hodnota pH hydrolyzátu se upraví na $6,0 \pm 0,2$ pomocí 20% roztoku NaOH. Obsah baňky se zaočkuje 10 ml inokula bakterie *Clostridium pasteurianum* a inkubuje se v anaerobní komoře při teplotě 37°C , po dobu 48 h. Po skončení kultivace se odebere vzorek, ve kterém se po odstředění a filtraci, stanoví koncentrace butanolu a acetonu jako produktů fermentace a glukózy jako zbytkového substrátu. Stanovení se provádí pomocí HPLC (podmínky HPLC analýzy: H^+ kolona temperovaná na 60°C , mobilní fáze 5mM H_2SO_4 o průtoku 0,5 ml/min, refraktometrický detektor). Koncentrace butanolu a acetonu po fermentaci jsou 5,0 a 3,8 g/l, koncentrace zbytkové glukózy 2 g/l.

Příklad 3 Oddělená hydrolyza slámy a kuřecího peří a využití směsného hydrolyzátu k produkci etanolu

Hydrolyza pšeničné slámy: Množství 10 g pšeničné slámy o sušině 94 % hm. se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA) (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s) na částice, které propadnou sítím o velikosti ok 1 mm. K uvedenému množství slámy se přidá 1,8 g NaOH a 0,6 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 100 ml vody v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá alkalická hydrolyza na rotační třepačce (otáčky 150 rpm) při teplotě 80°C po dobu 39 min. Po hydrolyze se kapalný podíl oddělí filtrací, k pevnému podílu se přidá 100 ml vody, upraví se pH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ pomocí 10% roztoku H_3PO_4 a přidá se 2 ml celulolytického enzymu Cellic CTec2 (Novozymes A/S, Dánsko). Enzymová hydrolyza celulosy probíhá 24 h, při teplotě 50°C , na rotační třepačce (otáčky 150 rpm).

Hydrolyza kuřecího peří: Množství 1,25 g vysušeného a odmaštěného peří se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA, podmínky mletí 10 000 ot./s, 20 s). Namleté peří se přelije se 100 ml 0,6% roztoku hydroxidu draselného v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá alkalická hydrolyza na rotační třepačce (otáčky 150 rpm) při teplotě 70°C po dobu 24 h.

Příprava inokula: Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se skladuje v podobě tzv. kryokonzerv v Ependorfových mikrozkuřkách při teplotě -70°C . Jedna kryokonzerva o

objemu 1 ml se použije na přípravu inokula tím způsobem, že se po rozmražení přelije v očkovacím boxu do 100 ml sterilního YPD média (složení média v g/l: kvasničný extrakt 10, pepton 20, glukóza 20) v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Inokulum se kultivuje v termostatu při teplotě 30°C po dobu 24 h.

Fermentace: Hydrolyzát slámy a kuřecího peří se smíchají v poměru 1:1 a hodnota pH vzniklého směsného hydrolyzátu se upraví na $6,0 \pm 0,2$ pomocí 20% roztoku NaOH. Směsný hydrolyzát o objemu 100 ml se zaočkuje 10 ml inokula kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a inkubuje se v termostatu při teplotě 30°C, po dobu 48 h. Po skončení kultivace se odebere vzorek, ve kterém se po odstředění a filtraci, stanoví koncentrace etanolu jako produktu fermentace a glukózy jako zbytkového substrátu. Stanovení se provádí pomocí HPLC (podmínky HPLC analýzy: H^+ kolona temperovaná na 60°C, mobilní fáze 5mM H_2SO_4 o průtoku 0,5 ml/min, refraktometrický detektor). Koncentrace etanolu po fermentaci je 13 g/l, koncentrace zbytkové glukózy 0 g/l.

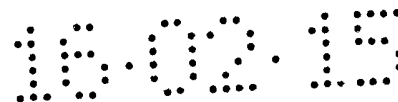
Příklad 4 Oddělená hydrolyza slámy a kuřecího peří a využití směsného hydrolyzátu k produkci butanolu

Hydrolyza pšeničné slámy: Množství 10 g pšeničné slámy o sušině 94 % hm. se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA) (podmínky mletí: 10 000 ot./s, 20 s) na částice, které propadnou sítím o velikosti ok 1 mm. K uvedenému množství slámy se přidá 1,8 g NaOH a 0,6 g $Ca(OH)_2$ a 100 ml vody v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá alkalická hydrolyza na rotační třepačce (otáčky 150 rpm) při teplotě 80°C po dobu 39 min. Po hydrolyze se kapalný podíl oddělí filtrací, k pevnému podílu se přidá 100 ml vody, upraví se pH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ pomocí 10% roztoku H_3PO_4 a přidá se 2 ml celulolytického enzymu Cellic CTec2 (Novozymes A/S, Dánsko). Enzymová hydrolyza celulosy probíhá 24 h, při teplotě 50°C, na rotační třepačce (otáčky 150 rpm).

Hydrolyza kuřecího peří: Množství 1,25 g vysušeného a odmaštěného peří se namele na střížném mlýnku (GRINDOMIX GM 200, Retsch, USA; podmínky mletí 10 000 ot./s, 20 s). Namleté peří se přelije se 100 ml 0,6% roztoku hydroxidu draselného v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Baňka se uzavře vatovou zátkou a ta se překryje alobalem. Následně probíhá alkalická hydrolyza na rotační třepačce (otáčky 150 rpm) při teplotě 70°C po dobu 24 h.

Příprava inokula: Bakterie *Clostridium pasteurianum* se skladuje v podobě tzv. sporových konzerv v Ependorfových mikrozkušavkách, v lednici, při teplotě 4°C. Jedna sporová konzerva o objemu 1 ml se použije na přípravu inokula tím způsobem, že se po tepelném šoku (80°C, 30s) přelije v očkovacím boxu do 100 ml sterilního TYA média (složení média v g/l: kvasničný extrakt 2, trypton 6, glukóza 20, KH₂PO₄ 0,5, octan amonný 3; MgSO₄·7H₂O 0,3; FeSO₄·7H₂O 0,01) v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml. Inokulum se kultivuje v anaerobní komoře při teplotě 37°C po dobu 24 h.

Fermentace: Hydrolyzát slámy a kuřecího peří se smíchají v poměru 1:1 a hodnota pH vzniklého směsného hydrolyzátu se upraví na $6,0 \pm 0,2$ pomocí 20% roztoku NaOH. Směsný hydrolyzát o objemu 100 ml se zaočkuje 10 ml inokula bakterie *Clostridium pasteurianum* a inkubuje se v anaerobní komoře při teplotě 37°C, po dobu 48 h. Po skončení kultivace se odebere vzorek, ve kterém se po odstředění a filtraci, stanoví koncentrace butanolu a acetonu jako produktů fermentace a glukózy jako zbytkového substrátu. Stanovení se provádí pomocí HPLC (podmínky HPLC analýzy: H⁺ kolona temperovaná na 60°C, mobilní fáze 5mM H₂SO₄ o průtoku 0,5 ml/min, refraktometrický detektor). Koncentrace butanolu, acetonu a etanolu po fermentaci jsou po řadě 6,7; 3,8 a 1,3 g/l, koncentrace zbytkové glukózy 0 g/l.



PATENTOVÉ NÁROKY

1. Úplné kultivační médium pro mikrobiální produkci ethanolu nebo butanolu **vyznačující se tím**, že se skládá z hydrolyzátu odpadu rostlinného původu zpracovaného celulolytickým enzymem a hydrolyzátu odpadu živočišného původu v hmotnostním poměru sušiny obou hydrolyzátů 0,5-1 (rostlinný hydrolyzát) : 0,06-0,25 (živočišný hydrolyzát).
2. Médium podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že odpadem rostlinného původu jsou nedřevnaté nadzemní části bylin, nepoužitelné pro lidskou výživu.
3. Médium podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že nedřevnaté nadzemní části bylin zahrnují drcenou obilnou nebo kukuřičnou slámu.
4. Médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že odpadem živočišného původu jsou živočišné tkáně obsahující keratin.
5. Médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že živočišnou tkání obsahující keratin je kuřecí peří.
6. Způsob výroby média podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že se směs odpadu rostlinného původu a odpadu živočišného původu podrobí alkalické hydrolyze při pH v rozmezí 12,0-13,0, následně se pH hydrolyzátu upraví na hodnotu v rozmezí 4,5-5,5 a celulóza obsažená v hydrolyzátu se enzymaticky rozloží zpracováním hydrolyzátu celulolytickým enzymem.
7. Způsob výroby média podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že se v kroku
 - a) odpad rostlinného původu podrobí alkalické hydrolyze při pH v rozmezí 12,0-13,0, následně se pH hydrolyzátu upraví na hodnotu rozmezí 4,5-5,5 a celulóza obsažená v hydrolyzátu se enzymaticky rozloží zpracováním hydrolyzátu celulolytickým enzymem; odděleně se v kroku
 - b) odpad živočišného původu podrobí alkalické hydrolyze za analogických podmínek jako při postupu podle a) a po úpravě jeho pH na hodnotu v rozmezí 4,5-5,5 se
 - c) produkty získané v krocích a) a b) smísí.

8. Způsob podle nároku 6 nebo 7, **vyznačující se tím**, se alkalická hydrolýza provádí při pH 12,0-13,0, při teplotě 60-80°C, po dobu 12-24h za současného třepání nebo míchání.
9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 6 až 8, **vyznačující se tím**, že se rozklad celulózy provádí přidáním 1-2% hmotn. celulolytického enzymu, který se nechá působit 12-24h, při teplotě 45-55°C, za současného třepání nebo míchání.
10. Způsob výroby etanolu fermentací kultivačního média mikroorganismem produkujícím etanol jako kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, **vyznačující se tím**, že se jako kultivačního média použije úplného kultivačního média podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, prostého jakýchkoliv dalších přísad.
11. Způsob výroby butanolu fermentací kultivačního média mikroorganismem produkujícím butanol jako bakterie *Clostridium pasteurianum*, **vyznačující se tím**, že se jako kultivačního média použije úplného kultivačního média podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, prostého jakýchkoliv dalších přísad.