

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2014-353

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.05.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.12.2015**
(Věstník č. 50/2015)

C12P 7/14 (2006.01)
C12G 3/12 (2006.01)
C12G 3/06 (2006.01)
C12G 3/02 (2006.01)
A23C 21/02 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12R 1/87 (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Praha
10- Hostivař, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Lubomír Adámek, Praha 4- Krč, CZ
Ing. Ivana Laknerová, Praha 4- Nusle, CZ
Ing. Marian Urban, Praha 7- Holešovice, CZ
Eva Rutová, Praha 3, CZ
Lucie Janovská, Praha 10, CZ
- (74) Zástupce:
Patentová a známková kancelář Novotný, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 45/2135, 120 00 Praha 2

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob kombinované dvoustupňové
fermentace rostlinných šťáv a
deproteinované syrovátky**

- (57) Anotace:
Řešení se týká dvoustupňového způsobu fermentační výroby nízko až středně alkoholických nápojů na bázi rostlinné šťávy a deproteinované syrovátky pomocí kvasničných kmenů zkvašujících zejména laktózu. První stupeň probíhá na zahusťených roztocích deproteinované syrovátky v míchaných mikroaerofilních podmínkách růstu při teplotách 25 až 37 °C a hodnotách pH 4,0 až 6,0. Naprodukováná biomasa kvasničné kultury po odstředění je použita jako výhradní masivní inokulum pro zakvašení roztoků rostlinných šťáv v druhém stupni fermentace probíhající stacionárně nebo v míchaných mikroaerofilních podmínkách. Pro výrobu středně alkoholických nápojů je lihovitost prokvašené rostlinné šťávy s výhodou posílena přidavkem ethanolu získaného destilací supernatantu z prvního stupně fermentace.

Způsob kombinované dvoustupňové fermentace rostlinných šťáv a deproteinované syrovátky

Oblast techniky

Vynález se týká dvoustupňového způsobu fermentační výroby nízko až středně alkoholových nápojů na bázi rostlinné šťávy a syrovátky s tím, že základ tvoří rostlinná šťáva, která je prokvašována za použití masivního kvasničného inokula mléčného kvašení, získaného prokvašením roztoků deproteinované syrovátky z předchozího stupně fermentace, přičemž naprodukovaný ethanol z prokvašené syrovátky je možno použít na posílení stupně lihovitosti ve finálním nápoji.

Dosavadní stav techniky

K prokvašování ovocných šťáv na optimální hodnotu obsahu ethanolu 10 až 12 % obj. je běžně zapotřebí doba 2 – 8 týdnů. Fermentace při koncentraci ethanolu blízké 10 % obj. probíhá značně pomaleji vlivem inhibičního působení naprodukovaného ethanolu na kvasničné buňky. Některé rostlinné šťávy (např. aroniová) obsahují pouze malé množství zkvasitelných látek, a proto je fermentací dosahováno optimální koncentrace ethanolu nepřevyšující hodnotu 5 % obj.. Hlubšího stupně prokvašování je možné docílit smícháním různých druhů rostlinných šťáv s vyšším množstvím asimilovatelných látek (např. jablečná šťáva). Společným zkvašováním ovocné šťávy a syrovátky se dosahuje optimální koncentrace ethanolu 9 až 10,5 % obj., přičemž nápoj získává příjemnou ovocnou chuť.

Prodloužení doby kvašení, spojené s využíváním více koncentrovaných rostlinných šťáv chudých na asimilovatelné látky, je způsobené vyšším osmotickým tlakem média, popř. zvýšenou přítomností bakteriostatických látek (např. kyseliny chlorogenové). V důsledku nahromadění nezkvasitelných látek může docházet k nežádoucí změně sensorických chuťových vlastností často spojené s výskytem vedlejších zdravotních účinků (např. laxativních).

V jiných případech lze množství zkvasitelných látek uměle navyšovat externím přidáváním dalších asimilovatelných látek, zejména cukrů.

Syrovátka patří k bioproduktům vyznačující se 70 až 75 % hmotn. obsahem využitelné laktózy a při použití vhodného kvasničného kmene je vhodnou surovinou pro výrobu středně nebo nízkoalkoholických nápojů.

Výživový význam syrovátky je všeobecně znám. Sladká syrovátka vzniká při výrobě sýrů srážením bílkovin pomocí enzymového syřidla při hodnotě pH 5 až 6. V syrovátce je obsaženo asi 50 % hmotn. sušiny mléka. Sušina se pohybuje mezi 4,0 až 6,5 % hmotn., z čehož největší podíl tvoří laktóza (70 až 80 % hmotn. sušiny) a dále bílkoviny (cca 10 % hmotn. sušiny). Zbývající podíl je tvořen minerálními látkami a nebílkovinnými dusíkatými látkami (cca 11 % hmotn. sušiny), tuky (cca 1 % hmotn.), kyselinami a vitaminy.

Sladká syrovátka odchází z provozu mlékárenského průmyslu v podobě málo koncentrovaných roztoků, které je nutno bezprostředně zpracovat zahuštěním na odparce a následně usušit. Vzhledem k zvyšující se ceně sušené sladké syrovátky na trhu se pro pouhé zkrmování stává syrovátka málo cenově výhodná a je účelnější ji dále zhodnotit, tzn. na místo pouhého ekonomicky náročného sprejového sušení je výhodnější ji fermentačně zpracovat na finální produkty, a sice na etanol a zejména na různé alkoholické nápoje a vysoce proteinové potraviny, kterých je na trhu stále málo. Tekutá fáze, která vznikne po separaci proteinové složky syrovátky, obsahuje významné množství zkvasitelných látek (zejména 70 až 75 % hmotn. laktózy), které je možno fermentací vhodným mikrobiálním kmenem zpracovat na etanol.

Určujícím faktorem délky fermentace této prokvašované směsi jsou růstové podmínky (teplota, pH, obsah živin) a zejména kvalita a množství vneseného inokula. Málo aktivní inokulum způsobuje prodlužování průběhu fermentace a zvyšuje nebezpečí vývoje jiných nežádoucích kvasných procesů.

Přidávky některých látek zlepšují ekonomiku fermentačního procesu. Janssen a kol., 1983, popisuje přídavek 0,5 % hmotn. peptonu, přídavek kvasničného extraktu uvádí ve své práci Rossenberg a kol., 1955, dále Grba a kol., 2002, a Ghaly a kol., 1997 a přídavek 1 % hmotn. melasy zmiňuje ve své práci Kourkoutas a kol., 2001. Janssen a kol., 1983, prezentuje pozitivní účinek na dobu zkvašování deproteinované syrovátky kmenem *Kluyveromyces fragillis* přídavky nenasycených mastných kyselin a ergosterolu v Tweenu 80. Adámek a Laknerová (2010) zjistili pozitivní účinek extraktu rostlinné biomasy pohanky (šrot, nať, obaly nažek) na rychlost prokvašování syrovátkových médií kmenem *Fabospora fragillis*. Podobný účinek měl i přídavek samotného rutinu nebo ostatních rostlinných materiálů bohatých na tento bioflavonoid (výlisky aronie a rakytníku (Adámek a Laknerová, 2010). Výskyt rutinu v rostlinné biomase dalších druhů rostlin je poměrně široký (Sofic a kol., 2012, Alaghemand a kol., 2012, Musallam a kol., 2011) a zahrnuje škálu různých bylin. Kromě bylin je obsažen i v plodech některých dřevin (Sochor a kol., 2010, Shannon, 2011).

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob kombinované dvoustupňové fermentace rostlinných šťáv a deproteinované syrovátky, podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že prokvašená deproteinovaná syrovátka z prvního stupně kultivace je rozdělena na fugát obsahující buňky mléčné kvasničné kultury a supernatant složený z naprodukovaného ethanolu a zbytku nevyužitých solí a dalších organických látek. V druhém stupni kultivace fugát slouží k masivnímu zakvašení roztoků rostlinných šťáv pomocí speciálních kvasničných kmenů mléčného kvašení a naprodukovaný ethanol obsažený v supernatantu se použije po destilaci ke zvýšení stupně lihovitosti ve výsledném alkoholickém nápoji.

Dostatečné množství inokula v prvním stupni kultivace je získáno pomnožením vhodných mléčných kvasničných kultur (např. *Fabospora fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Kluyveromyces lactis*) na roztocích deproteinované syrovátky v podmínkách třepané kultury (120 až 180 RPM), v rozmezí teplot 25 až 37 °C a hodnot pH 4,0 až 6,0. Růstové požadavky kvasničných kmenů jsou plně zajištěny minerálními a růstovými složkami látek obsažených v použitých roztocích deproteinované syrovátky.

Po prokvašení a odstředění je pomnožená kvasničná biomasa, ve formě fugátu, použita na masivní inokulaci roztoků rostlinných šťáv v druhém stupni kultivace. Masivní zákvas druhého stupně fermentace na rostlinné šťávě umožňuje překonávat negativní růstové vlivy v prokvašované rostlinné šťávě (zejména inhibitory a vyšší osmotický tlak). Fermentace probíhá stacionárně nebo v míchaných mikroaerofilních podmínkách při teplotách 25 až 37 °C a hodnotách pH 4,0 až 6,0.

Naprodukovaný ethanol v supernatantu z prvního stupně kultivace, obsahující optimálně 8 až 10 % obj. ethanolu, je po oddestilování použit pro posílení stupně lihovitosti ve finálním alkoholickém nápoji při zachování velmi dobré senzorické jakosti. Výše zmiňovaná suplementace je vhodná zejména pro rostlinné šťávy s nízkým množstvím zkvasitelných látek a rovněž přispívá k mikrobiální stabilizaci připraveného nápoje.

Vynález si klade za cíl dát k dispozici technologický postup řízené kombinované dvoustupňové fermentace rostlinných šťáv, který použitím dostatečného množství inokula kultury mléčných kvasinek významně zkracuje fermentační dobu a přípravu finálního alkoholického nápoje a zároveň omezuje vývoj nežádoucích mikrobiálních kontaminací.

Následující příklady provedení fermentačního procesu podle tohoto vynálezu, pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly. Způsob podle vynálezu byl úspěšně vyzkoušen původci v praxi u přihlašovatele ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha, v.v.i., CZ.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Kombinovaná dvoufázová fermentace 20% hmotn. roztoku jablečné šťávy a 20 % hmotn. deproteinované sladké syrovátky

1.stupeň

Za účelem přípravy dostatečného množství inokula pro zaočkování stacionární kultury 20 hmotn. % jablečné šťávy byla provedena 48 hodinová fermentace 20 hmotn. % deproteinované syrovátky. Kultivace probíhala v podmínkách třepané kultury (RPM 180) při pH 5,0 až 5,5 a kultivační teplotě 30 °C v 5 litrové Erlenmayerově baňce s užitným plněním 1000 ml vodného roztoku 20% hmotn. deproteinované syrovátky, předem sterilované 1 hod. varem na vodní lázni.

Během kultivace byla sledována refrakce, obsah naprodukovaného ethanolu a změny pH (Tabulka 1).

Tabulka 1 Průběh parametrů kultivace deproteinované syrovátky v podmínkách třepané kultury (180 RPM, teplota 30 °C)

Doba kultivace (hod.)	Refrakce (% hmotn.)	Ethanol (% obj.)	pH
0	18,5	0	5,25
24	12,9	4,74	4,81
30	11,5	6,16	4,79
48	8,4	8,86	4,69

Získaný fugát obsahující kulturu mléčné kvasinky *Fabospora fragilis* (1,8 g sušiny/l) byl po odstředění deproteinované syrovátky použit jako výhradní inokulum pro následné masivní zakvašení jablečné šťávy.

2.stupeň

Odstředěnou kvasničnou biomasou mléčné kultury *Fabospora fragilis* (2,1 g sušiny/l) byla inokulována 20 % hmotn. jablečná šťáva a kultivována za stacionárních podmínek v termostatu při teplotě 30 °C v 5 litrové Erlenmayerově baňce s užitným plněním 1000 ml 20 hmotn. % jablečné šťávy, předem sterilované 1 hodinu na vroucí vodní lázni. Průběh kvašení v jednotlivých dnech je zaznamenán v Tabulce 2.

Tabulka 2 Průběh parametrů kvašení stacionární fermentace jablečné šťávy

Doba kultivace (den)	Refrakce (% hmotn.)	Ethanol (% obj.)	pH
0	23,7	1,60	5,47
5	16,4	5,69	5,02
6	15,0	6,99	5,03
7	14,6	7,58	5,06
8	14,1	8,10	5,06
9	13,8	8,62	5,07
13	13,4	10,27	5,08

Po ukončení kvašení byla z ovocné šťávy kultura kvasinek odstředěna a čirý roztok šťávy byl pro zvýraznění senzorických vlastností dochucen 10 ml jablečného aromatu Zelené jablko.

Příklad 2

Kombinovaná dvoustupňová fermentace 20% hmotn. roztoku aroniové šťávy a 20 % hmotn. deproteinované sladké syrovátky

1.stupeň

Za účelem přípravy dostatečného množství inokula pro zaočkování stacionární kultury 20 hmotn. % šťávy aronie a zajištění ethanolu pro posílení stupně lihovitosti finálních ovocných nápojů byla provedena 40 hodinová fermentace 20 hmotn. % deproteinované syrovátky. Kultivace inokula probíhala v podmínkách třepané kultury (RPM 180) při pH 4,5 až 5,0 a kultivační teplotě 30 °C v 5 litrových Erlenmayerových baňkách s obsahem 1000 ml vodných roztoků 20% hmotn. deproteinované syrovátky, předem sterilované 1 hod. varem na vodní lázni.

Během kultivace byly sledovány hodnoty refrakce, obsah naprodukovaného ethanolu a změny pH (Tabulka 3).

Tabulka 3 Průběh parametrů růstu fermentačního pokusu deproteinované syrovátky v podmínkách třepané kultury (180 RPM, teplota 30 °C)

Doba kultivace (hod.)	Refrakce (% hmotn.)	Ethanol (% obj.)	pH
0	18,9	0	5,22
22	15,3	2,99	4,98
40	10,0	8,60	4,83

Fugát obsahující kulturu mléčné kvasinky *Kluyveromyces marxianus* CCM 8390 byl po odstředění deproteinované syrovátky použit jako výhradní masivní inokulum pro následné zakvašení aroniové šťávy (1,9 g sušiny/l), přičemž izolovaný naprodukovaný ethanol z prokvašené deproteinované syrovátky byl použit po destilaci pro posílení stupně lihovitosti k dosažení požadované koncentrace ethanolu ve finálním nápoji (viz. příklad 3)

2.stupeň

Po odstředění narostlé kultury mléčných kvasinek byl získaný fugát z prvního stupně kultivace (2,4 g sušiny/l) resuspendován 900 ml roztoku 20 % aroniové šťávy a 200 ml takto získané suspenze bylo použito jako výhradní inokulum pro fermentace 2 x 1000 ml 20 % aroniové šťávy. Paralelní kultivace probíhaly v 5 litrových Erlenmayerových baňkách s užitným plněním 1000 ml kultivačního média za stacionárních podmínek při teplotě 30 °C. Průběh kvašení v jednotlivých dnech je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4 Průběh parametrů kvašení stacionární fermentace aroniové šťávy (paralelní pokusy 1 a 2)

Doba kultivace (den)	Refrakce (% hmotn.)		Ethanol (% obj.)		pH	
	1	2	1	2	1	2
0	20,3	20,3	0	0	5,48	5,48
3	17,2	17,4	3,02	2,60	5,26	5,37
4	15,4	16,0	4,0	3,54	5,24	5,24
5	15,3	15,5	4,47	4,32	5,16	5,16
6	14,6	15,0	4,74	4,70	5,20	5,21
7	14,6	15,0	4,99	4,78	5,20	5,19

Příklad 3

Fortifikace prokvašené aroniové šťávy přidavkem ethanolu

Pro přípravu nápoje s žádanou koncentrací ethanolu 20 % obj. bylo do 750 ml prokvašené aroniové šťávy s obsahem 4,99 obj. % ethanolu (získané podle postupu v příkladu 2) přidáno 250 ml 65 % obj. ethanolu. Pro posílení stupně lihovitosti finálního nápoje byl použit ethanol (65 % obj.) získaný destilací supernatantu prokvašené 20 % hmotn. deproteinované syrovátky v prvním stupni kultivace (viz. příklad 2) po oddělení inokulační biomasy.

Příklad 4

Vliv množství inokula na intenzitu prokvašování aroniové šťávy

Roztoky 5 % hmotn. aroniové šťávy s přidavkem 10 % hmotn. sacharózy byly po 1 hod. sterilaci zaočkovány vnesením kvasničné biomasy *Kluyveromyces lactis* v množstvích 0,2 g sušiny, 0,4 g sušiny a 0,8 g sušiny/200 ml, resp.. Fermentace probíhala v míchaných mikroaerofilních podmínkách při 30 °C (třepačka, 180 RPM) (Tab. 5) a ve stacionárních podmínkách (termostat, 30 °C, Tab. 6).

Tabulka 5 Průběhy fermentačních parametrů s různými vsádkami inokula v roztocích 5 % aroniové šťávy se suplementem 10 % sacharózy v míchaných mikroaerofilních podmínkách

		inokulum (% obj.)				
		10		20		40
Doba	Rf	Ethanol	Rf	Ethanol	Rf	Ethanol
kultivace	(% hmotn.)	(ml/100	(% hmotn.)	(ml/100	(% hmotn.)	(ml/100
(hod)		ml)		ml)		ml)
0	14,4	0,7	14,9	1,4	16,0	2,8
17	13,3	1,34	12,8	2,83	12,5	5,85
23	12,5	1,62	11,9	3,16	11,0	6,0
40	12,1	1,65	10,5	4,17	8,4	9,20
64	12,0	1,90	8,9	5,75	7,7	9,79

Tabulka 6 Průběhy fermentačních parametrů s různými vsádkami inokula v roztocích 5 % aroniové šťávy se suplementem 10 % sacharózy ve stacionárních podmínkách

		inokulum (% obj.)				
		10		20		40
Doba	Rf	Ethanol	Rf	Ethanol	Rf	Ethanol
kultivace	(% hmotn.)	(ml/100	(% hmotn.)	(ml/100	(% hmotn.)	(ml/100
(dny)		ml)		ml)		ml)
0	13,0	0,9	14,2	1,8	14,8	3,6

3	12,5	1,85	12,4	3,25	13,1	4,99
4	11,6	2,47	11,5	3,98	12,0	5,83
5	10,9	2,93	10,1	5,03	11,1	6,19
6	10,9	3,42	9,4	5,81	10,1	6,83
7	10,2	3,93	8,6	6,57	10,0	7,39

Průmyslová využitelnost

Způsob kombinované dvoustupňové fermentace rostlinných šťáv a deproteinované syrovátky je progresivním technologickým postupem řízené kombinované dvoustupňové fermentace rostlinných šťáv, který použitím dostatečného množství inokula kultury mléčných kvasinek významně zkracuje fermentační dobu a přípravu finálního alkoholického nápoje a zároveň omezuje vývoj nežádoucích mikrobiálních kontaminací. Tím je jeho aplikace určena pro potravinářský průmysl.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob dvoustupňové kombinované fermentace roztoků rostlinných šťáv a deproteinované syrovátky za využití mléčných kvasničných kmenů, **vyznačující se tím**, že první stupeň fermentace probíhá na zakoncentrovaných roztocích deproteinované syrovátky s cílem zisku masivního inokula pro zakvašení rostlinných šťáv a v následném druhém stupni fermentace je prokvašená deproteinovaná syrovátka z prvního stupně kultivace rozdělena na fugát obsahující buňky mléčné kvasničné kultury a supernatant složený z naprodukovaného ethanolu a zbytku nevyužitých solí a dalších organických látek, přičemž v druhém stupni kultivace se fugát použije k masivnímu zakvašení roztoků rostlinných šťáv pomocí speciálních kvasničných kmenů mléčného kvašení a naprodukovaný ethanol obsažený v supernatantu se použije po destilaci ke zvýšení stupně lihovitosti na 12 až 20% obj.ve výsledném alkoholickém nápoji.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že první stupeň fermentace je veden v mikroaerofilních podmínkách míchané kultury a nakultivovaná kvasničná biomasa je základem pro masivní inokulaci rostlinné šťávy v druhém stupni fermentace probíhající ve stacionárních nebo míchaných mikroaerofilních podmínkách.
3. Způsob podle nároku 1 a 2, **vyznačující se tím**, že fermentace probíhá u obou stupňů v podmínkách rozmezí teplot 25 až 37 °C a hodnot pH 4,0 až 6,0.
4. Způsob podle předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že masivní inokulum je tvořeno s výhodou kmeny kvasničných mléčných kultur *Fabospora fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Kluyveromyces lactis* s koncentrací zásevu 0,1 až 0,5 % hmotn. sušiny.
5. Způsob podle předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že nahromaděná kvasničná biomasa v prokvašené rostlinné šťávě je odstraněna filtrací nebo odstředěním.

6. Způsob podle předcházejících nároků, , **vyznačující se tím**, že získaná prokvašená rostlinná šťáva po odstředění je dochucena extrakty aromatických bylin nebo aromaty.