

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.03.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2013**
(Věstník č. 20/2013)

(21) Číslo dokumentu:

2012-171

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

<i>A23C 21/00</i>	(2006.01)
<i>C07C 31/08</i>	(2006.01)
<i>C12N 1/16</i>	(2006.01)
<i>C12P 7/14</i>	(2006.01)
<i>A23J 1/18</i>	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.i.i., Praha 10 -
Hostivař, CZ

(72) Původce:

Adámek Lubomír RNDr., Praha 4, CZ
Urban Marian Ing., Praha 7, CZ
Beran Miloš Ing., Praha 5, CZ
Rutová Eva, Praha 3, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob semikontinuální fermentační výroby
etanolu, komplexu syrovátkových bílkovin a
kvasničné biomasy ze syrovátky**

(57) Anotace:

Semikontinuální způsob současné fermentační výroby etanolu a nutričně hodnotného komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy, při němž se syrovátkové médium podrobí v nevětraném fermentoru řízené anaerobní fermentaci kvasničnými kmeny asimilujícími laktózu, zejména kvasničným kmenem *Fabospora fragilis*, případně též *Saccharomyces fragilis* či *lactis* nebo některým z kmenů rodu *Kluyveromyces* či *Candida*, případně kombinací těchto kmenů, po dosažení požadované koncentrace etanolu ve fermentačním médiu v rozmezí 6 až 10 % hmotn. se část kompletního prokvašeného média oddělí pro separaci etanolu a komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy a zbývající část doplní dalším syrovátkovým médiem, po dosažení požadované koncentrace etanolu se celý proces periodicky opakuje v dalších cyklech. V jiném provedení může být sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou po odstředění vrácen společně s čerstvým syrovátkovým médiem zpět do fermentoru pro posílení procesu etanolové fermentace v dalším cyklu. Získaný komplex syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy, obsahující 20 až 80 % hmotn. syrovátkových bílkovin a 10 až 80 % hmotn. kvasničné biomasy, může být použit při výrobě řady potravinářských produktů, včetně funkčních potravin a nutraceutik.

CZ 2012 - 171 A3

Způsob semikontinuální fermentační výroby etanolu, komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy ze syrovátky

Oblast techniky

Vynález se týká semikontinuálního současného získávání etanolu, nutričně hodnotného komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy z vysoce koncentrovaných roztoků sladké syrovátky.

Dosavadní stav techniky

Pro výrobu etanolu nebo kvasničné biomasy je využívána celá řada různých uhlíkatých substrátů, nejčastěji různých sacharidů. Také mléčný cukr laktóza je často využívaným substrátem pro výrobu těchto produktů. Obvyklým zdrojem laktózy pro průmyslové využití je syrovátka.

Syrovátka dlouhodobě představovala pro mlékárenský průmysl obtížně zpracovatelný odpad. Část syrovátky byla zkrmována, podstatný podíl však byl často bez užitku likvidován mikrobiální degradací a představoval významný ekologický problém.

Díky vývoji moderních ultrafiltračních technologií slouží v dnešní době syrovátka nejčastěji jako surovina pro oddělení syrovátkových bílkovin, ve formě různých izolátů a koncentrátů. Syrovátkové bílkoviny jsou nutričně velmi hodnotné a mají velmi široké spektrum využití v potravinářském průmyslu, včetně potravinových doplňků pro sportovní výživu. Rovněž jsou použitelné ve farmacii a kosmetice. Po ultrafiltrační separaci bílkovin vzniká deproteinovaná syrovátka obsahující zejména laktózu a minerální látky. Deproteinovaná syrovátka představuje stále obtížný odpad s vysokou biologickou spotřebou kyslíku. Může být využita pro izolaci laktózy krystalizací ze zahuštěného roztoku. Tento proces je vzhledem k nízkému obsahu laktózy však dosti nákladný. Proto byla patentována celá řada fermentačních postupů zpracování syrovátky, deproteinované nebo kompletní, eventuálně dalších mléčných produktů, na různé metabolické produkty vznikající asimilací laktózy.

Některé patentované fermentační postupy zpracování syrovátky nebo jiných médií obsahujících laktózu zahrnují mikrobiální výrobu butanolu a acetonu (US 2166047), aminokyselin (JP 58020194, JP 59034894), potravinářských zahušťovacích a emulgačních činidel (US 4444793, NZ 201321, US 4851235), kyseliny propionové (AU 3490884, IE 851036L, CA 1256738), xantanové gumy (US

5434078), bioplynu (EP 1553059), octa (JP 2002335944), kyseliny mléčné a mléčanů (EP 0265409, RU 2112391, US 5952207) a v nedávné době také probiotických přípravků (např. EP 1502947, BG 108769U) nebo laktulózy (např. CN 1324956, RU 2203959).

Řada patentů se týká fermentační výroby etanolu (GB 477863, GB 1491405, GB 801274, GB 1524618, US 4617861, RU 2105060, EP 1041153, NZ 514253, EP 1041153 a EP 1918381). Mléčný cukr laktóza patří mezi obtížně asimilovatelné cukry pro kvasinky. Pouze několik kvasničných kmenů disponuje enzymem β -galaktosidázou, který je nezbytný pro štěpení laktózy na jednoduché zkvasitelné cukry glukózu a galaktózu. Mezi tyto kmeny patří *Saccharomyces fragilis*, kmeny rodu *Kluyveromyces*, zejména *K. marxianus* a *K. lactis*, některé kmeny rodu *Candida*, zejména *C. pseudotropicalis*, nebo *Fabospora fragilis*.

Řada patentů chrání také fermentační výrobu kvasničné biomasy s využitím laktózy jako zdroje uhlíku a energie (např. ES 2050066, CZ 299782).

Vzhledem k malé asimilovatelnosti laktózy, a tudíž nízké efektivitě její konverze na metabolické produkty, je však většina fermentačních technologií zmíněných výše málo efektivní pro průmyslové využití.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje nový semikontinuální způsob současné fermentační výroby etanolu, nutričně hodnotného komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy ze zahuštěné kompletní syrovátky, nebo syrovátkového média připraveného rozpuštěním sušené syrovátky ve vodě, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se syrovátkové médium podrobí v nevětraném fermentoru řízené anaerobní fermentaci kvasničnými kmeny asimilujícími laktózu, při teplotě 20 až 45 °C a hodnotě pH 4 až 6, v jejímž průběhu se převážná většina ze 4 až 20 % hmotn. přítomné laktózy přemění na etanol o koncentraci v rozmezí 6 až 10 % hmotn. v médiu, načež se část kompletního prokvašeného média oddělí pro separaci etanolu a sedimentu syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou a zbývající část doplní čerstvým syrovátkovým médiem a po dosažení požadované koncentrace etanolu se celý proces periodicky opakuje.

Způsob podle vynálezu je charakterizován tím, že anaerobní fermentace probíhá za působení zejména kvasničným kmenem *Fabospora fragilis*, případně též *Saccharomyces fragilis* či *lactis* nebo některým z kmenů rodu *Kluyveromyces* či *Candida*, případně kombinací těchto kmenů.

Způsob podle vynálezu je také charakterizován tím, že etanol je z prokvašeného média odebíraného v průběhu a po ukončení semikontinuální fermentace oddělen destilací, nanofiltrací či pervaporací jako jeden z konečných produktů.

Způsob podle vynálezu je dále charakterizován tím, že sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou je z prokvašeného média odebíraného v průběhu a po ukončení semikontinuální fermentace oddělen odstředěním jako další konečný produkt.

Způsob podle vynálezu je charakterizován též tím, že sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou je po odstředění vrácen společně s čerstvým syrovátkovým médiem zpět do fermentoru pro posílení procesu etanolové fermentace v dalším cyklu.

Nutričně hodnotný komplex syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy vyrobený způsobem podle vynálezu je také podstatou vynálezu, která spočívá v tom, že komplex obsahuje 20 až 80 % hmotn. syrovátkových bílkovin a 10 až 80 % hmotn. kvasničné biomasy.

Způsobem podle vynálezu získaný sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou po odstředění může být vrácen společně s čerstvým syrovátkovým médiem zpět do fermentoru pro posílení procesu etanolové fermentace v dalším cyklu.

Vzniklý etanol je z odebrané části prokvašeného média oddělen destilací, pervaporací nebo nanofiltrací. Tímto způsobem vyrobený etanol je velmi kvalitní a může být využit například jako potravinářský líh nebo bioetanol do palivových směsí.

Komplex syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou, získaný způsobem podle vynálezu, je z odebrané části prokvašeného média oddělen odstředěním jako další produkt.

Koncentrát syrovátkových bílkovin je zdrojem vysoce ceněných kvalitních bílkovin s nadprůměrným obsahem větvených aminokyselin. Kromě syrovátkových bílkovin obsahuje produkt kvasničnou biomasu v množství 10 až 80 % hmotn., která

mu dodává řadu nutričně významných látek, jako jsou beta-glukany, glukomananový komplex, vitaminy skupiny B, esenciální stopové prvky v biologické vazbě, nebo glutation. Některé složky kvasničné biomasy, jako jsou např. nukleové kyseliny, mohou také přispívat ke zvýšení senzorické kvality produktu.

Způsob podle vynálezu poskytuje nový levnější postup současné výroby koncentráту syrovátkových bílkovin, obohaceného kvasničnou biomasou s vysokým obsahem nutričně významných složek a etanolu jako druhého produktu.

Dále se způsobem podle vynálezu zpracuje velké množství syrovátky, která je jinak obtížně zpracovatelným vedlejším produktem, ale s vysokým obsahem nutričně významných látek.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Laboratorní pokus

1 litr sterilního média obsahujícího 20 % hmotn. sušené syrovátky ELIGO, a.s. v EM baňce o objemu 2 litry bylo inokulováno ze šikmého agaru kulturou *Fabospora fragilis* CCY 51-1-5, S – 2423333 ze sbírky Výzkumného ústavu potravinářského v Praze, v.v.i. Sušená syrovátka ELIGO, a.s. obsahuje přibližně 75 % hmotn. laktózy a 12 % hmotn. bílkovin.

Následující anaerobní fermentace probíhala na stolní rotační třepačce GFL 1083 (GFL Gesellschaft Labortechnik) při 180 kyvech za minutu při absenci větrání, teplotě 30 °C a hodnotě pH 5 až 6. Po 51 hodinách fermentace, když refrakce R_f klesla z původní hodnoty 18,5 na hodnotu 8,5 % a koncentrace etanolu byla 9,02 % objem., byl ukončen 1. fermentační cyklus. V tomto rozsahu koncentrací je hodnota R_f úměrná koncentraci laktózy v médiu a je jí možno použít jako rychlý orientační test pro řízení fermentace. Druhý fermentační cyklus byl iniciován přidávkem dalšího litru sterilního 20% hmotn. vodného roztoku syrovátky ELIGO, a.s. k prokvašenému médiu. Snížením již inhibiční koncentrace etanolu došlo k obnovení fermentačního procesu. Druhý fermentační cyklus byl ukončen po 23 hodinách, kdy hodnota R_f klesla z původních 14,9 na hodnotu 12 %, při koncentraci etanolu 7,41 % objem. Po ukončení 2. fermentačního cyklu byl odebrán 1 litr prokvašeného média,

uschován v chladnici pro další zpracování a nahrazen 1 litrem sterilního 20% hmotn. vodného roztoku syrovátky ELIGO, a.s., čímž byl iniciován 3. fermentační cyklus. Třetí fermentační cyklus byl ukončen po 53 hodinách, kdy hodnota R_f klesla z původních 15,4 na hodnotu 10,5 %, při koncentraci etanolu 8,38 % objem. Opět byl odebrán 1 litr prokvašeného média, uschován v chladnici a nahrazen 1 litrem sterilního 20% hmotn. vodného roztoku syrovátky ELIGO, a.s., čímž byl iniciován 4. fermentační cyklus. Čtvrtý, poslední fermentační cyklus, byl ukončen po 42 hodinách, kdy hodnota R_f klesla z původních 14,8 na hodnotu 11,1 %, při koncentraci etanolu 7,56 % objem. Po ukončení 4. fermentačního cyklu byl celý objem prokvašeného média spojen s dříve odebranými frakcemi prokvašeného média z předchozích cyklů a použit pro oddělení sedimentu, obsahujícího směs vysrážených syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou odstředěním a následnou destilací etanolu ze získaného supernatantu. Sediment byl usušen lyofilizací.

Výsledky a hodnocení fermentačního pokusu:

Tabulka 1: průběh 1. fermentačního cyklu (1 litr 20% hmotn. syrovátky)

Doba fermentace	Refrakce	Koncentrace etanolu	pH
(h)	R_f %	EtOH % (obj./obj.)	
0	18,5	0	5,94
21	13,5	4,33	5,13
27	11,5	5,85	5,05
45	8,5	8,13	5,02
51	8,5	9,02	5,01

Tabulka 2: průběh 2. fermentačního cyklu (přídavek 1 litru 20% hmotn. syrovátky)

Doba fermentace	Refrakce	Koncentrace etanolu	pH
(h)	R_f %	% (obj./obj.)	
0	14,9	4,18	5,36
18	12,5	6,15	5,23
23	12,0	7,41	5,23

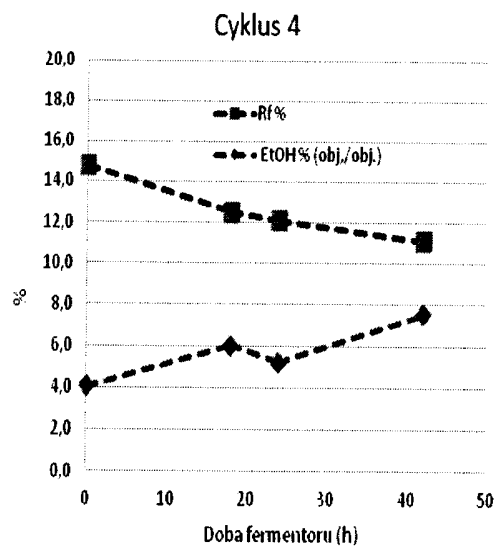
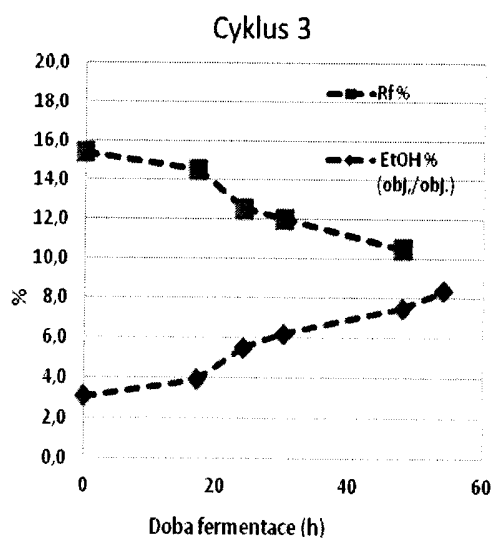
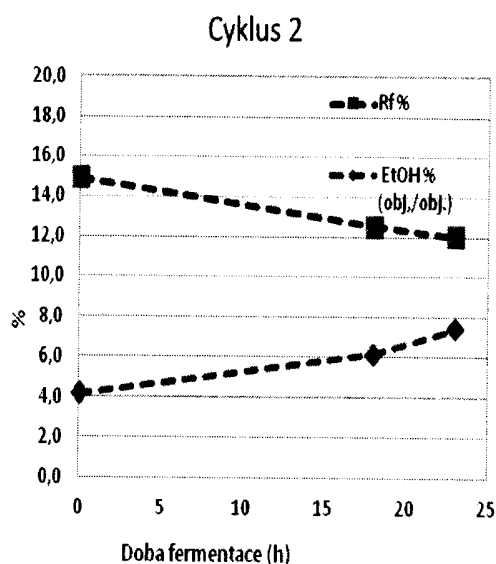
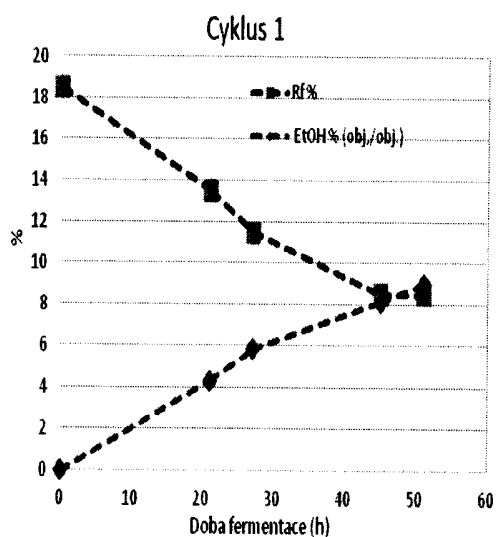
Tabulka 3: průběh 3. fermentačního cyklu (1 litr původní kultury + 1 litr 20% hmotn. syrovátky)

Doba fermentace	Refrakce	Koncentrace etanolu	pH
(h)	R_f %	% (obj./obj.)	

0	15,4	3,09	5,44
17	14,5	3,90	5,48
24	12,5	5,51	5,33
30	12,0	6,21	5,32
48	10,5	7,48	5,27
54		8,38	

Tabulka 4: průběh 4. fermentačního cyklu (1 litr původní kultury + 1 litru 20% hmotn. syrovátky)

Doba fermentace	Refrakce	Koncentrace etanolu	pH
(h)	Rf %	% (obj./obj.)	
0	14,8	4,10	5,47
18	12,5	6,04	5,35
24	12,1	5,23	5,37
42	11,1	7,56	5,28



Obr. 1: Grafické znázornění průběhu fermentačních cyklů 1 až 4

Vypočtené parametry fermentačního pokusu:

Výtěžnost kvasničné biomasy *Fabospora fragilis* z laktózy: $Y_{X/S} = 0,13$

Celková výtěžnost etanolu z laktózy: $Y_{X/S} = 0,58$

Produktivita tvorby etanolu:

1. cyklus: $1,40 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$

2. cyklus: $1,11 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$

3. cyklus: $0,77 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$

4. cyklus: $0,65 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$

Získané produkty:

Roztok etanolu: 520 g, 60 % hmotn., výborné senzorické vlastnosti

Bílkovinný koncentrát: 217 g ve formě prášku světle béžové barvy příjemných senzorických vlastností bez kvasničné pachutě

Složení bílkovinného koncentráту:

Celkový obsah bílkovin: 55,93 % hmotn.

Syrovátkové bílkoviny: 39,7 % hmotn.

Kvasničná biomasa: 32,5 % hmotn.

Laktóza: 14,75 % hmotn.

Minerální látky: 7,47 % hmotn.

Voda: 5,58 % hmotn.

Pozn.: Promytím získaného sedimentu vodou a opětovným odstředěním lze odstranit podstatnou část laktózy a solí a navýšit celkový obsah bílkovin produktu až na přibližně 70 % hmotn.

Příklad 2

Poloprovozní ověření technického řešení

Kultivace probíhala ve sterilním 20% hmotn. syrovátkovém médiu při teplotě 30 °C, hodnotě pH 5,3 až 6,0 ve čtyřech cyklech. Syrovátkové médium bylo připra-

veno ze sušené syrovátky ELIGO, a.s. Objem fermentačního média byl po celou dobu fermentace udržován na hodnotě 100 litrů. Po poklesu refrakce na hodnotu Rf 9% bylo vždy odebráno 50 litrů prokvašeného média. Z odebraného podílu prokvašeného média byl odstředěním na talířové odstředivce WESTFALIA separator SC 6-06-076 oddělen sediment obsahující směs vysrážených syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy, který byl vrácen zpět do fermentoru. Vracením tohoto sedimentu do fermentačního média byla do fermentoru zpětně dávkována vitální kvasničná biomasa, která zvyšovala rychlost produkce etanolu z laktózy ve fermentoru. Supernatant byl uschován v chladnici pro destilaci etanolu. Po vrácení sedimentu do fermentoru byl celkový objem fermentačního média vždy doplněn na původní hodnotu 100 l přidavkem sterilního 20% hmotn. vodného roztoku syrovátky ELIGO, a.s.

V průběhu celé fermentace bylo spotřebováno celkově 35 kg sušené sladké syrovátky, postupně dávkované v jednotlivých cyklech (viz Tabulka 5). V průběhu fermentace byly odebírány vzorky prokvašeného média pro stanovení refrakce. Refrakce je v určitém koncentračním rozsahu úměrná obsahu laktózy a lze ji použít jako rychlý test obsahu laktózy a při správném průběhu fermentace také obsahu etanolu ve fermentačním médiu. První fermentační cyklus trval přibližně 44 hodin, každý další cyklus 22 až 24 hodin. Celková doba fermentace byla 113 hodin. Po ukončení 4. fermentačního cyklu byl celý objem prokvašeného média použit pro oddělení sedimentu komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy odstředěním. Odstředěný sediment byl následně usušen v rozprašovací sušárně Vzduchotorg. Supernatant po odstředění byl spojen se supernatanty získanými v předchozích cyklech a použit pro rektifikační destilaci etanolu.

Výsledky a hodnocení fermentačního pokusu:

Tabulka 5: Bilance syrovátkových bílkovin v průběhu poloprovozní fermentace

	Přídavek sušené syrovátky (kg)	Celkový obsah syrovátkových bílkovin ve fermentoru (kg)
I. cyklus (rozkvašování)	15,0	1,80
II. cyklus	7,5	2,70
III. cyklus	7,5	3,60
IV. cyklus (dokvašování)	5,0	4,20

Vypočtené parametry poloprovozního fermentačního pokusu:

Celková výtěžnost kvasničné biomasy *Fabospora fragilis* z laktózy: $Y_{X/S} = 0,13$

Celková výtěžnost etanolu z laktózy: $Y_{X/S} = 0,39$

Celková produktivita tvorby etanolu: $0,9 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$

Získané produkty:

Roztok etanolu: 17 kg, 60 % hmotn., příjemné sensorické vlastnosti

Bílkovinný koncentrát: 11,1 kg ve formě prášku světle béžové barvy příjemných sensorických vlastností bez kvasničné pachutě

Složení bílkovinného koncentrátu:

Celkový obsah bílkovin: 50,5 % hmotn.

Syrovátkové bílkoviny: 36,0 % hmotn.

Kvasničná biomasa: 28,8 % hmotn.

Laktóza: 17,1 % hmotn.

Minerální látky: 13,5 % hmotn.

Voda: 4,6 % hmotn.

Pozn.: Promytím získaného sedimentu vodou a opětovným odstředěním lze odstranit podstatnou část laktózy a solí a navýšit celkový obsah bílkovin produktu až na téměř 70 % hmotn.

Průmyslová využitelnost

Komplex syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy vyrobený novým způsobem obsahuje vysoce ceněné syrovátkové bílkoviny s nadprůměrným obsahem větvených aminokyselin a řadu nutričně významných látek kvasničné biomasy, jako jsou beta-glukany, glukomananový komplex, vitaminy skupiny B, esenciální stopové prvky v biologické vazbě nebo glutation. Kromě vysoké nutriční hodnoty vyniká tento komplex také příznivými sensorickými vlastnostmi. V zahuštěné či suché formě může být tento produkt použit do široké škály potravinářských produktů, včetně funkčních potravin. V hydrolyzované formě může být zdrojem tzv. biologicky aktivních peptidů, které mohou být využity také pro výrobu nutraceutik.

Etanol vyrobený anaerobní fermentací novým způsobem může být využit zejména jako kvalitní potravinářský líh, případně jako palivový bioetanol.

Zbytky laktózy, obsažené v odpadním roztoku po destilaci etanolu, mohou sloužit jako podpora funkce čistírny odpadních vod, zvláště pro produkci bioplynu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob semikontinuální současné fermentační výroby etanolu, nutričně hodnotného komplexu syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy ze syrovátkového média připraveného zahuštěním syrovátky, nebo rozpuštěním sušené syrovátky ve vodě, **vyznačující se tím**, že se syrovátkové médium podrobí v nevětraném fermentoru řízené anaerobní fermentaci kvasničnými kmeny asimilujícími laktózu, při teplotě 20 až 45 °C a hodnotě pH 4 až 6, v jejímž průběhu se převážná většina ze 4 až 20 % hmotn. přítomné laktózy přemění na etanol o koncentraci v rozmezí 6 až 10 % hmotn. v médiu, načež se část kompletního prokvašeného média oddělí pro separaci etanolu a sedimentu syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou a zbývající část doplní čerstvým syrovátkovým médiem a po dosažení požadované koncentrace etanolu se celý proces periodicky opakuje.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že anaerobní fermentace probíhá za působení zejména kvasničným kmenem *Fabospora fragilis*, případně též *Saccharomyces fragilis* či *lactis* nebo některým z kmenů rodu *Kluyveromyces* či *Candida*, případně kombinací těchto kmenů.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že etanol je z prokvašeného média odebíraného v průběhu a po ukončení semikontinuální fermentace oddělen destilací, nanofiltrací či pervaporací jako jeden z konečných produktů.
4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou je z prokvašeného média odebíraného v průběhu a po ukončení semikontinuální fermentace oddělen odstředěním jako další konečný produkt.
5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že sediment syrovátkových bílkovin s kvasničnou biomasou je po odstředění vrácen společně s čerstvým syrovátkovým médiem zpět do fermentoru pro posílení procesu etanolové fermentace v dalším cyklu.

6. Nutričně hodnotný komplex syrovátkových bílkovin a kvasničné biomasy vyrobený způsobem podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje 20 až 80 % hmotn. syrovátkových bílkovin a 10 až 80 % hmotn. kvasničné biomasy.