

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 652

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34470**
(22) Přihlášeno: **18.12.2017**
(47) Zapsáno: **27.03.2018**

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

(72) Původce:
RNDr. Lubomír Adámek, Praha 4, Krč, CZ
Ing. Marian Urban, Ph.D., Praha 7, Holešovice, CZ
Ing. Ivana Laknerová, Praha 4, Nusle, CZ
Eva Rutová, Praha 3, Žižkov, CZ

(74) Zástupce:
Patentová a známková kancelář Novotný, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 2135/45, 120 00 Praha 2,
Vinohrady

(54) Název užitého vzoru:
**Kultivační půda pro produkci přírodních
pigmentů pomocí mikroskopických hub
rodu Monascus**

CZ 31652 U1

Kultivační půda pro produkci přírodních pigmentů pomocí mikroskopických hub rodu *Monascus*

Oblast techniky

Řešení se týká složení kultivační půdy pro produkci přírodních pigmentů pomocí mikroskopických hub rodu *Monascus*.

Dosavadní stav techniky

Při výrobě barviv jako potravinářských aditiv, označovaných evidenčními kódy (E) a majících za úkol zvýšit vizuální přitažlivost potravin, obnovit původní vzhled potravin, jejichž barva byla dotčena zpracováním, skladováním, balením nebo distribucí a v neposlední řadě obarvit jinak bezbarvé potraviny (Emerton V., Choi E.: Additives. Essential Guide to Food Additives (3), 101-319, 2008), se využívá nejnovějších poznatků z oblasti biotechnologie. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) prověřuje zdravotní nezávadnost všech aditiv, přičemž mezi prvními posuzovanými látkami, byla potravinářská barviva. V posledních letech se objevilo podezření, že některá přírodně identická barviva produkovaná synteticky nebo dokonce i přírodní potravinářská barviva (např. košenila) mohou mít vliv na zdraví dětí. Trendem současné doby je zvýšená iniciativa výrobců potravin a poskytovatelů stravovacích služeb odstranit některá syntetická barviva z výrobků (např. E102, E104, E110, E122) a nahradit je přírodními zdravotně nezávadnými.

Názory na zdravotní nezávadnost barviv se neustále vyvíjí a jsou velmi diskutovanou otázkou. Nedostatečně jsou například zmapovány možné toxické interakce mezi látkami ve směsi, chybí poznatky o mechanismech toxicity a ustavení prediktivních matematických a biologických modelů. Jednu z posledních polemik ohledně genotoxicity způsobila barviva na bázi sulfonovaných azo- sloučenin: Amarant (E 123), Ponceau 4R (E 124), Sunset Yellow FCF (E 110), Tartrazine (E 102) a Azorubine/Carmoisine (E122). (EFSA Journal 2010;8(10):1778). Ačkoliv bylo prokázáno, že konzumace těchto aditiv nepředstavuje riziko, EFSA přesto doporučila další nové doplňující testování a potraviny obsahující jedno nebo více těchto potravinářských barviv (E 110, E 104, E 122, E 129, E 102, E 124) musí v označení obsahovat doplňující informace: „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“

([http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?language=en&type=IM-](http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?language=en&type=IM-PRESS&reference=20080707IPR33563)

[PRESS&reference=20080707IPR33563;https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/ans091112](https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/ans091112)).

Biotechnologická produkce potravinářských barviv má potenciál nahradit diskutovaná přírodně identická barviva produkovaná synteticky z vysoce přečištěných ropných produktů, případně přírodní barviva mající své limity v sezónnosti suroviny, dále pak v menší barevné stálosti, citlivosti vůči světlu, zářevu, oxidaci a mnohdy problematické rozpustnosti ve vodě.

Zdrojem přírodních barevných látek, nejčastěji ve formě pigmentů, jsou rostlinné i živočišné druhy, některé mikroorganismy, lišejníky a houby (Velíšek J., Hajšlová J.: Chemie potravin II, Osis, Tábor, 602, 2009).

Globální trh s přírodními barvivami byl v roce 2014 odhadován na 1 144 milionů US\$ s predikcí růstu na 1 698 US\$ milionů do roku 2020, což představuje nárůst 6,8 %, přičemž dominantní podíl představují karotenoidy s podílem na trhu 31,8 %.

(<http://www.futuremarketinsights.com/reports/global-natural-food-colours-market>)

Ke společnostem hrajícím významnou roli na mezinárodním globálním trhu patří především firma Chr. Hansen A/S, Sensient Technologies Corporation and Kalsec Inc., DDW, Naturex S. A., ADM (Wild flavors Inc.), ROHA Dyechem Pvt. Ltd., GNT International B. V., DIC Corporation, and LycoRed Ltd.

V České republice se výrobou mikrobiálního pigmentu historicky komerčně zabývala pouze jediná firma ASCOLOR BIOTEC s.r.o. s barvivem Arpink Red™. V současné době na její činnost navázala firma NATURAL RED a.s., ve spolupráci s VÚPP, v.v.i., s poloprovozní výrobou o objemech 3000 l. Producentem tohoto červeného pigmentu je kmen mikroskopické houby *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*. Na základě souhlasného stanoviska Ministerstva zdravotnic-

tví ČR a po předložení požadované dokumentace JECFA konstatoval, že nejsou námitky vůči použití Arpink Red do masných výrobků a analogů masa a masných výrobků (v množství až 100 mg/kg), dále do nealkoholických nápojů (v množství až 100 mg/kg), alkoholických nápojů (v množství až 200 mg/kg), mléčných výrobků (v množství až 150 mg/kg), mrazených krémů (v množství až 150 mg/kg) a cukrovinek (v množství až 300 mg/kg).

S ohledem na předpokládanou změnu legislativních nařízení byla platnost stanoviska JECFA omezena do 31. 12. 2002. V současné době se připravují nové podklady k legislativnímu řízení.

Z nepřeberného množství možných mikrobiálních producentů pigmentů, které mohou nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu je možno ilustrativně uvést např.: *Xanthophyllomyces dendrorhous* – Astaxanthin, *Monascus sp.* – Ankaflavin Color supplement, Monascorubramin, Rubropunctatin, *Penicillium oxalicum* – Anthraquinone, *Fusarium sporotrichioides* – Lycopene, *Saccharomyces neoformans* – Melanin, *Rhodotorula sp.* – Torularhodin, *Flavobacterium* – Zeaxanthin, *Agrobacterium auranticum* – Astaxanthin, *Mycobacterium lacticola* – Astaxanthin, *Flavobacterium sp.* – Zeaxanthin, *Blakeslea trispora* a *Dunaliella salina* – α -Carotene, *Blakeslea trispora* – Lycopene, *Spongococcum excentricum* – Lutein.
(<https://www.hindawi.com/journals/ab/2014/837891/>)

Kultivaci mikroskopických hub může množství barevně významných složek sekundárních metabolitů, tzn. pigmentů dosahovat ve fermentačním prostředí až několik gramů na litr. Mezi výrazné vlastnosti pigmentu patří silná antioxidační aktivita, která má pozitivní vliv zejména v prevenci srdečně cévních a nádorových onemocnění. Uplatnění plísňové myceliární biomasy jako meziprojektu při biotechnologické výrobě v krmivářství nebo při výrobě potravin je dána základním striktním požadavkem na zdravotní nezávadnost z hlediska produkce toxinů. Tento nárok lze do jisté míry splnit výběrem vhodných kmenů a úpravou složení kultivační půdy. Biotechnologická příprava červeného pigmentu by mohla být alternativní náhradou nebo doplněním dosud používaných červených pigmentů ve farmacii nebo potravinářství (např. košenila).

Informací o komerční nebo potenciální využitelnosti plísňových kultur produkujících pigmenty v krmivářském, farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu je v současné době velmi málo.

Při řízené kultivaci mikroskopických hub vzniká souběžně s preferovaným barvivem i plísňová myceliární biomasa, která je také bohatým zdrojem celé řady biologicky aktivních látek. Izolovaná myceliární biomasa obsahuje, vedle významného množství vlákniny, také významné množství proteinů, vitaminů, minerálních látek a některých imunostimulačních faktorů. Praktické využití samotné plísňové myceliární biomasy je zatím popsáno jen velmi ojediněle. V literatuře se uvádí využití této mykoproteinové biomasy v krmivářství jako suplement proteinů a vitaminů pod názvem „Terlikin“ (bílkovino- a vitamínový preparát získaný z biomasy naprodukované na odpadních produktech při zpracování brambor). V potravinářství tvoří mykoproteinová biomasa základ řady výrobků, které nabízí řetězce supermarketů Sainsbury ve Velké Británii pod názvem „Sainsbury's Quorn“ (např. Sainsbury's Quorn pie, Quorn Swedish style balls). Velmi perspektivní se ukazuje využití plísňové myceliární biomasy k izolaci glukanu (Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann V., Pose G., Wagner J. R.: β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Microbiology* (49), 1, 2013, 41-45; Park H. S., Yu Y. M., Lee M. K., Maeng P. J., Kim S. C., Yu J. H.: Velvet-mediated repression of β -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* spores. *Scientific Reports.*, (5), Article number: 10199 2015). Glukany jsou základem vnitřní struktury buněčných stěn. Čisté glukany mohou být využity jako imunostimulátory při aplikacích v medicíně a veterinárním lékařství, protože podporují produkci monocytů, neurofylů, kolagenu, elastinu a stimulují makrofágy, aby zvýšily i interleukinovou reakci. Imunostimulačním působením jsou glukany významné zejména pro přeživky. Glukany hrají významnou roli i v případě snižování cholesterolu.

Velká pozornost v biotechnologii plísňových kultur je věnována samotné produkci a izolaci naprodukovaných pigmentů, které by mohly být náhradou za používaná syntetická přírodní barviva. Množství produkovaného pigmentu v tekutých půdách je možné ovlivňovat výběrem vhodných kultivačních médií, dále vzájemným poměrem obsažených složek nebo přidáním některých stopových prvků.

Produkovaný pigment je možno získávat ze supernatantu mikrofiltrační a dále nanofiltrační technikou ve formě vysoce koncentrovaného stabilního preparátu využitelného v potravinářství nebo ve farmaceutickém průmyslu.

- 5 Složení živné půdy zásadně ovlivňuje získávání výše popsaných dvou základních složek fermentace, tzn. pigmentu a myceliární biomasy. Neexistuje absolutně přímá korelace mezi produkcí plísňové myceliární biomasy a množstvím vytvořeného pigmentového produktu. Nevhodný poměr uhlíkové a dusíkové složky média vede k nadměrné tvorbě biomasy na úkor preferované produkce pigmentové složky.

- 10 Úkolem technického řešení bylo nalezení racionálních podmínek vedení kultivačního procesu plísňové kultury rodu *Monascus* s využitím ethanolu a dalších biologicky aktivních látek přítomných v mléčných produktech. Řešení si dále klade za cíl dát k dispozici úpravu složení kultivační půdy s cílem zrychlení a dosažení optimální produkce pigmentu v kultivačním médiu.

Podstata technického řešení

- 15 Uvedené nedostatky odstraňuje kultivační půda pro produkci přírodních pigmentů pomocí mikroskopických hub rodu *Monascus*, podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje jako hlavní uhlíkatý zdroj ethanol v aktuálních koncentracích 0,2 až 1 % obj., který byl získán zkvašením laktózy obsažené v 3 až 20 % hmotn. roztocích mléčných produktů kulturou kvasinky *Kluyveromyces marxianus*, dále obsahuje hlavní dusíkatý zdroj hydrolyzáty proteinů 0,1 až 0,5 % hmotn. společně s minoritním zastoupením kvasničného extraktu v koncentraci 20 0,05 až 0,1 % hmotn., pro funkci růstových látek. Kultivační půda, pro obsah aktuálních koncentrací ethanolu 0,2 až 1 % obj., obsahuje 3 až 20 % hmotn. zkvašených roztoků mléčných produktů s obsahem 1,5 až 8 % obj. ethanolu. Kultivační půda, při úbytku živin dále obsahuje přídavek prokvašeného roztoku mléčných produktů na ethanol, při změně nastaveného rozmezí pH 4,5 až 6.
- 25 Následující příklady provedení fermentačního procesu na půdách s proměnlivými zdroji uhlíku a dusíku, řešení, pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly. Využití těchto kultivačních půd podle řešení bylo úspěšně vyzkoušeno původci v praxi u přihlašovatele ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha, v.v.i., CZ.

Příklady uskutečnění technického řešení

30 Příklad 1

Porovnání asimilovatelných uhlíkatých zdrojů na produkci přírodního pigmentu kulturou mikroskopické houby *Monascus*.

- 35 V Tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky kultivačních pokusů na živných půdách s různým obsahem uhlíkatých látek. Seriální kultivační pokus byl proveden v Erlenmayerových baňkách s užitečným plněním 500 ml živné půdy obsahující stejná množství hydrolyzáty proteinu 0,2 % hmotn. a kvasničného extraktu 0,1 % hmotn. a různé přídavky asimilovatelných uhlíkatých zdrojů a ethanolu ve dvou různých koncentracích. Pokusy byly provedeny na rotační třepačce (100 RPM) při teplotě 30 °C bez úpravy pH. Po uplynutí 100 kultivačních hodin byly jednotlivé varianty z tohoto seriálního pokusu zhodnoceny z hlediska produkce pigmentu měřením absorpance A_{494} .
- 40 Ve variantě živných půd s ethanolem byl použit ethanolový zdroj ve formě 20% hmotn. deproteínované syrovátky o koncentraci 8 % obj. ethanolu prokvašené kulturou mléčné kvasinky *Kluyveromyces marxianus* tak, aby konečná koncentrace ethanolu v médiu v Erlenmayerových baňkách byla 1 nebo 2 % obj. Porovnáním naměřených hodnot je zřejmá vhodnost všech použitých uhlíkatých zdrojů s různým stupněm využitelnosti. Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve variantách živných půd obsahujících 2 % hmotn. sacharózy a 1 % obj. ethanolu. Porovnáním dosažených
- 45 hodnot u jednotlivých zdrojů uhlíku je zřejmé, že vyšší obsah uhlíkatého zdroje v případě varianty živné půdy se sacharózou 4 % hmotn. a ve variantě živné půdy s ethanolem 2 % obj. způsobuje zpomalování produkce pigmentu.

Tabulka 1. Složení kultivačních médií s různým obsahem asimilovatelných zdrojů

C-zdroj	Sacharóza		Maltóza		Glukóza		Ethanol	
%	2	4	2	4	2	4	1	2
Kvasničný extrakt (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Vysokoprotein. hydrolyzát (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Absorbance (494 nm)	2,974	0,540	0,337	0,695	0,238	0,490	2,458	2,077

Příklad 2

Srovnávací kultivační pokus na deproteinované syrovátce s mikroskopickou houbou *Monascus purpureus* s různými variantami složení půdy.

- 5 Kultivační pokusy s kmenem *Monascus purpureus* byly vedeny v Erlenmayerových baňkách s užitečným plněním 500 ml kultivačního média. Základ půdy tvořila deproteinovaná syrovátka 5 % hmotn. Kultivační půda u obou variant I a II dále obsahovala stejná množství kvasničného extraktu 0,1 % hmotn., ale různá množství hydrolyzátu proteinu 0,2, resp. 0,4 % hmotn. Základním uhlíkatým zdrojem v obou variantách půd byl ethanol obsažený v dávkované prokvašené
- 10 kultuře mléčné kvasinky *Kluyveromyces marxianus*. Před zahájením kultivačního pokusu byl ethanol přidán ve formě mléčné kultury do živného média tak, aby v obou variantách živné půdy byla počáteční koncentrace ethanolu 0,6 % obj. Po vnesení ethanolu byla zahájena kultivace na rotační třepačce (100 RPM) při teplotě 29 °C. Během 144 hodinové kultivace v periodicky odebíraných vzorcích byla stanovována hodnota absorbance pro posouzení produkce přírodních pigmentů a byly sledovány aktuální koncentrace ethanolu. Z tabulky č. 2 je zřejmé, že nejvyšší dosažená absorbance byla naměřena ve variantě živné půdy II, kde byl vyšší poměr živných látek
- 15 dusíku ku obsaženému zdroji uhlíku (53 mg aminodusíku/1ml, resp. 106 mg aminodusíku/1 ml vloženého ethanolu).

- 20 Tabulka 2. Srovnávací kultivační pokus s produkcí přírodních pigmentů v kulturách mikroskopické houby *Monascus purpureus* na ethanolu obsaženém v 5% hmotn. deproteinované syrovátce (různé poměry živných látek dusíku a uhlíku)

Složky půdy	I	II
Deproteinová syrovátka (5% hmotn.)	500	500
Kvasničný extrakt (% hmotn.)	0,1	0,1
Vysokoprotein. hydrolyzát (% hmotn.)	0,2	0,4
Ethanol (% obj.) - počáteční koncentrace	0,6	0,6
Čas (hod.)	Aktuální obsah ethanolu v živném médiu (obj. %)	
0		
72	0,324 (slabě červená)	0,278 (slabě červená)
96	červená	červená

Složky půdy	I	II
120	0,866	1,460
144	1,132	2,902
264	4,244	7,600
Čas (hod.)	Aktuální obsah ethanolu v živném médiu (obj. %)	
0 (počát. koncentrace)	0,6	0,6
72	0,41	0,52
120	0,21	0,22
144	0,05	0,004

Příklad 3

Produkce přírodních pigmentů mikroskopické plísně *Monascus purpureus* na živných půdách obsahujících různé zdroje ethanolu (ethanol obsažený v prokvašené kvasinkové kultuře směsi mléka a syrovátky).

- 5 Srovnávací kultivační pokusy s mikroskopickou kulturou *Monascus purpureus* byly provedeny na rotační třepačce (100 RPM) při teplotě 29 °C s použitím různých variant živných půd obsahujících jako základ roztoky 3% hmotn. deproteinované syrovátky a přídavky 0,1 % hmotn. kvasničného extraktu, 0,4 % hmotn. hydrolyzátu proteinu a 1 % hmotn. sacharózy. Obsažená sacharóza u všech variant půd byla použita na rozkvašení kultury mikroskopické houby. Po uplynutí 96 hodin, kdy došlo k vyčerpání obsažené sacharózy, byl do variant živných půd II a III do-
- 10 dán rozdílný uhlíkatý ethanolový zdroj. Ve variantě II živné půdy (v intervalu 96 až 120 hodin ve formě dělených dávek) to byl ethanol obsažený v alkalizovaném prokvašeném roztoku mléka a syrovátky pomocí kvasinky *Kluyveromyces marxianus* a ve srovnávací variantě III byl použit jako uhlíkatý zdroj komerční koncentrovaný ethanol. Varianta I sloužila jako kontrolní půda, tzn.,
- 15 kultivace pokračovala bez přídavku ethanolu. V pokračující kultivaci na rotační třepačce byly sledovány obsahy ethanolu a množství produkovaného pigmentu vyjádřeného hodnotou absorbance při vlnové délce 494 nm. Zatímco ve variantě I, kde nebyl obsažen ethanolový suplement, docházelo k plynulému zvyšování pH a velmi mírnému vzestupu hodnot naměřeného množství pigmentů (zřejmě způsobeného vlivem jeho uvolnění z nitra buněk), v ostatních variantách II
- 20 a III růst pokračoval a byl doprovázen postupným snižováním hodnoty pH média a zvyšováním produkce pigmentů. Ve variantě II se suplementem ethanolizovaného mléčného produktu byla pozorovaná zvýšená produkce pigmentů v médiu, svědčící o tom, že ethanol produkovaný kvasinkovou kulturou *Kluyveromyces marxianus* v roztoku mléčného produktu může být velmi dobrým uhlíkatým zdrojem pro produkci pigmentů.
- 25 Tabulka 3 Produkce mikrobiálních pigmentů mikroskopickou houbou *Monascus* na různých zdrojích ethanolu (komerční ethanol a ethanol obsažený v prokvašeném mléčném produktu)

Čas (hod.)	I Kontrola				II				III			
	Rf %	pH	A ₄₉₄	EtOH (obj. %)	Rf %	pH	A ₄₉₄	EtOH (obj. %)	Rf %	pH	A ₄₉₄	EtOH (obj. %)
0	4,9	5,08	N/A	0	4,9	5,08	N/A	0	4,9	5,08	N/A	0
96	4,4	7,03	1,289	0	4,4	7,08	1,455	0	4,4	7,06	1,311	0

Po při- dání etha- nolu				*				**				***
				0	4,8	7,49		0,58	4,6	7,08		0,60
120	4,1	7,39	1,391	0,04	4,0	6,15	3,020	0,56	4,4	6,8	1,704	0,59
144	4,4	7,62	1,630	0,04	3,5	5,52	6,370	0,37	4,5	6,54	3,075	0,38

*bez přídavku ethanolu, **přídavek ethanolu obsaženého v prokvašeném mléčném produktu,
***přídavek ethanolu koncentrovaného komerčního

Průmyslová využitelnost

- 5 Kultivační půda pro produkci přírodních pigmentů pomocí mikroskopických hub rodu *Monascus* a jejich možných dalších derivátů rozšiřuje sortiment vhodných půd s omezením vstupu balastních látek při současném snížení nákladů na její přípravu.

NÁROKY NA OCHRANU

- 10 1. Kultivační půda pro produkci přírodních pigmentů pomocí mikroskopických hub rodu *Monascus*, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako hlavní uhlíkatý zdroj ethanol v aktuálních koncentracích 0,2 až 1 % obj., který byl získán zkvašením laktózy obsažené v 3 až 20% hmotn. roztocích mléčných produktů kulturou kvasinky *Kluyveromyces marxianus*, dále obsahuje jako hlavní dusíkatý zdroj hydrolyzáty proteinů v koncentraci 0,1 až 0,5 % hmotn. společně s minoritním zastoupením kvasničného extraktu v koncentraci 0,05 až 0,1 % hmotn.
- 15 2. Kultivační půda podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pro obsah aktuálních koncentrací ethanolu 0,2 až 1 % obj. obsahuje 3 až 20 % hmotn. zkvašených roztoků mléčných produktů s obsahem 1,5 až 8 % obj. ethanolu.
3. Kultivační půda podle nároků 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že při úbytku živin dále obsahuje přídavek prokvašeného roztoku ethanolizovaných mléčných produktů při změně nastaveného rozmezí pH 4,5 až 6.

Konec dokumentu
