

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2021-582

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12C 11/02 (2006.01)

C12C 12/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.12.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **10.05.2023**
(Věstník č. 19/2023)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, Nové Město, CZ

(72) Původce:
Ing. Petra Kubizniaková, Praha 9, Horní Počernice,
CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, Mikovice,
CZ
Ing. Katarína Hanzalíková, Gbely, SK
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov, Dolní
Předměstí, CZ
prof. Ing. Tomáš Brányik, Ph.D., Praha 6, Liboc,
CZ

(74) Zástupce:
Dobroslav Musil a partneři s.r.o., Zábrdovická
917/11b, 615 00 Brno, Zábrdovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus*
CCM 9180 a jeho použití při výrobě
nealkoholického piva**

(57) Anotace:
Vynález se týká kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 izolovaného na začátku spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně zpracovává galaktózu, sacharózu, arabinózu, celiobiózu, rafinózu, xylózu, kyselinu mléčnou, glycerol a sorbitol. Nezpracovává maltózu. Vytváří ovoidní, elipsoidní nebo cylindrické buňky s rozměry 3 µm x 4 až 6 µm, které mohou vytvářet pseudomycelium. Vynález se dále týká výroby nealkoholického piva, při které hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180.

CZ 2021 - 582 A3

Kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 a jeho použití při výrobě nealkoholického piva

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180.

Vynález se dále týká také použití tohoto kmene kvasinek při výrobě nealkoholického piva.

10

Dosavadní stav techniky

Výroba piva spočívá v kontrolovaném zkvašování cukrů obsažených v mladině pivovarskými
 15 kvasinkami. Jako pivovarské kvasinky se přitom označují kulturní kvasinky několika druhů a rodů:
 k produkci spodně kvašených piv se používá druh *Saccharomyces pastorianus*, k produkci svrchně
 kvašených piv druh *Saccharomyces cerevisiae*, k produkci speciálních druhů piv, např. rody
Brettanomyces nebo *Torulaspora* (viz např. T. Kochláňová a kol.: „Kvasinky non-*Saccharomyces*
 a jejich význam v pivovarském průmyslu. I. část – *Brettanomyces* (Dekkera)“ a „Kvasinky non-
 20 *Saccharomyces* a jejich význam v pivovarském průmyslu. II. část“, obojí Kvasný Průmysl 62/2016
 (7 až 8)). Pivovarské kvasinky přitom při své činnosti přeměňují sacharidy na ethanol, oxid uhličitý
 a energii potřebnou k jejich pomnožování a také přibližně dva tisíce dalších látek, zejména vyšších
 alkoholů, esterů, aldehydů atd., které ovlivňují výsledné sensorické vlastnosti hotového piva. Pro
 celkový sensorický dojem je pak velmi důležitý celkový poměr těchto všech vyšších alkoholů a
 25 esterů, neboť jednotlivé sloučeniny jsou samy o sobě velmi často pod prahovou koncentrací
 sensorického vnímání. Obecně je přitom např. známo, že kmeny svrchních kvasinek
Saccharomyces cerevisiae produkují větší množství a širší spektrum sensoricky aktivních látek než
 kmeny spodních kvasinek *Saccharomyces pastorianus* (viz např. Lodolo a kol.: „The yeast
Saccharomyces cerevisiae – the main character in beer brewing.“ *FEMS Yeast Res* 8(7):1018-36,
 30 2008), a také to, že „lehčí“ chuť spodně kvašených piv způsobuje, kromě nižší teploty hlavního
 kvašení, také změněná exprese genů zodpovědných za produkci esterů u druhu *Saccharomyces*
pastorianus (viz např. Procopio a kol.: „Function and regulation of yeast genes involved in higher
 alcohol and ester metabolism during beverage fermentation“, *European Food Research and*
Technology 233(5):721-729, November 2011).

35

Nealkoholické pivo je definováno jako kvašený nápoj z obilného sladu s obsahem alkoholu do
 0,5 % obj. V současné době se vyrábí několika způsoby: 1) odstraněním alkoholu z již vyrobeného
 piva působením teploty nebo membránovými procesy, 2) předčasně ukončenou fermentací, 3)
 použitím speciálního kmene kvasinek, 4) změnou podmínek rmutování (tj. úpravou spektra
 40 zkvasitelných cukrů v mladině), 5) technikou kontinuální fermentace; případně kombinací
 některých z těchto postupů (např. použitím speciálního kmene kvasinek se sníženou produkcí
 alkoholu v kombinaci s předčasným ukončením kvašení, apod.) – viz např. Brányik et al.: „A
 review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production“, *J. Food Engin.* 108: 493-506,
 2012. Jako speciální kmeny kvasinek se sníženou produkcí alkoholu se používají např.
 45 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* nebo *Zygosaccharomyces rouxii*, které mají
 omezenou schopnost fermentovat přítomné cukry a vytvoří méně alkoholu (viz např. Sohrabvandi
 et al.: „Characteristics of different brewer's yeast strains used for non-alcoholic beverage
 fermentation in media containing different fermentable sugars“. *Iran. J. Biotechnol.* 8: 178-185,
 2011). Kromě toho bylo popsáno i použití kvasinek rodu *Pichia*, *Candida shehatae* (viz např.
 50 Michel, M. et al.: Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a
 focus on secondary metabolites and practical applications. *J. Inst. Brew.*, 2016, 122: 569 až 587.
 doi: 10.1002/jib.381), *Torulaspora delbrueckii* (viz např. Canonico et al.: „*Torulaspora delbrueckii*
 in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content“,
Food Microbiol. 56: 45-51) nebo *Kluyveromyces* (viz např. Medeiros et al.: „Aroma compounds
 55 produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column

bioreactor“, World. J. Microbiol. Biotechnol., 17: 767 až 771). Takto vyrobená piva mohou chutnat po mladině, bývají sladší a ovocnější než piva alkoholická, vyrobená tradičním způsobem nebo zbavená alkoholu fyzikálními metodami.

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180, který se izoloval na začátku spontánního kvašení hroznového moštu. Pro další použití se připravil selekcí a opakovaným přeočkováváním na sladidlovém agaru s tetracyklinem. Kultivace probíhala aerobně v mikrobiologickém inkubátoru při teplotě 26 °C po dobu 3 až 5 dní. Po nárůstu kultury kvasinek na povrchu agaru se tato kultura přenesla sterilizovanou očkovací kličkou na novou Petriho misku s agarem a rozočkovala se tzv. křížovým roztěrem, při kterém se ředí koncentrace kvasinek na agaru. Tento postup se opakoval do doby, než kultura kvasinek narostla do podoby viditelně oddělených kolonií. Následná izolace kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 se poté provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladidlový agar.

Takto izolovaný kmen se následně charakterizoval biochemickými testy a sekvenováním ITS oblastí DNA.

20

Kvasinky kmene *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 vytvářejí ovoidní, elipsoidní nebo cylindrické buňky s rozměry 3 µm x 4 až 6 µm. Vegetativně se množí multilaterálním pučením na užší straně, mohou produkovat pseudohyfy (pseudomycelium).

Vzhled a konzistence kolonií – matné, krémově zbarvené, vypouklé. Charakter nárůstu v kapalném médiu – v kapalinách tvoří sediment, může se tvořit mázdra. Kmen roste při teplotách pod 15 °C i při teplotě 37 °C.

Kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 využívá aerobně (oxiduje) i anaerobně (fermentuje) galaktózu, sacharózu, arabinózu, celiobiózu, rafinózu, xylózu, kyselinu mléčnou, glycerol a sorbitol. Nevyužívá maltózu.

Kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 má ve srovnání se stávajícími pivovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pastorianus* některé výhodné vlastnosti pro využití při přípravě nealkoholického piva. Zejména jde o neschopnost zkvašovat maltózu, hlavní cukr pivovarské mladiny, díky čemuž tento kmen produkuje jen nízké koncentrace alkoholu. Optimální teplota pro výrobu nealkoholického piva s použitím tohoto kmene je v rozmezí 7 až 9 °C, kdy kvasinky produkují optimální množství sensoricky aktivních látek. Optimální stupňovitost mladiny pro výrobu nealkoholického piva je pak v rozmezí 5 až 9 % hmotn., kdy kvasinky produkují optimální množství alkoholu (do 0,5 % obj., což je horní hranice nealkoholického piva).

Kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 podle vynálezu je uložen ve sbírce mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., označované kódem RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem RIBM 197 a v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) v Brně pod číslem CCM 9180.

Příklady uskutečnění vynálezu

50

Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 pro laboratorní kvasné zkoušky

Při přípravě kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu nealkoholického piva, se použila čistá kultura tohoto

kmene, která se získala izolací ze spontánního kvašení hroznového moštu (viz výše), a která se až do doby přípravy uchovávala v chladničce při teplotě 2 ± 1 °C.

Kultura kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 se zaočkovala na šikmý sladinný agar ve zkumavkách uzavřených vatovou zátkou. Z vytvořeného kvasničného nárůstu se potom sterilně očkovací kličkou převedla část biomasy do 10 ml 10% sterilní mladiny, načež 2 dny probíhala kultivace při teplotě 25 °C. Poté se odlila horní prokvašená vrstva a kvasničná sediment se převedla do 50 ml 10% sterilní mladiny, načež 2 dny probíhala kultivace při teplotě 20 °C. Následně se tento kmen pomnožil převáděním do vždy většího objemu v poměru přibližně 1:4. Kvasničná sediment se tak nejprve převedla do 250 ml 10% sterilní mladiny, kde 5 dní probíhalo pomnožování při teplotě 15 ± 1 °C, poté se vytvořený kvasničný sediment převedl do 1000 ml 10% mladiny, kde 3 dny probíhala kultivace při teplotě 12 ± 1 °C.

Tímto způsobem připravený kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 se může přímo použít pro laboratorní kvasné zkoušky nebo pro výrobu nealkoholického piva. V případě potřeby se předtím ještě promyje vodou (opakovanou sedimentací a promýváním), čímž se z něj odstraní kultivační médium.

Příklad 2: Příprava nealkoholického piva v laboratorních podmínkách s použitím kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180

Do mladiny (3 litry) s původním extraktem přibližně 6 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 připravený postupem popsaným v příkladu 1. Zákvasná dávka činila přibližně 7×10^7 buněk/ml mladiny. Následná fermentace probíhala ve vysterilované plastové nádobě při teplotě 8 °C ± 1 °C po dobu 3 dní.

Po ukončení kvašení se takto připravené pivo převedlo do ležáckých nádob a při teplotě 2 ± 1 °C se uložilo do ležáckého sklepa. Po 3 týdnech ležení se u něj změřilo prokvašení, obsah alkoholu a hořkost. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

30

Tabulka 1. Základní chemický rozbor

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Alkohol	% obj.	0,35
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	5,92
Prokvašení skutečné	%	7,77
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	10,2

Jak je zřejmé, kmen *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 produkuje ve srovnání s běžným pivovarskými kvasnicemi jen nízké koncentrace alkoholu.

35

Dále se také provedlo senzorické hodnocení takto připraveného nealkoholického piva degustační komisí. Toto pivo nevykazovalo žádné senzorické závady. Celkový subjektivní dojem byl vyhodnocen jako velmi dobrý. Pivo se od dostupných nealkoholických piv liší svou lehkostí, svěžestí a tóny citrusů ve vůni i chuti.

40

Příklad 3: Příprava nealkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180

Do mladiny s původním extraktem přibližně 8,5 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 připravený postupem popsaným v příkladu 1. Zákvasná dávka činila přibližně 7×10^7 buněk/ml mladiny. Následná fermentace probíhala ve vysterilované plastové nádobě při teplotě 7 °C ± 1 °C po dobu 5 dní.

45

Po ukončení kvašení se takto připravené pivo převedlo do ležáckých nádob a při teplotě 2 ± 1 °C se uložilo do ležáckého sklepa. Pivo leželo v ležáckých nádobách 4 týdny. Poté se u něho změřilo prokvašení, extrakt, obsah alkoholu a hořkost. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

5 Tabulka 2. Základní chemický rozbor

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Extrakt zdánlivý	% hmotn.	8,05
Extrakt skutečný	% hmotn.	8,15
Alkohol	% hmotn.	0,19
Alkohol	% obj.	0,24
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	8,64
Prokvašení zdánlivé	%	5,43
Prokvašení skutečné	%	4,35
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	10,1

Dále se také provedlo senzorické hodnocení takto připraveného nealkoholického piva degustační komisí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Dominující chuť byla vyhodnocena jako slabá esterová a citrusová; pivo mělo dále velmi slabou kvasničnou, karamelovou a připálenou chuť. Nealkoholické pivo vyrobené s použitím kmene *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 bylo vyhodnoceno jako odlišné od dostupných nealkoholických piv – lehké, svěží, s tóny léta a citrusů.

15 Tabulka 3. Senzorické hodnocení

Sledovaný parametr	Hodnocení
říz	2,1
plnost	1,7
hořká	0,5
hořkost - kulminace	1,0
hořkost - dozrívání	0,4
hořkost - charakter	1,2
trpkost	0,6
sladká chuť	2,8
kyselá chuť	0,8
chmelová chuť	0,7
ovocná/esterová chuť	1,6
sladová chuť	1,9
kvasničná chuť	0,5
mladinová chuť	1,5
sladinová chuť	2,0
parfémová chuť	1,1
diacetylová chuť	*
karamelová chuť	0,9
připálená chuť	*
Vyhovuje stylu	1,3
Vyváženost	2,3
Obliba	5,1
Celkový dojem	3,6

* nezaznamenáno

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus* uložený u České sbírky mikroorganismů pod číslem CCM 9180 izolovaný na začátku spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně zpracovává galaktózu, sacharózu, arabinózu, celiobiózu, rafinózu, xylózu, kyselinu mléčnou, glycerol a sorbitol, nezpracovává maltózu a vytváří ovoidní, elipsoidní nebo cylindrické buňky s rozměry 3 μm x 4 až 6 μm .

10 2. Způsob výroby nealkoholického piva, **vyznačující se tím**, že hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCM 9180 podle nároku 1.