



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

214854
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 C 7/00

(22) Přihlášeno 12 12 77

(21) (PV 8312-77)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 31 08 77
(101524/1977) Japonsko

(40) Zveřejněno 10 09 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72)

Autor vynálezu

YOSHIOKA KAZUO, HASHIMOTO NAOKI, TAKASAKI, HIDAKA
HIDEMASA, YOKOHAMA, ONEDA TORU, KAWASAKI (Japonsko)

(73)

Majitel patentu

KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA, TOKIO, MEIJI SEIKA KABUSHIKI
KAISHA, TOKIO (Japonsko)

(54) Způsob výroby pivovarské sladiny

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy pivovarské sladiny enzymatickým zpracováním ječmene ve formě zrn nebo v rozemletém stavu amylázou nebo kombinací amylázy a proteázy, přičemž se škrobový podíl štěpí účinkem amylázy produkované mikroorganismy z rodu *Streptomyces* nebo se zpracovávání provádí účinkem výše uvedené amylázy a proteázy produkované mikroorganismy z rodu *Aspergillus*, v podstatě v nepřítomnosti sladu.

Vynález se týká způsobu přípravy pivo-
varské sladiny enzymatickým zpracováním
ječmene ve formě zrn nebo v roze-
mletém stavu amylázou nebo kombinací
amylázy a proteázy, přičemž uvedená amy-
láza je produkována při aerovně kultivaci
mikroorganismů rodu *Streptomyces* a prote-
áza je produkována mikroorganismy rodu
Aspergillus.

Z dosavadního stavu techniky je velmi
dobře známo, že postup vaření piva zahrnu-
je následující fáze: mladina se podrobí al-
koholickému kvašení za použití pivovar-
ských kvasnic, přičemž sladina se připraví
vystíráním ječného sladu a, v případě, že to
je nutné, přidavného škrobovitého materiá-
lu skupinou enzymů ve sladu, které vznik-
nou během sladování. Jak je tedy uvedeno,
vyžaduje běžný postup přípravy pivovarské
sladiny nezbytně tak zvané sladování za úče-
lem přípravy sladu, přičemž tento postup se
provádí máčením, klíčením a hvozďením ječ-
mene. Během provádění sladování dochází k
přeměně různých složek ječmene jako je na-
příklad škrob, a vytváří se skupina enzymů,
které jsou nutné k provedení vystírání.

Během provádění vystíracího procesu se
rozpustné složky, přítomné ve sladu a při-
davný škrobový materiál, extrahují a neroz-
pustné složky se rozpustí a štěpí účinkem
enzymů ze sladu.

Hlavním cílem sladovacího postupu je při-
pravit skupinu enzymů, které jsou nutné pro
vystírací proces. Uvedené sladování je ovšem
časově velmi náročný postup, který vyžaduje
je mnohá opatření a zařízení a dále vyžaduje
komplikovanou provozní kontrolu.

Je rovněž znám postup, podle kterého se
eliminuje sladování, přičemž se slad nahra-
dí nesladovaným ječmenem a přidavnými en-
zymy. Tento postup je obsažen v pat. Spo-
jených států amerických č. 3 081 172 (z roku
1963), přičemž v následujícím období bylo
vyvinuto větší množství postupů v tomto
směru. K tomu aby bylo varným postupem
připraveno pivo, které by mělo vynikající
organoleptické vlastnosti, je nezbytné při-
pravit sladinu, která obsahuje složky v urči-
tém stanoveném rozmezí. V prvé řadě je dů-
ležité, aby při štěpení škrobu, které je nej-
důležitější fází postupu vaření piva, vznik-
ly zkvasitelné cukry a dextriny v určitém
množství ve sladině při vystíracím procesu.

Uvedené zkvasitelné cukry jsou důležité
jako hlavní substrát pro pivovarské kvasni-
ce. Nedostatek těchto cukrů způsobuje špat-
ný průběh kvašení a z toho vyplývá zhorše-
ní organoleptických vlastností výsledného
piva. Uvedené dextriny přispívají ke koloid-
ní povaze piva a k plnosti piva. Z výše uve-
deného je tedy zřejmé, že kontrolování tvor-
by zkvasitelných cukrů a dextrinů ve sladi-
ně na požadovanou úroveň podle typu piva,
které má být varným způsobem připraveno,
je velmi důležité a jediné tak je možno při-
pravit pivo o vynikajících organoleptických
vlastnostech. Ovšem je třeba uvést, že ne-

sladovaný ječmen je obtížněji štěpitelný ve
srovnání se sladem, neboť neproběhne do
požadovaného stupně tvorba enzymů a pře-
měna škrobu v ječmenu. Podle dosavadního
stavu techniky, který je reprezentován uve-
denými postupy, je zřejmé, že enzymatické
štěpení škrobu z ječmene za účelem přípra-
vy pivovarské sladiny neproběhne zcela ú-
spěšně. V případech, kdy se slad zcela na-
hradí nesladovaným ječmenem a přidavnými
enzymy, což bylo rovněž navrženo postupy
podle dosavadního stavu techniky, není mož-
né dosáhnout dostatečného štěpení škrobu z
ječmene během vystírání, jak již bylo uve-
dono výše, a tím připravit zkvasitelné cuk-
ry v dostatečném množství. Pozorovaný po-
kles zcukření sladiny, resultující z ječmene
a enzymů, je nižší než pokles zcukření v běž-
ně používané sladině připravené ze sladu.

Kromě toho je ještě nutno uvést, že je nut-
né použít sladu v případě vystírání ječmene
s přidavnými enzymy. V tomto směru je mož-
no poukázat například: Eur. Brew. Conv.,
Proc., 149 [1971], J. Inst. Brewing, 80, 236
[1974]; MBAA, Technical Quarterly, 9, 12
[1972]; Brewer's Digest, July, 56, [1969] a
patent Velké Británie č. 1 303 644.

Běžný postup přípravy sladiny při rmuto-
vání za použití nesladovaného ječmene a
přidavných enzymů je následující. Ječmen,
jako hlavní surovina, se vloží do vystírací
kádě společně s vodou, sladem a přidavnými
enzymy. Tato kaše se udržuje při teplotě po-
hybující se v rozmezí od 45 do 50 °C hlavně
za účelem proteinového štěpení, potom se
zahřívá na teplotu pohybující se v rozmezí
od 60 do 65 °C a dále se udržuje při této
teplotě hlavně za účelem přidavy zkvasi-
teľných cukrů. Toto vystírání se v podstatě
neliší od běžně používaného postupu vystírá-
ní sladu.

V tomto bodě je nutno poznamenat, že na
jedné straně nebyly prováděny pouze pokusy
související s výběrem vhodných přidavných
enzymů, které by byly vhodné pro rmutová-
ní za použití nesladovaného ječmene a při-
davných enzymů, ale byly rovněž učiněny
snahy upravit vlastnosti zrn ječmene takov-
ým způsobem, aby složky přítomné v to-
to ječmenu, jako je například škrob, byly
snadno štěpitelné stejně jako složky sladu,
přičemž tyto snahy byly dovedeny až k prak-
tickému použití výsledků. Například je mož-
no v tomto směru uvést, že bylo vyzkoušeno
předběžné zahřívání ječmene za účelem zte-
kucení.

V těchto případech je ovšem zcukernění
zkapalněného ječmene prováděno za přidav-
ku sladu jako zdroje beta-amylázy, neboť
předběžné zpracovávání zrn ječmene při vy-
sokých teplotách inaktivuje latentní beta-
amylázu v zrnech. V tomto směru je možno
poukázat na patenty Spojených států ame-
rických č. 3 712 820, 3 713 840 a 3 719 500.

Rovněž je známa z dosavadního stavu
techniky příprava pivovarské sladiny bez
použití jakéhokoliv sladu, vařením ječmene

a přidáváním škrobového materiálu, po němž následuje enzymatické zpracovávání. Ovšem je třeba poznamenat, že jelikož se používá přídavek cukrového sirupu v množství, které je třikrát větší než obsah ječmene (jak je uvedeno například v japonské zveřejněné patentové přihlášce č. 4428/65), není možno tento postup striktně označovat jako úplné nahrazení sladu ječmene a enzymy.

Jak již bylo shora uvedeno, je velmi důležité při přípravě pивovarské sladiny enzymatickým zpracováním ječmene v první řadě to opatření, aby pozorovatelný pokles zcukření sladiny z ječmene a enzymů byl srovnatelný s poklesem zcukření u běžné sladiny ze sladu, ovšem je rovněž velmi důležité, aby složení dusíkatých sloučenin ve sladině z ječmene a z enzymů bylo srovnatelné se složením sladiny ze sladu. Pokud se týče dusíkatých sloučenin, které jsou velmi důležitou složkou společně s uhlohydráty, je nezbytné, aby vzniklo dostatečné množství aminokyselin a peptidů a aby bylo toto množství udržováno na vhodné úrovni.

Nízkomolekulární dusíkaté látky, včetně aminokyselin jsou důležité jako hlavní substrát pro pивovarské kvasnice. Jestliže je těchto dusíkatých sloučenin nedostatek, potom zkvašení sladiny neproběhne normálním způsobem a soulad organických vlastností není ve výsledném pivu normální. Na jedné straně přispívají vysokomolekulární dusíkaté látky ke koloidní povaze piva a dále k plnosti piva. Z tohoto důvodu je při přípravě pивovarské sladiny rovněž důležité opatření, aby výsledné pivo mělo vynikající organoleptické vlastnosti, upravit obsah nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin a vysokomolekulárních dusíkatých sloučenin na hodnotu, která leží v požadovaném rozmezí.

Ovšem podle dosavadního stavu techniky, která se týká enzymatického zpracování ječmene, se úplné nahrazení sladovnického ječmene a přidavných enzymů projeví ve složení dusíkatých sloučenin ve výsledné sladině, které se liší od složení v běžně používané sladině ze sladu. V běžné sladině, která je připravována ze sladu, je poměr formolového dusíku, který označuje množství nízkomolekulárních dusíkových sloučenin, k celkovému množství dusíku asi 1:3, zatímco ve sladině, která se připraví způsobem, při kterém se úplně nahradí slad ječmene a přidavnými enzymy, je tento poměr asi 1:4. V tomto směru je možno poukázat na: Inst. Brew. Australia a New Zeland Sec. III (1966).

Při enzymatickém zpracování ječmene se projevuje trend ke snížení obsahu nízkomolekulárních sloučenin ve sladině ve srovnání s běžně používanou sladinou, jak je to uvedeno v: Eur. Brew. Conv. Proc. Congr. 283 (1967), a i přesto, že se toto enzymatické zpracovávání provádí v kombinaci s asi 20% sladu, zůstává tento trend ke snižování obsahu nízkomolekulárních dusíkatých látek nezměněn. V tomto směru je možno pouká-

zat na patent Spojených států amerických č. 3 713 840, a dále na Brewer's Digest, July, 56 (1969) a na proces Biochemistry, srpen, 46 (1970).

Z výše uvedeného plyne, že při enzymatickém zpracovávání ječmene, jestliže je nutno upravit množství celkového dusíku ve sladině ve srovnání s běžně používanou sladinou ze sladu, dochází k tomu, že množství nízkomolekulárních dusíkatých látek jako substrátu pro pивovarské kvasnice, je nedostatečné.

Na druhé straně, jestliže je projevována snaha upravit množství nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin, které slouží jako zdroj substrátu pro pивovarské kvasnice, podle množství obsaženého v běžné pивovarské sladině ze sladu, potom celkové množství dusíku bude nadbytečné. Je dále nutno poznamenat, že je velmi obtížné připravit varným způsobem pivo, které by mělo vynikající organoleptické vlastnosti z těchto uvedených druhů sladin, ve kterých by se složení dusíkatých sloučenin lišilo od složení, které je v běžné sladině.

Autoři předmětného vynálezu zjistili, že mikroorganismy, které náleží k rodu *Streptomyces*, produkují amylázu, která projevuje zvláštní enzymatickou aktivitu, jak je to uvedeno v japonské zveřejněné patentové přihlášce č. 1871/74, v patentu Spojených států amerických č. 3 804 717, v patentu Velké Británie č. 1 377 223, v kanadském patentu č. 973 492, a ve francouzském patentu č. 7 138 545 (zveřejněná přihláška číslo 2 110 070). Tato amyláza je tepelně stabilní a projevuje velkou schopnost produkovat maltózu stejně jako schopnost ztekucovat škrob. Ovšem jestliže se tato amyláza ponechá působit přímo na surový ječmen, potom pozorovaný pokles zcukření a složení dusíkatých sloučenin ve výsledné sladině nebude srovnatelný s poklesem zcukření a se složením dusíkatých sloučenin ve sladině připravené ze sladu.

Cílem postupu podle uvedeného vynálezu je navrhnout a vyvinout způsob přípravy pивovarské sladiny zpracováním nesladovaného ječmene amylázou, produkovanou mikroorganismy z rodu *Streptomyces*, přičemž tato sladina by měla obsahovat dostatečné množství zkvasitelných cukrů, které by bylo srovnatelné s množstvím v běžně používané sladině, připravené ze sladu, a složení dusíkatých sloučenin by bylo srovnatelné se složením v běžné sladině, připravené ze sladu.

Podstata způsobu přípravy pивovarské sladiny enzymatickým zpracováním ječmene ve formě zrn nebo v rozemletém stavu amylázou nebo kombinací amylázy a proteázy spočívá podle uvedeného vynálezu v tom, že se škrobový podíl štěpí při pH 5,0 až 6,5 při teplotě v rozmezí od 45 do 55 °C po dobu v rozmezí od 30 do 90 minut a potom při teplotě v rozmezí od 60 do 70 °C po dobu v rozmezí od 30 do 120 minut účinkem amylázy produkované při aerobní kultivaci mikro-

organismů náležícím k rodu *Streptomyces*, což je *St. hygrosopicus* ATCC č. 21722, *St. viridochromogenes* ATCC č. 21724, *St. albus* ATCC č. 21725 nebo *St. tosaensis* nov. sp. ATCC č. 21723, nebo se zpracovávání provádí výše uvedenou amylázou a proteázou produkovanou mikroorganismy náležícími k rodu *Aspergillus*, což je *Asp. oryzae*, *Asp. melleus* nebo *Asp. niger*, v podstatě v nepřítomnosti sladu.

Ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu se enzymatické zpracovávání provádí v přítomnosti kombinace amylázy *Streptomyces* a proteázy *Aspergillus* a cellulázy.

Výhody postupu podle uvedeného vynálezu vyplývají z popisu následujících dvou možných provedení postupu podle uvedeného vynálezu.

Podle prvního provedení přípravy pivovarské sladiny se enzymaticky zpracovává škrobový materiál, přičemž v prvním stupni se připraví škrobový materiál, který obsahuje převážně množství ječmene, který byl předem zmazovatěn, a ve druhém stupni se ponechá působit na škrobový materiál amyláza za účelem zcukernění tohoto materiálu, přičemž se uvedená amyláza získá aerobní kultivací mikroorganismu produkujícího amylázu, který náleží k rodu *Streptomyces*, a v případě, že se použije škrobu, potom má enzymatickou aktivitu a charakteristiky takové, že optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí od 4,5 do 5,0, hranice hydrolýzy škrobu je minimálně 75 %, vzhledem k teoreticky vzniklé maltóze, a hmotnostní poměr glukózy k maltóze, vzniklé ze škrobu, je maximálně 0,06 : 1. Uvedená amyláza bude v dalším označována jako *Streptomyces* amyláza, což je amyláza produkovaná mikroorganismy rodu *Streptomyces*.

Postup podle tohoto prvního provedení je v podstatě charakterizován tím, že se použije specifické amylázy, to znamená amylázy produkované mikroorganismy rodu *Streptomyces*, a substrát na který uvedený enzym působí je zmazovatělý škrobový materiál, který obsahuje ječmen jako hlavní složku. Podle tohoto provedení postupu podle vynálezu se připraví pivovarská sladina, která má složení srovnatelné s složením sladiny připravované ze sladu. Konkrétně je možno uvést, že použitím amylázy produkované mikroorganismy rodu *Streptomyces* se snadným způsobem získá sladina, která vykazuje pozorovaný pokles zcukernění až například 87 %, jak je to uvedeno v dále uvedeném postupu podle příkladu 7, v příkladové části.

Tato vlastnost *Streptomyces* amylázy může být považována za zcela unikátní a jedinečnou, neboť jak již bylo uvedeno shora, zmazovatění ječmene způsobuje inaktivaci beta-amylázy v zrnech ječmene, což v případě použití jiných enzymů než je uvedená *Streptomyces* amyláza vede k poklesu v hodnotě pozorovatelného poklesu zcukernění, jak je to uvedeno v postupu podle příkla-

du 7, který bude uveden v příkladové části. Kromě toho je nutno uvést, že zmazovatění materiálu se projeví ve zlepšení organoleptických vlastností piva, jak to bude ještě uvedeno v příkladech 1 až 4, které budou následovat. Z výše uvedených důvodů je podle uvedeného vynálezu možné připravit pivovarskou sladinu zpracováváním ječmene pouze amylázou produkovanou mikroorganismy rodu *Streptomyces*, aniž by bylo třeba použít sladu.

Podle druhého možného provedení postupu podle uvedeného vynálezu se enzymaticky zpracovává škrobový materiál tak, že se v prvním stupni připraví škrobový materiál, který obsahuje převážně množství ječmene, a ve druhém stupni se nechá na uvedený škrobový materiál působit amyláza a proteáza za účelem štěpení tohoto materiálu, přičemž uvedená amyláza je produkována aerobní kultivací mikroorganismu produkujícího amylázu, který náleží k rodu *Streptomyces*, a v případě použití tohoto výše uvedeného škrobového materiálu má enzymatickou aktivitu a charakteristiky takové, že optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí od 4,5 do 5,0, hranice hydrolýzy škrobu je minimálně 75 % vzhledem k teoreticky vzniklé maltóze a hmotnostní poměr glukózy k maltóze vzniklé ze škrobu je maximálně 0,06 : 1, přičemž tato amyláza je stejně jako v prvním provedení označována v dalším jako *Streptomyces* amyláza, a uvedená proteáza je produkována mikroorganismem náležícím k rodu *Aspergillus*, přičemž tato proteáza bude v dalším textu označována jako *Aspergillus* proteáza.

V případě, že se podle uvedeného vynálezu ponechá působit tato zvláštní amyláza, to znamená *Streptomyces* amyláza, na zmazovatělý škrob z ječmene, získá se sladina, která má hodnotu pozorovatelného poklesu zcukření podobnou jako je tato hodnota běžně používané sladiny připravené ze sladu, přičemž není potřeba použít při tomto postupu sladu. Ovšem v případě, kdy se enzymatické zpracovávání ječmene amylázou *Streptomyces* provádí za současného působení zvláštní proteázy, to znamená *Aspergillus* proteázy, potom se podle tohoto druhého provedení podle uvedeného vynálezu získá výsledná sladina, která je srovnatelná s běžně používanou sladinou připravenou ze sladu, pokud se týče složení nejenom uhlohydrátů, ale rovněž i dusíkatých sloučenin. To znamená, že je možno tímto postupem připravit produkt, ve kterém je poměr formolového dusíku k celkovému dusíku 1 : 3, přičemž tento poměr je srovnatelný s poměrem u běžně používané sladiny připravené ze sladu, a dále je ve výsledném pivu připraveném z této sladiny zachována plnost a organoleptické vlastnosti které jsou srovnatelné s vlastnostmi piva, které se připraví z běžné sladiny ze sladu.

Kromě toho je nutné uvést, že v případě, kdy se použije proteáza produkovaná mikro-

organismy rodu *Aspergillus* při enzymatickém zpracovávání ječmene amylázou produkovanou mikroorganismy rodu *Streptomyces*, potom je možno dosáhnout vysoké hodnoty pozorovaného poklesu zcukernění, a rovněž tak i vysokého poměru formolového dusíku k celkovému dusíku, přičemž tento poměr je srovnatelný s poměrem, který se vyskytuje u běžně používané sladiny, i přesto že není uvedený škrob z ječmene předem zmazovateln.

Vliv kombinovaného účinku uvedené zvláštní amylázy a proteázy se jeví jako rozhodující činitel, pokud se týče dosažených výhod postupu podle vynálezu. Jinými slovy řečeno, při použití jiné amylázy než *Streptomyces* amylázy se dosáhne hodnoty poklesu zcukernění, který je pouze nedostatečný, a při použití bakteriální proteázy se získá poměr formolového dusíku k celkovému dusíku takový, který není srovnatelný s poměrem existujícím v běžné sladince připravené ze sladu.

Výše uvedené výhody postupu podle uvedeného vynálezu jsou zcela neočekávatelné. Je nutno v této souvislosti poznamenat, že podle dosavadního stavu techniky je známo a poukázáno na proteázu, která je produkována bakteriemi, které náleží například k rodu *Bacillus*, přičemž tato látka je nejvhodnější pro použití při enzymatickém zpracování ječmene, jak je to uvedeno například v patentu Velké Británie č. 1 202 976, 1 304 005 a 1 303 644 a v patentu Spojených států amerických č. 3 719 500. Ve skutečnosti tyto patenty a další odkazy [jako například: Příkladná Biochemie i mikrobiologie XII (6), 897 (1975)], uvádí, že proteáza produkovaná plísněmi (například rodu *Aspergillus*) může být použita v kombinaci s amylázou. Ovšem naprosto není možno předpokládat z těchto pramenů, že kombinace zvláštního druhu amylázy, to znamená *Streptomyces* amylázy, a zvláštního druhu proteázy, to znamená *Aspergillus* proteázy, může rezultovat ve zcela jedinečném a unikátním účinku, to znamená, že je možno dosáhnout současně uspokojivého složení uhlohydrátů s obsahem dusíkatých sloučenin, aniž by bylo nutné použít současně sladu.

Další zcela neočekávatelný výsledek tkví v tom, že podle druhého provedení postupu podle uvedeného vynálezu není nutno použít zmazovatelný ječmen za účelem získání dostatečného množství zvasitelných cukrů ve sladince, ačkoliv podle prvního provedení postupu podle uvedeného vynálezu se ječmen předem zmazovat.

Výše uvedené druhé provedení postupu podle uvedeného vynálezu je nejvýhodnější pro průmyslové využití, neboť je možno podle tohoto provedení připravit pivovarskou sladinu, která je srovnatelná co do složení uhlohydrátů a obsahu dusíkatých sloučenin s běžně používanou sladinou, připravenou ze sladu, aniž by bylo nutné provádět zmazování škrobu z ječmene.

Významná výhoda postupu podle uvedeného vynálezu spočívá v tom, že není nutné použít přídatného množství sladu. V případech kdy by to bylo nutné je možno použít přidavek sladu, což je zahrnuto v rozsahu uvedeného vynálezu. Rovněž je možno použít, jak již bylo uvedeno ve výhodném provedení postupu podle vynálezu, i další látky, jak bude ještě v dalším podrobně rozvedeno.

Streptomyces amyláza

Amyláza produkovaná mikroorganismy rodu *Streptomyces*, která se podle postupu podle uvedeného vynálezu nechá působit na škrobové materiály, má enzymatickou aktivitu a charakteristiky takové, že optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí od 4,5 do 5,0, hranice hydrolýzy škrobu není menší než 75 % vzhledem k teoreticky získané maltóze, a hmotnostní poměr glukózy k maltóze, která se připraví ze škrobu, je maximálně 0,06 : 1, přičemž se tato amyláza získá aerobní kultivací mikroorganismu produkujícího amylázu, náležícím k rodu *Streptomyces*. V tomto směru je možno poukázat na japonskou zveřejněnou patentovou přihlášku č. 1871/74, patent Spojených států amerických č. 3 804 717, patent Velké Británie č. 1 377 223, kanadský patent č. 973 492, a francouzský patent č. 7 138 545. Tyto odkazy jsou zde uvedeny pouze za účelem porovnání.

Jako příklady druhů mikroorganismů produkujících amylázu, které náleží k rodu *Streptomyces*, je možno uvést následující:

1. *Streptomyces aureofaciens* (FERM* č. P606)
2. *Streptomyces flavus* (FERM č. P605)
3. *Streptomyces hygroscopicus* var. *angustomyceticus* (FERM č. P607)
4. *Streptomyces hygroscopicus* (FERM č. P602, ATCC** č. 21 722). Tento druh je popsán ve Waksman: The Actinomycetes, Vol. 2 (1961) a ve Applied Microbiology, Vol. 10, P. 258-263 (1962). Tento druh je jeden z nejvýhodnějších pro postup podle uvedeného vynálezu.
5. *Streptomyces viridochromogenes* (FERM č. P603, ATCC č. 21 724). Tento druh je popsán ve Waksman: The Actinomycetes, Vol. 2 (1961) a v Journal of Bacteriology, Vol. 85, P. 676-690 (1963). Tento druh je jedním z nejvýhodnějších pro postup podle uvedeného vynálezu.
6. *Streptomyces albus* (FERM č. P604, ATCC č. 21 725). Tento druh je popsán ve Waksman: The Actinomycetes, Vol. 2 (1961). Tento druh je jedním z nejvýhodnějších druhů pro postup podle uvedeného vynálezu.
7. *Streptomyces tosaensis* nov. sp. (FERM č. P601, ATCC č. 21 723). Tento druh

byl izolován některými autory uvedeného vynálezu, přičemž detaily je možno zjistit z výše uvedené japonské patentové zveřejněné přihlášky č. 1871/74 a z jiných odkazů. Tento druh je jedním z nejvýhodnějších druhů pro postup podle uvedeného vynálezu.

*) Číslo FERM je depozitní číslo Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of International Trade and Industry, Inage, Chiba-Shi, Japonsko.

**) ATCC znamená American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Spojené státy americké.

Kultivace těchto druhů za aerobních podmínek a shromažďování a čištění vzniklé amylázy, která je nahromaděna v kultivačním prostředí, může být provedena některou z běžně používaných metod, jako jsou například metody všeobecně používané pro Actinomycetes, jak je například uvedeno v již výše uvedené japonské zveřejněné přihlášce patentu č. 1871/74 a v jiných odkazech. Například druh *Streptomyces hygroscopicus* (ATCC č. 21722) se inokuluje na inokulační médium, které obsahuje 2 % kukuřičného šrotu, 1 % pšeničných klíčků a 0,5 procent média Ferma (toto médium je dodáváno firmou Trader's Oil Mill Co., Texas, USA), a které má hodnotu pH asi 7,0, při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin, přičemž dochází k produkci kvasné kultury.

Inokulační médium se potom zaočkuje do kultivačního média, které obsahuje 12 % rozpustného škrobu, 3 % sójové mouky a 0,2 % dihydrofosforečnanu draselného, a jehož hodnota pH je 7,0, a potom se provádí kultivace při teplotě 35 °C po dobu 90 hodin. Výsledné kulturní prostředí se odfiltruje a filtrát se zkoncentruje na objem, který činí 1/5 objemu původního. Potom se k takto získanému zkoncentrovanému roztoku přidá chladný ethanol v množství, které je dvakrát větší než objem roztoku ke srážení amylázy. Vysrážená amyláza se potom suší, čímž vznikne surový enzym.

Aspergillus proteáza

Podle druhého provedení podle postupu podle uvedeného vynálezu se nechá působit proteáza na škrobový materiál, přičemž uvedená proteáza je produkována mikroorganismem, který náleží k rodu *Aspergillus*. Jako příklad druhů mikroorganismů náležících k rodu *Aspergillus*, které produkují uvedenou proteázu, je možno uvést: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus mellius*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* 0,8.1 (FERM 3745; ATCC č. 20498), přičemž tyto druhy byly izolovány autory uvedeného vynálezu. Kromě těchto druhů proteáz, které se získají kultivací uvedených plísní, je možno rovněž s úspěchem použít i jiných běžně dostupných druhů proteáz. Jako příklad těchto běžně dostupných druhů proteázy produko-

vané mikroorganismy rodu *Aspergillus*, je možno uvést: „Proteáza Amano A“ (Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Japonsko), „Denzym“ (Nagase and Co., Ltd., Japonsko), „Rhozyme A 4“ (Rohm and Haas, Penn., USA), a „Fermex“ (Wallerstren N. Y., USA). Obecnými vlastnostmi těchto uvedených proteáz je optimální hodnota pH pohybující se v rozmezí od 6,5 do 7,5 optimální teplota se pohybuje v rozmezí od 45 do 55 °C, a stabilní rozmezí hodnoty pH v rozmezí od 5,5 do 10,0.

Velmi důležitý znak postupu podle uvedeného vynálezu spočívá v tom, že není potřeba žádného přídavného množství sladu, přičemž se při tomto postupu provádí zpracovávání zmazovatělého ječmene amylázou produkovanou mikroorganismem rodu *Streptomyces* v kombinaci s proteázou produkovanou mikroorganismy rodu *Aspergillus*. V případě, kdy to je ovšem nezbytné, je možno rovněž použít přídavek sladu v kombinaci s těmito uvedenými materiály, přičemž i toto provedení náleží do rozsahu podle uvedeného vynálezu. Do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží provedení, kdy se místo použití sladu v kombinaci s uvedenými složkami použije přídavku malého množství diastázy, získané extrakcí ze sladu, nebo se použije jiných druhů amyláz, proteáz, celuláz, glukonáz a podobně, současně s amylázou produkovanou mikroorganismy rodu *Streptomyces* a proteázou produkovanou mikroorganismy rodu *Aspergillus*.

Škrobový materiál

Škrobový materiál se podle uvedeného vynálezu zpracovává amylázou *Streptomyces* buďto samostatně nebo společně s proteázou *Aspergillus*, přičemž tento uvedený škrobový materiál obsahuje převážný podíl ječmene. V textu byl několikrát použit termín „obsahuje převážný podíl ječmene“, který znamená, že škrobový materiál obsahuje kromě ječmene dále ještě 0 až 80 % hmotnostních škrobového materiálu jiného než ječmen, přičemž uvedená hodnota je vztažena na ječmen, jako je například škrob, rýže, kukuřice, kaoliang a brambory, a zvláště se používá škrob z nevyklíčených obilných materiálů.

V případě, že se postupuje podle druhého provedení podle uvedeného vynálezu, při kterém se zpracovává škrobový materiál amylázou *Streptomyces* v kombinaci s proteázou *Aspergillus*, potom nemusí být škrob z ječmene předběžně zmazovatěn. Ovšem podle prvního provedení postupu podle uvedeného vynálezu, kdy se nepoužívá proteázy *Aspergillus*, přičemž se používá ke zpracovávání škrobového materiálu pouze amylázy *Streptomyces*, je zmazování škrobu z ječmene podstatné. V případě, že se použije jiného škrobového materiálu než je ječmen, jako přídavného škrobového materiálu, potom tento přídavný škrobový materiál může

nebo nemusí být zmazovateln. V případě, že se použije přídatného škrobového materiálu ve zmazovatelném stavu, potom se toto zmazování může provést buďto současně nebo odděleně od provádění zmazování ječmene.

Podle uvedeného vynálezu se toto zmazování ječmene nebo přídatného materiálu může provést jakoukoliv běžně používanou metodou používanou při zmazování škrobových materiálů. Jako příklad této metody je možno uvést vaření ječmene ve formě zrn nebo meliva. Toto uvedené vaření zahrnuje zahřívání ječmene v přítomnosti vody v množství, které činí přinejmenším jednu polovinu množství ječmene, za tlaku a při teplotách přinejmenším 100 °C, ve výhodném provedení při teplotě pohybující se v rozmezí od 110 do 130 °C, po dobu přinejmenším 20 minut, ve výhodném provedení po dobu pohybující se v rozmezí od 30 do 60 minut. Toto vaření je rovněž možno provést účinkem páry.

Jako další příklad provádění tohoto zmazování škrobového materiálu může být uvedeno zpracovávání v protlačovacím zařízení za zvýšené teploty a tlaku. Toto protlačovací zařízení obsahuje jako hlavní součást zahřívací nádobu pro zahřívání a plastifikování uvedeného materiálu, který má být zpracován a dále obsahuje šnekové prostředky pro posun takto připraveného uhněteného materiálu za tlaku [viz například: Ind. Eng. Chem. 45, 970 (1953)]. Použitý ječmen ve formě zrn nebo meliva se zmazovat v tomto protlačovacím zařízení za zvýšených teplot a tlaků. V tomto zařízení je rovněž možné provádět zmazování dalšího přídatného škrobového materiálu, kromě ječmene, přičemž hmotnost tohoto přídatného škrobového materiálu je maximálně 80 % hmotnostních vztaženo na uvedený ječmen.

Po provedení tohoto zmazování se ječmen buďto ještě ve vlhkém stavu nebo po usušení (například na obsah vlhkosti maximálně 5 % hmotnostních), podrobí enzymatickému zpracování podle uvedeného vynálezu.

Dále je nutno uvést, že použitý „škrobový materiál“ v postupu podle uvedeného vynálezu může být takovým materiálem, který byl podroben různému zpracovávání, zvláště enzymatickému zpracovávání, kromě již uvedeného zmazování. Například je možno uvést, že škrobový materiál je možno před samostatným zmazováním nebo po zmazování, případně současně s prováděním zmazování, podrobit enzymatickému zpracovávání účinkem alfa-amylázy, celulózy, nebo proteázy. Jako příklad takového zpracování podle postupu podle uvedeného vynálezu je možno uvést, že se škrobový materiál vaří v přítomnosti alfa-amylázy, přičemž dojde k současnému zmazování a ztekucení. Konkrétně je možno dále uvést, že při praktickém provádění tohoto kroku se ječmen a přídatný škrobový materiál o

hmotnosti pohybující se v rozmezí od 0 do 80 % hmotnostních, vztaženo na uvedený ječmen, přidají k vodě o množství 2 až 4krát větším než je hmotnost pevné směsi za vzniku kašovitě hmoty. Potom se k této kaši přidá alfa-amyláza v množství pohybujícím se v rozmezí od 0,1 do 0,3 %, vztaženo na celkové množství škrobového materiálu a na sušinu, a takto připravená kaše se zahřívá na teplotu pohybující se v rozmezí od 70 do 90 °C, přičemž toto zahřívání se provádí po dobu pohybující se v rozmezí od 5 do 30 minut za účelem ztekucení škrobu. Potom se získaná kaše vaří při teplotě pohybující se v rozmezí od 100 do 120 °C po dobu pohybující se od 5 do 30 minut za účelem úplného ztekucení škrobu.

Vystírací proces (enzymatické zpracování škrobového materiálu)

Podle uvedeného vynálezu se nechá působit amyláza *Streptomyces* nebo tato amyláza a proteáza *Aspergillus*, na škrobový materiál připravený shora uvedeným postupem, přičemž je možno použít jakéhokoliv vystíracího procesu, kterého se používá při běžném rmutování za použití nesladovaného ječmene a přídatných enzymů, nebo je možno použít jakéhokoliv jiného vhodného procesu.

Jako jeden příklad tohoto postupu je možno uvést infúzní postup, při kterém se celkový obsah kašovitě hmoty podrobí zahřívání v přítomnosti enzymu v samostatné vystírací kádli, aniž by byla uvedená kašovitá hmota rozdělována. V tomto případě se uvedený zahřívací postup provádí takovým způsobem, že se se zahříváním započne při nejnižších teplotách a teplota se v dalším postupu postupně zvyšuje, nebo se postupuje takovým způsobem, že se započne při nejvyšší teplotě a teplota se potom v dalším postupu postupně snižuje.

Rovněž je možno použít dekokční postup. Tento postup se provádí takovým způsobem, že se kašovitá hmota zahřívá v přítomnosti enzymu ve vystírací kádli, ovšem na rozdíl od předcházejícího postupu se část kaše odebere a vaří se ve vystíracím kotli. Tato kašovitá hmota ve vystíracím kotli se potom vrací do vystírací kádě a výsledkem je to, že se teplota celého obsahu kašovitě hmoty zvýší.

Konkrétně je možno tento postup charakterizovat například tak, že se amyláza *Streptomyces* přidá v množství pohybujícím se v rozmezí od 1 do 8 miligramů na gram ječmene ke směsi horké vody a škrobového materiálu, který byl předem v případě, kdy to je nezbytné, zmazován a ztekucen postupem, který byl již popsán shora, a potom se v případě nutnosti přidá k uvedené kaši proteáza *Aspergillus* v množství pohybujícím se v rozmezí od 0,5 do 5,0 miligramů na gram ječmene, nebo papain jako proteolytický enzym v množství pohybujícím se v rozmezí od 1 do 4 miligramů na gram ječmene,

a dále celulóza v množství pohybujícím se v rozmezí od 1 do 4 miligramů na gram ječmene. Takto připravená kaše se udržuje na teplotě pohybující se v rozmezí od 45 do 55 °C po dobu pohybující se v rozmezí od 30 do 90 minut, potom se teplota uvedené kaše upraví na hodnotu pohybující se v rozmezí od 60 do 65 °C a udržuje se při této teplotě po dobu v rozmezí od 30 do 60 minut. Potom se část této kašovité hmoty (v množství asi 1/3 až 1/2 z celkového množství kaše) oddělí a vaří se ve vystíracím kotli po dobu pohybující se v rozmezí od 5 do 10 minut a potom se opět vrátí do vystírací kádě. Během provádění tohoto posledního kroku, se teplota zbývající kašovité hmoty ve vystírací kádi udržuje na hodnotě pohybující se v rozmezí od 60 do 65 °C. Tímto způsobem je možno připravit vhodnou sladinu pro varný postup výroby piva, přičemž tato sladina a výsledný produkt, pivo, mají vynikající organoleptické vlastnosti. Výše uvedený krok vaření může být proveden dvakrát. Například po provedení výše uvedeného postupu se opět spojená kašovitá hmota zahřívá na teplotu pohybující se v rozmezí od 70 do 75 °C a potom se odebere asi 1/3 až 1/2 uvedené opět spojené kašovité hmoty a tento druhý oddělený podíl se opět zahřívá po dobu pohybující se v rozmezí od 5 do 10 minut. Zbývající kašovitá hmota se udržuje při teplotě pohybující se v rozmezí od 70 do 75 °C po dobu v rozmezí od 20 do 40 minut, a potom se spojí s kaší, která byla odděleně zahřívána.

Ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu se přídatný škrobový materiál, jiný než ječmen, zpracuje amylázou *Streptomyces* společně s ječmenem, který byl předem zmazovatěn. Je ovšem třeba poznamenat, že v tomto případě nemusí být přídatný škrobový materiál přítomen od samého počátku provádění vystíracího postupu ječmene. V případě, že to je nutné, může být tento přídatný škrobový materiál předem zpracován alfa-amylázou a/nebo celulázou a potom se tento materiál přidá do vystíracího procesu ječmene.

Takto připravená zápara se zfiltruje a získaný extrahovaný filtrát (sladká sladina) se upraví na požadovanou úroveň (například na 10 až 12° Plato). Potom se přidá vhodné množství chmelu, jako například množství pohybující se v rozmezí od 2 do 5 g/l, k takto připravené sladké sladině a směs se uvede do varu po dobu 1 až 2 hodin. Potom se získaná mladina podrobí kvašení účinkem pivovarských kvasnic.

V dalším budou uvedeny praktické příklady provedení, které jsou zde uvedeny za účelem bližšího objasnění podstaty a použitelnosti postupu podle vynálezu, přičemž je nutno poznamenat, že tyto příklady pouze ilustrují tento postup podle vynálezu aniž by ho jakýmkoliv způsobem omezovaly.

Příklad 1

Podle tohoto příkladu se surový ječmen vaří za tlaku společně s ekvivalentní hmotností vody při teplotě 120 °C po dobu 30 minut. Potom se uvařený ječmen suší na horkém vzduchu při teplotě 85 °C po dobu 6 hodin, přičemž se získá zmazovatělý ječmen.

Potom se takto připravený zmazovatělý ječmen rozemílá a 9 kilogramů takto připraveného ječmene se umístí do vystírací kádě, do které se současně přidá 30 litrů horké vody při teplotě 50 °C, 20 gramů amylázy *Streptomyces*, 10 gramů papainu a 10 gramů celulózy. Takto získaná kašovitá hmota se míchá při teplotě 50 °C po dobu 60 minut.

Vedle toho se vloží do varné nádoby 3,5 kilogramu kukuřičného škrobu, 15 litrů horké vody o teplotě 50 °C a 10 gramů alfa-amylázy. Obsah varné nádoby se zahřívá při teplotě 70 °C po dobu 10 minut a dále se udržuje při této teplotě po dobu 10 minut. Potom se teplota této směsi zvýší na 100 °C během 15 minut a obsah se uvede do varu a vaření se provádí 25 minut. Během tohoto postupu se provede ztekucení kukuřičného škrobu.

Po dokončení těchto dvou separátních postupů se obě kašovité hmoty sloučí a výsledná kašovitá hmota se zahřeje na teplotu 65 °C a při této teplotě se udržuje po dobu 30 minut. Potom se asi 50 % této spojené kašovité hmoty přemístí do vystíracího kotle a obsah tohoto kotle se uvede do varu. Zbývající kašovitá hmota se udržuje na teplotě 65 °C po dobu 60 minut ve výše uvedené vystírací kádi. Během tohoto kroku se vytváří zkvasitelné cukry.

Ke konci vystíracího postupu se obě kašovité hmoty z vystírací kádě a z vystíracího kotle spojí a zahřejí na teplotu 80 °C. Potom se získaná kašovitá hmota zfiltruje a takto získaný koláč se postříkuje horkou vodou. Potom co se upraví extrahovaný obsah výsledné sladké sladinu, se tato sladina vaří s chmelem. Takto získaná mladina se ochladí a v dalším se podrobí kvašení účinkem pivovarských kvasnic. Kvašení, dokvašování, filtrace a stáčení se provádí běžným způsobem známým dostatečně v pivovarnictví.

Příklad 2

Podle provedení podle tohoto příkladu se přidá 9 kilogramů ječmene, 3,5 kilogramu kukuřičného škrobu, 10 gramů alfa-amylázy a 5 gramů celulózy do 50 litrů horké vody o teplotě 50 °C, a potom se výsledná kašovitá hmota udržuje při teplotě 50 °C po dobu 30 minut, potom se zahřeje tento obsah na teplotu 90 °C během 10 minut, při této teplotě se udržuje po dobu 10 minut, a nakonec se vaří po dobu 30 minut. Vzniklá kašovitá hmota se ochladí na teplotu 50 °C, a k této kaši se potom přidá 20 gramů amylázy *Streptomyces*, 10 gramů papainu a 10 gra-

mů celulózy. Potom se takto připravená kaše udržuje při teplotě 50 °C po dobu 30 minut a nakonec se teplota zvýší na 65 °C.

V dalším se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 1.

Příklad 3

Podle tohoto příkladu se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 1 s tím rozdílem, že se při přidávání amylázy *Streptomyces* a dalších enzymů dále použije přídatku 5 gramů diastázy jako přídatného enzymu vzhledem k amyláze *Streptomyces*.

Příklad 4

Podle tohoto příkladu se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 2, s tím rozdílem, že se použije při přidávání amylázy *Streptomyces* a dalších enzymů přídatku 5 gramů diastázy jako přídatného enzymu vzhledem k amyláze *Streptomyces*.

Příklad 5

Podle tohoto příkladu se surový ječmen

pořádně rozemele a potom se zmazovává ve vytlačovacím zařízení. Zmazovatělý ječmen se zpracuje enzymy podle postupu uvedeném v příkladu 1.

Příklad 6

Podle tohoto příkladu se jednak surový ječmen a jednak kukuřičné melivo zmazovává ve vytlačovacím zařízení. Potom se 9 milogramů zmazovatělého ječmene a 3,5 kilogramů zmazovatělého kukuřičného meliva umístí ve vystírací kádi a potom se do této vystírací kádě přidá 50 litrů horké vody o teplotě 50 °C a dále enzymy podle příkladu 1. Výsledná kaše se udržuje na teplotě 50 °C po dobu 60 minut a potom se teplota zvýší na 65 °C.

Potom se uvedená kaše zpracuje stejným postupem jako je uveden v příkladu 1. Složení získané sladiny podle uvedených příkladů 1, 2, 3 a 4 je uvedeno v tabulce 1.

Pokud se týče tabulky 1, složení uhlohydrátů bylo zjištěno gelovou filtrační metodou (Am. Soc. Brew. Chem. Proc. 154, 1970), a množství bylo stanoveno EBC metodou (Analytica EBC 3rd Edition, 1975).

Tabulka 1

Sladina	Složení*				sladiny
	Příklad 1	Příklad 2	Příklad 3	Příklad 4	Kontrolní příklad**
Pozorovaný pokles					
zcukernění (%)	84,4	83,2	86,5	85,1	83,2 až 86,7
Monosacharidy (%)	8,5	8,3	9,3	9,0	8,4 až 10,5
Disacharidy (%)	49,2	49,1	50,8	51,0	49,8 až 51,9
Trisacharidy (%)	17,3	16,8	16,2	15,9	15,2 až 16,7
Zkvasitelné cukry (%)	75,0	74,2	76,3	75,9	73,4 až 78,5
Oligosacharidy (%)	9,3	9,3	9,1	8,7	8,6 až 10,5
Dextrin (%)	15,7	16,5	14,6	15,4	12,9 až 16,1
Celkový obsah dusíku (mg N/100 ml)	80,2	81,0	83,3	84,6	76,2 až 84,7

* složení se vztahuje na sladinu 11°

** v tomto provedení bylo použito sladu místo ječmene a enzymů v příkladu 1

Jak je patrné z tabulky 1, v případě že se zmazovatělý ječmen zpracuje amylázou *Streptomyces*, jako je tomu v příkladech 1 a 2, potom je složení karbohydrátů ve výsledné sladince vhodné pro přípravu piva.

Organoleptické vlastnosti piva, které bylo připraveno ze sladiny získané podle prvního provedení postupu podle uvedeného vynálezu, byly srovnatelné s vlastnostmi kontrolního piva, které bylo připraveno ze sladu, což bylo zjištěno na základě sensorického hodnocení (ze tří vzorků). Porota sestavená ze 20 porotců nezaznamenala žádný podstatný rozdíl mezi pivem připraveným ze sladiny získané podle uvedeného vynálezu a mezi kontrolním pivem. Kromě toho je nutno uvést, že pivo získané podle uvedeného vy-

nálezu má sladovou příchut a pивní příchut, a neprojevovalo žádný zápach po mlátu a diacetyl. U piva, které se připraví ze sladiny získané běžným enzymatickým zpracováváním ječmene, se stěží dosáhne těchto uvedených vlastností.

Příklad 7

Podle tohoto příkladu se ječmen nebo zmazovatělý ječmen zpracuje enzymem v množství které odpovídá diastatické možnosti sladu, přičemž teplotní schéma je stejná jako v příkladu 1. Pozorovaný pohled zcukření výsledné sladiny je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2

Pozorovaný pokles zcukření sladiny (%)

Materiál	Enzym			
	Amyláza Streptomyces	Běžný produkt A	Běžný produkt B	Slad* (kontrolní látka)
Škrob z ječmene a kukuřice	76	80	72	—
Zmazovatělý škrob z ječmene a kukuřice	87	73	53	—
Škrob ze sladu a kukuřice	—	—	—	82 až 87

*) V tomto provedení podle příkladu 1 bylo použito pět druhů sladu místo ječmene a různých enzymů.

Z tabulky 2 je zřejmé, že v případě, že se zpracovává zmazovatělý ječmen amylázou Streptomyces jako hlavním zdrojem enzymu, potom pozorovaný pokles zcukření výsledné sladiny je srovnatelný s poklesem zcukření kontrolního vzorku, přičemž tento výsledek není možno dosáhnout použitím žádných jiných enzymů.

Příklad 8

Podle tohoto provedení se do vystírací kádě vloží 9 kilogramů rozemletého ječmene současně se 30 litry horké vody o teplotě 50 °C, a dále se přidá 15 gramů proteázy Aspergillus, 20 gramů amylázy Streptomyces a 10 gramů celulózy. Takto připravená kaše se míchá při teplotě 50 °C po dobu 60 minut, přičemž se v hlavní míře vytvoří dusíkaté sloučeniny.

Dále se odděleně vloží do varné nádoby 3,5 kilogramů kukuřičného škrobu, 15 litrů horké vody o teplotě 50 °C a 10 gramů alfa-amylázy. Tento obsah ve varné nádobě se potom zahřeje na teplotu 70 °C během 10 minut a potom se tento obsah udržuje na této teplotě po dobu 10 minut. V dalším postupu se kaše zahřeje na teplotu 100 °C během 15 minut a dále se tato kaše vaří při této teplotě po dobu 25 minut. Během tohoto postupu dojde ke ztekucení škrobu.

Po dokončení těchto postupů se obě kašové hmoty spojí, vzniklá hmota se zahřeje na teplotu 65 °C a při této teplotě se potom udržuje po dobu 30 minut. Potom se asi 50 % této kašovitě hmoty přemístí do vystíracího kotle a tato kaše se potom vaří. Kašovitá hmota, která zůstala ve vystírací kádě, se udržuje na teplotě 65 °C po dobu 60 minut. Během tohoto postupu dochází ke tvorbě zkvasitelných cukrů.

Ke konci vystíracího procesu se obě kašovitě hmoty jednak z vystírací kádě a jednak z vystíracího kotle, spojí, potom se zahřeje na teplotu 80 °C a nakonec se provede filtrace. Poté co se upraví vzniklá sladká sladina se sladina vaří s chmelem. Takto připravená vzniklá mladina se ochladí a po-

tom se podrobí kvašení účinkem pivovarských kvasnic. Kvašení, dokvašení, filtrace a vaření se provádí běžným pivovarnickým způsobem.

Příklad 9

Podle tohoto příkladu se přidá 9 kilogramů rozemletého ječmene, 3,5 kilogramu kukuřičného škrobu, 10 gramů alfa-amylázy a 5 gramů celulózy do 50 litrů horké vody o teplotě 50 °C. Takto získaná kašovitá hmota se udržuje při teplotě 50 °C po dobu 30 minut, potom se tato hmota zahřeje na teplotu 90 °C během 10 minut, při této teplotě se udržuje po dobu 10 minut, a nakonec se vaří po dobu 30 minut. Výsledná kašovitá hmota, získaná tímto postupem se ochladí na teplotu 50 °C, a potom se k této kaši přidá 15 gramů proteázy Aspergillus, 20 gramů amylázy Streptomyces, 10 gramů celulózy a 10 gramů beta-glukanázy. Takto připravená kaše se udržuje na teplotu 50 °C po dobu 30 minut a potom se teplota této hmoty zvýší na 65 °C.

Potom se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 8.

Příklad 10

V tomto provedení se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 8 s tím rozdílem, že se ječmen zmazovává za tlaku ve výtlačném zařízení a tento zmazovatělý ječmen se použije místo surového ječmene.

Příklad 11

Podle tohoto provedení se provede stejný postup jako je uveden v příkladu 8 s tím rozdílem, že se kaše zahřeje na teplotu 65 °C, a při této teplotě se kaše udržuje po dobu 90 minut.

Složení sladin, získaných podle příkladu 8 až 11 je uvedeno v tabulce 3.

Sladina byla analyzována metodou EBC (Analytica EBC, 3rd Edition 1975).

Tabulka 3

Složka	Složení*				sladiny
	Příklad 8	Příklad 9	Příklad 10	Příklad 11	Kontrolní př.**
Celkový dusík (mg N/100 ml)	80,8	79,8	82,1	82,5	76,2 až 84,7
Formolový dusík (mg N/100 ml)	25,6	25,7	25,5	26,7	23,9 až 27,0
Poměr formolového dusíku k celkovému dusíku (%)	31,7	32,2	31,1	32,4	30,9 až 32,7
Pozorovaný pokles zcukření (%)	83,9	85,3	84,7	85,0	83,2 až 86,7

*) Uvedená data se vztahují na sladinu 11°

**) V postupu podle příkladu 8 bylo použito pět druhů sladu místo ječmene a enzymů.

Jak je zřejmé z tabulky 3, v případě že se použije při enzymatickém zpracování ječmene amylázou *Streptomyces proteáza Aspergillus*, potom poměr formolového dusíku k celkovému dusíku ve výsledné sladině je srovnatelný s poměrem ve sladině připravené ze sladu. Rovněž je možno z tabulky 3 zjistit, že v případě kdy je ječmen zmazovateň nebo není zmazovateň, dosáhne se vysoké pozorované hodnoty poklesu zcukření ve výsledné sladině, která je srovnatelná s hodnotou získanou při použití sladu, takže je možno konstatovat, že použití proteázy *Aspergillus* při enzymatickém zpracování ječmene amylázou *Streptomyces* umožňuje, že není nutné použít zmazovateň ječmene.

Organoleptické vlastnosti piva, které se připraví ze sladiny získané podle druhého

provedení postupu podle uvedeného vynálezu, byly srovnány s vlastnostmi kontrolního piva, které se připraví ze sladu, na základě senzorické zkoušky (ze tří vzorků). Porota sestavená z 20 porotců nezaznamenala žádnou podstatnou odchylku mezi pivem připraveným ze sladiny získané podle uvedeného vynálezu a kontrolním pivem. Pivo připravené ze sladiny podle uvedeného vynálezu mělo sladovou příchutí a pивní chuť, přičemž neprojevovalo žádný mlatový zápach a diacetylový zápach. Tyto dobré vlastnosti piva se ztěží dosáhnou u piva připraveného běžným enzymatickým zpracováním.

Sladina, získaná na základě enzymatického štěpení ječmene amylázou *Streptomyces* měla následující pozorovaný pokles zcukření.

Tabulka 4

Proteáza	Pozorovaný pokles zcukření sladiny		
	Materiál		Kontrolní provedení ¹⁾
	Škrob ze surového ječmene a kukuřice	Zmazovatelý škrob z ječmene a kukuřice	
Papain	74 % ²⁾	84 % ³⁾	—
Proteáza <i>Aspergillus</i>	84 % ⁴⁾	85 % ⁵⁾	—
			82 až 87 %

Poznámky:

- 1) Kontrolní pokus: v postupech podle příkladů 1 nebo 8 bylo použito místo ječmene a enzymů pět druhů sladu.
- 2) V příkladu 1 byl použit místo zmazovatelého ječmene surový ječmen.
- 3) Příklad 1.
- 4) Příklad 8.
- 5) Příklad 10.

Tento uvedený účinek proteázy *Aspergillus* v kombinaci s působením amylázy *Streptomyces* na pokles zcukření ve sladině nebylo možno dosáhnout s jinými druhy proteáz

zy, jako například s papainem, jak je to uvedeno v tabulce 4.

Příklad 12

Poměr formolového dusíku k celkovému dusíku ve sladinách, které byly získány z ječmene a kukřičného škrobu, které byly zpracovávány různými druhy proteáz, v kombinaci s amylázou *Streptomyces*, je uveden v tabulce 5. Z tabulky 5 je zřejmé, že poměr formolového dusíku k celkovému dusíku je srovnatelný s poměrem ve sladině, připravené pouze ze sladu, v případě že se použije proteáza *Aspergillus*.

Tabulka 5

Poměr formolového dusíku k celkovému dusíku ve sladidně.

Formolový dusík/ celkový dusík ve sladidně (%)	Proteáza
Bakteriální alkalická proteáza	21
Bakteriální neutrální proteáza	22
Papain	25
Bromelin	26
Pancreatin	26
Trypsin	24
Proteáza <i>Aspergillus oryzae</i>	32
Proteáza <i>Aspergillus mellius</i>	31
Proteáza <i>Aspergillus niger</i>	33
Sladina připravená ze sladu a z kukuřičného škrobu (kontrolní vz)*	31—33

*) viz tabulka č. 3

Surový ječmen se zpracuje několika běžnými amylázami a současně proteázou *Aspergillus*. Obchodní běžný produkt A je směsí enzymů pro pivovarnický postup, který obsahuje bakteriální amylázu a obchodní produkt B je bakteriální amyláza.

V tabulce 6 je uveden rozhodující vliv amylázy *Streptomyces* podle uvedeného vynálezu na úroveň poklesu zcukření ve výsledné sladidně.

Tabulka 6

Pokles zcukření ve sladidně

Amyláza <i>Streptomyces</i>	84 %
Obchodní produkt A	79
Obchodní produkt B	73
Kontrolní vzorek (slad)*	82—87

Amyláza *Streptomyces* se nahradí produktem A nebo B podle příkladu 8,

*) viz tabulka 4.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy pivovarské sladiny enzymatickým zpracováváním ječmene ve formě zrn nebo v rozemletém stavu amylázou nebo kombinací amylázy a proteázy, vyznačující se tím, že se škrobový podíl štěpí při pH 5,0 až 6,5 při teplotě v rozmezí od 45 do 55 °C po dobu v rozmezí od 30 do 90 minut a potom při teplotě v rozmezí od 60 do 70 °C po dobu v rozmezí od 30 do 120 minut účinkem amylázy produkované při aerobní kultivaci mikroorganismů náležících k rodu *Streptomyces*, což je *St. hygrosopicus* ATCC

č. 21 722, *St. viridochromogenes* ATCC číslo 21 724, *St. albus* ATCC č. 21 725 nebo *St. tosaensis* nov. sp. ATCC č. 21 723, nebo se zpracovávání provádí výše uvedenou amylázou a proteázou produkovanou mikroorganismy náležícími k rodu *Aspergillus*, což je *Asp. oryzae*, *Asp. melleus* nebo *Asp. niger*, v podstatě v nepřítomnosti sladu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že enzymatické zpracovávání se provádí v přítomnosti kombinace amylázy *Streptomyces* a proteázy *Aspergillus* a cellulázy.