

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 085

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12C 11/00 (2006.01)
C12C 11/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-787**
(22) Přihlášeno: **13.12.2016**
(40) Zveřejněno: **03.01.2018**
(Věstník č. 1/2018)
(47) Uděleno: **22.11.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **03.01.2018**
(Věstník č. 1/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
DILLEMANS M. et al.: "The Amplification Effect of the IL V5 Gene on the Production of Vicinal Diketones in *Saccharomyces Cerevisiae*", Journal of the American Society of Brewing Chemists, vol. 45, no. 3, 1987, str. 81 - 84.
CN 101497865; CN 105018360; CN 101451110.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, CZ
AMPELOS, ŠLECHTITELSKÁ STANICE
VINAŘSKÁ ZNOJMO, s.r.o., Vrbovec, CZ

(72) Původce:
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov 1, CZ
Lukáš Kylián, Suchohrdly, CZ
Ing. Petra Kubizniaková, Praha 9 - Horní Počernice,
CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář,
Zábrdovická 11, 615 00 Brno

(54) Název vynálezu:
**Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*
CCM 8715 a jeho použití při výrobě piva**

(57) Anotace:
Vynález se týká kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 izolovaného ze spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně zpracovává galaktózu, sacharózu, rafinózu a maltózu a aerobně zpracovává laktát, a který vytváří elipsoidní až kulové buňky s rozměry 6 až 8 µm x 4 až 6 µm, které nevytváří mycelium. Vynález se dále týká výroby piva, při které hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715.

CZ 307085 B6

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 a jeho použití při výrobě piva

Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715.

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

Dosavadní stav techniky

Výroba piva spočívá v kontrolovaném zkvašování cukrů obsažených v mladině pivovarskými 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-*Saccharomyces* a jejich význam v pivovarském průmyslu. II. část“, obojí Kvasný Průmysl 62 / 2016 (7–8)). Pivovarské kvasinky přitom při své činnosti přeměňují sacharidy na ethanol, oxid uhličitý a energii potřebnou k pomnožování kvasinek 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 všech těchto vyšších alkoholů a 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, 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).

Výroba vína pak spočívá ve zkvašování sacharidů přítomných v hroznovém moštu vinařskými kvasinkami. Při tomto zkvašování dochází k přeměně sacharidů na ethanol a oxid uhličitý a energii potřebnou k pomnožování kvasinek. Vinařské kvasinky jsou oproti pivovarským kvasinkám odolnější vůči alkoholu. Do moštu se přitom dostávají buď z povrchu bobulí (spontánní kvašení), nebo přidáním čisté kultury ušlechtilých kvasinek (čisté kvašení). Kulturní vinařské kvasinky patří do druhů *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces bayanus*.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715, který se izoloval ze spontánního kvašení hroznového moštu. Pro další použití se připravil selekcí a opakovaným přeočkováváním na sladidlový agar s tetracyklinem. Kultivace pak 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 až do doby, než kultura kvasinek narostla do podoby viditelně oddělených kolonií. Následná izolace kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 se pak provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladidlový agar.

Takto izolovaný kmen se poté charakterizoval biochemickými testy a polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

- 5 Kvasinky kmene *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 vytvářejí elipsoidní až kulovité buňky s rozměry 6 až 8 μm x 4 až 6 μm , které nevytváří mycelium a jen vzácně vytváří pseudomycelium.

Vzhled a konzistence kolonií - nátěr je těstovitý, krémový, světle hnědý, hladký, lesklý. Charakter nárůstu v kapalném mediu - v kapalinách tvoří sediment, mázdra se nikdy nevytváří.

- 10 Kmen *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 využívá aerobně (oxiduje) i anaerobně (fermentuje) galaktózu, sacharózu, rafinózu, maltózu a glukózu. Aerobně využívá (oxiduje) laktát.

- 15 Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 má ve srovnání s pivovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pastorianus* některé výhodné vlastnosti pro využití při přípravě piva. Zejména jde o produkci jen minimálního množství diacetylu, který hoto-
vému pivu uděluje chuť po másle a ve vyšších koncentracích je považován za nežádoucí. Opti-
mální teplota pro výrobu piva s použitím tohoto kmene je v rozmezí 18 až 22 °C, kdy kvasinky
20 produkují optimální množství senzoricky aktivních látek; avšak tento kmen lze použít i pro kva-
šení při teplotách 12 až 16 °C, přičemž i při těchto teplotách je charakteristický vysokou rychlostí
kvašení.

- 25 Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 podle vynálezu je uložen ve sbírce mikro-
organismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., označované kódem RIBM
(Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem RIBM 192 a v České sbírce mikroorga-
nismů (Czech Collection of Microorganisms) v Brně pod číslem CCM 8715.

Příklady uskutečnění vynálezu

- 30 **Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 pro laboratorní kvasné zkoušky**

- 35 Při přípravě kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu piva, se použila čistá kultura tohoto kmene, která se získala izolací ze spontánního kvašení hroznového moštu (viz výše), a která se až do doby přípra-
vy uchovávala v chladničce při teplotě 2 ± 1 °C.

- 40 Kultura kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 se zaočkovala na šikmý sladinový 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 pro-
bíhala kultivace při teplotě 25 °C. Poté se odlila horní prokvašená vrstva a kvasničná sedlina se převedla do 50 ml 10% sterilní mladiny, načež 2 dny probíhala kultivace při teplotě 20 °C.
45 Následně se tento kmen pomnožil převáděním do vždy většího objemu v poměru přibližně 1:4. Kvasničná sedlina se tak nejprve převedla do 250 ml 10% sterilní mladiny, kde 5 dní probíhalo pomnožování při teplotě 17 ± 1 °C, poté se vytvořený kvasničný sediment převedl do 1000 ml 10% mladiny, kde 3 dny probíhala kultivace při teplotě 17 ± 1 °C.

- 50 Tímto způsobem připravený kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 se může přímo použít pro laboratorní kvasné zkoušky nebo pro výrobu piva. V případě potřeby se předtím ještě promyje vodou (opakovanou sedimentací a promýváním), aby došlo k odstranění kultivačního média.

Příklad 2: Příprava piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715

Do mladiny s původním extraktem přibližně 12 % (stejným postupem však lze připravit pivo z mladiny s jiným extraktem) se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 připravený postupem popsáním v příkladu 1. Zákvasná dávka činila přibližně 30 milionů buněk / ml mladiny. Následná fermentace probíhala ve vysterilované plastové nádobě při teplotě $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dní.

V průběhu kvašení se sledoval průběh množení buněk a jejich sedimentace počítáním buněk mikroskopickou technikou pomocí Bürkerovy komůrky. Kromě toho se dále měřil úbytek extraktu, prokvašení, koncentrace alkoholu a změna pH. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Měřený parametr	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Alkohol (% obj.)	0	2,48	3,65	3,81	3,95	4,08
Prokvašení zdánlivé (%)	0	40,57	59,34	62,27	65,03	67,53
Extrakt zdánlivý (% hm.)	11,87	6,78	4,68	4,29	3,96	3,69
pH	5,74	4,36	4,24	4,23	4,22	4,22
Počet buněk (mil/ml)	29,8	80	74,6	57,05	23	24,5

Po ukončení kvašení se takto připravené pivo převedlo do ležáckých nádob a při teplotě $2 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ se uložilo do ležáckého sklepa. Po 6 týdnech ležení se u něj změřilo pH, prokvašení, extrakt, obsah alkoholu, koncentrace diacetylu, pentandionu, acetaldehydu a dimethylsulfidu (DMS), přičemž naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

Jak je zřejmé, kmen *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 produkuje ve srovnání s běžným pivovarskými kvasnicemi jen nízké koncentrace diacetylu, který je zodpovědný za nežádoucí máslovou příchut' piva.

Tabulka 2

Měřený parametr	Hodnota
Extrakt zdánlivý (% hmotn.)	3,65
Extrakt skutečný (% hmotn.)	5,16
Alkohol (% obj.)	4,15
Prokvašení zdánlivé (%)	68,1
Diacetyl (mg/l)	0,013
Pentandion (mg/l)	<0,005
Acetaldehyd (mg/l)	49,39
DMS (μg/l)	36

Kromě toho se u tohoto piva dále měřil také obsah vyšších alkoholů a esterů, které se výraznou měrou podílí na senzorickém profilu hotového nápoje. V tabulce 3 jsou uvedeny vybrané vyšší

alkoholy a estery a poměr celkových vyšších alkoholů k esterům (poměr A/E). Hodnota tohoto poměru pak vypovídá o tom, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 se chovají podobně jako svrchní pivovarské kvasnice, vytváří však vyšší množství betafenyl alkoholu než většina jejich kmenů (obvyklé hodnoty jsou do 4) a současně velmi nízké množství diacetylu i pentandionu. To je velmi výhodné z hlediska technologie výroby piva, neboť díky tomu není nutné do výrobního postupu zařazovat dlouhou prodlevu na odbourání diacetylu.

Tabulka 3

Sledovaná látka	Obsah
ethylformiát (mg/l)	0,04
ethylacetát (mg/l)	12,19
propylacetát (mg/l)	0,059
isobutylacetát (mg/l)	0,227
ethylbutyrát (mg/l)	0,169
propanol (mg/l)	27,38
isobutanol (mg/l)	15,73
isoamylacetát (mg/l)	1,29
2 a 3-methyl-butanol (mg/l)	57,69
ethylkapronát (mg/l)	0,223
ethylkaprylát (mg/l)	0,179
ethyl-hexanol (mg/l)	0,012
furfuryl-alkohol (mg/l)	0,053
fenylethylacetát (mg/l)	0,288
β -fenyl-alkohol (mg/l)	9,61
suma alkoholů (mg/l)	11048
suma esterů (mg/l)	14,75
poměr A/E	7,49

Kromě toho se také analyzovala produkce fenolických látek, které jsou zodpovědné za medicínské nebo hřebíčkové aroma piva. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4, přičemž je zřejmé, že jsou obdobné jako při použití kmenů pivovarských kvasnic používaných při výrobě pšeničných piv.

Tabulka 4

Sledovaná látka	Obsah
2-fenylethanol (mg/l)	23,46
4-vinylguajakol (mg/l)	6,48
Tyrosol (mg/l)	4,66

Dále se také provedlo senzoričké hodnocení piva degustační komisí. Nápoj připravený s využitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 nevykazoval žádné senzoričké závady, byl příjemně nasycený, lehce citronově nakyslý, s intenzivní vůní po koriandru a hřebíčku a chutí připomínal svrchně kvašené pivo. Hořkost byla vyhodnocena jako příjemná. Celkový subjektivní dojem byl vyhodnocen jako nadprůměrný.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* uložený u České sbírky mikroorganismů pod
číslem 8715 izolovaný ze spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně
zpracovává galaktózu, sacharózu, rafinózu a maltózu a aerobně zpracovává laktát, a který vytváří
elipsoidní až kulové buňky s rozměry 6 až 8 μm x 4 až 6 μm , které nevytváří mycelium.
- 10 2. Způsob výroby piva, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že hlavní fermentace mladiny probíhá
kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8715 podle nároku 1.

15

Konec dokumentu
