

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2021-601

(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: **30.12.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **21.06.2023**

(Věstník č. 25/2023)

(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 *Diutina rugosa* CCM 9182 a
jeho použití při výrobě nealkoholického piva**

(57) Anotace:
Vynález se týká kmene kvasinek *Diutina rugosa*
CCM 9182 v pivovarském provozu jako
kontaminující kvasinka, který aerobně zpracovává
glukózu, galaktózu, xylózu, manitol, sorbitol,
glycerol a kyselinu mléčnou, nezpracovává maltózu
a vytváří ovoidní až válcovité buňky s rozměry 2 až
3 µm x 4 až 8 µm. Vynález se dále týká výroby
nealkoholického piva, při které hlavní fermentace
mladiny probíhá kmenem kvasinek *Diutina rugosa*
CCM 9182.

Kmen kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 a jeho použití při výrobě nealkoholického pivaOblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182.

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 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 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 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).

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 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 požívají, např. *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. Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., and Hutzler, M. (2016): „Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications“. *J. Inst. Brew.*, 122: 569-587. doi: [10.1002/jib.381](https://doi.org/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 produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed

column bioreactor“, World. J. Microbiol. Biotechnol., 17: 767-771). Kromě toho je známé použití kmene *Williopsis saturnus* (synonymum pro *Cyberlindnera suaveolens*) při výrobě piva se sníženým obsahem alkoholu (viz např. studie Liu, S. Q., & Quek, A. Y. (2016): „Evaluation of Beer Fermentation with a Novel Yeast *Williopsis Saturnus* “. Food technology and biotechnology, 54(4), 403-412). Takto vyrobená piva mohou chutnat po mladíně, bývají sladší a ovocnější než piva alkoholická vyrobená tradičním způsobem nebo zbavená alkoholu fyzikálními metodami.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182, který se izoloval z pivovarského prostředí jako kontaminující kvasinka. Pro další použití se připravil selekcí a opakovaným přeočkováváním na sladinovém 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 *Diutina rugosa* CCM 9182 se poté provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladinový agar.

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

Kvasinky kmene *Diutina rugosa* CCM 9182 vytvářejí ovoidní až válcovité buňky s rozměry 2 až 3 µm x 4 až 8 µm. Množí se multilaterálním pučením, mohou produkovat pseudohyfy (pseudomycelium).

Vzhled a konzistence kolonií – krémově zbarvené, vypouklé. Charakter nárůstu v kapalném médiu – v kapalinách tvoří mázdru. Kmen neroste při teplotách pod 15 °C a při teplotě nad 30 °C.

Kmen *Diutina rugosa* CCM 9182 využívá aerobně glukózu, galaktózu, xylózu, manitol, sorbitol, glycerol a kyselinu mléčnou. Nevyužívá maltózu.

Kmen kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 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 senzoričky 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 *Diutina rugosa* CCM 9182 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 199 a v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) v Brně pod číslem CCM 9182.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 pro laboratorní kvasné zkoušky

Při přípravě kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu nealkoholického piva, se použila čistá kultura tohoto kmene, která se

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

5 Kultura kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 se zaočkovala na šikmý sladivý 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 \pm 1 °C, poté se vytvořený kvasničný sediment převedl do 1000 ml 10% mladiny, kde 3 dny probíhala kultivace při teplotě 12 \pm 1 °C.

15 Tímto způsobem připravený kmen kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 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.

20 **Příklad 2: Příprava nealkoholického piva v laboratorních podmínkách s použitím kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182**

Do mladiny (3 litry) s původním extraktem přibližně 6 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 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 $8 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 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.	0,06
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	5,92
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	9,5

35 Jak je zřejmé, kmen *Diutina rugosa* CCM 9182 produkuje ve srovnání s běžným pivovarskými kvasnicemi jen nízké koncentrace alkoholu.

40 Dále se také provedlo sensorické hodnocení takto připraveného nealkoholického piva degustační komisí. Toto pivo nevykazovalo žádné sensorické závady. Celkový subjektivní dojem byl vyhodnocen jako velmi dobrý. Pivo se od dostupných nealkoholických piv liší tóny cherry ve vůni i chuti.

Příklad 3: Příprava nealkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182

45 Do mladiny s původním extraktem přibližně 8,5 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 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 $7 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ po dobu 5 dní.

50 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.

Tabulka 2. Základní chemický rozbor

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Extrakt skutečný	% hmotn.	8,19
Alkohol	% obj.	0,11
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	8,54
Prokvašení skutečné	%	4,25
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	10,1

- 5 Dále se také provedlo senzoričné hodnocení takto připraveného nealkoholického piva degustační komisí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Dominující chuť byla vyhodnocena jako karamelová a sladinová; pivo mělo dále velmi slabou kvasničnou a esterovou. Nealkoholické pivo vyrobené s použitím kmene *Diutina rugosa* CCM 9182 bylo vyhodnoceno jako odlišné od dostupných nealkoholických piv – lehce karamelové, s tóny cherry.

10

Tabulka 3. Senzorické hodnocení

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

* nezaznamenáno

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen kvasinek *Diutina rugosa* uložený u České sbírky mikroorganismů pod číslem CCM 9182 izolovaný v pivovarském provozu jako kontaminující kvasinka, který aerobně zpracovává glukózu, galaktózu, xylózu, manitol, sorbitol, glycerol a kyselinu mléčnou, nezpracovává maltózu a vytváří ovoidní až válcovité buňky s rozměry 2 až 3 μm x 4 až 8 μm.
2. Způsob výroby nealkoholického piva, **vyznačující se tím**, že hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Diutina rugosa* CCM 9182 podle nároku 1.