

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

310 440

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12C 11/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2023-509
(22) Přihlášeno: 21.12.2023
(40) Zveřejněno: 18.06.2025
(Věstník č. 25/2025)
(47) Uděleno: 07.05.2025
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 18.06.2025
(Věstník č. 25/2025)

(56) Relevantní dokumenty:
STEWART, Graham G. *Saccharomyces* species in the production of beer. *Beverages*, 2016, Vol. 2, No. 34, p. 1-18, ISSN 2306-5710.
CZ 307575 B6; CZ 307574 B6; CZ 307085 B6; CZ 307083 B6.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, Nové Město, CZ
I. Zichovecká s.r.o., Zichovec, CZ

(72) Původce:
Ing. Barbora Pudivitrová, Praha 10, Vršovice, CZ
Ing. Petra Kubizniaková, Praha 9, Horní Počernice, CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, Mikovice, CZ
Ing. Katarína Majtán, Gbely, SK
Ing. Ondřej Husák, RNDr., Zichovec, CZ
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov, Dolní Předměstí, CZ

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

(54) Název vynálezu:
**Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*
RIBM W159 a jeho použití při výrobě
svrchně kvašeného piva**

(57) Anotace:
Řešení se týká kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159, CCM 9391, izolovaného z rybníčné vody v ovocném sadu v Ústeckém kraji, který aerobně i anaerobně zpracovává glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, maltózu a melibiózu, aerobně navíc trehalózu a vytváří okrouhlé buňky s průměrem 3 až 4,5 µm.
Řešení se dále týká výroby svrchně kvašeného piva, při které hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159, CCM 9391.

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 a jeho použití při výrobě svrchně kvašeného piva

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159.

Vynález se dále týká také použití tohoto kmene kvasinek při výrobě svrchně kvašeného 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
 20 „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
 25 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.
 30 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).

35

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159, který se
 40 izoloval z rybníční vody v ovocném sadu v Ústeckém kraji. Pro další použití se připravil selekcí a
 opakovaným přeočkováváním na sladínovém agaru. 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
 45 misku s agarem a rozočkovala se tzv. křížovým roztěrem, při kterém se ředí koncentrace
 kvasinek na agaru. Tento postup se opakovat do doby, než kultura kvasinek narostla do podoby
 viditelně oddělených kolonií. Následná izolace kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM
 W159 se poté provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladínový
 agar.

50 Takto izolovaný kmen se následně charakterizoval biochemickými testy.

Kvasinky kmene *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 vytvářejí okrouhlé buňky s průměrem 3
 až 4,5 µm, nevytváří mycelium ani pseudomycelium.

Vzhled a konzistence kolonií – matné, krémově zbarvené, vypouklé. Charakter nárůstu v kapalném médiu – v kapalinách tvoří sediment, mázdra se nikdy nevytváří. Kmen roste při teplotách od 15 do 37 °C.

- 5 Kmen *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 využívá aerobně (oxiduje) i anaerobně (fermentuje) glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, maltózu a melibiózu. Aerobně využívá také trehalózu.

- 10 Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 má ve srovnání se stávajícími pivovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* některé výhodné vlastnosti pro využití při přípravě svrchně kvašeného piva. Zejména jde o produkci těchto senzorických atributů: převažující aroma a chuť po hřebíčku, mírné aroma a chuť po banánu, vanilce, broskvi, tropickém ovoci a rumu.

- 15 Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 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 W159 a v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) v Brně pod číslem CCM 9391.

20

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 pro laboratorní kvasné zkoušky

25

Při přípravě kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu svrchně kvašeného piva, se použila čistá kultura tohoto kmene, která se získala izolací z rybníčné vody v ovocném sadu (viz výše), a která se až do doby přípravy uchovávala v chladničce při teplotě 2 ± 1 °C.

30

- Kultura kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 se zaočkovala na šikmý sladinový agar ve zkumavkách uzavřených vatovou zátkou. Z vytvořeného kvasničního 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
35 sedlina 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 sedlina 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.

40

Tímto způsobem připravený kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 se může přímo použít pro laboratorní kvasné zkoušky nebo pro výrobu svrchně kvašeného piva. V případě potřeby se předtím ještě promyje vodou (opakovanou sedimentací a promýváním), čímž se z něj odstraní kultivační médium.

45

Příklad 2: Příprava svrchně kvašeného piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159

- 50 Do mladiny (4 litry) s původním extraktem přibližně 11 % se přidal kvasničný zákvas *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 připravený postupem popsáním v příkladu 1. Zákvasná dávka činila přibližně 15×10^7 buněk/ml mladiny. Následná fermentace probíhala ve vysterilované plastové nádobě při teplotě 20 °C ± 1 °C po dobu 4 dní. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

55

Tabulka 1. Základní chemický rozbor po hlavním kvašení

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Extrakt zdánlivý	% hmotn.	3,03
Alkohol	% obj.	3,9
Prokvašení zdánlivé	%	70,91
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	17,2

- 5 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 změnilo prokvašení, extrakt, obsah alkoholu a hořkost a senzoricky aktivní látky. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Chemický rozbor po dokvašení

Měřený parametr	jednotka	hodnota
extrakt zdánlivý	% hmotn.	2,93
extrakt skutečný	% hmotn.	4,48
alkohol (% hmotn.)	% hmotn.	3,32
alkohol (% obj.)	% obj.	4,25
extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	10,96
prokvašení zdánlivé	%	73,3
prokvašení skutečné	%	59,1
hořkost (izosloučeniny)	JH	20
pH	-	4,64
diacetyl	mg/l	0,113
pentadion	mg/l	0,01
acetaldehyd HSP	mg/l	2,9
ethyl-formiát	mg/l	<0,01
ethyl-acetát (octan ethylnatý)	mg/l	9,2
propylacetat	mg/l	<0,01
2-methylpropyl-acetát	mg/l	0,07
ethyl-butyát	mg/l	0,05
2-methylpropanol (isobutanol)	mg/l	12,9
3-methyl-butyl-acetát (isoamylacetát)	mg/l	0,9
n-propanol	mg/l	36,3
butyl-acetát	mg/l	<0,01
2- a 3-methylbutanol	mg/l	46,6
ethyl-hexanoát	mg/l	0,32
ethyl-2-hydroxy-propanoát (mléčnan ethylnatý)	mg/l	0,77
ethyl-oktanoát	mg/l	0,09
ethylhexanol	mg/l	0,02
ethyl-dekanoát	mg/l	0,35
furfurylalkohol	mg/l	0,01
2-fenyl-ethyl-acetát	mg/l	0,01
ethyl-dodekanoát	mg/l	0,02
2-fenylethanol (GC-FID)	mg/l	22
ethyl-tetradekanoát	mg/l	<0,01

ethyl-hexadekanoát	mg/l	<0,01
alkoholy celkové	mg/l	117,3
estery celkem	mg/l	11,8
poměr alkoholy-estery	-	9,95

- 5 Dále se provedlo senzorické hodnocení takto připraveného svrchně kvašeného piva degustační komisí. Toto pivo nevykazovalo žádné senzorické závady. Podle hodnotitelů vykazovalo pivo slabou až střední plnost, sladké aroma a chuť po hřebíčku, slabou hořkost v kulminaci a v dozívání, velmi slabou až slabou trpkou a kyselou chuť, velmi slabý říz, stopy hořkosti po polknutí. Kromě toho ještě hodnotitelé zmiňovali aroma a chuť po banánu, jablku, mladině, obilí, vanilce, víně, broskvi, tropickém ovoci a rumu. Celkový subjektivní dojem byl vyhodnocen jako velmi dobrý – viz tabulka 3.

- 10 Tabulka 3. Senzorické hodnocení

Sledovaný parametr	hodnocení
říz	0,9
plnost	2,3
hořkost po polknutí	0,8
hořkost v kulminaci	1,9
hořkost v dozívání	1,8
charakter hořkosti	2,2
trpkost	1,6
sladká chuť	2,2
kyselá chuť	1,7
oblíba	3,4
chuť po hřebíčku	2,3

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159 uložený u České sbírky mikroorganismů pod číslem CCM 9391 izolovaný z rybníčné vody v ovocném sadu v Ústeckém kraji, který aerobně i anaerobně zpracovává glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, maltózu a melibiózu, aerobně navíc trehalózu, a vytváří okrouhlé buňky s průměrem 3 až 4,5 μm .
2. Způsob výroby svrchně kvašeného piva, **vyznačující se tím**, že hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* RIBM W159, CCM 9391, podle nároku 1.