

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 927

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-274**
(22) Přihlášeno: **22.04.2014**
(40) Zveřejněno: **29.10.2015**
(**Věstník č. 43/2015**)
(47) Uděleno: **09.08.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **20.09.2017**
(**Věstník č. 38/2017**)

(56) Relevantní dokumenty:
Miguel M et al. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(1), 113-8.; Simova E et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 28, 1-6.; Diosma G et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1), 43-53..

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, CZ

(72) Původce:
Ing. Alexandr Mikyška, Praha 3 - Vinohrady, CZ
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov 1, CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, CZ
Ing. Petra Kubizniaková, Praha 9 - Horní Počernice,
CZ

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

(54) Název vynálezu:
**Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*
CCM 8503**

(57) Anotace:
Řešení se týká kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503, který fermentuje glukózu, sacharózu, maltózu, rafinózu, ale nefermentuje galaktózu, laktózu, trehalózu a melibiózu, vytváří elipsoidní a kulovité buňky s rozměry 6 až 10 µm x 5 až 8 µm, které nevytváří mycelium a jen vzácně vytváří pseudomycelium, a který během zkvašování sladlin připravených z různých obilných substrátů vytváří senzoryicky aktivní látky, které udělují hotovému nápoji ovocnou a svěží chuť.

CZ 306927 B6

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503Oblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503.

Dosavadní stav techniky

10

Známé nízkoalkoholické nápoje, jako je např. pivo, apod. se běžně získávají kvašením obilných substrátů, obvykle na bázi ječmene anebo kombinace ječmene a pšenice, prostřednictvím kvasinek druhů *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pastorianus*. Tyto nápoje se mohou dále upravovat syčením oxidem uhličitým, pasterací, přidavkem cukrů a různých přísad (např. kyseliny citrónové, karamelu, přírodních aromat, výluhů bylin, vitamínů, minerálních látek, atd.).

15

Podstata vynálezu

20

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503, který fermentuje glukózu, sacharózu, maltózu, rafinózu, ale nefermentuje galaktózu, laktózu, trehalózu a melibiózu, a který během zkvašování sladlin připravených z různých substrátů vytváří senzory aktivní látky, které udělují hotovému nápoji ovocnou a svěží chuť a to překvapivě i v případě použití netradičních obilovin, jako je např. oves, pohanka nebo pšenice. Tyto jeho vlastnosti byly prakticky ověřeny s využitím laboratorních kvasných testů dle CZ patentu 303042 (viz příklad 2 níže), jejichž podstatou je zakvašení mladiny daným kmenem kvasinek a následné kvašení mladiny o objemu do 5 litrů v otevřeném kónickém válci v prostředí s řízenou teplotou, přičemž se alespoň jednou sledují požadované parametry kvasící mladiny, jako např. zdánlivý obsah extraktu, stupeň zdánlivého prokvašení, obsah alkoholu, růstová křivka kvasinek, sedimentace kvasinek, a/nebo mladého piva ze skupiny obsah extraktu, rychlost zkvašování extraktu, stupeň zdánlivého prokvašení, obsah alkoholu, obsah vicinálních diketonů, obsah SO₂, obsah těkavých látek, obsah dusíku, obsah hořkých látek, obsah redukujících cukrů, přítomnost vitamínů skupiny B. Kromě toho byly tyto vlastnosti dále ověřeny také čtvrtprovozními pokusnými várkami (viz příklad 3 níže).

35

Další výhodou tohoto kmene kvasinek je, že dobře sedimentuje a usnadňuje tak odstranění buněk z fermentačního média a tedy i tzv. downstream procesy při zisku finálního produktu.

40

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 se izoloval z keřirových zrn, což jsou, jak je popsáno např. v práci Withuhn a kol.: "Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation", Int. Dairy J. 15: 383–389, 2005, symbiotické kultury bakterií mléčného kvašení, octových bakterií, kvasinek a vláknitých hub v bílkovinách, tucích a cukrech. Při izolaci kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 se naočkovalo 0,1 ml homogenátu keřirového zrna ve sterilní destilované vodě na Petriho misku obsahující sladlinový agar. Pro inhibici růstu konkurenčních bakterií přítomných v keřirovém zrně se do tohoto substrátu přidalo antibiotikum tetracyklin v koncentraci 50 mg/l. Kultivace následně probíhala aerobně v mikrobiologickém inkubátoru při teplotě 26 °C (nejvhodnější teplota je cca 25 až 30 °C) po dobu 3 až 5 dnů. Po nárůstu kultury kvasinek na povrchu agaru se tato kultura přenesla sterilizovanou očkovací kličkou na novou Petriho misku se sladlinovým 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 *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 se pak provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladlinový agar.

45

Izolovaný kmen byl poté charakterizován biochemickými testy a druhově-specifickou PCR.

55

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 vytváří elipsoidní a kulovité buňky s rozměry 6 až 10 µm x 5 až 8 µm, které nevytváří mycelium a jen vzácně vytváří pseudomycelium. Vzhled a konzistence kolonií – nátěr je těstovitý, krémový, světle hnědý, hladký, lesklý, nikdy není drsný ani kučeravý. Charakter nárůstu v kapalném médiu – v kapalinách tvoří sediment, mázdra se nikdy nevytváří. Tento kmen dobře přežívá v běžných tekutých substrátech (např. sladině, YPD, apod.), a na pevné ztužené půdě (např. sladinovém agaru), takže je vhodný pro krátkodobé i dlouhodobé skladování.

Kmen je uložen ve Sbírce mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. – RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) pod číslem RIBM 164 a v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 8503.

Pro výrobu nápojů se pak tento kmen kvasinek použije s výhodou zejména ve formě koncentráту.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 pro praktické použití

Při přípravě kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu alkoholických a nízkoalkoholických nápojů, např. piva, se vycházelo z čisté kultury tohoto kmene získané izolací z keřirového zrna, která se až do doby přípravy uchovávala na sladinovém agaru v chladničce při teplotě 2 až 4 °C.

Kultura kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 se zaočkovala na šikmý sladinový agar ve zkumavkách uzavřených vatovou zátkou. Z vytvořeného kvasničného nárůstu se potom sterilně převedla očkovací kličkou 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 3 až 4 dny probíhala kultivace při teplotě 20 °C. Následně se tento kmen pomnožil převáděním do vždy většího objemu v poměru 1:4 za současného snižování teploty. Kvasničná sediment se tak nejprve převedla do 250 ml 10% sterilní mladiny, kde 5 dní probíhalo kvašení při teplotě 15 °C, poté se vytvořený kvasničný sediment převedl do 1000 ml 10% mladiny, kde 7 dní probíhala kultivace při teplotě 8 °C, načež se dále převedl do 4000 ml stejné mladiny, kde probíhala další kultivace za stejných podmínek.

Tímto způsobem izolovaný kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 je připraven přímo pro laboratorní kvasné zkoušky nebo pro výrobu požadovaného alkoholického nebo nízkoalkoholického nápoje. V případě potřeby se předtím ještě promyje vodou (opakovanou sedimentací a promýváním), aby došlo k odstranění kultivačního média.

Příklad 2: Laboratorní kvasné zkoušky kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503

Technologické vlastnosti kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 byly ověřeny laboratorními kvasnými testy dle CZ patentu 303042, jejichž podstatou je zakvašení mladiny daným kmenem kvasinek a následné kvašení mladiny o objemu do 5 litrů v otevřeném kónickém válci v prostředí s řízenou teplotou, přičemž se alespoň jednou sledují požadované parametry kvasící mladiny, jako např. zdánlivý obsah extraktu, stupeň zdánlivého prokvašení, obsah alkoholu, růstová křivka kvasinek, sedimentace kvasinek, a/nebo mladého piva ze skupiny obsah extraktu, rychlost zkvašování extraktu, stupeň zdánlivého prokvašení, obsah alkoholu, obsah vicinálních diketonů, obsah SO₂, obsah těkavých látek, obsah dusíku, obsah hořkých látek, obsah redukujících cukrů, přítomnost vitamínů skupiny B. V daném případě probíhaly tyto laboratorní kvasné zkoušky v otevřených skleněných kónických kvasných válcích o objemu 1 l, přičemž jako

substrát nesloužila mladina, ale tři varianty sladiny připravené z pohanky, ovesa a pšenice Citrus. Základní charakteristiky těchto sladin jsou uvedeny v Tabulce 1.

5 Tabulka 1

Měřený parametr	Jedn.	Pohanka	Oves	Pšenice Citrus
Extrakt	% hm.	10,5	8,08	10,8
Barva	j.EBC	12,38	7,12	4,91
pH		6,09	5,98	6,19

10 Laboratorní kvasné zkoušky kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 probíhaly při teplotě 12 °C, po dobu 4 dnů přičemž zákvasná dávka byla 15 milionů buněk/ml. Základní parametry prokvašených sladin po provedení laboratorních testů jsou uvedeny v Tabulce 2.

15 Tabulka 2

Specifikace	Extrakt (%)	Prokvašení zdánlivé (% rel.)	Prokvašení skutečné (% rel.)
Pohanka	8,6	20,5	16,4
Oves	6	27,6	22,2
Pšenice Citrus	9,5	14,7	11,8

Výsledky senzorického posouzení těchto prokvašených sladin jsou pak uvedeny v Tabulce 3.

20

Tabulka 3

Specifikace	Sladkost	Kyselost	Plnost	Vůně/chuť	Celkový dojem
Pohanka	1	2	2	svěží	2
Oves	2	1	2	sladká, ovocná	1
Pšenice Citrus	1	1	3	mdlá, uzená	3

deskriptory – 0 až 5, celkový dojem 1 (nejlepší) až 9

25

Příklad 3: Pokusné várky alkoholických nápojů z netradičních obilovin s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503

5 V mikroskladovně byly připraveny slady z vybraných netradičních obilovin – pohanky (vysoký obsah polyfenolů – rutinu), ovsa, a pšenice odrůdy Citrus (obsahuje v porovnání s jinými odrůdami několikanásobně vyšší množství karotenoidů). V pilotní varně s objemem várky 2 hl byly šetrným infuzním postupem mutování připraveny sladiny ze 100% sladů pšenice Citrus, ovsa
10 a směsi pohankového sladu s ječným sladem v poměru 1:1. Sladiny byly povařeny bez chmele pro vyloučení zákalotvorných látek. Základní charakteristiky takto připravených sladin jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4

Měřený parametr	Jedn.	Pšenice Citrus	Oves	Pohanka + ječmen
Extrakt	% hm.	10,36	10,15	10,37
Extrakt dosažitelný	% hm.	2,67	2,4	3,75
Prokvašení dosažitelné	% hm.	74,2	74,2	63,8
Celkové polyfenoly	mg/l	38	58	255
Flavanoidy	mg/l	6,03	5,70	57,62
pH		6,13	5,86	5,99
Barva	j.EBC	8,04	-	11,85
Aminodusík	mg/l	145	171	193
Celkový dusík	mg/l	976	881	1007

15 Hlavní kvašení kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 probíhalo při teplotě 15 °C po dobu 12 dnů ve sladině vyrobené z pšenice Citrus, po dobu 13 dnů v ovesné sladině a 14 dnů ve sladině vyrobené ze směsi pohankového a ječného sladu. Poté ve všech sladinách
20 proběhlo dokvašování po dobu 4 týdnů při teplotě 2 °C.

Příprava kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 přitom probíhala dle způsobu popsaného v Příkladu 1. Zákvasná dávka byla 15 milionů buněk/ml.

25 Výsledky rozboru hotového nápoje jsou pak uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5

Měřený parametr	Jedn.	Pšenice Citrus	Oves	Pohanka + ječmen
Zdánlivý extrakt	%	4,01	4,34	6,16
Skutečný extrakt	%	5,21	5,43	6,95
Alkohol	% hm.	2,54	2,3	1,64
Extrakt původní mladiny	%	10,18	9,94	10,17
Prokvašení zdánlivé	%	60,6	56,4	39,4
Prokvašení skutečné	%	48,8	45,4	31,7
pH		3,32	3,43	3,52
Barva	j.EBC	7,8	25,9	15,2
Celkové polyfenoly	mg/l	43	49	237
Flavanoidy	mg/l	3,3	8,4	37,2
DPPH-ARP	%	27	26	53

5

Výsledky rozboru hotového nápoje z hlediska obsahu vybraných sensoricky významných těkavých látek jsou dále uvedeny v Tabulce 6.

10 Tabulka 6

Měřený parametr	Pšenice Citrus	Oves	Pohanka + ječmen
acetaldehyd (mg/l)	12,44	1,36	6,48
DMS (µg/l)	114	462	41
mravenčan ethylnatý (mg/l)	0,00	0,01	0,00
octan ethylnatý (mg/l)	32,66	7,16	7,63
octan propylnatý (mg/l)	0,12	0,00	0,00
octan isobutylnatý (mg/l)	0,20	0,03	0,06

máseľnan ethylnatý (mg/l)	0,09	0,02	0,05
propanol (mg/l)	48,0	16,8	10,0
octan butylnatý (mg/l)	0,02	0,00	0,00
isobutanol (mg/l)	21,8	10,9	7,3
octan isoamylnatý (mg/l)	3,20	0,21	1,10
2a3-methyl-butanol (mg/l)	79,6	35,5	30,3
kapronan ethylnatý (mg/l)	0,32	0,05	0,22
mléčnan ethylnatý (mg/l)	2,23	2,44	1,06
kaprylan ethylnatý (mg/l)	0,20	0,06	0,08
ethyl-hexanol (mg/l)	0,51	0,48	0,26
octan fenyl-ethylnatý (mg/l)	1,54	0,16	0,27
β-fenyl-alkohol (mg/l)	25,5	17,0	8,7
suma alkoholů (mg/l)	175,4	80,6	56,6
suma esterů (mg/l)	40,6	10,3	10,6
poměr A/E	4,32	7,85	5,34

Po ukončení fermentace byly jednotlivé pokusné varianty rozděleny na dva podíly, přičemž jeden z nich byl dále hořčen preparátem iso-alfa kyselin na 15 EBU.

5

Všechny nápoje připravené s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503 byly dobře přirozeně karbonizovány, říz byl ve všech případech střední (bodová hodnota 3 ze škály 0 až 5). Plnost chuti byla u nápoje z ovesného sladu oproti nápojům z pšeničného sladu a směsi pohankového a ječného sladu vyšší. Hořkost dohořčených variant byla hodnocena jako slabá, v případě směsi pohankového a ječného sladu jako střední. Senzorická hořkost nechmele-
ných variant byla hodnocena jako velmi slabá s výjimkou směsi pohankového a ječného sladu, kde byla hořkost hodnocena jako výraznější (2 – slabá). U nápoje z ovesného sladu byla v porov-
nání s ostatními nápoji zaznamenána mírně nižší sladkost a vyšší kyselost. Intenzita ovocné/este-
rové vůně byla u všech nápojů srovnatelná. U nápojů z ovesného sladu a ze směsi pohankového
a ječného sladu byla zaznamenána slabá obilná vůně/chuť. U nápoje ze směsi pohankového
a ječného sladu byla navíc zaznamenána velmi slabá až slabá kovová chuť, která pravděpodobně
souvisí s polyfenolovými látkami obsaženými v pohance. Ani u jednoho z nápojů nebyla zjištěna
vůně/chuť po DMS (po vaření zelenině). Je s podivem, že u nápoje z ovesného sladu s obsahem
DMS vysoko nad sensorickým prahem se vliv této látky sensoricky neprojevil. Možným vy-
světlením je maskování jinými látkami.

20

Výsledky sensorického hodnocení jsou dále uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7

Sledovaný parametr	Pšenice Citrus		Oves		Pohanka + ječmen	
	nehořčen o	hořčeno	nehořčen o	hořčeno	nehořčen o	hořčeno
říz	3	3	3	3	3	3
plnost	2,5	2,5	3	3	2,5	2,5
hořkost	1	3	1	2	2	3
doznívání po 20s	1	2	1	2	1	1
trpkost	1	1	1,5	2	2,5	3
sladkost	1	2	0,5	0,5	2	2
kyselost	2	2	2,5	2,5	2	2
ovocná/ester ová	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
kvasničná	2	2	2	1,5	1	1
obilná			2	2	2	2
kovová					1	1
celkový dojem	3,4	3,9	6,4	5,9	5	5,5

deskriptory – 0 až 5, celkový dojem 1 (nejlepší) až 9

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8503, který fermentuje glukózu, sacharózu, maltózu, rafinózu, ale nefermentuje galaktózu, laktózu, trehalózu a melibiózu, vytváří elipsoidní a kulovité buňky s rozměry 6 až 10 μm x 5 až 8 μm , které nevytváří mycelium a jen vzácně vytváří pseudomycelium, a který během zkvašování sladin připravených z různých obilných substrátů vytváří senzoricky aktivní látky, které udělují hotovému nápoji ovocnou a svěží chuť.

Konec dokumentu