

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2021-419

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12C 11/02 (2006.01)
C12H 3/00 (2019.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.09.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **22.03.2023**
(Věstník č. 12/2023)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, Nové Město, CZ
Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ

(72) Původce:
prof. Ing. Tomáš Brányik, Ph.D., Praha 6, Liboc,
CZ
Ing. Petra Kubizniaková, Praha 9, Horní Počernice,
CZ
Ing. Martin Slabý, Kralupy nad Vltavou, Mikovice,
CZ
Ing. Katarína Hanzalíková, Gbely, SK
Ing. Emre Ilpars, Yenimahalle, Ankara, TR
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov, Dolní
Předměstí, CZ
doc. RNDr. Martin Vlach, Ph.D., Praha 10,
Uhřetěves, CZ
Mgr. Luboš Veverka, Kladno, Kročehlavy, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, patentový zástupce, Zábřdovická
801/11, 615 00 Brno, Zábřdovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*
CCM 9181 a jeho použití při výrobě
nízkoalkoholického a nealkoholického piva**

(57) Anotace:
Vynález se týká kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 izolovaného na konci spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně zpracovává glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, a aerobně zpracovává sorbózu a glycerol. Nezpracovává maltózu. Vytváří elipsoidní buňky s rozměry 3 µm x 4 až 6 µm, které nevytváří mycelium. Vynález se dále týká výroby nízkoalkoholického a nealkoholického piva, při které hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181.

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 a jeho použití při výrobě nízkoalkoholického a nealkoholického piva

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181.

10 Vynález se dále týká také použití tohoto kmene kvasinek při výrobě nízkoalkoholického a nealkoholického piva.

Dosavadní stav techniky

15 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 až 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 až 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 až 729, November 2011).

Nízkoalkoholické pivo je definováno jako kvašený nápoj z obilného sladu s obsahem alkoholu od 0,5 do 1,2 % obj. V současné době se vyrábí několika způsoby: 1) předčasně ukončenou fermentací, 2) použitím speciálního kmene kvasinek, 3) změnou podmínek rmutování (tj. úpravou spektra zkvasitelných cukrů v mladině), 4) 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 až 506, 2012.

Nealkoholické pivo je pak 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 až 506, 2012.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181, který se izoloval na konci spontánního kvašení hroznového moštu. Pro další použití se připravil selekcí a opakovaným přeočkováváním na sladinném 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 *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 se poté provedla naočkováním vybrané kolonie na Petriho misku obsahující sladinný agar.

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

Kvasinky kmene *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 vytvářejí elipsoidní buňky s rozměry 3 µm x 4 až 6 µm, které nevytváří mycelium a jen vzácně vytváří 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 pod 15 °C a při teplotě 37 °C.

Kmen *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 využívá aerobně (oxiduje) i anaerobně (fermentuje) glukózu, galaktózu, sacharózu a rafinózu. Aerobně využívá sorbózu a glycerol. Nevyužívá maltózu.

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 má ve srovnání se stávajícími pivovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pastorianus* některé výhodné vlastnosti pro využití při přípravě nízkoalkoholického a 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 nízkoalkoholického a nealkoholického piva s použitím tohoto kmene je v rozmezí 7 až 9 °C, kdy kvasinky produkují optimální množství senzoryicky aktivních látek. Optimální stupňovitost mladiny pro výrobu nízkoalkoholického a nealkoholického piva je pak v rozmezí 5 až 9 % hmotn., kdy kvasinky produkují optimální množství alkoholu (do 1,2 % obj., což je horní hranice nízkoalkoholického piva).

Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 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 198 a v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) v Brně pod číslem CCM 9181.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 pro laboratorní kvasné zkoušky

Při přípravě kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 pro praktické použití – např. pro jeho další testování nebo pro výrobu nízkoalkoholického a nealkoholického piva, se použila čistá kultura tohoto kmene, která se získala izolací ze spontánního kvašení hroznového moštu (viz výše), a která se až do doby přípravy uchovávala v chladničce při teplotě 2 ± 1 °C.

Kultura kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 se zaočkovala na šikmý sladinný 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.

- 5 Kvasničná sediment 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.

- 10 Tímto způsobem připravený kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 se může přímo použít pro laboratorní kvasné zkoušky nebo pro výrobu nízkoalkoholického a nealkoholického piva. V případě potřeby se předtím ještě promyje vodou (opakovanou sedimentací a promýváním), čímž se z něj odstraní kultivační médium.

- 15 **Příklad 2: Příprava nízkoalkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181**

- 20 Do mladiny s původním extraktem přibližně 7 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 připravený postupem popsáním v příkladu 1. Zákvasná dávka činila přibližně 7×10^7 buněk/ml mladiny. Následná fermentace probíhala ve vysterilované plastové nádobě při teplotě 7 ± 1 °C po dobu 5 dní.

- 25 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, extrakt, obsah alkoholu a hořkost. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Základní chemický rozbor

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Extrakt zdánlivý	% hmotn.	7,10
Extrakt skutečný	% hmotn.	7,37
Alkohol	% obj.	0,73
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	8,48
Prokvašení zdánlivé	%	16,36
Prokvašení skutečné	%	13,14
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	9,2

- 30 Jak je zřejmé, kmen *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 produkuje ve srovnání s běžným pivovarskými kvasnicemi jen nízké koncentrace alkoholu.

- 35 Dále se také provedlo senzorické hodnocení takto připraveného nízkoalkoholického piva degustační komisí. Toto pivo nevykazovalo žádné senzorické závady. Celkový subjektivní dojem byl vyhodnocen jako velmi dobrý – viz tabulka 2.

Tabulka 2. Senzorické hodnocení

Sledovaný parametr	Hodnocení
říz	2,1
plnost	1,6
hořkost	0,6
hořkost - kulminace	1,2
hořkost - doznívání	0,6
hořkost - charakter	1,3
trpkost	0,5
sladká chuť	2,3
kyselá chuť	1,2
chmelová chuť	0,6
ovocná/esterová chuť	1,9
sladová chuť	1,2
kvasničná chuť	0,8
mladinová chuť	1,8
sladinová chuť	1,8
parfémová chuť	*
diacetylová chuť	*
karamelová chuť	0,8
připálená chuť	*
vyhovuje stylu	1,4
vyváženost	2,2
oblíba	4,6
celkový dojem	3,4

* nezaznamenáno

5

Příklad 3: Příprava nealkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181

10 Pro splnění parametrů nealkoholického piva se nízkoalkoholické pivo připravené postupem popsaným v příkladu 2 naředí vodou na koncentraci alkoholu 0,5 % obj., případně nižší.

Příklad 4: Příprava nízkoalkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 se studeným chmelením chmelovými odrůdami Mosaic a Kazbek

15 Do mladiny s původním extraktem přibližně 7 % se přidal zcentrifugovaný kvasničný koncentrát kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 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 $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5 dní.

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 3 týdny, přičemž se během posledních 7 dní ležení studeně chmelilo kombinací chmelových odrůd Mosaic a Kazbek (poměr hmotnosti chmelů 20:1) v celkové dávce 10,6 g/l. Poté se u něho změřilo prokvašení, extrakt, obsah alkoholu a hořkost. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Základní chemický rozbor

Měřený parametr	jednotka	hodnota
Extrakt zdánlivý	% hmotn.	5,43
Extrakt skutečný	% hmotn.	5,73
Alkohol	% obj.	0,8
Extrakt původní mladiny (Plato)	% hmotn.	6,96
Prokvašení zdánlivé	%	18,83
Prokvašení skutečné	%	14,35
Hořkost (izosloučeniny)	jednotky hořkosti	44,06

Dále se také provedlo senzorické hodnocení takto připraveného nízkoalkoholického piva degustační komisí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Dominující chuť byla vyhodnocena jako slabá esterová a mladinová; pivo mělo dále velmi slabou sladovou, kvasničnou, sladinovou, parfémovou, karamelovou a připálenou chuť.

Tabulka 4. Senzorické hodnocení

Sledovaný parametr	Hodnocení
říz	1,9
plnost	1,7
hořkost	1,6
hořkost - kulminace	2,9
hořkost - dozívání	1,9
hořkost - charakter	2,3
trpkost	1,1
sladká chuť	1,9
kyselá chuť	0,9
chmelová chuť	1,6
ovocná/esterová chuť	1,5
sladová chuť	1,5
kvasničná chuť	0,8
mladinová chuť	1,6
sladinová chuť	1,3
parfémová chuť	0,9
diacetylová chuť	0,9
karamelová chuť	*

připálená chuť	0,9
vyhovuje stylu	1,0
vyváženost	1,9
oblíba	4,3
celkový dojem	3,1

* nezaznamenáno

Příklad 5: Příprava nealkoholického piva s použitím kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181

5

Pro splnění parametrů nealkoholického piva se nízkoalkoholické pivo připravené postupem popsaným v příkladu 4 naředí vodou na koncentraci alkoholu 0,5 % obj., případně nižší.

10

Senzorické hodnocení piv připravených za použití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 vypovídá o tom, že tato piva jsou kvalitní, dobře pitelná a naprosto vyhovují stylu nízkoalkoholického a nealkoholického piva. Piva jsou celkově vyvážená, chuťově sladěná, přičemž žádná chuť ani vůně není dominantní.

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* uložený u České sbírky mikroorganismů pod číslem 9181 izolovaný na konci spontánního kvašení hroznového moštu, který aerobně i anaerobně zpracovává glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, aerobně zpracovává sorbózu a glycerol, nezpracovává maltózu a vytváří elipsoidní buňky s rozměry 3 μm x 4 až 6 μm.

2. Způsob výroby nízkoalkoholického a nealkoholického piva, **vyznačující se tím**, že hlavní fermentace mladiny probíhá kmenem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCM 9181 podle nároku 1.

10