

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 304 311

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12N 1/16* (2006.01)  
*C12N 1/18* (2006.01)  
*C12C 11/02* (2006.01)  
*C12C 12/00* (2006.01)  
*C12R 1/85* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-829**  
(22) Přihlášeno: **12.11.2010**  
(30) Právo přednosti:  
**12.11.2010 CZ**  
(40) Zveřejněno: **23.05.2012**  
**(Věstník č. 21/2012)**  
(47) Uděleno: **15.01.2014**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku:  
**26.02.2014**  
**(Věstník č. 9/2014)**

(56) Relevantní dokumenty:

Huuskonen A. et al.: „Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts“, Appl. Environ. Microbiol., 76(5), 1563-1573, Mar 2010; Reilly D.I. et al.: „Characteristics of high cell density fermentations with different lager yeast strains“, J. Am. Soc. Brew. Chem., Vol. 62(1), 23-28, 2004; Pratt P.L. et al.: „The Effects of Osmotic Pressure and Ethanol on Yeast Viability and Morphology“, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 109(3), 218-228, 003, No. 3, 2003; Pátková J. et al.: „Changes in the yeast metabolism at very high-gravity wort fermentation“, Folia Microbiol., Vol. 45(4), 335-338, 2000; Sigler K. et al.: „Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor and haze. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 82, 1027-1035, 2009; Casey G.P. et al.: „High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production“, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 48(3), 639-646, 1984.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha  
2, CZ

(72) Původce:

Kosař Karel, Brno, CZ  
Kubizniaková Petra, Praha 9 - Horní Počernice, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář,  
Dobroslav Musil, Cejl 38, Brno, 60200

(54) Název vynálezu:

**Způsob zjišťování vhodnosti určitého  
kmene nebo směsi kmenů pivovarských  
kvasinek ke zkouškám na použitelnost  
daného kmene nebo směsi kmenů  
pivovarských kvasinek pro technologii HGB**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB. Jeho podstata spočívá v tom, že daný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek se zaočkuje do kultivační pudy tvořené sterilní pивní mladinou s obsahem extraktu alespoň 16 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu, a kultivuje se za teploty 10 až 12 °C, přičemž pokud alespoň po 120 hodinách kultivace vytvoří sediment, je příslušný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek vhodná k testování použitelnosti pro technologii HGB standardním postupem.

CZ 304311 B6

## **Způsob zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB**

5

### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB.

### Dosavadní stav techniky

Podstata technologie HGB (High Gravity Brewing) pro výrobu piva spočívá ve zkvašování vysokokoncentrovaných pivních mladín, tj. mladín s obsahem extraktu 14 a více % hmotnostních vhodnými kmeny pivovarských kvasinek, a následném ředěním vytvořeného piva odplyněnou vodou na skutečně požadovanou koncentraci mladiny – obvykle na 10 nebo 12 % hmotnostních. Použitím této technologie může pivovar bez výrazných finančních či prostorových investic podstatně zvýšit svou výrobní kapacitu. Vysokokoncentrované pivní mladiny však nejsou ideálním prostředím pro kultivaci pivovarských kvasinek, neboť zvýšený obsah cukrů a jiných složek extraktu zvyšuje jejich osmotický tlak, což společně se zvýšeným obsahem alkoholu a CO<sub>2</sub> nepříznivě ovlivňuje vitalitu a aktivitu běžných kmenů pivovarských kvasinek. Některé z nich v důsledku zvýšeného působení těchto stresových faktorů dokonce produkují sekundární metabolity, jako např. vicinální diketony, které negativně ovlivňují senzorický charakter výsledného piva. Z těchto důvodů je možné pro technologii HGB použít jen pečlivě vybrané a otestované kmeny pivovarských kvasinek.

I když bylo na toto téma vydáno množství odborných prací, z nichž například Patricia L. Pratt, James H. Bryce and Graham G. Stewart „The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology“ (J. Inst. Brew. 109 (3), 218–228, 2003) se zabývá vlivem zvýšeného osmotického tlaku a množství ethanolu na životaschopnost pivovarských kvasinek a jejich morfologii, J. Ptáková, D. Šmogrovičová, P. Bafrncová a Z. Domény „Changes in the yeast metabolism at very high–gravity wort fermentation“ (Folia Microbiol. 45 (4), 335–338 (2008) změnami metabolismu pivovarských kvasinek při kvašení vysokokoncentrovaných mladín, K. Sigler, D. Matoulková, M. Dienstbier a P. Gabriel „Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze“ (Appl. Microbiol. Biotechnol (2009)82: 1027–1035) čistým vlivem osmotického tlaku pivní mladiny na průběh fermentace, vitalitu pivovarských kvasinek a aroma a zákal piva, a Gregory P. Casey, Carol A. Magnus and W. M. Ingledew „High–gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production“ (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1984, p. 639–646) vlivem vysokokoncentrovaných mladín na schopnost fermentace, produkci ethanolu a výživu kvasinek, žádná z nich neposkytuje jednoduchý, levný a univerzální způsob pro výběr nových kmenů pivovarských kvasinek vhodných pro technologii HGB a ověření jeho použitelnosti. To se dosud provádí pomocí laboratorních kvasných zkoušek, při kterých jsou sledovány technologické a analytické parametry použití daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek, v kombinaci s následnými čtvrtprovozními zkouškami, při kterých je kromě těchto parametrů dále posuzována i senzorická kvalita vyrobeného piva. Tyto testy jsou však finančně i časově neúměrně náročné, a proto nevhodné pro větší soubory kmenů pivovarských kvasinek, případně testování nových kmenů pivovarských kvasinek, u kterých není použitelnost pro technologii HGB předem jistá. Tyto nevýhody brání testování nových kmenů, případně směsí kmenů pivovarských kvasinek, a jejich potenciálnímu průmyslovému využití, a tím i rozvoji samotné technologie HGB pro výrobu piva.

Cílem vynálezu je odstranit nevýhody stavu techniky a navrhnout levný, jednoduchý a univerzální způsob zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB.

5

#### Podstata vynálezu

Cíle vynálezu je dosaženo způsobem zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB, jehož podstata spočívá v tom, že daný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek se zaočkuje do kultivační půdy tvořené sterilní pivní mladinou s obsahem extraktu alespoň 16 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu, a kultivuje se za teploty 10 až 12 °C, přičemž pokud alespoň po 120 hodinách kultivace vytvoří sediment, je příslušný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek vhodná k testování použitelnosti pro technologii HGB standardním postupem. Díky tomu se k nákladnějšímu testování použitelnosti pro technologii HGB standardními postupy dostanou pouze ty kmeny nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek, které mají pro úspěšné použití v této technologii alespoň základní předpoklady.

20

Při tom je výhodné, pokud je použita kultivační půda tvořená sterilní pivní mladinou s obsahem extraktu 20 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu.

25

Vhodným standardním postupem pro testování použitelnosti daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB je pak laboratorní kvasná zkouška a/nebo testování ve čtvrtprovozu.

#### Příklady provedení vynálezu

30

Způsob zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB (High Gravity Brewing) podle vynálezu umožňuje rychle a levně zjistit, zda je daný kmen, resp. směs kmenů alespoň potenciálně použitelný pro tuto technologii. Tento způsob spočívá v zaočkování testovaného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek do kultivační půdy o specifickém složení, kultivaci za specifických podmínek, a následném posouzení množství sedimentu vytvořeného za určitý předem stanovený časový interval a/nebo rychlosti vytvoření jeho předem stanoveného množství. Podle alespoň jednoho z těchto parametrů, případně jejich kombinace pak lze relativně spolehlivě odhadnout intenzitu kultivace daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek při podmínkách technologie HGB, a dle toho určit zda je tento kmen nebo směs kmenů alespoň potenciálně použitelný, nebo zcela nepoužitelný pro tuto technologii, a na základě toho jej buď doporučit ke zkouškám na použitelnost pro technologii HGB některým ze známých standardních postupů, například pomocí kvasných zkoušek a/nebo testování ve čtvrtprovozu, nebo ho naopak z tohoto ověřování vyřadit. Díky tomu se do fáze složitějších a tedy časově i finančně náročnějších zkoušek dostanou pouze ty kmeny nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek, které mají alespoň základní předpoklady pro úspěšné použití v technologii HGB. Způsob podle vynálezu tak lze použít jak pro rozřídění větších skupin kmenů nebo směsí kmenů pivovarských kvasinek na ty alespoň potenciálně použitelné a zcela nepoužitelné pro technologii HGB, tak i pro orientační ověření použitelnosti konkrétního kmene nebo směsi kmenů pro tuto technologii, a také pro předběžné testování různých složení směsi kmenů pivovarských kvasinek určené pro tuto technologii.

50

K provádění způsobu podle vynálezu se jako kultivační půda používá standardní laboratorně připravená sterilní mladina s obsahem extraktu 16 až 20 % hmotnostních, jejímž základem může být například předpřipravená sušená sterilní mladina podle CZ UV 20497, která dále obsahuje ales-

55

- poň 7 % objemových ethanolu. Její pH se pohybuje v rozmezí 5,5 až 6,0. Do této kultivační půdy se standardním způsobem zaočkuje daný kmen pivovarských kvasinek nebo směs kmenů pivovarských kvasinek, přičemž její kultivace pak probíhá za tmy při teplotě 10 až 12 °C po dobu 72 až 120 hodin. Následně se dle množství vytvořeného sedimentu a/nebo dle rychlosti vytvoření předem stanoveného množství sedimentu stanovuje použitelnost daného kmene pivovarských kvasinek nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB, resp. její vhodnost k dalším zkouškám na použitelnost pro technologii HGB. Kmen, resp. směs kmenů, která za daných podmínek vytvoří po 120 hodinách pouze zanedbatelné množství sedimentu, či dokonce nevytvoří žádný sediment, je přitom pro technologii HGB zcela nepoužitelná a není nutné její použitelnost dále testovat složitějšími postupy. Naproti tomu, kmen nebo směs kmenů, která za tuto, nebo kratší dobu vytvoří dostatečné množství sedimentu je pro technologii HGB alespoň potenciálně použitelná a lze ji doporučit k testování skutečné použitelnosti a/nebo stanovení podmínek její použitelnosti některým z dosud známých standardních postupů.
- I přesto, že výše uvedené podmínky kultivace byly ověřeny řadou experimentů jako nejvhodnější, je možné je v individuálních případech přizpůsobit konkrétním požadavkům a/nebo aktuální situaci. Doba kultivace tak může být například při rychlém vytvoření požadovaného množství sedimentu zkrácena, nebo naopak při vytvoření menšího, či hraničního množství sedimentu prodloužena. Také teplota, za níž kultivace probíhá, může být vhodným způsobem upravena, přičemž je možné ji pro zrychlení kultivace zvýšit nad 12 °C, avšak s nebezpečím, že přitom bude jako vhodný pro další testování vyhodnocen kmen nebo směs kmenů, který je ve skutečnosti pro technologii HGB zcela nepoužitelný a jeho kultivace není za podmínek této technologie dostatečná. Kromě toho může kultivace dále probíhat za přístupu světla, neboť tento faktor nemá na podmínky kultivace a zejména na množství vytvořeného sedimentu a/nebo rychlost jeho vytváření v podstatě žádný vliv.

V následujícím je popsáno několik konkrétních a experimentálně ověřených příkladů použití způsobu podle vynálezu.

- Laboratorně připravená sterilní mladina s obsahem extraktu 12, 16 a 20 % hmotnostních byla standardním způsobem asepticky rozplněna do Freudenreichových baněk. Následně se k ní sterilním způsobem přidal čistý ethanol o výsledné koncentraci 0, 5, 7 a 9 % objemových, čímž bylo připraveno 9 variant kultivační půdy různého složení dle tabulky 1 o objemu každé z nich 10 ml. Do všech těchto variant kultivační půdy byla následně zaočkována pomnožená kultura pivovarských kvasinek testovaného kmene s koncentrací buněk  $5 \times 10^6$  na ml mladiny.

Tabulka 1

Kultivační půda	Obsah extraktu (% hmotnostní)	Obsah etanolu (% objemová)
A	12	0
B1	16	0
B2	16	5
B3	16	7
B4	16	9
C1	20	0
C2	20	5
C3	20	7
C4	20	9

Kultivační půda ve variantě A přitom slouží jako kontrolní vzorek, který simuluje podmínky při výrobě piva běžnou technologií.

- 5 Kultivační půdy ve variantách B1 a C1 slouží jako kontrolní vzorky pro potvrzení nebo vyloučení kultivace daného kmene pivovarských kvasinek v mladině se zvýšeným obsahem extraktu.

#### Příklad 1

10

Do variant kultivační půdy A, B1 až B4 a C1 až C4 podle tabulky 1 byla zaočkována kultura pivovarských kvasinek kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 9 pomnožená předcházející 48 hodinovou kultivací při teplotě 25 °C v mladině s obsahem extraktu 10 % hmotnostních. Kultivace po zaočkování pak probíhala po dobu 120 hodin při teplotě 11 °C, přičemž po uplynutí 72 hodin byl u kultivační půdy ve variantách B1 až B4 a C1 až C4 sledován růst kultury a posuzována tvorba sedimentu ve srovnání s variantou kultivační půdy A. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

15

20

Tabulka 2

Kultivační půda	72 hodin po zaočkování	96 hodin po zaočkování	120 hodin po zaočkování
A	++	++	++
B1	++	++	++
B2	+	+	++
B3	+	+	++
B4	–	–	+
C1	+	++	++
C2	+	+	++
C3	+	+	+
C4	–	–	+

25

Kde + značí vytvoření sedimentu, ++ vytvoření velkého množství sedimentu a – nevytvoření sedimentu.

30

Z množství vytvořeného sedimentu je zřejmé, že kmen pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 9 je schopen intenzivní kultivace za stanovených podmínek ve všech variantách kultivační půdy A, B1 až B4 a C1 až C4, a proto je velmi pravděpodobně použitelný pro technologii HGB. Tento kmen lze tedy doporučit ke zkouškám na použitelnost pro technologii HGB některým ze standardních postupů.

35

Použitelnost kmene pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 9 pro technologii HGB byla následně nezávisle potvrzena kvasnými zkouškami, na základě kterých byl tento kmen doporučen k otestování ve čtvrtprovozu.

## Příklad 2

Do kultivační půdy variant A, B1 až B4 a C1 až C4 byla zaočkována kultura pivovarských kvasinek kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 112 pomnožená stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledky sledování růstu kultury a posuzování tvorby sedimentu jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Kultivační půda	72 hodin po zaočkování	96 hodin po zaočkování	120 hodin po zaočkování
A	++	++	++
B1	++	++	++
B2	++	++	++
B3	++	++	++
B4	+	++	++
C1	++	++	++
C2	+	++	++
C3	+	+	++
C4	–	–	–

Kde + značí vytvoření sedimentu, ++ vytvoření velkého množství sedimentu a – nevytvoření sedimentu.

Z množství vytvořeného sedimentu je zřejmé, že kmen pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 112 je schopen intenzivní kultivace za stanovených podmínek ve všech variantách kultivační půdy A, B1 až B4 a C1 až C3, a proto je velmi pravděpodobně použitelný pro technologii HGB. Tento kmen lze doporučit ke zkouškám na použitelnost pro technologii HGB některým ze standardních postupů.

Použitelnost kmene pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 112 pro technologii HGB byla následně nezávisle potvrzena kvasnými zkouškami, na základě kterých byl tento kmen doporučen k otestování ve čtvrtprovozu.

## Příklad 3

Do kultivační půdy variant A, B1 až B4 a C1 až C4 byla zaočkována kultura pivovarských kvasinek kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 32 pomnožená stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledky sledování růstu kultury a posuzování tvorby sedimentu jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4

Kultivační půda	72 hodin po zaočkování	96 hodin po zaočkování	120 hodin po zaočkování
A	++	++	++
B1	++	++	++
B2	+	+	+
B3	–	–	+
B4	–	–	–
C1	+	+	++
C2	–	+	+
C3	–	–	–
C4	–	–	–

5

Kde + značí vytvoření sedimentu, ++ vytvoření velkého množství sedimentu a – nevytvoření sedimentu.

10

Z množství vytvořeného sedimentu je zřejmé, že kmen pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 32 je sice schopen kultivace za stanovených podmínek ve variantách kultivační půdy A, B1 až B3 a C1 až C2, avšak jeho kultivace je složením kultivační půdy do značné míry inhibována. Tento kmen tedy lze z dalšího testování vyloučit jako nevhodný pro technologii HGB.

15

#### Příklad 4

20

Do kultivační půdy variant A, B1 až B4 a C1 až C4 byla zaočkována kultura pivovarských kvasinek kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 99 pomnožená stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledky sledování růstu kultury a posuzování tvorby sedimentu jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

Kultivační půda	72 hodin po zaočkování	96 hodin po zaočkování	120 hodin po zaočkování
A	++	++	++
B1	++	++	++
B2	+	+	++
B3	+	+	++
B4	–	–	+
C1	++	++	++
C2	–	+	+
C3	–	–	–
C4	–	–	–

25

Kde + značí vytvoření sedimentu, ++ vytvoření velkého množství sedimentu a – nevytvoření sedimentu.

- 5 Z množství vytvořeného sedimentu je zřejmé, že kmen pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 99 je sice schopen kultivace za stanovených podmínek ve všech variantách kultivační půdy A, B1 až B4 a C1 až C2, avšak jeho kultivace je složením kultivační půdy do značné míry inhibována. Tento kmen tedy lze označit jako nevhodný pro technologii HGB využívající mladiny s vyšším obsahem extraktu, avšak díky jeho dobré kultivaci v kultivační půdě varianty B3 ho lze doporučit k dalšímu testování použitelnosti pro technologii HGB využívající mladiny s obsahem extraktu okolo 16 % hmotnostních některých ze standardních způsobů.

#### Příklad 5

- 15 Do kultivační půdy variant A, B1 až B4 a C1 až C4 byla zaočkována kultura pivovarských kvasinek kmene *Saccharomyces pastorianus* RIBM 58 pomnožená stejným způsobem jako v příkladu 1. Výsledky sledování růstu kultury a posuzování tvorby sedimentu jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6

Kultivační půda	72 hodin po zaočkování	96 hodin po zaočkování	120 hodin po zaočkování
A	++	++	++
B1	++	++	++
B2	–	–	–
B3	–	–	–
B4	–	–	–
C1	+	++	++
C2	–	–	–
C3	–	–	–
C4	–	–	–

- 25 Kde + značí vytvoření sedimentu, ++ vytvoření velkého množství sedimentu a – nevytvoření sedimentu.

- 30 Z množství vytvořeného sedimentu je zřejmé, že kmen pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* RIBM 58 je sice schopen kultivace za stanovených podmínek ve všech variantách kultivační půdy A, B1 a C1, avšak jeho kultivace v ostatních variantách kultivační půdy zcela inhibována, takže tento kmen je pro technologii HGB zcela nepoužitelný a lze ho z dalšího testování vyloučit.

- 35 Z porovnání výše uvedených příkladů, jejich závěrů a případně i ověření je zřejmé, že aby bylo možné daný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek považovat za alespoň potenciálně vhodnou pro technologii HGB a doporučit ji k dalšímu testování standardními postupy, musí maximálně po 120 hodinách od zaočkování vytvořit při kultivaci za teploty 10 až 12 °C sediment v kultivační půdě tvořené mladinou s obsahem extraktu alespoň 16 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu. Následné standardní postupy testování přitom spočívají
- 40 v provedení laboratorní kvasné zkoušky, při které je sledován nejen růst daného kmene nebo



směsi kmenů pivovarských kvasinek na vysokokoncentrované mladině, ale také technologické a analytické parametry, jako například rychlost úbytku extraktu, tvorby ethanolu, pomnožení a následná sedimentace kvasinek, přičemž po ukončení kvašení se dále stanovuje obsah senzoric-  
ky aktivních látek v mladém pivu.

Pro zjišťování vhodnosti daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost pro technologii HGB využívající vysokokoncentrované mladiny s vyšším obsahem extraktu se pak používá kultivační půda tvořená mladinou s obsahem extraktu 20 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu. Ostatní podmínky kultivace, posuzování sedimentu i případné standardní postupy jsou stejné jako u výše popsaného postupu.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zjišťování vhodnosti určitého kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek ke zkouškám na použitelnost daného kmene nebo směsi kmenů pivovarských kvasinek pro technologii HGB, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že daný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek se zaočkuje do kultivační půdy tvořené sterilní pивní mladinou s obsahem extraktu alespoň 16 % hmotnostních, která obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu, a kultivuje se za teploty 10 až 12 °C, přičemž pokud alespoň po 120 hodinách kultivace vytvoří sediment, je příslušný kmen nebo směs kmenů pivovarských kvasinek vhodná k testování použitelnosti pro technologii HGB standardním postupem.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kultivační půda je tvořena sterilní mladinou s obsahem extraktu 20 % hmotnostních a obsahuje alespoň 7 % objemových ethanolu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že standardním postupem je laboratorní kvasná zkouška a/nebo testování ve čtvrtprovozu.

---

Konec dokumentu

---