

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037762**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.19

(21) Номер заявки
201892596

(22) Дата подачи заявки
2017.06.23

(51) Int. Cl. *C12C 1/027* (2006.01)
C12C 1/047 (2006.01)
C12C 7/047 (2006.01)
C12C 1/02 (2006.01)

(54) РАФИНИРОВАННЫЕ НАПИТКИ НА ОСНОВЕ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

(31) 16177402.1

(32) 2016.07.01

(33) EP

(43) 2019.05.31

(86) PCT/EP2017/065498

(87) WO 2018/001882 2018.01.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАРЛСБЕРГ БРЮИРИЗ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Скадхауг Биргит, Лок Фин, Кнудсен
Сорен, Вендт Тони, Круцевич
Катаржина, Марри Лусия, Олсен Оле
(DK)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) WO-A1-8606740
US-A-4052795
WO-A1-2013163041
EP-A1-3017706
US-A-4315380
FR-A1-2462085

(57) Изобретение относится к способам получения напитков на основе зерновых культур. В частности, изобретение обеспечивает, например, способы замачивания и проращивания зерна зерновых культур при постоянной аэрации. Изобретение также обеспечивает размол во влажном состоянии пророщенного зерна зерновых культур и непосредственный перенос пророщенного зерна, без сушки, в пивоварню для дальнейшей переработки. Способы настоящего изобретения значительно снижают необходимое потребление воды, энергозатраты и транспортные затраты по сравнению с существующими способами.

B1**037762****037762****B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится, в общем, к проращиванию и получению водных экстрактов зерновых культур (например, полученных посредством затирания), включая способы, используемые для получения пива. Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает малозатратный, быстрый и непрерывный способ получения пива из зерна ячменя. Способы можно проводить в одной установке. Настоящее изобретение в равной степени применимо к проращиванию и получению водных экстрактов других зерен злаков, включая рис, сорго, маис, просо и пшеницу, а также процессам пивоварения, предусматривающим добавки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

В промышленных процессах ослаживания зерна ячменя проращивают или ослаживают при регулируемых условиях, которые позволяют частичную мобилизацию крахмала и белковых запасов крахмалистого эндосперма в течение периода в 4-6 дней. Процесс ослаживания обычно начинают погружением сухих зерен ячменя в воду. Этот процесс известен как замачивание, где целью является не только очистка зерна, но также и повышение содержания влаги в нем приблизительно до 40% (мас./мас/), чтобы стадия мобилизации эндосперма, которая идет далее, происходила быстрее. При замачивании воду сливают один раз для обеспечения повторной аэрации зерна. Эта стадия известна как "воздушная выдержка" и рассматривается как необходимая главным образом потому, что погруженное зерно становится обедненным по кислороду приблизительно через 16 ч. После "воздушной выдержки" в течение приблизительно 8 ч зерно повторно погружают в воду для завершения обработки замачиванием в течение еще одного 8-часового периода или рядом стадий повторного замачивания. Двухстадийный процесс замачивания для повышения содержания влаги сухого зерна до 40% или выше занимает, в общем, приблизительно 32 ч. В некоторых солодовнях используют техники замачивания распылением.

Замоченное зерно располагают для проращивания, во время которого ферменты, секретируемые из алейроновых и щитковых эпителиальных клеток - вместе с некоторыми, которые предварительно существуют в клетках крахмалистого эндосперма, - разлагают клеточные стенки, крахмал и белок. При нормальных условиях проращивания фитогормон гиббереллиновая кислота (GA), как считается, синтезируется в нодальной области или в другом месте зародыша, откуда она диффундирует вместе с градиентом воды (Fincher, 2011).

Солодовник обычно нацелен на быстрое индуцирование синтеза насколько возможно большого числа разлагающих крахмал ферментов в зерне. Во многих промышленных программах ослаживания GA добавляют для ускорения процесса секреции ферментов из алейронового слоя. Разлагающие крахмал ферменты, которые включают α - и β -амилазы, ферменты расщепления разветвленной структуры крахмалов и α -глюкозидазы, частично деполимеризуют запасы крахмала зерна на моносахариды, олигосахариды и глюкозу (Smith и соавт., 2005; касательно указанных β -амилаз отметим, что они находятся в крахмалистом эндосперме при росте зерна). Продукты деполимеризации крахмала затем используются дрожжевыми клетками в качестве источника углерода и ферментируются в этанол пива. Диастатическая способность является параметром качества ослаживания, который относится к уровням активности батареи разлагающих крахмал ферментов, причем высокие значения желательны для пивоварения.

Другие основные компоненты зерна ячменя включают запасные белки, которые также находятся в погибших клетках крахмалистого эндосперма и включают гордеины, а также водо- и солерастворимые белки. Деполимеризация их также начинается естественно в процессе ослаживания, но пивовар может контролировать степень разложения этих белков, чтобы достаточно пептидов и аминокислот высвободилось для поддержки роста дрожжей при последующей стадии проращивания в пивоварне. Однако, если разложение запасных белков продолжается слишком долго, высвободившиеся белки могут вызывать сложности в процессе пивоварения. В частности, высокие уровни высвободившихся растворимых белков могут осаждаться и образовывать нежелательную мутность в готовом пивном продукте или повышать потенциал для образования альдегида Штреккера при хранении пива. В требованиях к качеству ослаживания должный уровень свободного аминного азота (FAN) желателен для роста дрожжей при ферментации. Индекс Кольбаха является мерой отношения растворимых : всех белков, причем солод с должным индексом Кольбаха обычно предпочтителен. Степень разложения белков, таким образом, является постоянной проблемой для солодовника. Кроме проблемы осаждения пива, которая может быть связана с избыточным количеством экстрагированных белков, очень высокие уровни FAN также приводят к сложностям из-за возможного образования неприятного вкуса.

Солодовники также стремятся вызвать высокие уровни ферментов, которые разлагают полисахариды клеточной стенки в зерне ячменя, в частности (1,3; 1,4)- β -глюканов и арабиноксиланов. Не полностью разложившиеся (1,3; 1,4)- β -глюканы могут быть особенно проблематичными для пивоваров, поскольку они могут экстрагироваться из солода в растворимых формах, которые образуют высоковязкие водные растворы, которые замедляют процессы фильтрации на пивоварнях и способствуют нежелательной мутности готового пива. Таким образом, низкие уровни растворимого (1,3; 1,4)- β -глюкана представляют важный параметр качества ослаживания, тогда как высокие уровни фермента (1,3; 1,4)- β -глюканазы остаются важными мерами качества солода.

Как указано выше, процесс осолаживания обычно занимает приблизительно 4-5 дней. После стадий регулируемого проращивания влажный солод сушат от содержания влаги приблизительно 40 до 4-5%. Этот процесс сушки, называемый обжигом, является очень энергоемким и составляет основные затраты для промышленности.

Печная сушка рассматривалась важной частью получения пива по многим причинам. Одной важной причиной является то, что при проращивании образуются проростки (также называемые "стебли"). Проростки имеют горький вкус, который влияет на послевкусие пива, и, кроме того, проростки могут добавлять нежелательный цвет пиву (смотрите Beer Brewing Technology (1999): 183, опубликованный Shokuhin Sangyo Shimbun, а также US 9326542). Когда свежепросошенный солод сушили в печи, проростки можно легко удалять, например, при помощи устройства для удаления стеблей. Согласно общему руководству по "Солодам и осолаживанию" от D.E. Briggs, затем "стебли необходимо удалять [...], поскольку они являются очень гигроскопичными, богатыми на растворимые азотсодержащие вещества, содержат вещества с плохим вкусом и горькие вещества и могут быть богатыми на диоксид серы и/или нитрозамины. Удаление стеблей следует проводить сразу после удаления солода из печи, чтобы помочь его охлаждению, и перед тем, как проростки наберут влагу из воздуха, становясь слабыми и мягкими (менее хрупкими) и, таким образом, их сложнее будет разрушать и отделять" (D.E. Briggs, Malts and Malting; p695 First Edition, 1998 Published by Blackie & Professionals, London, ISBN 0 412 29800).

Высушенный в печи солод обычно имеет уровень влаги 4,5-5,0%. Высушенный в печи солод затем переносят из солодовни в пивоварню по дороге, железной дороге или по морю. Это относится к тому факту, что процессы осолаживания и пивоварения традиционно проводили в разных местах и часто разными корпорациями.

В пивоварне высушенный в печи солод перемалывают для разрушения зерен и полученное содержимое экстрагируют горячей водой в процессе, известном как затирание. Экстрагированный материал содержит частично разложившийся крахмал, белок и молекулы клеточных стенок, как описано выше, и они разлагаются дальше эндогенными ферментами зерна, которые были экстрагированы из солода. На этой стадии некоторые пивовары добавляют дополнительные - и обычно недорогие источники углерода (добавки) - для поддержания последующего процесса дрожжевого брожения и для компенсации более высокой стоимости солода. Указанные добавки могут быть ячменем, рисом, пшеницей или другой мукой зерновой культуры из непроросшего зерна, но их добавление может вызвать сопутствующее добавление гидролитических ферментов, поскольку в солоде присутствует недостаточно эндогенных ферментов для разложения компонентов добавки. Добавленные ферменты обычно из неочищенных и относительно недорогих экстрактов грибковых и/или бактериальных культур. Добавление экзогенных ферментов является неправомерным в некоторых странах, в частности, где пиво должно производиться в условиях жестких норм.

Дополнительное разложение крахмала и других компонентов эндосперма, экстрагированных в горячую воду, проводят в процессе, известном как засахаривание. После затирания экстракты отфильтровывают, часто в фильтрационном чане, и охлаждают. Экстракт можно кипятить в присутствии хмеля или экстрактов хмеля, и при охлаждении дрожжевые культуры добавляют для брожения высвободившихся сахаров в этанол. Полученное таким образом пиво обычно созревает, и его отфильтровывают перед бутелированием. Пиво можно также газировать перед бутелированием.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способы быстрого проращивания и получения водных экстрактов зерновых культур. Способы значительно ускоряют процесс получения сусла для получения напитков на основе зерновых культур, в то же время сохраняя потенциал для получения указанного сусла с высокими уровнями сбраживаемых сахаров, предпочтительно с низкими уровнями β -глюкана и ксилана. В частности, напитки, полученные из указанного сусла, могут отличаться низким уровнем вяжущего вкуса.

Настоящее изобретение показывает, что непрерывный и интегрированный процесс пивоварения, проходящий от сухого зерна ячменя до пива, можно осуществлять на одном месте. В этом отношении настоящее изобретение обеспечивает способы объединенного замачивания и проращивания зерновых культур до содержания влаги, например, $>30\%$, предпочтительно $>35\%$, путем постоянной аэрации. Настоящее изобретение может при этом обеспечивать значительную экономию воды посредством исключения сушки солода, а также значительную экономию энергии, например, путем исключения стадии печной сушки.

В настоящем изобретении зерно погружают и инкубируют в водном растворе (обычно воде), причем O_2 подают в указанную жидкость. Обычно указанный O_2 подают непрерывно во время инкубации, которая, например, может происходить в течение диапазона от 20 до 72 ч и, в общем, позволяет зерну не только достичь соответствующего содержания влаги, но и прорасти регулируемым образом. Стадия проращивания может также включать одну или более воздушных выдержек, обычно после стадии инкубации в водном растворе с аэрацией. Этот процесс регулируемого проращивания можно укоротить добавлением одного или более соединений, способных ускорять проращивание. Например, фитогормон гиббереллиновую кислоту (GA) можно добавлять в водную жидкость или с начала, или при инкубации. GA

"активирует" экспрессию генов в его целевых клетках, а именно алейроне и щитковом эпителии зерна ячменя, включая гены, кодирующие эндогенные ферменты, необходимые для гидролиза крахмала, запасных белков и полисахаридов клеточных стенок. Таким образом, общее время, требуемое для замачивания и проращивания, можно снизить с более чем 5 дней в обычных процессах варки до ~2 дней или менее при помощи настоящего изобретения.

После объединенных процессов замачивания и проращивания способы настоящего изобретения предусматривают стадию тонкого измельчения пророщенных зерен зерновых культур. Особенно интересным аспектом настоящего изобретения является то, что способы настоящего изобретения позволяют проводить тонкое измельчение пророщенных зерен зерновых культур сразу после прорастания. Следовательно, способы, в общем, не предусматривают стадию сушки пророщенных зерен зерновых культур. В частности, способы не предусматривают стадию печной сушки пророщенных зерен зерновых культур. Как описано выше, одним важным аспектом печной сушки является обеспечение простоты удаления проростков. Перед сушкой удаления проростков сложнее достичь. Однако пророщенные зерна зерновых культур, полученные согласно способам настоящего изобретения, имеют значительно меньшее число проростков (обычно менее 4 г на 100 г пророщенного ячменя (в пересчете на сухую массу)), и, как показано настоящим изобретением, стадия печной сушки не требуется в отношении зерновой культуры, пророщенной согласно способам настоящего изобретения.

Пророщенные зерна зерновых культур можно, например, тонко измельчать подверганием пророщенных зерен зерновых культур мокрому измельчению с последующей стадией получения водного экстракта, например путем затирания при заранее определенной температуре в течение любого подходящего времени, как описано в данном документе ниже в разделе "Получение водного экстракта". Превращение высвободившихся сахаридов, например полисахаридов, и белков можно облегчить при затирании добавлением смесей экзогенных ферментов, которые катализируют разложение крахмала, запасных белков и полисахаридов клеточной стенки. Ферменты можно частично очищать из самого ячменя, из солода или из других источников или, альтернативно, из грибковых и/или бактериальных ферментных смесей, которые можно закупать в коммерческих источниках.

Помимо преимуществ, описанных выше, настоящее изобретение устраняет не только необходимость в печной сушке солода, но также необходимость в транспортировке высушенного зерна из солодовни на пивоваренный завод. Экономии средств на энергию до 50% можно достичь посредством этого объединенного замачивания и проращивания настоящего изобретения, что может сильно снизить углеродный след промышленности. Это важно из-за усиления законодательных и налоговых давлений в большинстве стран по всему миру в отношении снижения углеродного следа промышленности осоложивания и пивоварения.

Кроме того, в контексте устойчивости настоящее изобретение обеспечивает полное получение пива, которое можно проводить на уже существующем пивоваренном оборудовании, так что требуются небольшие дополнительные капитальные затраты.

Настоящее изобретение также определено в формуле изобретения, приложенной к нему.

Описание фигур

На фиг. 1 показан пример оборудования, пригодного для осуществления способа настоящего изобретения, в котором зерно можно погрузить в водный раствор и непрерывно аэрировать. Оборудование содержит впускное отверстие для зерна 1 зерновых культур; бак, например бак 2 для замачивания; впускной канал для газа, например аэрационные камни 3; насос, например воздушный насос 4; выпускное отверстие для зерна 5 зерновых культур; насос 6 для зерна; оборудование для тонкого измельчения зерен зерновых культур, например, мельницу 7; впускное отверстие 8; емкость, например емкость 9 для затирания; и выпускное отверстие 10.

На фиг. 2 показаны зерна голозерного ячменя после инкубации в воде при 15 или 25°C в течение 24, или 48 ч при указанном потоке воздуха. На фиг. 2А показана выборка зерен, тогда как фиг. 2В показывает отдельные типичные зерна. Отметим, что уже через 24 ч при 15°C зерна начинали прорастать (с видимым ростком даже при потоке воздуха только 30 л/ч, и несколько небольших проростков были видны через 48 ч). Через 24 ч при 25°C зерна начинали прорастать и содержали видимый росток, даже при потоке воздуха только 30 л/ч. С более высоким потоком воздуха или через 48 ч несколько небольших проростков были видны.

На фиг. 3 показаны зерна шелушеного ячменя после инкубации в воде при 15 или 25°C в течение 24, или 48 ч при указанном потоке воздуха. На фиг. 3А показана выборка зерен, тогда как фиг. 3В показывает отдельные типичные зерна.

На фиг. 4 показаны графики относительно активностей α -амилазы (панель А), β -амилазы (панель В) и конечной декстриназы (панель С) в зернах, пророщенных в присутствии различных количеств GA в воде с аэрацией.

На фиг. 5 показан пример процесса затирания с пропитанным, пророщенным и размолотым во влажном виде зерном.

На фиг. 6 показан график фильтруемости сусла, которое получали из зерна, пророщенного с различной аэрацией в присутствии или в отсутствие смеси пивоваренных ферментов Ultraflo Max (UFM).

На фиг. 7 показан график уровня сбраживаемых сахаров в сусле, полученном из зерна, пророщенного в течение 48 ч при 25°C при различных условиях аэрации. Образцы, дополненные смесью пивоваренных ферментов Ultraflo Max, отмечали как UFM.

На фиг. 8 показан пример оборудования, пригодного для осуществления стадий настоящего изобретения, в котором зерно можно погрузить в водный раствор и непрерывно аэрировать. Оборудование содержит впускное отверстие для зерна 1 зерновых культур; бак, например, FlexTank 2; решетку или сетку, например мета-сетку 3; впускной канал для газа, например аэраторные камни 4, и насос, например воздушный насос 5.

На фиг. 9 показаны результаты активности α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы.

На фиг. 10 показана α -амилаза в 8 сортах ячменя после проращивания с аэрацией (1 - Alexis, 2 - Chief, 3 - Chill, 4 - Paustian, 5 - Planet, 6 - Prestige, 7 - Quench, 8 - Tipple).

На фиг. 11 показана активность α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы в шелушенном ячмене, у которого удалили шелуху и затем прорастили с аэрацией.

На фиг. 12 показана активность α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы в ячмене, пророщенном в водном растворе с аэрацией (WA) с воздушной выдержкой(ами) (A) или без них в течение времени, указанного для голозерного ячменя 01 (фиг. 11A) и для шелушеного ячменя 02 (фиг. 11B).

На фиг. 13 показан % потери массы после удаления проростков как в шелушенном, так и голозерном ячмене, пророщенном инкубацией в водном растворе с аэрацией в течение 48 ч (48 ч WA), и ячмене, пророщенном при стандартных условиях замачивания в течение 96 ч (осолаживание 96 ч).

На фиг. 14 показано содержание NDMA в непророщенном ячмене, в ячмене, пророщенном способами настоящего изобретения (Солод 1a), и в 3 различных обычных солодах (Солод 1b, Солод 2 и Солод 3).

Определения

Термин "приблизительно" при использовании в данном документе в отношении численных значений предпочтительно означает $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$.

Термин "добавка" при использовании в данном документе относится к обогащенным углеродом источникам сырьевого материала, добавленным при получении пива. Добавка может быть непророщенным зерном зерновых культур, которое может быть размолото вместе с пророщенным зерном, полученным согласно настоящему изобретению. Добавка также может быть сиропом, сахаром или подобным.

Термин "росток" при использовании в данном документе относится к эмбриональной растущей почке, которая видна на фазе проращивания зерна зерновых культур.

Термин "содержание воды" зерна при использовании в данном документе относится к % воды мас./мас. в указанном зерне.

Термин "пророщенное зерно" при использовании в данном документе относится к зерну с развивающимся видимым ростком, предпочтительно ростком по меньшей мере 1 мм, таким как по меньшей мере 2 мм.

Термин " β -глюкан" при использовании в данном документе, если не указано иное, относится к полимеру клеточной стенки зерновой культуры "(1,3; 1,4)- β -глюкану".

Аналогично, термин "ксилан" при использовании в данном документе, если не указано иное, относится к полимеру клеточной стенки зерновой культуры "арабиноксилану".

Термины "высушенный в печи солод" и "осушенный солод" при использовании в данном документе относятся к пророщенному зерну зерновых культур, которое было высушено печной сушкой.

Термин "прорастающее зерно" при использовании в данном документе относится к зерну с развивающимся видимым ростком и видимым стеблем.

Термин "замачивание" при использовании в данном документе относится к процессу повышения содержания воды в зернышке зерновой культуры.

Термин " β -глюканаза" при использовании в данном документе относится к ферментам с потенциалом для деполимеризации β -глюкана зерновой культуры. Следовательно, если не указано иное, термин " β -глюканаза" относится к эндо- или экзоферменту или их смеси, характеризующейся (1,3; 1,4)- β - и/или (1,4)- β -глюканазной активностью.

Термин "ксиланаза" при использовании в данном документе относится к ферментам с потенциалом для разложения основных и боковых цепей ксилана и арабиноксилана. Следовательно, если не указано иное, термин "ксиланаза" относится к ферменту или смеси ферментов, характеризующейся ферментативными активностями, полученными одним или несколькими следующими классами ферментов: эндо-1,4-ксиланаза; экзо-1,4-ксиланаза; арабинофуранозидаза; эстераза феруловой кислоты.

Ферментативные активности зерен зерновых культур при использовании в данном документе относятся к активностям, измененным в муке, полученной из определенного типа зерна. Например, 10 ед/г α -амилазной активности на 1 г зерна зерновых культур относится к указанной α -амилазной активности (10 ед), измеренной в водном экстракте, полученном из 1 г муки (в пересчете на сухое вещество) из указанной зерновой культуры, α -амилазная активность определяется при помощи K-CERA 01/12 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия). β -Амилазная активность определяется при помощи

К-БЕТА3 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия). Активность конечной декстриназы определяется при помощи T-LDZ1000 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия).

Объем газа, как указано в данном документе, относится к объему указанного газа при 1 атм и 20°C.

Объем O₂, как указано в данном документе, относится к объему O₂ при 1 атм и 20°C. В вариантах осуществления настоящего изобретения, если O₂ содержится в смеси газов, тогда общий объем газовой смеси можно определять, и объем O₂ можно рассчитывать как процент от общего объема, который составляет O₂. В качестве примера тогда атмосферный воздух содержит 21% O₂. Таким образом, объем O₂ в атмосферном воздухе при использовании в данном документе составляет 21% всего объема атмосферного воздуха.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Зерно зерновых культур.

Способы настоящего изобретения предусматривают стадию проращивания, которая включает инкубацию зерна зерновых культур в водном растворе. Следует отметить, что смесь водного раствора и зерна зерновых культур можно рассматривать как суспензию.

Зерно зерновых культур может быть зерном любой зерновой культуры, например зерновой культуры, выбранной из группы, состоящей из ячменя, риса, сорго, маиса, проса, тритикале, ржи, овса и пшеницы. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения зерно зерновых культур представляет собой зерно ячменя. Указанное зерно может быть зерном любого сорта ячменя, таким как любой сорт ячменя, описанный ниже в данном документе в разделе "Ячмень".

Зерно зерновых культур может иметь относительно низкое содержание воды перед инкубацией в указанном водном растворе. Например, зерно зерновых культур может иметь содержание воды самое большее 30%, предпочтительно самое большее 20%, такое как самое большее 15%, например в диапазоне 5-15%.

Перед инкубацией в указанном водном растворе зерно зерновых культур может быть подвергнуто одной или более стадиям противомикробной обработки. Указанная противомикробная обработка может быть любой пригодной противомикробной обработкой, которая не ухудшает потенциал зерна для проращивания. Противомикробная обработка может, например, быть обработкой одним или несколькими противомикробными средствами. Указанные противомикробные средства могут быть любым противомикробным средством, которое при используемых концентрациях является нетоксичным для зерна зерновых культур. Например, противомикробное средство может быть хлорсодержащим соединением, например гипохлоритом. Противомикробное средство также может быть пероксидом, например пероксидом водорода и/или перуксусной кислотой. Неограничивающие примеры пригодных коммерческих противомикробных средств включают P3-Hypochloran®, P3-peroxysan® или P3-oxonia active 150®. Зерно зерновых культур можно обрабатывать гипохлораном в концентрации в диапазоне 0,1-10%, таком как в диапазоне 0,5-5%, например приблизительно 1%, таким как 1%. Зерно зерновых культур можно обрабатывать указанным гипохлораном в диапазоне от 15 мин до 10 ч, таким как в диапазоне 1-5 ч, например в течение диапазона 2-4 ч. После обработки зерно зерновых культур можно промывать один или несколько раз.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения противомикробная обработка проводится путем инкубации зерна зерновых культур в водном растворе, содержащем противомикробное средство. Сразу после указанной инкубации можно начинать стадию проращивания, например, путем начала аэрации. Таким образом, в таких вариантах осуществления не требуется менять водный раствор, и тот же водный раствор можно использовать для противомикробной обработки и, по меньшей мере, в течение начала последующей стадии проращивания. Это, в частности, может быть в случае, когда противомикробное средство представляет собой пероксид, например пероксид водорода.

Может быть предпочтительным, чтобы указанное зерно зерновых культур не подвергалось проращиванию перед инкубацией в водном растворе согласно настоящему изобретению. Следовательно, может быть предпочтительным, чтобы зерно зерновых культур не подвергалось стадии предварительного проращивания.

Как описано выше, зерно зерновых культур может быть любым зерном зерновых культур. Некоторые зерна зерновых культур содержат шелуху, тогда как другие зерна зерновых культур не содержат шелуху. Шелушенные зерна зерновых культур можно обрабатывать для удаления, по меньшей мере, части шелухи перед стадией проращивания. В общем, обработка для удаления шелухи не требуется, если используется голозерное зерно зерновых культур. Голозерные зерновые культуры включают, например, сорта голозерного ячменя и пшеницы.

Шелушенные зерна зерновых культур можно обрабатывать для удаления шелухи путем воздействия на зерна зерновых культур физической обработки, удаляя шелуху. Указанная физическая обработка может, например, быть выбрана из группы, состоящей из шлифовки, обработки песком, шелушения и сглаживания. Предпочтительно физическая обработка приводит к потере шелухи. Потеря шелухи может определяться как потеря общей массы. Таким образом, физическая обработка предпочтительно приводит к потере в диапазоне 1-4%, такой как к потере в диапазоне 1,5-3,0%, всей массы зерна зерновых культур.

Проращивание.

Способы настоящего изобретения предусматривают стадию проращивания зерна зерновых культур. Стадия проращивания включает стадию инкубации зерна зерновых культур в водном растворе обычно с аэрацией.

Инкубация в водном растворе с аэрацией.

Зерно зерновых культур может быть любым зерном зерновых культур, описанным выше в данном документе в разделе "Зерно зерновых культур", а водный раствор может быть любым из водных растворов, описанных ниже в данном документе в разделе "Водный раствор".

Может быть предпочтительно, чтобы при указанной инкубации в водном растворе зерна зерновых культур полностью покрывались указанным водным раствором в течение всей инкубации. Таким образом, зерна зерновых культур можно, например, инкубировать по меньшей мере в 1, предпочтительно по меньшей мере 1,5, более предпочтительно по меньшей мере 2, например, в диапазоне 1-10, таком как в диапазоне 1-5, например, в диапазоне 1,5-3 л водного раствора на 1 кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления зерна зерновых культур погружают в водный раствор на все время инкубации.

В других вариантах осуществления зерна зерновых культур поглощают водный раствор таким образом, что в конце инкубации указанным водным раствором весь указанный водный раствор поглощается зерном зерновых культур.

В других вариантах осуществления водный раствор, оставшийся после инкубации с аэрацией, можно слить с зерна зерновых культур.

В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы после инкубации зерна зерновых культур в указанном водном растворе, основная масса, например, по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, например, по существу все зерно зерновых культур содержало видимый росток по меньшей мере 1 мм.

В некоторых вариантах осуществления после инкубации зерна зерновых культур в указанном водном растворе, основная масса, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по существу все зерно зерновых культур содержит один или несколько видимых проростков.

В некоторых вариантах осуществления после инкубации зерна зерновых культур в указанном водном растворе, основная масса, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по существу все зерно зерновых культур содержит один или несколько видимых проростков и видимый стебель.

В некоторых вариантах осуществления после инкубации зерна зерновых культур в указанном водном растворе, зерна зерновых культур имеют содержание воды по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 35%, более предпочтительно по меньшей мере 37%, например, в диапазоне 35-60%, например, в диапазоне 35-50%, например, в диапазоне 37-60%, например, в диапазоне 37-50%.

Содержание воды в зерне зерновых культур можно определять путем определения массы зерна зерновых культур после сушки указанного зерна зерновых культур и определения массы высушенного зерна зерновых культур. Разницу массы влажного и сухого зерна зерновых культур рассматривают как воду, и содержание воды обеспечивается как масса воды, поделенная на общую массу зерна зерновых культур (влажного зерна зерновых культур). Содержание воды, представленное в %, таким образом представлено как % мас./мас.

Зерно зерновых культур можно инкубировать в указанном водном растворе в течение достаточного времени для обеспечения проращивания основной массы указанного зерна зерновых культур, как описано выше. Зерно зерновых культур можно также инкубировать в указанном водном растворе в течение достаточного времени для получения вышеуказанного содержания воды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия проращивания включает инкубацию в водном растворе с последующей воздушной выдержкой. В таких вариантах осуществления инкубацию в водном растворе проводят в течение времени, достаточного для обеспечения достаточной ферментативной активности в пророщенных зернах зерновых культур после воздушной выдержки. Ферментативная активность предпочтительно является такой как описано в данном документе ниже в разделе "Пророщенное зерно зерновых культур".

Обычно зерно зерновых культур инкубируют в водном растворе в течение по меньшей мере 20 ч, например, по меньшей мере 24 ч. Обычно зерно инкубируют в указанном водном растворе в течение самое большее 72 ч, например, в течение самое большее 60 ч, например, в течение самое большее 48 ч. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления зерна зерновых культур инкубируют в указанном водном растворе в диапазоне 20-72 ч, например, в диапазоне 20-60 ч, например, в диапазоне 20-48 ч, например, в диапазоне 20-30 ч, например, в диапазоне 22-26 ч.

В некоторых вариантах осуществления зерна зерновых культур инкубируют в водном растворе с аэрацией в течение диапазона 24-60 ч, предпочтительно в течение диапазона 40-55 ч, более предпочти-

тельно в течение диапазона 45-50 ч. Это может, в частности, быть в вариантах осуществления настоящего изобретения, где проращивание не содержит стадию воздушной выдержки, например в вариантах осуществления, где зерна зерновых культур тонко измельчают главным образом сразу после инкубации в водном растворе.

В некоторых вариантах осуществления зерна зерновых культур инкубируют в водном растворе с аэрацией в течение диапазона 24-70 ч, предпочтительно в течение диапазона 40-60 ч, более предпочтительно в течение диапазона 45-55 ч. Это может, в частности, быть в вариантах осуществления настоящего изобретения, где проращивание не содержит стадию воздушной выдержки, например в вариантах осуществления, где зерна зерновых культур тонко измельчают главным образом сразу после инкубации в водном растворе.

В некоторых вариантах осуществления зерна зерновых культур инкубируют в водном растворе с аэрацией в течение диапазона 16-40 ч, предпочтительно в течение диапазона 16-30 ч, например, в диапазоне 20-30 ч, более предпочтительно в течение диапазона 22-26 ч. Это может, в частности, быть в вариантах осуществления настоящего изобретения, где проращивание также содержит стадию воздушной выдержки.

Зерно зерновых культур можно инкубировать при любой пригодной температуре, однако может быть предпочтительно, чтобы инкубацию проводили при температуре, достаточно высокой для обеспечения быстрого повышения содержания воды. Как показано в данном документе ниже в примере 1, тогда значительное повышение температуры может способствовать повышению содержания воды. Таким образом, может быть предпочтительно, чтобы зерна зерновых культур инкубировали в указанном водном растворе при температуре по меньшей мере 15°C, например, по меньшей мере 20°C, например, по меньшей мере 25°C. В частности, зерна зерновых культур можно инкубировать в диапазоне 10-35°C, предпочтительно в диапазоне 15-30°C, например, в диапазоне 20-30°C, например, в диапазоне 25-30°C.

В частности, в вариантах осуществления настоящего изобретения, если зерна зерновых культур инкубируют при температуре в диапазоне 20-30°C, тогда указанные зерна зерновых культур можно инкубировать в диапазоне 20-48 ч.

Как описано в данном документе выше, указанные зерна зерновых культур часто инкубируют в указанном водном растворе, тогда как O_2 пропускают через водный раствор. Это также называется так, что указанные зерна зерновых культур инкубировали в водном растворе с аэрацией. Предпочтительно O_2 пропускают через водный раствор непрерывно в течение всей инкубации. Указанный O_2 можно пропускать через водный раствор любым подходящим образом, однако часто газ, содержащий O_2 , вводят в дно и/или в нижнюю часть контейнера, содержащего водный раствор с зерном зерновых культур. Обычно газ будет диффундировать через смесь водного раствора/зерна зерновых культур и выходить из смеси водного раствора/зерна зерновых культур сверху водного раствора. В частности, инкубацию можно проводить в устройстве, описанном ниже в данном документе в разделе "Устройство". Также возможно, что тяжелые газы, а именно CO_2 , отводятся из нижней части контейнера, при этом свежий воздух/ O_2 можно подавать в верхнюю часть контейнера.

Указанный O_2 можно добавлять в указанный водный раствор в виде чистого O_2 . Часто, однако, указанный O_2 содержится в газовой смеси. В одном варианте осуществления указанный O_2 содержится в атмосферном воздухе. Таким образом, способ настоящего изобретения может предусматривать пропускание атмосферного воздуха через указанный водный раствор.

В общем, по меньшей мере 2 л, предпочтительно по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O_2 проходит через указанный водный раствор на 1 кг зерна зерновых культур в час. Масса указанного зерна зерновых культур представлена в пересчете на сухую массу. Например, в диапазоне 2-100 л, например, в диапазоне 2-75 л, например, в диапазоне 2-50 л, например в диапазоне 4-100 л, например, в диапазоне 4-75 л, например, в диапазоне 4-50 л, например, в диапазоне 6-100 л, например, в диапазоне 6-75 л, например, в диапазоне 6-50 л O_2 проходит через указанную смесь водного раствора/зерна зерновых культур на 1 кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу) в час.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы по меньшей мере 20 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, более предпочтительно по меньшей мере 30 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 40-100 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 40-80 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 60 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур проходили через указанную смесь водного раствора/зерна зерновых культур в час. Масса зерна зерновых культур представлена в пересчете на сухую массу. При инкубации зерно зерновых культур обычно поглощает, по меньшей мере, некоторую часть водного раствора, и, следовательно, концентрация O_2 в водном растворе будет обычно изменяться при инкубации. Обычно количество O_2 , подаваемое на литр водного раствора в час, находится в диапазоне

40-200 г, предпочтительно в диапазоне 50-150 г.

Как указано выше, часто это атмосферный воздух проходит через водный раствор. Таким образом, способ может предусматривать пропускание по меньшей мере 10 л, предпочтительно по меньшей мере

15 л, более предпочтительно по меньшей мере 20 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 30 л атмосферного воздуха через указанный водный раствор на 1 кг зерна зерновых культур в час. Масса указанного зерна зерновых культур представлена в пересчете на сухую массу. Например, в диапазоне 10-500 л, например, в диапазоне 10-375 л, например, в диапазоне 10-250 л, например, в диапазоне 20-500 л, например, в диапазоне 20-375 л, например, в диапазоне 20-250 л, например, в диапазоне 30-500 л, например, в диапазоне 30-375 л, например, в диапазоне 30-250 л атмосферный воздух проходит через указанный водный раствор на 1 кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу) в час. В одном варианте осуществления в диапазоне 50-110 л, предпочтительно 80-100 л атмосферного воздуха пропускают через указанный водный раствор на 1 кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу) в час.

Воздушная выдержка.

Помимо указанной инкубации в водном растворе с аэрацией, зерно зерновых культур можно также инкубировать в воздухе (например, в отсутствие водного раствора). Стадию инкубации в воздухе можно также называть "воздушной выдержкой". Таким образом, после инкубации в водном растворе с аэрацией оставшийся водный раствор можно сливать и зерна зерновых культур можно инкубировать на воздухе. Альтернативно, после инкубации в водном растворе с аэрацией весь водный раствор поглощался зерном зерновых культур, которое можно затем инкубировать на воздухе. Такую инкубацию на воздухе предпочтительно проводят с аэрацией, например O_2 можно пропускать через контейнер, содержащий зерно зерновых культур. Предпочтительно O_2 пропускают через указанный контейнер в течение всей воздушной выдержки. Количество O_2 , пропускаемое через контейнер, содержащий зерно зерновых культур, может быть таким же количеством O_2 , которое пропускают через водный раствор, как описано выше. O_2 можно подавать в виде атмосферного воздуха.

Воздушную выдержку можно проводить в течение любого подходящего количества времени, предпочтительно в течение 18-50 ч, более предпочтительно в течение 18-38 ч, например, в течение 22-35 ч.

Во время воздушной выдержки дополнительное количество воды или водного раствора можно добавлять в зерно зерновых культур, например, путем полива или обрызгивания. Однако при воздушной выдержке зерна зерновых культур не следует погружать в водный раствор.

Способы проращивания.

Проращивание также содержит несколько стадий инкубации в водном растворе и/или несколько стадий воздушной выдержки. В общем, первая стадия является стадией инкубации зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше. Таким образом, проращивание может содержать или состоять из следующих стадий:

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка".

В этом варианте осуществления инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией может, например, проводиться в течение 16-30 ч, например, в течение 20-30 ч, например, в течение 22-26 ч, тогда как воздушная выдержка может проводиться в 18-38 ч, например, в течение 22-35 ч.

Проращивание может также содержать или состоять из следующих стадий:

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка";

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией".

Проращивание может также содержать или состоять из следующих стадий:

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка";

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка".

Проращивание может также содержать или состоять из следующих стадий:

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка";

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией";

- инкубация зерна зерновых культур на воздухе, как описано выше в разделе "Воздушная выдержка";

- инкубация зерна зерновых культур в водном растворе с аэрацией, как описано выше в разделе "Инкубация в водном растворе с аэрацией".

Время для каждой инкубации может изменяться, однако обычно вся стадия проращивания, т.е. общее время для всех инкубаций в водном растворе и всех воздушных выдержек, не превышает 72 ч, более

предпочтительно не превышает 60 ч, еще более предпочтительно не превышает 54 ч. Таким образом, может быть предпочтительно, чтобы вся стадия проращивания проводилась в диапазоне 20-72 ч, например, в диапазоне 24-60 ч, например, в диапазоне 24-48 ч. Следовательно, если проращивание содержит несколько стадий инкубации в водном растворе и/или воздушных выдержек, тогда каждая стадия инкубации в общем короче по времени.

Предпочтительно, чтобы все стадии проращивания проводили в одном и том же контейнере. Указанный контейнер может, в частности, быть баком, таким как любой из баков, описанных в данном документе ниже в разделе "Устройство".

В некоторых вариантах осуществления можно добавлять один или несколько экзогенных ферментов. Например, один или несколько ферментов можно добавлять на стадии проращивания, например, как описано в WO 2016/071463.

Зерна зерновых культур предпочтительно тонко измельчают главным образом сразу после проращивания. Следовательно, способы настоящего изобретения предпочтительно не содержат стадию сушки между стадией проращивания и тонкого измельчения зерна зерновых культур.

Пророщенное зерно зерновых культур.

Настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему стадию получения пророщенного зерна зерновых культур.

Пророщенные зерна зерновых культур предпочтительно содержат одну или несколько гидролитических ферментативных активностей, например, обеспечиваемых α -амилазами, β -амилазами, ферментами расщепления разветвленной структуры крахмала (такими как конечные декстриназы), α -глюкозидазами и протеазами.

Часто начало гидролитической ферментативной активности может возникать скоординированным по времени образом, и, таким образом, активность некоторых гидролитических ферментов можно использовать в качестве маркера для других гидролитических ферментативных активностей.

Следовательно, предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновых культур имели достаточный уровень измеряемой α -амилазной активности. Предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур имеют измеряемую α -амилазную активность по меньшей мере 4 ед/г, например, по меньшей мере 10 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). Таким образом, предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур могут иметь измеряемую α -амилазную активность по меньшей мере 20 ед/г, например, по меньшей мере 30 ед/г, например, по меньшей мере 40 ед/г, например, по меньшей мере 50 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). В вариантах осуществления настоящего изобретения, где зерно зерновых культур представляет собой пшеницу, α -амилазная активность может составлять по меньшей мере 30 ед/г. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения зерно зерновых культур может иметь α -амилазную активность по меньшей мере 50 ед/г, например, по меньшей мере 60 ед/г, например, по меньшей мере 70 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). Это может, в частности, быть в вариантах осуществления, где зерна зерновых культур инкубируют в водном растворе с аэрацией с последующей воздушной выдержкой.

α -Амилазную активность предпочтительно определяют согласно стандартным способам, например при помощи набора Ceralpha (K-CERA) от Megazyme, Ирландия. В частности, α -амилазная активность может быть определена, как описано в примере 2 ниже.

Также может быть предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновых культур имели достаточный уровень измеряемой β -амилазной активности. Предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур имеют измеряемую β -амилазную активность по меньшей мере 5 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). Таким образом, предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур могут иметь измеряемую β -амилазную активность по меньшей мере 10 ед/г, например, по меньшей мере 15 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу).

Предпочтительно β -амилазную активность определяют согласно стандартным способам, например при помощи набора Betamyl (K-BETA3) от Megazyme, Ирландия. В частности, β -амилазная активность может быть определена, как описано в примере 2 ниже.

Также может быть предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновых культур имели достаточный уровень активности конечной декстриназы. Предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур имеют активность конечной декстриназы по меньшей мере 5 мед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). Таким образом, предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур могут иметь активность конечной декстриназы по меньшей мере 10 мед/г, например, по меньшей мере 15 мед/г, например, по меньшей мере 20 мед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). В вариантах осуществления настоящего изобретения, где зерно зерновых культур представляет собой пшеницу, активность конечной декстриназы может составлять по меньшей мере 8 ед/г. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения зерно зерновых культур может иметь активность конечной декстриназы по меньшей мере 20 ед/г, например, по меньшей мере 22 ед/г, например, по меньшей мере 25 ед/г зерна зерновых культур (в пересчете на сухую массу). Это может, в частности, быть в вариантах осуществления, где зерна зерновых культур инкубируют в водном растворе с аэрацией с последующей

воздушной выдержкой.

Предпочтительно активность конечной декстриназы определяют согласно стандартным способам, например при помощи набора Limit Dextrizyme T-LDZ1000 от Megazyme, Ирландия. В частности, активность конечной декстриназы может быть определена, как описано в примере 2 ниже.

Интересно, что пророщенные зерна зерновых культур согласно настоящему изобретению имеют значительно сниженное количество проростков по сравнению с обычным свежепросошим солодом. Таким образом, пророщенные зерна зерновых культур согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат самое большее 4 г проростков на 100 г проросшего ячменя, предпочтительно самое большее 3 г проростков на 100 г проросшего ячменя, еще более предпочтительно самое большее 2 г проростков на 100 г проросшего ячменя, например, самое большее 1,1 г проростков на 100 г проросшего ячменя, причем как масса проростков, так и масса проросшего ячменя представлена в пересчете на сухую массу. Массу проростков предпочтительно определяют, как описано в примере 10 ниже.

Нитрозамины (NDMA) являются химическими соединениями с химической структурой $R^1N(-R^2)-N=O$, а именно нитрозогруппой, соединенной с амином. Большинство нитрозаминов являются канцерогенными. Даже хотя уровни нитрозаминов в современных солодах низкие, зерна проросшего ячменя согласно настоящему изобретению, тем не менее, все еще имеют значительно сниженное содержание NDMA по сравнению с обычным солодом. В одном варианте осуществления зерна проросшего ячменя согласно настоящему изобретению содержат самое большее 0,15 мкг/кг NDMA, предпочтительно самое большее 0,12 мкг/кг NDMA, например, самое большее 0,10 мкг/кг NDMA.

Водный раствор.

Водный раствор может быть любым водным раствором. Водный раствор можно рассматривать раствором, даже хотя смесь водного раствора и зерна зерновых культур может рассматриваться как суспензия. Часто водный раствор представляет собой воду, такую как водопроводная вода. Одно или несколько дополнительных средств можно добавить в указанную воду, и, таким образом, водный раствор может быть водой, такой как водопроводная вода, содержащая одно или несколько дополнительных средств. Указанные дополнительные средства могут содержаться в водном растворе сначала или их можно добавить при инкубации.

Указанные дополнительные средства могут, например, быть соединениями, способными ускорять проращивание зерна зерновых культур. Таким образом, водный раствор может содержать гиббереллиновую кислоту (GA), например водный раствор может содержать GA в концентрации по меньшей мере 100 нМ, например, в концентрации по меньшей мере 1000 нМ, например, в концентрации в диапазоне 100-100000 нМ, например, в концентрации в диапазоне 500-2000 нМ. Указанная GA может находиться в водном растворе с начала инкубации или ее можно добавить при инкубации. Указанная GA может быть любой GA, например GA_3 или GA_7 . В одном варианте осуществления указанная GA представляет собой GA_3 .

Дополнительное средство также может быть противовспенивающим средством. Указанное противовспенивающее средство может, например, быть любым пищевым противовспенивающим средством, например Foamzol FCD511 (AB Vickers, Великобритания).

Устройство.

Способы настоящего изобретения можно выполнять при помощи одного или нескольких устройств, подходящих для выполнения способов.

Например, стадию инкубации зерна зерновых культур в водном растворе можно проводить в контейнере, оборудованном одним или несколькими воздушными насосами. Контейнер может быть любым контейнером, в котором зерна зерновых культур можно инкубировать в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления контейнер может быть баком, например баком, описанным ниже.

Один пример устройства, пригодного для инкубации зерна зерновых культур, представлен на фиг. 8. Устройство содержит бак 2, который должен иметь достаточный объем для вмещения зерна зерновых культур и водного раствора. Бак, показанный на фиг. 8, является цилиндрическим, но бак, который можно использовать с настоящим изобретением, может иметь любую подходящую форму, например он может быть цилиндрическим баком, например цилиндрическим баком с конической нижней частью. Бак может быть изготовлен из любого подходящего материала, например, пластмассы (такой как Plexiglas) или металла (например, нержавеющей стали или меди).

Бак содержит по меньшей мере одно впускное отверстие 1 для зерна зерновых культур, которое можно использовать для добавления зерна зерновых культур в бак. Впускное отверстие можно также использовать для подачи других компонентов в бак, например впускное отверстие можно использовать для подачи водного раствора, например воды. Впускное отверстие может располагаться в любом пригодном положении в баке, и в некоторых вариантах осуществления впускное отверстие расположено в верхней части бака, например сверху бака. Впускное отверстие должно иметь достаточный размер для обеспечения подачи зерна зерновых культур. Даже если не требуется, бак может содержать дополнительные впускные отверстия, помимо впускного отверстия для зерна зерновых культур.

Бак может необязательно содержать решетку или сетку 3, расположенную по существу горизонтально в баке. Если есть, такая решетка или сетка обычно располагается в нижней 1/3, например в ниж-

ней 1/5, бака. Решетка или сетка предпочтительно содержит только отверстия, которые меньше, чем зерно зерновых культур. Решетка или сетка может быть изготовлена из любого подходящего материала, такого как пластмасса или металл, и может, например, быть металлической сеткой. Таким образом, решетку или сетку можно использовать для отделения зерна зерновых культур от нижней части бака. Однако бак часто не будет содержать сетку. В частности, если бак содержит выпускное отверстие для зерна зерновых культур в днище или вблизи днища, тогда указанный бак обычно не содержит решетку или сетку.

Кроме того, бак содержит один или несколько впускных каналов 4 для газа. Указанные впускные каналы могут быть любым впускным каналом, через который газ, содержащий O_2 , может проходить в бак. Впускные каналы для газа могут иметь форму, которая позволяет газу входить в водный раствор с высокой скоростью, обеспечивая диффузию газа через водный раствор. Таким образом, например, впускные каналы для газа могут быть форсунками, жиклерами, аэрационными распределителями или аэрационными камнями. В одном варианте осуществления впускные каналы для газа представляют собой аэрационные камни. Впускные каналы для газа, в общем, соединены с насосом 5, который закачивает газ в бак, через указанные впускные каналы. Насос может быть любым насосом, способным закачивать газ, например воздух, через впускные каналы для газа. Предпочтительно, чтобы бак содержал множество впускных каналов для газа, например по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 3, например, в диапазоне 3-20. Впускные каналы для газа могут располагаться в любом месте в баке, но обычно они располагаются в нижней 1/3, например в нижней 1/5, бака. Это позволяет газу поступать в водный раствор снизу и диффундировать вверх через водный раствор. Избыток газа может покидать бак через любое отверстие в баке, например, через впускное отверстие для добавления зерна. В одном варианте осуществления может быть предпочтительно, чтобы указанные впускные каналы 3 располагались непосредственно на боковых стенках бака 2, предпочтительно в нижней части боковых стенок, например, как показано на фиг. 1.

Пример устройства, пригодного для проведения нескольких стадий способов настоящего изобретения, показан на фиг. 1. Устройство содержит впускное отверстие для зерна 1 зерновых культур, бак 2, впускной каналы 3 для газа и насос 4, которые могут быть любым из впускных отверстий для зерна зерновых культур, баков, впускных каналов для газа и насосов, описанных выше в данном документе относительно фиг. 8. Бак 2 может со жать выпускное отверстие 5 для зерна зерновых культур, расположенное в нижней 1/3, например нижней 1/5, бака, например расположенное на днище бака. Указанное выпускное отверстие можно использовать как для удаления зерна зерновых культур, так и для удаления других компонентов, находящихся в баке, например водного раствора. Указанное выпускное отверстие может быть соединено с насосом 6 для зерна, например, посредством трубопровода. Указанный насос 6 для зерна может быть любым насосом, способным закачивать зерно из бака 2 в оборудование 7 для тонкого измельчения зерна зерновых культур и необязательно также в емкость 9 для затирания.

Устройство содержит оборудование 7 для тонкого измельчения зерна зерновых культур. Указанное оборудование может быть любым оборудованием, способным тонко измельчать зерна зерновых культур с содержанием воды свыше 20%, например, свыше 35%. Оборудование может, в частности, быть дробилкой или мельницей, например мельницей для мокрого измельчения. Оборудование 7 может быть соединено с баком 2 и с емкостью 9 при помощи трубопровода(ов). Движение зерна из бака 2 в оборудование 7 и далее в емкость 9 можно обеспечивать насосом 6.

Устройство может также содержать емкость 9. Емкость 9 может быть любой емкостью, которая может содержать водный экстракт и которая может выдерживать температуры, используемые для затирания, например температуры до 90°C, например, до 85°C, например, до 80°C. Таким образом, емкость может быть изготовлена из любого материала, выдерживающего такие температуры, например, из металла, такого как нержавеющая сталь или медь. Емкость может иметь любую подходящую форму, например она может быть по существу цилиндрической. Емкость может быть связана с оборудованием для контроля температуры. Емкость можно использовать для получения водного экстракта тонко измельченных зерен зерновых культур посредством процесса, включающего инкубацию при одной или нескольких заранее определенных температурах, как описано в настоящем документе в разделе "Получение водного экстракта". Указанное оборудование для контроля температуры способно регулировать температуру жидкости в емкости, включая способность к нагреванию жидкости в емкости до заранее определенной температуры, например до любой из температур, описанной в настоящем документе в разделе "Получение водного экстракта". Емкость 9 может также содержать оборудование для перемешивания или вращения любой жидкости, содержащейся в указанной емкости. В частности, емкость 9 может быть емкостью для затирания. Емкости для затирания хорошо известны в данной области, и емкость 9 может быть любой обычной емкостью для затирания.

Емкость 9, в общем, содержит впускное отверстие 8, через которое тонко измельченные пророщенные зерна зерновых культур могут поступать в емкость. Указанное впускное отверстие 8 обычно расположено в верхней половине, например в верхней 1/3, например в верхней 1/5, емкости, например сверху емкости. Тонко измельченные зерна зерновых культур можно вводить через трубопровод из оборудования 7 для тонкого измельчения зерен зерновых культур во впускное отверстие 8 емкости 9.

В общем, емкость 9 также содержит выпускное отверстие 10, через которое водный экстракт может выходить из емкости после получения водного экстракта (см. подробности в отношении водного экстракта ниже в данном документе в разделах "Водный экстракт" и "Получение водного экстракта"). Выпускное отверстие обычно расположено в нижней половине, например в нижней 1/3, например в нижней 1/5, емкости, например на днище емкости.

Тонкое измельчение пророщенного зерна зерновых культур.

Способы настоящего изобретения предусматривают стадию тонкого измельчения зерна зерновых культур, пророщенных инкубацией в водном растворе с аэрацией.

В то время когда указанные зерна зерновых культур тонко измельчают, они предпочтительно все еще имеют высокое содержание воды, предпочтительно указанные зерна зерновых культур имеют содержание воды по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере 35%. Например, пророщенные зерна зерновых культур можно переносить непосредственно с инкубации в указанном водном растворе в оборудование для тонкого измельчения зерна зерновых культур. Следовательно, пророщенные зерна зерновых культур могут иметь такое же содержание воды в момент тонкого измельчения, какое имеют зерна зерновых культур сразу после инкубации зерна зерновых культур в водном растворе, например, содержание воды, описанное в настоящем документе выше в разделе "Проращивание". В частности, способы обычно не предусматривают стадию сушки пророщенного зерна зерновых культур воздействием повышенных температур. Предпочтительно пророщенные зерна зерновых культур не имеют содержание воды менее 20%, предпочтительно не менее 25%, еще более предпочтительно не менее 30%, еще более предпочтительно не менее 35%, в любое время после проращивания и до тонкого измельчения указанного зерна зерновых культур. Таким образом, способы предпочтительно не предусматривают стадию печной сушки пророщенных зерен зерновых культур.

Пророщенные зерна зерновых культур можно тонко измельчать при помощи любого оборудования, пригодного для тонкого измельчения зерна зерновых культур с содержанием воды более 20%, например, более 25%, например, более 30%, например, более 35%. Например, пророщенные зерна зерновых культур можно подвергать размолу, например влажному размолу. Пригодные мельницы для размолу пророщенного зерна зерновых культур включают мельницы, доступные от Mill star, США. Пророщенные зерна зерновых культур можно также подвергать измельчению.

Зерна зерновых культур, в общем, тонко измельчают до такой степени, что можно получить водный экстракт сбраживаемых сахаров зерна зерновых культур. Таким образом, зерна зерновых культур достаточно измельчают, так что 7 л водного экстракта 1 кг указанного тонко измельченного зерна зерновых культур имеет удельную плотность по меньшей мере 8° Плато.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, где водный экстракт получают из пророщенного зерна зерновых культур и одной или нескольких добавок, указанные добавки могут также быть тонко измельчены. В частности, это может быть в случае, где указанные добавки содержат непророщенное зерно зерновых культур. Указанные добавки могут быть тонко измельчены, например, размолоты в отдельном процессе. Однако также предусмотрено в настоящем изобретении, что добавки тонко измельчают вместе с пророщенным зерном зерновых культур. Аналогично, если водный экстракт получают из пророщенного зерна зерновых культур и высушенного в печи солода, указанный высушенный в печи солод может быть тонко измельченным, например, размолотым в отдельном процессе. Однако также предусмотрено в настоящем изобретении, что высушенный в печи солод тонко измельчают вместе с пророщенным зерном зерновых культур.

Получение водного экстракта.

Способы настоящего изобретения также предусматривают стадию получения водного экстракта тонко измельченного пророщенного зерна зерновых культур. Указанная стадия может, например, быть стадией затириания.

Вышеуказанный водный экстракт может, в общем, быть получен инкубацией тонко измельченного зерна зерновых культур в воде или в водном растворе. Водный раствор для получения водного экстракта, в общем, является другим водным раствором по сравнению с водным раствором, используемым для инкубации зерна зерновых культур при проращивании.

Для различения водный раствор для получения водного экстракта можно также называть "раствором для затириания". Раствор для затириания может быть любым водным раствором, но он обычно состоит из воды, такой как водопроводная вода, в которую можно добавлять одно или несколько дополнительных средств. Для различения между дополнительными средствами, добавляемыми при проращивании, эти дополнительные средства можно называть "дополнительными средствами для затириания". Таким образом, раствор для затириания может состоять из воды (например, водопроводной воды), в которую добавляют одно или несколько дополнительных средств для затириания. Средства для затириания могут находиться в растворе для затириания сначала или их можно добавить при процессе получения водного экстракта.

Указанные дополнительные средства для затириания могут быть ферментами. Таким образом, раствор для затириания может содержать один или несколько ферментов. Указанные ферменты можно до-

бавлять в раствор для затириания сначала или потом во время процесса.

Указанные ферменты могут, например, быть одним или несколькими гидролитическими ферментами. Подходящие ферменты включают липазы, разлагающие крахмал ферменты (например, амилазы), глюканызы [предпочтительно (1-4)- и/или (1,3; 1,4)-β-глюканызы], и/или ксиланызы (такие как арабиноксиланызы), и/или протеазы, или смеси ферментов, содержащие один или несколько из вышеуказанных ферментов, например Cereflo, Ultraflo или Ondea Pro (Novozymes). Например, раствор для затириания может содержать один или несколько гидролитических ферментов, причем по меньшей мере один гидролитический фермент выбирают из группы, состоящей из α-амилазы, β-амилазы, конечной декстриназы, пуллулазы, β-глюканызы, ксиланызы, глюкоамилазы и протеазы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раствор для затириания содержит один или несколько из следующих ферментов:

β-глюканыза, такая как эндо-(1,3; 1,4)-β-глюканыза или эндо-1,4-β-глюканыза;

ксилазыза, такая как эндо- или экзо-1,4-ксилазыза, арабинофуранозидазы или эстеразы феруловой кислоты;

α-амилазы;

пуллулазы или конечная декстриназы;

глюкоамилазы.

Добавляют ли ферменты в раствор для затириания или нет и решения о том, какие ферменты добавлять, могут зависеть от используемого зерна зерновых культур. Таким образом, в вариантах осуществления настоящего изобретения, если зерновая культура представляет собой растение ячменя с низкими уровнями β-глюкана (например, как описано в данном документе ниже в разделе "Ячмень"), тогда небольшое количество или несколько β-глюканызы можно добавлять в раствор для затириания.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы экзогенную протеазу не добавляли при затириании. Добавление протеазы может быть менее предпочтительным, поскольку протеазы могут влиять на ферментативную активность. В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы экзогенную липазу не добавляли при затириании.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы самое большее 700 ед, предпочтительно самое большее 350 ед экзогенной глюкоамилазы на 1 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) использовали при получении водного экстракта.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы самое большее 400 AGU, предпочтительно самое большее 200 AGU экзогенной глюкоамилазы на 1 кг пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) использовали при получении водного экстракта. Определение AGU можно выполнять, как описано в US 7060468.

В другом варианте осуществления предпочтительно, чтобы объединенные экзогенные глюкоамилазы и α-амилазы, используемые при получении водного экстракта, не превышали 700 ед, предпочтительно не превышали 350 ед на 1 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество). Объединенную активность глюкоамилазы и α-амилазы можно, например, определять при помощи K-CERA 01/12 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия).

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы самое большее 20 ед экзогенной пуллулазы или конечной декстриназы на 1 кг пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) использовали при получении водного экстракта.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы самое большее 100 PUN пуллулазы на кг пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) использовали при получении водного экстракта. Определение PUN можно выполнять, как описано в US7060468.

Указанные дополнительные средства для затириания могут также быть добавками, например непророщенным зерном зерновых культур, сиропами или сахарами. Если добавляют добавки, они могут также быть тонко измельченными, например, размолотыми или измельченными. Если добавка представляет собой зерно зерновых культур, например зернозерновых культур, которое не подвергали проращиванию, тогда оно может обычно быть тонко измельченным или размолотым. Если добавка представляет собой сиропы, сахара или подобное, они будут обычно не размолоты. Добавку, такую как сахара или сиропы, можно добавлять в раствор для затириания в любое время в процессе; однако, такие добавки можно также добавлять в водный экстракт или позднее в процессе получения напитка, как описано ниже. В общем, добавки добавляют в меньших количествах, чем пророщенное зерно зерновых культур. Таким образом, по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 90% углеводов водного экстракта получают из пророщенного зерна зерновых культур, тогда как добавки предпочтительно только составляют незначительную часть углеводов. Если добавка является непророщенным зерном зерновых культур, тогда предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновых культур составляли по меньшей мере 50% (мас./мас.), предпочтительно по меньшей мере 70% (мас./мас.), более предпочтительно по меньшей мере 90% (мас./мас.) всего зерна зерновых культур, как определено в пересчете на сухую массу.

Дополнительные средства для затириания могут также представлять собой высушенный в печи со-

лод. Если добавляют высушенный в печи солод, он также может быть тонко измельченным, например, размолом или измельчением. В общем, высушенный в печи солод добавляют в меньших количествах, чем пророщенное зерно зерновых культур. Таким образом, пророщенные зерна зерновых культур составляют по меньшей мере 80% (мас./мас.), предпочтительно по меньшей мере 90% (мас./мас.), более предпочтительно по меньшей мере 95% (мас./мас.) всего зерна зерновых культур и солода, как определено в пересчете на сухую массу. В предпочтительных вариантах осуществления не добавляют высушенный в печи солод.

Указанные дополнительные средства для затириания, предпочтительно пищевого качества, могут также быть солью, например CaCl_2 .

Указанные дополнительные средства для затириания могут также быть кислотой, предпочтительно пищевой кислотой, например H_3PO_4 .

Водный экстракт обычно получают инкубацией тонко измельченного пророщенного зерна зерновых культур в растворе для затириания при одной или нескольких заранее определенных температурах. Указанная заранее определенная температура может также называться "температурой затириания" в данном документе. Указанные температуры затириания могут, например, быть обычными температурами, используемыми для затириания.

Температура затириания, в общем, или поддерживается постоянной (изотермическое затириание), или постепенно возрастает, например повышается постепенным образом. В любом случае растворимые вещества в тонко измельченном пророщенном зерне зерновых культур высвобождаются в указанный раствор для затириания, при этом образуя водный экстракт.

Температура(ы) затириания обычно представляют собой температуру(ы) в диапазоне 30-90°C, например, в диапазоне 40-85°C, например, в диапазоне 50-85°C. Температуры затириания можно выбирать согласно используемому типу зерновой культуры. Следовательно, в вариантах осуществления настоящего изобретения, где зерна зерновых культур представляют собой ячмень с низкими уровнями липоксигеназной (LOX) активности и/или метилметионинтрансферазной (ММТ) активности или без нее (см. подробности ниже в данном документе в разделе "Ячмень"), температура затириания может быть ниже, например в диапазоне 35-69°C.

Инкубацию в растворе для затириания можно проводить в течение любого подходящего количества времени. Время инкубации в растворе для затириания в емкости для затириания может, например, находиться в диапазоне 60-300 мин, например, в диапазоне 60-240 мин, например, в диапазоне 90-300 мин., например, в диапазоне 90-240 мин, например, в диапазоне 90-270 мин, например, указанное время инкубации в растворе для затириания может быть любым временем, используемым при обычном затириании. Одним неограничивающим примером подходящего затириания является:

(1) затириание при температуре в диапазоне 50-60°C, например приблизительно 55°C, в диапазоне 10-30 мин, например приблизительно 15 мин;

(2) нагревание до температуры в диапазоне 60-70°C, предпочтительно в диапазоне 60-65°C, например приблизительно 62°C, в диапазоне 30-90 мин, например приблизительно 60 мин;

(3) нагревание до температуры в диапазоне 70-75°C, например приблизительно 72°C, в диапазоне 5-30 мин, например приблизительно 15 мин;

(4) нагревание до температуры в диапазоне 75-80°C, предпочтительно в диапазоне 75-78°C, например приблизительно 78°C, в диапазоне 5-15 мин, например, приблизительно 10 мин.

После инкубации в растворе для затириания в емкости для затириания тонко измельченные пророщенные зерна зерновых культур в растворе для затириания можно переносить в другой контейнер, например фильтрационный чан, и инкубировать в течение дополнительного времени при повышенной температуре, например в диапазоне 70-78°C, в течение 30-120 мин.

Таким образом, инкубация в растворе для затириания может, помимо вышеуказанных стадий, также содержать стадию (5):

(5) нагревание до температуры в диапазоне 70-78°C, предпочтительно в диапазоне 75-78°C, например приблизительно 78°C, в диапазоне 30-120 мин, например приблизительно 60 мин.

Один неограничивающий пример подходящих температур и времени затириания показан в данном документе на фиг. 5. Инкубацию в течение первых приблизительно 120 мин можно, например, проводить в емкости для затириания, тогда как остальную инкубацию, например, можно проводить в другом контейнере. Другие неограничивающие примеры можно найти в литературе по пивоварению, например в Briggs и соавт. (выше) и Hough и соавт. (выше).

После инкубации в растворе для затириания водный экстракт можно обычно разделять, например, посредством фильтрации на водный экстракт и остаточные нерастворившиеся твердые частицы, последние также называют "отработанным зерном". Фильтрацию можно, например, проводить в фильтрационном чане. Альтернативно, фильтрация может быть фильтрацией через заторный фильтр. Водный экстракт, полученный таким образом, можно также называть "первым суслом".

Дополнительную жидкость, такую как вода, можно добавлять к отработанному зерну в процессе, также называемом промывание. После промывания и фильтрации можно получать "второе сусло". Дополнительные сусла можно получать повторением процедуры.

Таким образом, водный экстракт может быть суслом, например первым суслом, вторым суслом, дополнительным суслом или их комбинацией.

Водный экстракт.

Водный экстракт, полученный способами настоящего изобретения, может иметь ряд полезных свойств, включая, помимо прочего, свойства, описанные в этом разделе.

Как указано выше, водный экстракт можно подвергать стадии фильтрации. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы сусло имело хорошую фильтруемость. Например, может быть технически сложным фильтровать высоковязкую жидкость, причина, по которой может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт имел низкую вязкость.

Фильтруемость можно определять рядом путей. В одном варианте осуществления фильтруемость определяют как количество жидкости, полученное после фильтрации через фильтровальную воронку, снабженную фильтровальной бумагой, в течение 1 ч. Предпочтительно водный экстракт имеет фильтруемость по меньшей мере 250 мл, когда 400 мл раствора для затирания, содержащего 100 г тонко измельченного зерна зерновых культур, добавляют в указанную фильтровальную воронку. Фильтруемость можно также определять как процент объема жидкости, полученной после фильтрации в течение 60 мин, как описано выше, по сравнению с объемом жидкости водного экстракта, добавленного в указанную воронку. Таким образом, фильтруемость может составлять по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60% (об./об.). В частности, фильтруемость можно определять, как описано в данном документе ниже в примере 3.

Фильтруемость может часто зависеть от уровня β -глюкана. Следовательно, может быть предпочтительным, чтобы уровень β -глюкана не был слишком высоким. Например, водный экстракт может содержать самое большее 200 мг/л, предпочтительно самое большее 150 мг/л β -глюкана.

Также предпочтительно, чтобы водный экстракт содержал соответствующий уровень сбраживаемых сахаров. В частности, может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт содержал по меньшей мере 10 г, например, по меньшей мере 15 г мальтозы на 1 л. Например, может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт содержал по меньшей мере 1 г/л на градус Плато мальтозы. Также может быть предпочтительно, чтобы указанный водный экстракт содержал по меньшей мере 1 г, например, по меньшей мере 2 г глюкозы на 1 л.

Обычно желательно, чтобы сусло содержало свободный аминный азот (FAN) на уровнях, которые достаточно высоки для получения хорошей жизнеспособности дрожжей, тогда как очень высокие уровни могут быть нежелательными. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт содержал в диапазоне 150-400 мг/л, например, в диапазоне 150-300 мг/л, например, в диапазоне 150-250 мг/л FAN.

Обычно желательно, чтобы сусло содержало высокие уровни аминокислот валина, поскольку они могут снижать вероятность нежелательного образования диацетила. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт содержал по меньшей мере 55 мг/л, например, по меньшей мере 60 мг/л валина. В одном варианте осуществления водный экстракт содержит по меньшей мере 65 мг/л валина.

Вышеуказанные уровни сахаров, FAN и аминокислот являются предпочтительными уровнями в водном экстракте перед любой ферментацией.

Получение напитков.

В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения также предусматривают стадию переработки водного экстракта, полученного способами настоящего изобретения, в напиток.

Водный экстракт можно кипятить с хмелем или без него, после чего он может называться прокипяченным суслом.

Во-первых, второе и дополнительное сусла можно объединять и затем подвергать нагреванию или кипячению. Водный экстракт можно нагревать или кипятить в течение любого подходящего количества времени, например в диапазоне от 60 до 120 мин. Во время нагревания или кипячения объем водного экстракта может уменьшаться из-за испарения. Может быть предпочтительно, чтобы объем водного экстракта снижался менее чем на 8%, предпочтительно менее чем на 5%. Это может сильно снизить энергозатраты.

Напиток можно получать ферментацией водного экстракта, например брожением сусла. Таким образом, напиток можно получать сбраживанием водного экстракта при помощи дрожжей.

В одном варианте осуществления напиток может быть спиртным напитком, таким как пиво. В других вариантах осуществления напиток может быть безалкогольным напитком на основе пророщенного зерна зерновых культур. Безалкогольный напиток может, например, быть безалкогольным пивом или другими видами безалкогольных напитков, такими как Maltina.

В одном предпочтительном варианте осуществления напиток представляет собой пиво, например, пиво может быть светлым пивом или элем. Таким образом, пиво может, например, быть выбрано из группы, состоящей из альтбейра, амбер эля, ячменного вина, Берлинер Вайссе, Бьер-де-Гард, биттера, золотого эля, крепкого темного пива, коричневого эля, калифорнийского обычного пива, сливочного эля,

экспорт дортмундера, доппельбока темного, темного пшеничного, айсбока, фруктового ламбика, золотого эля, гозе, хейзе, пшеничного пива, светлого лагеря, индийского пейл-эля, кельпа, ламбика, светлого эля, майбока, солодового ликера, мягкого эля, мартовского пива, старого эля, фландрийского коричневого эля, пейл-эля, пильзнера, портера, красного эля, ржаного пива, сезонного пива, шотландского эля, парового пива, стаута, черного пива, лагеря, бельгийского белого пива, пшеничного пива и пшеничного бока. Водный экстракт согласно настоящему изобретению получают из пророщенного зерна зерновых культур, которое не подвергали печной сушке. Пророщенное зерно зерновых культур, которое не было высушено в печи, обычно имеет более светлый цвет, и, следовательно, способы настоящего изобретения являются особенно пригодными для получения светлого пива, в частности для получения лагерного пива. Более темное пиво можно также получать способами настоящего изобретения, например путем добавления одного или нескольких высушенных в печи солодов при затирании, как описано в разделе "Получение напитков".

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам получения напитка, предусматривающим стадии:

получение водного экстракта при помощи способа согласно настоящему изобретению;
переработка указанного экстракта в напиток.

Спиртные напитки, такие как пиво, можно согласно способам настоящего изобретения изготавливать из пророщенного зерна зерновых культур. Пророщенное зерно зерновых культур, помимо хмеля и дрожжей, способствует вкусу и цвету пива.

Как только получили водный экстракт, его можно перерабатывать в пиво любым способом, включая обычные способы пивоварения. Неограничивающие описания примеров подходящих способов пивоварения можно найти, например, в публикациях Briggs и соавт. (1981) и Hough и соавт. (1982). Множество регулярно обновляемых способов анализа ячменных и пивных продуктов доступны, например, помимо прочего, в Американской ассоциации специалистов по биохимии зерна (1995), Американском обществе специалистов по пивоварению (1992), Европейской конвенции по пивоварению (1998) и Институте пивоварения (1997). Следует признать, что многие конкретные процедуры используют для конкретной пивоварни, причем наиболее значимые изменения относятся к предпочтениям местных потребителей. Любой такой способ получения пива можно использовать с настоящим изобретением.

Первая стадия получения пива из водного экстракта предпочтительно включает нагревание указанного водного экстракта, как описано в настоящем документе выше, с последующей далее фазой охлаждения и необязательно вихревого перемешивания. Одно или несколько дополнительных соединений можно добавлять в водный экстракт, например одно или несколько дополнительных соединений, описанных ниже в разделе "Дополнительные соединения". После охлаждения водный экстракт можно переносить в ферментационные чаны, содержащие дрожжи, например пивные дрожжи, такие как *S. pastorianus* или *S. cerevisiae*. Водный экстракт можно ферментировать в течение любого подходящего периода времени, в общем, в диапазоне 1-20, например, 1-10 дней. Брожение проводят при любой подходящей температуре, например при температуре в диапазоне 10-20°C. Способы могут также предусматривать добавление одного или нескольких ферментов, например один или несколько ферментов можно добавить в сусло перед брожением или во время него. В частности, указанный фермент может быть пролин-специфической эндопротеазой. Неограничивающие примеры пролин-специфической эндопротеазы представляют собой "Brewer's Clarex", доступный от DSM. В других вариантах осуществления экзогенные ферменты не добавляют в ходе способов.

В течение длящегося несколько дней процесса брожения сахар превращается в спирт и CO₂ одновременно с образованием некоторых вкусовых веществ. Брожение может окончиться в любое желательное время, например, как только не будет наблюдаться никакого падения %P.

Затем пиво можно дополнительно обрабатывать, например охлаждать. Его можно также фильтровать и/или осветлять, процесс, который дает приятный запах и менее дрожжевой вкус. Добавки также можно добавлять. Кроме того, можно добавлять CO₂. Наконец, пиво можно пастеризовать и/или фильтровать перед его упаковкой (например, переносом в контейнеры или кеги, бутилированием или консервированием). Пиво можно также пастеризовать стандартными способами.

Пиво, полученное способами настоящего изобретения, обычно имеет приятный вкус и не имеет или имеет только небольшую терпкость. Вкус может анализировать, например, дегустационная комиссия специалистов в области пива.

Ячмень.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения зерна зерновых культур, которые необходимо использовать со способами настоящего изобретения, представляют собой зерна ячменя.

Указанные зерна могут быть зернами любого растения ячменя. Однако в некоторых вариантах осуществления растение ячменя может содержать одну или несколько конкретных характеристик, например одну или несколько характеристик, описанных ниже в данном документе. Даже хотя различные характеристики обсуждаются отдельно ниже в данном документе, растение ячменя настоящего изобретения может иметь комбинацию этих характеристик.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения ячмень может быть сортом (с.) голозерного ячменя. Также в настоящем изобретении рассматривается, что ячмень является сортом ячменя с тонкой шелухой от природы, таким как сорт Admiral. Например, шелуха может составлять менее 7% всей массы зерна и шелухи.

Как указано выше, предпочтительно, чтобы водный экстракт, полученный при затирании, имел вязкость, достаточно низкую для обеспечения хорошей фильтруемости заторной смеси. Как также описано более подробно ниже, растворимые β -глюканы могут способствовать высокой вязкости водного экстракта. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы использовали растение зерновой культуры и, в частности, растение ячменя с низким уровнем β -глюкана, например, без β -глюкана, например, уровнем β -глюкана, который ниже уровня обнаружения. Эти растения ячменя известны в данной области и включают, например, растения ячменя имеющие мутацию в гене, кодирующем β -глюкансинтазу.

Указанный ген может быть геном, кодирующим полипептид SEQ ID NO: 2, указанный в US 2012/0030784. Например, растение ячменя может быть ячменем, содержащим лишенный β -глюкана ген, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 18 US 2012/0030784. Растение ячменя также может быть таким, которое содержит ген с подавленным CslF6, что дает зерна ячменя с очень низкими уровнями (1,3; 1,4)- β -глюкана (как описано Taketa и соавт., 2011).

Растение ячменя также может быть растением ячменя с низким уровнем активности LOX. Такие растения ячменя известны в данной области и включают, например, растения ячменя, имеющие мутацию в гене, кодирующем LOX-1, например, растение ячменя может быть растением ячменя, имеющим любые мутации в гене LOX-1, описанные в WO 02/053721, WO 2005/087934 и WO 2004/085652.

Растение ячменя также может быть растением ячменя, имеющим мутацию в гене, кодирующем липоксигеназу 1 (LOX-1), и/или в гене, кодирующем LOX-2. Например, растение ячменя может быть растением ячменя, имеющим любые мутации в генах LOX-1 и LOX-2, описанных в WO 2010/075860.

Растение ячменя также может быть растением ячменя с низким уровнем активности MMT. Такие растения ячменя известны в данной области и включают, например, растения ячменя, имеющие мутацию в гене, кодирующем MMT. В частности, растение ячменя может быть растением ячменя, имеющим любые мутации в гене MMT, описанным в WO 2010/063288. Растение ячменя также может быть любыми растениями ячменя, описанными в WO 2011/150933.

Растение ячменя также может быть растением ячменя, характеризующимся повышенным сигналингом GA. В частности, растение ячменя может быть растением ячменя, имеющим мутацию в гене Slender I, который кодирует белок DELLA. Например, растение ячменя может быть растением ячменя, имеющим любые мутации, описанные Chandler et al., Journal of Experimental Botany, Vol. 64, No. 6, p. 1603-1613, 2013, doi:10.1093/jxb/ert022, например, в табл. 1. Например, растение ячменя может иметь мутацию в гене Slender I, что дает мутантный ген Slender I, кодирующий мутантный белок DELLA, причем указанный мутантный белок DELLA имеет мутацию в одной или нескольких аминокислотах под номерами 46, 490, 280, 268, 271, 277, 231, 481, 282, 277, 227, 485 или 237, например, мутацию, выбранную из группы, состоящей из G46E, S490F, R268H, G271D, A277T, V231M, R481H, V282F, A277T, G227E, S485F и C237Y. Нумерация аминокислот дана относительно последовательности белка DELLA, доступного под номером доступа в Genbank AK372064 или AF035820 (версия от 4 февраля 2013 г.).

Напиток.

Напитки, полученные переработкой водного экстракта согласно настоящему изобретению в напиток, могут иметь ряд полезных свойств, включая, помимо прочего, свойства, описанные в этом разделе.

В общем, желательно, чтобы напитки согласно настоящему изобретению содержали насколько возможно мало диацетила. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы напиток содержал диацетил на уровне, который ниже порогового значения, рассматриваемого посторонним привкусом в светлом пиве. Предпочтительно напиток содержит самое большее 30 ч./млрд диацетила, более предпочтительно самое большее 25 ч./млрд диацетила, еще более предпочтительно самое большее 20 ч./млрд диацетила. В частности, это происходит в случае, если напиток является пивом, например светлым пивом.

Напиток согласно настоящему изобретению может, например, быть водным экстрактом, как описано в данном документе, который необязательно может быть ферментирован. Таким образом, напиток может содержать или состоять из указанного водного экстракта или ферментированного водного экстракта и необязательно одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения могут, например, быть любыми из дополнительных соединений, описанных в данном документе ниже в разделе "Дополнительные соединения".

Дополнительные соединения.

Способы настоящего изобретения могут предусматривать стадию добавления одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения могут, например, быть ароматизатором, консервантом, функциональным ингредиентом, красителем, подсластителем, регулирующим pH средством или солью. Регулирующее pH средство может, например, быть буфером или кислотой, такой как фосфорная кислота.

Функциональные ингредиенты могут быть любым ингредиентом, добавленным для получения заданной функции. Предпочтительно функциональный ингредиент делает напиток здоровее. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают витамины или минералы.

Консервант может быть любым пищевым консервантом, например он может быть бензойной кислотой, сорбиновой кислотой, сорбатами (например, сорбатом калия), сульфитами и/или их солями.

Дополнительное соединение также может быть CO_2 . В частности, CO_2 можно добавлять для получения газированного напитка.

Ароматизатор, который можно использовать с настоящим изобретением, может быть любым пригодным ароматизатором. Ароматизатор можно, например, выбирать из группы, состоящей из придающих аромат веществ, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растений и настоев трав. В частности, ароматизирующие соединения могут быть хмелем.

Настоящее изобретение можно также описывать следующими пунктами.

1. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

- a) обеспечение зерна зерновой культуры;
- b) инкубация указанного зерна в водном растворе, пока зерна не будут иметь содержание воды по меньшей мере 35%, причем по меньшей мере 2 л O_2 на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час, при этом получая пророщенное зерно;
- c) тонкое измельчение указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 35%;
- d) получение водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

2. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

- a) обеспечение зерна зерновой культуры;
- b) подвергание зерна зерновых культур стадии проращивания, при этом получая пророщенное зерно, причем указанная стадия проращивания предусматривает инкубацию указанного зерна в водном растворе, пока зерно не будет иметь содержание воды по меньшей мере 35%, причем по меньшей мере 2 л O_2 на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час;
- c) тонкое измельчение указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 20%; при условии, что указанное зерно зерновых культур не имеет содержание воды ниже 20% в любое время между стадиями (b) и (c);
- d) получение водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное зерно инкубируют в указанном водном растворе в течение 20-72 ч.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерно зерновой культуры погружают в водный раствор на всю стадию проращивания.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерно зерновой культуры погружают в водный раствор, причем по меньшей мере 2 л O_2 на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час в течение 24-60 ч, предпочтительно в течение 40 -55 ч.

6. Способ по любому из пп.1-3, в котором стадия проращивания предусматривает:

- i) по меньшей мере одну стадию инкубации указанного зерна в водном растворе, причем по меньшей мере 2 л O_2 на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час; и
- ii) по меньшей мере одну стадию инкубации указанного зерна зерновых культур на воздухе.

7. Способ по п.6, в котором указанную по меньшей мере одну стадию инкубации указанного зерна в водном растворе проводят в течение 16-40 ч, предпочтительно в течение 20-30 ч.

8. Способ по любому из пп.6, 7, в котором стадию инкубации указанного зерна зерновых культур на воздухе проводят с аэрацией.

9. Способ по любому из пп.6-8, в котором стадию инкубации указанного зерна зерновых культур на воздухе проводят в течение 18-50 ч, более предпочтительно в течение 18-38 ч, например, в течение 22-35 ч.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором вся стадия проращивания не превышает 72 ч, более предпочтительно не превышает 60 ч, еще более предпочтительно не превышает 54 ч.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный водный раствор представляет собой воду.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ также предусматривает добавление гиббереллиновой кислоты (GA) в водный раствор.

13. Способ по п.12, в котором указанную GA добавляют в водный раствор в концентрации по

меньшей мере 100 нМ, например, по меньшей мере 1000 нМ.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O_2 на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере 20 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, более предпочтительно по меньшей мере 30 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 40-100 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 40-80 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур, например, в диапазоне 60 г O_2 на 1 кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) пропускают через указанную смесь водного раствора/зерна зерновых культур в час.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный O_2 содержится в газовой смеси.

17. Способ по п.16, в котором газовая смесь представляет собой атмосферный воздух.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере 10 л, предпочтительно по меньшей мере 15 л, более предпочтительно по меньшей мере 20 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 30 л атмосферного воздуха на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновых культур пропускают через указанный водный раствор в час.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный раствор дополнительно содержит противовспенивающее средство.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором инкубацию проводят при температуре в диапазоне 15-30°C, предпочтительно при приблизительно 25°C.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерно выдерживают в той же емкости на стадии (b).

22. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерно зерновых культур инкубируют в указанном водном растворе, пока оно не будет иметь содержание воды по меньшей мере 35%, например, по меньшей мере 37%.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерно, обеспеченное на стадии (a), было обработано противомикробным средством.

24. Способ по п.23, в котором противомикробное средство представляет собой пероксид, например пероксид водорода.

25. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ не предусматривает стадию удаления проростков.

26. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерновая культура представляет собой шелушеную зерновую культуру, например шелушенный ячмень.

27. Способ по п.26, причем способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной шелухи перед инкубацией указанного зерна в водном растворе.

28. Способ по п.27, в котором удаление указанной шелухи приводит к потере в диапазоне 1-4%, например, к потере в диапазоне 1,5-3,0% от всей массы зерна зерновых культур.

29. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

А) обеспечения пророщенного зерна зерновой культуры с содержанием воды по меньшей мере 35%;

В) тонкого измельчения указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 35%;

С) получения водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

30. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

А) обеспечения пророщенного зерна зерновой культуры с содержанием воды по меньшей мере 20% при условии, что указанное зерно зерновых культур не имело содержание воды ниже 20% в любое время после проращивания;

В) тонкого измельчения указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 20%;

С) получения водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно зерновых культур имеет содержание воды по меньшей мере 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере 35% в любое время при тонком измельчении указанного зерна зерновых культур.

32. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно зерновых культур не имело содержание воды менее 25%, еще более предпочтительно менее 30%, еще более предпочтительно

тельно менее 35% в любое время между завершением стадии прорастивания и временем тонкого измельчения указанного зерна зерновых культур.

33. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерновая культура представляет собой ячмень.

34. Способ по п.33, в котором ячмень представляет собой голозерный ячмень или сорт ячменя с тонкой шелухой.

35. Способ по любому из пп.1-32, в котором зерновая культура представляет собой голозерную зерновую культуру, например, пшеницу или голозерный ячмень.

36. Способ по любому из пп.1-33, в котором зерновая культура представляет собой шелушеную зерновую культуру, такую как шелушенный ячмень.

37. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерновая культура представляет собой ячмень, характеризующийся одним или несколькими из следующего:

A) наличие мутации в гене, кодирующем β -глюкансинтазу,

B) наличие мутации в гене, кодирующем LOX-1,

C) наличие мутации в гене, кодирующем LOX-2,

D) наличие мутации в гене, кодирующем MMT; и/или

E) наличие мутации в гене, кодирующем DELLA.

38. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно имеет α -амилазную активность по меньшей мере 4 ед/г, предпочтительно по меньшей мере 30 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

39. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно имеет α -амилазную активность по меньшей мере 100 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

40. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно имеет β -амилазную активность по меньшей мере 5 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно имеет активность конечной декстриназы по меньшей мере 5 мед/г зерна в пересчете на сухую массу.

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно содержит самое большее 4 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество).

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно содержит самое большее 2 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество).

44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пророщенное зерно непосредственно перед стадией его тонкого измельчения имеет содержание нитрозаминов самое большее 0,15 мкг/кг, предпочтительно самое большее 0,12 мкг/кг, например, самое большее 0,10 мкг/кг зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество).

45. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадия С. предусматривает затирание указанного размолотого пророщенного зерна раствором для затирания при температуре в диапазоне 50-80°C.

46. Способ по п.45, в котором указанное затирание выполняют в присутствии одного или нескольких добавленных гидролитических ферментов.

47. Способ по п.46, в котором по меньшей мере один гидролитический фермент выбирают из группы, состоящей из разлагающих клеточные стенки и крахмал ферментов, включая, помимо прочего, α -амилазу, β -амилазу, конечную декстриназу, пуллулазу, β -глюканазу, ксиланазу, глюкоамилазу и протеазу.

48. Способ по п.45, в котором указанное затирание выполняют в присутствии по меньшей мере одной β -глюканазы и по меньшей мере одной ксиланазы.

49. Способ по любому из пп.45-48, в котором самое большее 700 ед, предпочтительно самое большее 350 ед экзогенной глюкоамилазы и/или α -амилазы на г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) добавляют при указанном затирании.

50. Способ по любому из пп.45-49, в котором самое большее 100 PUN экзогенной пуллулазы на г пророщенных зерном зерновых культур (в пересчете на сухую массу) добавляют при указанном затирании.

51. Способ по любому из пп.45, 46 и 49, 50, в котором зерновая культура характеризуется низким уровнем β -глюкана в зерне и в котором β -глюканазу не добавляют при затирании.

52. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ дополнительно предусматривает стадию фильтрации указанного водного экстракта.

53. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный экстракт имеет фильтруемость по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный экстракт содержит самое большее 200 мг/л β -глюкана.

55. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный экстракт содержит по меньшей мере 10 г, например, по меньшей мере 15 г мальтозы на 1 л.

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный экстракт содержит в диапазоне от 150 до 400 мг/л FAN.

57. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором водный экстракт содержит по меньшей мере 60 мг/л, предпочтительно по меньшей мере 65 мг/л валина.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ не предусматривает стадию печной сушки.

59. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

i) получения водного экстракта при помощи способа по любому из предшествующих пунктов;

ii) переработки указанного экстракта в напиток.

60. Способ по п.59, в котором стадия (ii) предусматривает стадии:

a) нагревание указанного водного экстракта необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;

b) охлаждение водного экстракта;

c) ферментация указанного водного экстракта при помощи дрожжей, при этом получая ферментированный напиток.

61. Способ по п.60, причем способ дополнительно предусматривает стадию осаждения, проводимую после стадии (a) или стадии (b).

62. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем весь способ проводят в одном месте.

63. Способ по любому из пп.59-62, в котором напиток содержит самое большее 25, например, самое большее 20 ч./млрд диацитила.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно показано следующими примерами. Однако их не следует рассматривать как ограничение настоящего изобретения. Образцы ячменя, используемые в примерах в данном документе ниже, все были анализированы следующим образом.

Тест на проращивание.

Все образцы ячменя, используемые в примерах, оценивали на параметры индекса проращивания, энергии проращивания и чувствительности к воде. Данные основаны на размере образца из 100 зерен ячменя для теста в 4 мл на проращивание и размере образца из 100 зерен ячменя для теста в 8 мл на проращивание согласно способу Analytica-EBC 3.6.2 Энергия проращивания ячменя (способ BRF).

Получение характеристик образцов ячменя.

Массы тысяч зернышек определяли автоматическим подсчетом при помощи устройства Data Count JR, тогда как фракционирование по размеру, используя Pfeuffer Sortimat K3, разбивали по 4 классам различного зерна с (X): $X > 2,8$ мм; $2,8 < X < 2,5$ мм; $2,5 < X < 2,2$ мм; $X < 2,2$ мм. Данные фракционирования по размеру рассчитывали на основе 100 г образцов зерна.

Содержание белка, воды и крахмала в образцах ячменя определяли при помощи прибора Foss 1241 NIT, используя калибровку ячменя (FOSS BY213271; обеспеченный Foss, Дания). Перед (например, за 24 ч) инкубацией в водном растворе содержание воды 100 г образцов зерна повторно определяли при помощи прибора Foss 1241 NIT, используя калибровку ячменя Foss BY303300 (Foss, Дания).

Содержание воды в зерне определяли путем измерения сначала массы соответствующего образца ячменя, а затем сушкой указанного образца и определением массы высушенного образца. Разницу массы влажного и сухого образца рассматривают как воду, и содержание воды равняется массе воды, поделенной на общую массу образца (влажного образца).

Анализ пророщенного зерна.

Образцы пророщенного зерна тестировали на следующие параметры (мас./мас.): содержание воды, содержание белка, растворимый белок и экстракт образца солода. Значения определяли при помощи прибора Foss 1241 NIT, откалиброванного согласно данным, представленным Foss (Дания; калибровка MA000010).

Пример 1. Одностадийное замачивание и проращивание.

В лабораторных экспериментах 1 кг сухого зерна ячменя помещали в цилиндр из Plexiglass и постоянно аэрировали атмосферным воздухом снизу столбца зерна. Схематическое изображение используемого оборудования представлено в данном документе на фиг. 8. Зерно аэрировали снизу различными уровнями атмосферного воздуха в течение различных периодов времени, в течение которых содержание влаги в зерне повышалось, как показано в табл. 1, и начиналось проращивание. Различные сорта ячменя, как указано на легенде фигуры, использовали в этом анализе. Поток воздуха устанавливали при помощи массового расходомера SmartTrak® 50 и контроллера (Sierra, Калифорния, США) и температуру измеряли при помощи точного термометра Testo 735 (Testo, Германия).

Датчики для измерения потока воздуха, температуры, pH, проводимости, окислительно-восстановительного потенциала и содержания O_2 воды для замачивания включали в эту систему. Датчики позволяли не только контролировать процесс в режиме реального времени, но также регулировать условия замачивания и проращивания во время процессов; этот уровень контроля невозможен путем

следования существующим протоколам осоложивания и пивоварения.

Зерно линии голозерного ячменя переносили в цилиндр из Plexiglas и сначала инкубировали в течение 3 ч в 1% РЗ-гипохлоране (Ecolab, Швейцария) после инкубирования в течение 45 ч в воде, регулируемой 1 нМ гиббереллиновой кислотой (GA) и 0,01% Foamazol FCD511 (AB Vickers, Бертон-апон-Трент, Великобритания). Инкубацию проводили или при 15, или 25°C и зерно аэрировали или 30, 60, 90, или 120 л/ч атмосферного воздуха. Образцы собирали через 24 и 48 ч. Результаты подытожены на фиг. 2. Как показано, доступ воздуха сильно ускорял проращивание ячменя. При сравнении с неаэрированным образцом (0 л/ч) все образцы, подвергнутые действию потока воздуха, характеризовались заметной разницей развития зерна. В частности, зерно имело видимый росток более 1 мм даже через 24 ч, при 15°C и 30 л/ч потока воздуха. Повышение потока воздуха вызывало дополнительное развитие ростка через 24 ч при 15°C. При 25°C некоторые зерна даже показывали видимые проростки (60, 90 или 120 л/ч). Увеличение времени инкубации приводило к улучшению роста, причем все зерна, подвергнутые действию потока воздуха, характеризовались проращиванием и развитием видимых проростков через 48 ч. С увеличением температуры инкубации было повышение роста ростков и проростков. Поток воздуха 90 л/ч соответствовал 51 г O₂ в час. Если рассчитывали как O₂ на 1 л H₂O, количество будет изменяться с течением времени, поскольку зерна зерновых культур поглощали воду при инкубации. Обычно поток воздуха 90 л/ч соответствует 64-121 г O₂ на 1 л H₂O в час.

Такой же эксперимент проводили при помощи зерна линии шелушеного ячменя, и результаты подытожены на фиг. 3. Зерна линии шелушеного ячменя также имели видимый росток более 1 мм после инкубации через 24 ч, при 25°C и 30 л/ч потока воздуха. Увеличение времени инкубации приводило к улучшению роста со всеми зернами, подвергнутыми действию потока воздуха 60 л/ч, характеризующимися проращиванием и развитием видимых проростков через 48 ч.

Поглощение воды зерном показывали определением содержания воды в виде % (мас./мас.) в линии голозерного ячменя и в линии шелушеного ячменя, при 15 и 25°C, как описано выше. Результаты подытожены в табл. 1 (голозерный ячмень) и табл. 2 (шелушенный ячмень). Содержание воды, по-видимому, не сильно зависело от потока воздуха, если поток воздуха составлял по меньшей мере 30 л/ч. Напротив, содержание воды было намного больше через 24 ч при 25°C, чем при 15°C.

Таблица 1

Поглощение воды (%), зерна голозерного ячменя

Поток воздуха	Температура (T) = 15°C			T = 25°C		
	0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч
0 л/ч	11,4	31,7 ± 0,6	37,1 ± 1,4	11,4	36,7 ± 1,3	43,3 ± 0,9
30 л/ч	11,4	35,5 ± 1,5	41,5 ± 1,8	11,4	40,6 ± 0,5	46,0 ± 0,1
60 л/ч	11,4	35,1 ± 1,0	42,0 ± 1,2	11,4	38,9 ± 0,1	46,5 ± 0,6
90 л/ч	11,4	34,3 ± 0,9	42,6 ± 1,4	11,4	38,3 ± 1,7	45,7 ± 0,5
120 л/ч	11,4	35,5 ± 0,8	43,2 ± 1,1	11,4	38,2 ± 2,2	44,9 ± 0,6

Таблица 2

Поглощение воды (%), зерна шелушеного ячменя

Поток воздуха	Температура (T) = 15°C			T = 25°C		
	0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч
0 л/ч	13,6	32,5 ± 0,7	36,5 ± 0,3	13,6	38,3 ± 0,6	42,6 ± 0,7
30 л/ч	13,6	33,4 ± 0,3	39,0 ± 0,4	13,6	39,3 ± 0,2	46,7 ± 0,6
60 л/ч	13,6	32,9 ± 0,7	39,4 ± 0,6	13,6	39,7 ± 1,2	47,9 ± 0,2
90 л/ч	13,6	34,1 ± 0,3	38,5 ± 0,2	13,6	40,3 ± 0,4	47,2 ± 0,5
120 л/ч	13,6	33,3 ± 0,5	39,0 ± 0,4	13,6	40,1 ± 0,3	47,3 ± 0,8

Следовательно, результаты настоящего изобретения показывают, что температура 25°C может быть более предпочтительной для ранних скоростей поглощения воды зерном и, таким образом, общей скорости проращивания.

Пример 2. Ферментативная активность.

При проращивании зерно ячменя начинает секретировать диапазон гидролитических ферментов, таких как α-амилазы, конечные декстриназы и (1,3; 1,4)-β-глюканазы. Обычно эти ферментативные активности обнаруживают зависящим от времени образом, причем активности α-амилазы, β-амилазы и/или конечной декстриназы пригодны в качестве общего маркера активности гидролитических ферментов. Таким образом, активности α-амилазы и конечной декстриназы определяли после проращивания, выполняемого согласно способу настоящего изобретения.

GA является фитогормоном, который активирует алейроновый слой в прорастающем ячмене. Многие солодовники добавляют GA в низкой концентрации в процессе осоложивания. Здесь различные концентрации GA добавляют в воду для инкубации зерна в начале процесса. Раствор GA₃ получали из гиббереллиновой кислоты (G7645, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в абсолютном этаноле и добавляли в воду. Ферментативные активности контролировали изменением активностей гидролитических ферментов в экстрактах зерна через 24 и 48 ч.

Получение образцов.

Перед анализом ферментативной активности образцы пророщенного зерна размалывали при помощи стандартной мельницы Foss Cyclotech (Foss, Дания), оборудованной шлифовальным кольцом из карбида вольфрама (Foss 10004463), никелированной мешалкой (Foss 1000 2666) и экраном с выпускными отверстиями в 1 мм (Foss 10001989). Все измерения ферментативной активности в пророщенном зерне ячменя проводили в течение 48 ч после размола образца.

α -Амилазная активность.

α -Амилазная активность пророщенного зерна была основана на муке, полученной, как описано выше в разделе "Получение образцов". Анализы по определению α -амилазной активности использовали набор Ceralpha от Megazyme при помощи стандартного лабораторного оборудования. Анализы проводили согласно протоколу изготовителя (K-CERA 01/12), включая расчет α -амилазной активности.

β -Амилазная активность

При измерении β -амилазной активности пророщенного зерна муку получали, как описано выше в разделе "Получение образцов". Анализы на β -амилазную активность выполняли, следуя рекомендациям представленным с набором Betamyl от Megazyme (K-BETA3).

Активность конечной декстриназы.

Для измерения активности конечной декстриназы в пророщенном зерне муку получали, как описано выше в разделе "Получение образцов". Активность конечной декстриназы определяли при помощи набора Limit Dextrizyme T-LDZ1000 от Megazyme. Анализы, включая измерения активности, проводили согласно протоколу изготовителя (T-LDZ1000 07/9).

Активности α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы определяли в линии голозерного ячменя. Зерна ячменя проращивали, главным образом как описано в примере 1, путем инкубации в воде в присутствии 0,01% FCD511 Foamzol и различных количеств GA с аэрацией. Поток воздуха устанавливали на 90 л/ч при помощи массового расходомера SmartTrak® 50 и контроллера (Сьерра, Калифорния, США) без санитарной обработки при 25°C (измерено при помощи точного термометра Testo 735, Testo, Германия). Ферментативные активности в пророщенном зерне измеряли через 24 и 48 ч после начала, причем результаты показаны на фиг. 4.

Кроме того, активности α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы определяли как в линии голозерного ячменя, так и линии шелушеного ячменя. Зерна ячменя проращивали главным образом как описано в примере 1 путем инкубации в воде в присутствии 0,01% FCD511 Foamzol и 1000 нМ GA с аэрацией. Различный поток воздуха использовали, как показано в табл. 3 и 4, при помощи массового расходомера SmartTrak® 50 и контроллера (Сьерра, Калифорния, США) без санитарной обработки при 25°C (измерено при помощи точного термометра Testo 735, Testo, Германия).

Ферментативные активности в пророщенном зерне измеряли через 24 и 48 ч, причем результаты показаны в табл. 3 (голозерный ячмень) и табл. 4 (шелушенный ячмень).

Таблица 3

Ферментативные активности в зерне голозерного ячменя

Поток воздуха		Температура (T) = 15°C			T = 25°C		
		0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч
0 л/ч	$\alpha^*)$	1,1 ± 0,2	0,2 ± 0,2	н.о.	1,1 ± 0,2	н.о.	н.о.
	$\beta^{**})$	18,6 ± 0,3	19,4 ± 0,1	16,2 ± 2,6	18,6 ± 0,3	15,8 ± 0,6	16,8 ± 1,6
	LD ^{***)}	1,6 ± 2,2	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,9	1,6 ± 2,2	1,1 ± 1,6	1,4 ± 0,8
30 л/ч	α	1,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	13,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	5,2 ± 0,7	33,1 ± 0,6
	β	18,6 ± 0,3	13,8 ± 0,3	18,3 ± 1,8	18,6 ± 0,3	16,3 ± 0,8	19,6 ± 0,6
	LD	1,6 ± 2,2	4,6 ± 3,3	5,5 ± 0,9	1,6 ± 2,2	5,2 ± 0,6	14,0 ± 3,1
60 л/ч	α	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	13,4 ± 0,8	1,1 ± 0,2	5,2 ± 0,1	48,3 ± 1,6
	β	18,6 ± 0,3	15,0 ± 1,8	18,6 ± 2,1	18,6 ± 0,3	15,5 ± 2,0	16,9 ± 3,7
	LD	1,6 ± 2,2	3,6 ± 0,2	7,5 ± 2,9	1,6 ± 2,2	4,8 ± 1,9	19,6 ± 2,5
90 л/ч	α	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	13,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2	5,2 ± 0,1	59,3 ± 2,3
	β	18,6 ± 0,3	16,7 ± 1,6	16,9 ± 1,4	18,6 ± 0,3	15,1 ± 3,6	17,7 ± 2,5
	LD	1,6 ± 2,2	1,5 ± 1,4	7,5 ± 0,6	1,6 ± 2,2	4,0 ± 1,6	26,0 ± 3,3
120 л/ч	α	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	12,7 ± 0,7	1,1 ± 0,2	4,9 ± 0,1	59,3 ± 0,9
	β	18,6 ± 0,3	16,9 ± 1,8	17,7 ± 1,7	18,6 ± 0,3	14,6 ± 3,1	18,6 ± 3,4
	LD	1,6 ± 2,2	2,1 ± 1,0	7,6 ± 0,4	1,6 ± 2,2	2,0 ± 0,4	22,4 ± 0,7

*) α -амилазная активность (ед/г);

**) β -амилазная активность (ед/г);

***) активность свободной конечной декстриназы (мед/г).

Таблица 4

Ферментативные активности в зерне шелушеного ячменя*)

Поток воздуха		Температура (T) = 15°C			T = 25°C		
		0 ч	24 ч	48 ч	0 ч	24 ч	48 ч
0 л/ч	α	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
	β	17,1 ± 0,7	19,2 ± 1,7	18,2 ± 1,0	17,1 ± 0,7	12,8 ± 1,4	10,7 ± 0,5
	LD	н.о.	2,7 ± 2,6	н.о.	н.о.	1,6 ± 2,2	1,6 ± 0,2
30 л/ч	α	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	1,9 ± 2,7
	β	17,1 ± 0,7	17,3 ± 1,7	11 ± 2,7	17,1 ± 0,7	12,1 ± 1,4	14,5 ± 0,4
	LD	н.о.	2,7 ± 0,6	н.о.	н.о.	0,3 ± 0,4	2,1 ± 0,6
60 л/ч	α	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	4,4 ± 6,2
	β	17,1 ± 0,7	18,9 ± 0,5	11,0 ± 0,7	17,1 ± 0,7	9,8 ± 0,9	17,5 ± 1,2
	LD	н.о.	0,6 ± 0,8	н.о.	н.о.	0 ± 1,8	5,1 ± 0,4
90 л/ч	α	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	4,1 ± 5,8
	β	17,1 ± 0,7	18,6 ± 1,0	10,3 ± 1,0	17,1 ± 0,7	9,3 ± 0,6	17,2 ± 1,2
	LD	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0 ± 1,4	9,2 ± 2,6
120 л/ч	α	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	9,3 ± 0,2
	β	17,1 ± 0,7	18,6 ± 0,6	10,9 ± 1,3	17,1 ± 0,7	9,2 ± 0,6	16,0 ± 1,2
	LD	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	2,4 ± 0,6	8,0 ± 2,2

*) Сокращения идентичны легенде к табл. 3;

н.о. = не определено.

Как показано на фиг. 4, уровни как α -амилазы, так и конечной декстриназы значительно повышались после добавления GA.

Пример 3. Затириание.

Зерна ячменя проращивали, как описано в настоящем документе выше в примере 1. Через 2 дня непрерывного замачивания и проращивания, жидкую фазу сливали с зерен и зерна размалывали во влажном состоянии в лабораторном гомогенизаторе (Omega Juicer 8226, Omega, США). Экстракцию размолотого зерна в воде проводили при помощи схемы затириания, показанной на фиг. 5. Этот процесс можно также называть "затирианием". При затириании обычно также происходило засахаривание. При затириании CaCl_2 и H_3PO_4 обычно добавляли в воду.

Во время процесса промышленного затириания препараты экзогенных ферментов можно добавлять для продолжения превращения частично разложившегося крахмала, запасного белка и полисахаридов клеточной стенки в сбраживаемые сахара и аминокислоту, которые затем поддерживают рост дрожжей при брожении. Сравнивали характеристики затириания в присутствии и в отсутствие смеси ферментов Ultraflo Max для пивоварения (Novozymes, Дания). Ultraflo Max представляет собой смесь ферментов, содержащую β -глюканазную и ксиланазную активности. После затириания экстракты фильтровали при помощи стандартного заторного фильтра.

Эффективность смеси экзогенных ферментов тестировали путем измерения фильтруемости заторной смеси, которая оставалась после процесса затириания. Фильтруемость определяли при помощи фильтровальной воронки с внутренним диаметром сверху 140 мм (Urbanti Pequannock, Нью-Джерси, США), оборудованной MN 614 $\frac{1}{4}$ Ø 320 мм REF 527032 (Macherey Nagel, Дюрен, Германия). Массу образцов записывали при помощи стандартных весов (MPB1502L, Mettler Toledo, Швейцария). Фильтруемость определяли как общее количество жидкости, полученной после фильтрации в течение 60 мин заторной смеси, содержащей 400 мл раствора для затириания, ранее дополненного 100 г размолотого, проросшего ячменя.

Результаты эксперимента подытожены на фиг. 6 для зерна линии голозерного ячменя, которое проращивали в течение 48 ч при 25°C с аэрацией, как описано для эксперимента, подробно описанного в примере 1.

Пример 4. Сусло.

Сусло получали, как подробно описано в экспериментах примера 3, используя проросшее зерно ячменя, полученное как описано в примере 1. Зерно ячменя из голозерной линии инкубировали в течение 48 ч при 25°C в присутствии GA, как описано в примере 1, с аэрацией атмосферным воздухом или 45, или 90 л/ч. Проросшее зерно ячменя размалывали во влажном состоянии и затирали, как описано в примере 3, или в присутствии, или в отсутствие смеси ферментов Ultraflo Max (Novozymes, Дания).

Уровни сбраживаемых сахаров - фруктозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы и мальтотриозы - определяли следующим образом. После кипения сусла его разбавляли 1:2000 водой milliQ, а затем фильтровали через 0,2 мкм нейлоновой мембранный фильтр (Titan3 30 мм, Thermo Scientific, Калифорния, США). Аликвоты по 10 мкл сначала помещали в колонку CarboPac SA10-4 мкм, а затем анализировали на безреагентной системе для ВЭЖХ Dionex ICS 5000+, оборудованной предколонкой CarboPac SA10-4 мкм (4×50 мм). Элюирование отдельных молекул проводили при помощи изократического 25 mM КОН в течение 20 мин. После вычитания исходного уровня и использования углеводов с чистотой для ВЭЖХ в качестве эталонных стандартов [d-(+)-глюкоза, d-фруктоза, d-(+)-мальтоза мальтотриоза], углеводы ко-

личественно определяли интегрированием площади пика. Результаты показаны на фиг. 7.

Пример 5 Брожение.

Сусло, полученное как описано в примере 3, кипятили в присутствии хмеля или экстракта из хмеля и процесс брожения начинали посредством обычной инокуляции экстракта с подходящим штаммом пивных дрожжей. Брожение, фильтрацию пива и бутилирование выполняли согласно традиционным протоколам.

Пивоварение небольших партий.

В примере сравнивают пиво, полученное из двух сортов ячменя, обработанных согласно способам, описанным в данном документе с пивом, полученным из несоложенного ячменя, обработанным коммерчески доступной смесью пивных ферментов. Сусло и готовое пиво анализировали и сравнивали с коммерческим эталонным светлым пивом (обозначенным "эталон" в данном документе), если возможно. Данные эталонного светлого пива получали отдельно от других источников.

Материал.

Если иное не указано, материал использовали как есть.

	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Сравнительный
Сорт ячменя	Голозерный 01	Шелушенный 02	Шелушенный 02	Голозерный 01	80% солод 20% ячмень
Обработка перед размолом	при 90 л/ч воздуха 24 ч WA 24 ч А	при 90 л/ч воздуха 24 ч WA 24 ч А	---	---	Солод, полученный стандартной процедурой

Размол.

Обработанный материал	Необработанный материал
Размалывали на бытовой соковыжималке (Omega J822C)	Размалывали на MULTICRACKER

Пивоварение.

Пивоварение выполняли при стандартных условиях при помощи отношения твердых частиц/воды 1-4.

	Обработанный материал (испытание 1 и 2)	Необработанный материал (испытание 3)	Необработанный материал (испытание 4)	Сравнительный
pH	5,20	5,70	5,70	Обычно 5,20
Добавление фермента	Ultraflo® Max, 0,2 г/кг DM Attenuzyme® Flex, 1,0 г/кг DM	Ondeapro®, 2,0 г/кг DM	Ondeapro®, 2,0 г/кг DM	Ultraflo® Max, 0,08 г/кг DM Attenuzyme® Core, 0,2 г/кг DM

Проросший ячмень, необработанный материал и/или солод затирали, используя стандартную программу затираания с двумя стадиями засахаривания в присутствии указанных ферментов.

Ultraflo® Max, Attenuzyme® Flex, Attenuzyme® Core и Ondeapro® доступны от Novozymes, Дания. Согласно данным изготовителя:

Ultraflo® Max содержит β-глюканазу (700 EGU/г) и ксиланазу (250 FXU/г);

Attenuzyme® Flex содержит глюкоамилазу (400 AGU/г) и пуллулазу (80 PUN/г) согласно информации о товаре от изготовителя;

Attenuzyme® Core содержит глюкоамилазу (1600 AGU/г);

Ondeapro® содержит β-глюканазу, ксиланазу, α-амилазу, пуллулазу (637 PUN/г), протеазу и липазу.

При определении активности Attenuzyme® Flex, как описано в примере 2, обнаружили, что использовали количество Attenuzyme® Flex, соответствующее 16243 мед активности конечной декстриназы ячменя на 1 г раствора ферментов. Кроме того, обнаружили, что объединенная активность глюкоамилазы и α-амилазы составляла 628863 ед на 1 г раствора ферментов.

Холодное сусло собирали после стандартной фильтрации и кипения сусла с добавленным хмелем в начале кипения.

Исходный экстракт доводили водопроводной водой для получения конечного плато (в %P) 11,5 после кипения и испарения и цвет сусла регулировали для получения цвета, аналогичного цвету эталонного пива.

Брожение.

Пивоваренные ферменты Clagex® (доступные от DSM) добавляли в холодное сусло при 0,1 г/кг DM, в сусло добавляли 8Е6 клеток/мл дрожжей нижнего брожения (*S. pastorianus*), дополненное сусло аэрировали воздухом в течение 30 мин, брожение проводили в безнапорном ферментационном чане при 15°C до конца брожения, закончившее бродить пиво выдерживали при 4°C до переноса в бак.

Перенос в бак.

Пиво с менее чем 5E5 клеток/мл в суспензии переносили в бак, бак продували CO₂ до 0,5 бар перед и после заполнения, CO₂ добавляли до повышенного давления 0,5 бар и пиво выдерживали при 4°C до фильтрации.

Фильтрация.

Пиво фильтровали через три слоя листов пористого фильтра, 1,2 бар CO₂ давления прикладывали к пиву в баке после фильтрации, пиво выдерживали при 4°C до упаковки.

Упаковка.

Пиво упаковывали в 33 мл бутылки и выдерживали при 4°C для окончательных тестов и органолептической оценки.

Результаты анализов сахара в сусле до брожения.

Концентрацию всех сбраживаемых сахаров определяли главным образом, как описано в примере 4, и результаты показаны в табл. 5. Уровни глюкозы заметно выше в обоих вариантах пива, полученных согласно способам настоящего изобретения, по сравнению с пивом, полученным из несоложенного ячменя.

Таблица 5

	Испытание 1		Испытание 2		Испытание 3		Испытание 4		Сравнительный	
	г/100 г/%P сусла	%	г/100 г/%P сусла	%	г/100 г/%P сусла	%	г/100 г/%P сусла	%	г/100 г/%P сусла	%
Сахароза	0,008	1,9	0,016	1,8	0,019	2,5	0,021	2,2	0,024	3,3
Глюкоза	0,202	47,4	0,497	56,3	0,054	7,1	0,046	4,8	0,333	46,1
Фруктоза	0,012	2,8	0,014	1,5	0	0,0	0,013		0,016	2,2
Мальтоза	0,193	45,3	0,338	38,3	0,533	70,8	0,651	68,7	0,312	43,2
Мальтотриоза	0,011	2,6	0,017	1,9	0,147	19,5	0,217	22,9	0,037	5,1

Свободный аминный азот и β-глюкан.

Концентрацию свободного аминного азота (FAN) в сусле перед брожением, а также в готовом пиве определяли согласно стандартному протоколу ThermoFisher, Gally Beermaster, для FAN, калориметрический метод. Обычные значения свободного аминного азота (FAN) в сусле составляют 200 мг/л. FAN важный для хорошей жизнеспособности дрожжей при брожении. В общем, желательны уровни FAN, которые достаточно высоки для получения хорошей жизнеспособности дрожжей. Результаты для FAN в сусле перед брожением показаны в табл. 6а и в пиве - в табл. 6б.

β-Глюкан обычно разлагается при обычном ослаживании. Слишком высокие уровни β-глюкана нежелательны, поскольку они могут вызывать проблемы с фильтрацией. Уровень β-глюкана в сусле перед брожением, а также в пиве определяли при помощи набор для "бета-глюкана (высокая MW)" от Thermo Scientific согласно инструкциям изготовителя, и результаты показаны в табл. 6а (сусло до брожения) и табл. 6б (пиво).

Таблица 6а

мг/л	Сусле перед брожением				Сравнительный
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	
FAN	265	177	104	118	219
бета-глюкан	143	107	86	151	73

Таблица 6б

мг/л	Пиво				Сравнительный
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	
FAN	116	36	50	55	104
бета-глюкан	60	50	44	58	46

Аминокислоты в сусле до брожения.

Концентрацию всех стандартных аминокислот в сусле до брожения определяли при помощи набора Waters AccQ-Tag Ultra, следуя описанной там процедуре. Результаты для аминокислот в сусле до брожения показаны в табл. 7.

В частности, важна концентрация валина до брожения. Чем больше валина присутствует в сусле, тем ниже вероятность образования "нежелательного диацетила" при брожении - и при этом более длительное время нахождения DA. Концентрация валина в 5 раз больше (испытание 1) и в 2 раза больше (испытание 2), чем в сусле, полученном согласно настоящему изобретению, по сравнению с испытанием 3.

Таблица 7					
мг/л сусла	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Сравнительный
Гистидин	20	30	17	23	56
Аспарагин	119	82	77	100	
Серин	8	44	26	43	67
Глутамин	79	45	10	16	
Аргинин	92	92	59	77	144
Глицин	58	34	18	21	36
Аспарагиновая кислота	9	54	45	53	79
Глутаминовая кислота	87	58	36	67	72
Треонин	81	44	26	33	77
Аланин	193	103	45	58	113
Пролин	317	105	38	70	
Цистеин	0	4	0	0	
Лизин	113	77	51	59	104
Тирозин	94	56	36	45	116
Метионин	37	24	17	21	42
Валин	153	71	31	50	132
Изолейцин	80	43	16	28	79
Лейцин	214	109	52	69	181
Фенилаланин	139	75	39	47	144
Триптофан	47	32	25	30	
Все аминокислоты	1960	1212	681	907	

Различные ключевые числа пивоварения и брожения определяли и сравнивали с эталоном. Результаты представлены в табл. 8. Отметим, что пиво, полученное способом настоящего изобретения, имело значительно более низкие уровни диацетила. Обычно предпочтительно, чтобы уровни диацетила были насколько возможно низкими.

Таблица 8					
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Сравнительный
Исходный экстракт, %P	11,4	11,5	11,7	11,5	10,1
RDF, %	70,8	70,5	74,9	72,5	70,3
pH	4,06	3,90	4,21	4,15	4,25
Спирт, об. %	5,2	5,2	5,6	5,4	4,54
Цвет, единицы EBC	5,4	8,0	5,4	7,1	6,4
Горечь	14	14	16	18	16
Диацетил, части на миллиард	14	15	27	28	22
SO ₂ , мг/л	1	1	1	1	3

Оценка органолептических свойств.

Все пиво, полученное, как описано в этом примере, подвергали оценке органолептических свойств. Общий показатель вкуса для них всех был приемлемым. Одним отличием между различным пивом было то, что пиво из испытания 3 имело показатель "заметно" для вкуса "мыльный, жирный, диацетил, маслянистый, прогорклый", тогда как пиво из испытания 2 (полученное согласно настоящему изобретению) имело только показатель "незначительно" для этого вкуса.

Пример 6.

Замачивание пшеницы.

Четыре коммерчески доступных сорта пшеницы (1-Benchmark, 2-Creator, 3-Pistoria, 4-Sheriff) дезинфицировали в течение 1 ч в 0,1% гипохлорана, затем пропитывали и проращивали инкубацией в баке в течение 24 или 48 ч в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA3 и 0,01% противовспенивающего средства (Sigma 204). Инкубацию проводили при 25°C и 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации.

После инкубации активности α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы определяли главным

образом, как описано в примере 2. Результаты показаны на фиг. 9. После 48 ч инкубации активность α -амилазы и конечной декстриназы значительно повышалась.

Пример 7.

Замачивание шелушеного ячменя.

Восемь коммерчески доступных сортов ячменя (1 - Alexis, 2 - Chief, 3 - Chill, 4 - Paustian, 5 - Planet, 6 - Prestige, 7 - Quench, 8 - Tipple) дезинфицировали в течение 1 ч в 0,1% гипохлорана, затем пропитывали и проращивали инкубацией в баке в течение 24 или 48 ч в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA3 и 0,01% противовспенивающего средства (Sigma 204). Инкубацию проводили при 25°C и 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации.

После инкубации активность α -амилазы определяли главным образом, как описано в примере 2. Результаты показаны на фиг. 10. После 48 ч инкубации активность α -амилазы значительно повышалась.

Пример 8.

Шелушение шелушеного ячменя.

Шелушенный ячмень (шелушенный 02) отшелушивали механической обработкой наждачной бумагой в течение 1, 2, 4 или 16 мин для частичного удаления шелухи. Обработка давала 1, 2, 3 или 5% потерю массы. Зерна обрушенного ячменя дезинфицировали в течение 1 ч в 0,1% гипохлорана, затем пропитывали и проращивали инкубацией в баке в течение 24 или 48 ч в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA3 и 0,01% противовспенивающего средства (Sigma 204). Инкубацию проводили при 25°C и 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации.

После инкубации активности α -амилазы, β -амилазы и конечной декстриназы определяли главным образом как описано в примере 2. Результаты показаны на фиг. 11. Обрушивание зерен ячменя до потери массы 2% давало значительно сниженные активности α -амилазы и конечной декстриназы.

Пример 9.

Воздушная выдержка голозерного и шелушеного ячменя.

Голозерный (голозерный 01) и шелушенный (шелушенный 02) ячмень дезинфицировали в течение 1 ч в 0,1% гипохлорана и замачивали и проращивали согласно различным режимам замачивания.

WA = вода/воздух.:

Инкубация в баке в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA3 и 0,01% противовспенивающего средства (Sigma 204) при 25°C, в то же время 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации.

A = воздух.

Инкубация влажного зерна зерновых культур в баке. В течение всей инкубации 90 л/ч воздуха пропускали через влажное зерно зерновых культур с нижней части бака. Инкубацию проводили при 25°C.

Зерна зерновых культур инкубировали в WA или WA и A в течение времени, указанного на фиг. 13, и результаты показаны на фиг. 13. На фиг. 12A показан результат для голозерного 01, а на фиг. 12B показан результат для шелушеного 02. 24 ч инкубации в воде с аэрацией с последующими 24-32 ч инкубации без воды, но все еще с аэрацией давали зерно зерновых культур с очень высокими ферментативными активностями.

Пример 10.

Проросший ячмень получали главным образом, как описано выше в примере 1. Более конкретно, зерна ячменя сортов голозерный 01 и шелушенный 02 дезинфицировали промывкой 0,1% гипохлорана в течение 1 ч, затем замачивали и проращивали инкубацией в течение 48 ч в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA и 0,01% противовспенивающего средства. Инкубацию проводили при 25°C и 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации. Проросший ячмень сушили замораживанием и взвешивали. Образовавшиеся проростки удаляли при помощи оборудования для пива "Старый Мюнхен" и проросший ячмень снова взвешивали. Разницу массы перед и после удаления проростков рассматривали как массу проростков. Массу четырех различных образцов определяли, но только три первых включали, поскольку последний образец содержал пыль. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

	Голозерный 01			Обшелушенный 02		
	Масса до (г)	Масса после (г)	Масса проростков (г)	Масса до (г)	Масса после (г)	Масса проростков (г)
1	99,864	98,822	1,042	99,882	99,387	0,495
2	100,024	99,135	0,889	99,871	99,47	0,401
3	98,599	97,629	0,97	99,704	99,282	0,422
среднее			0,97			0,44
стандартное отклонение			0,08			0,05

Зерна ячменя из той же партии голозерного 01 и шелушеного 02 также замачивали и проращивали в течение 96 ч стандартными способами. Проросший ячмень сушили замораживанием и взвешивали и

проростки удаляли при помощи оборудования для пива "Старый Мюнхен". После удаления проростков ячмень снова взвешивали и разницу массы до и после удаления проростков рассматривали как массу проростков. Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10

	Голозерный 01			Шелушенный 02		
	Масса до (г)	Масса после (г)	Масса проростков (г)	Масса до (г)	Масса после (г)	Масса проростков (г)
1	95,167	87,026	8,141	96,343	89,867	6,476
2	95,281	87,046	8,235	95,602	89,102	6,5
3	95,318	87,113	8,205	95,338	89,072	6,266
среднее			8,19			6,41
стандартное отклонение			0,05			0,13

В табл. 11 показано сравнение массы (в г) проростков ячменя, пророщенного способами настоящего изобретения (48 ч WA), и ячменя, замоченного обычными способами (осолаживание 96 ч). Очевидно, что ячмень, пророщенный способами настоящего изобретения, имел значительно сниженное образование проростков. На фиг. 13 показана потеря массы после удаления проростков в %.

Таблица 11

Шелушенный 02_ 48чWA	0,44	0,05
Голозерный 01_ 48чWA	0,97	0,08
Шелушенный 02_ осолаживание 96ч	6,41	0,13
Голозерный 01_ осолаживание 96ч	8,19	0,05

Пример 11.

Нитрозамин NDMA образуется, в частности, в корнях при обжиге солода (Wainwright (1986), J. Inst. Brew, 92, 73-80). Как описано в примере 10, преимуществом пророщенного зерна зерновых культур, полученных способами настоящего изобретения, является то, что они содержат меньше корней по сравнению с обычным свежепроросшим солодом. Содержание NDMA в существующем солоде низкое, однако может быть предпочтительно снижать уровни еще больше.

Содержание NDMA анализировали в ячмене, в пророщенном зерне ячменя, полученном согласно способам настоящего изобретения (обозначенном "солод 1a" в этом примере), и в трех промышленных солодах. Все промышленные солоды обрабатывали для удаления проростков стандартными способами.

Как ячмень-1, так и солод-1a и солод-1b получали из одной и той же партии сорта шелушенного ячменя (шелушенный 02), тогда как два других образца солода солод-2 и солод-3 получали из других партий ячменя. Солод-1a получали главным образом, как описано выше в примере 1. Таким образом, зерна ячменя дезинфицировали при помощи промывки 0,1% гипохлораном в течение 1 ч, затем замачивали и проращивали инкубацией в течение 48 ч в водопроводной воде, содержащей 1000 нМ GA и 0,01% противовспенивающего средства. Инкубацию проводили при 25°C и 90 л/ч воздуха пропускали через воду, подавая снизу бака, в течение всей инкубации.

Проросший ячмень сушили замораживанием перед анализом на содержание NDMA при помощи ГХ-МС. Результаты показаны на фиг. 14. Анализ явно показывал, что меньше NDMA присутствует в солоде-1a по сравнению с солодами, полученными стандартным осолаживанием, включающим печную сушку, даже хотя стандарт подвергали удалению стеблей.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Проблемы будущей нехватки воды и электроэнергии необходимо решать на основе принципов социальной, экономической и экологической ответственности. При этом настоящее изобретение способствует длительной устойчивости развития производства пива в отношении снижения использования воды и электроэнергии. Путем исключения процесса печной сушки вместе с прямым объединением замачивания и проращивания в процессе пивоварения применение способов настоящего изобретения значительно снизит капитальные и эксплуатационные расходы производства пива.

Настоящее изобретение может способствовать снижению капитальных затрат и снижению экологической нагрузки на промышленности осолаживания и пивоварения во многих отношениях, включая

процессы замачивания и проращивания, которые на данный момент требуют нескольких дней для завершения, можно осуществлять намного быстрее;

процессы замачивания и проращивания можно выполнять в одной емкости в одном месте;

традиционные стадии воздушной выдержки и второго замачивания процесса осолаживания можно исключить;

процессы могут иметь сниженное водопотребление, например до 40%;

дорогостоящее нагревание для печной сушки солода можно исключить;

дорогостоящие транспортные затраты для перемещения солода из солодовни на пивоварню можно исключить;

оборудование и установки, требуемые для выполнения способов настоящего изобретения, могут соответствовать существующему оборудованию в пивоварнях и не будут, таким образом, требовать больших новых капиталовложений.

Цитируемая литература

- Bamforth C (2009) In: Beer: Tap into the art and science of brewing. Oxford University Press.
- Briggs DE (1998) In: Malts and Malting. Blackie &, Professionals.
- Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Medhurst A, Stone BA, Newbigin EJ, Bacic A and Fincher GB (2006) Cellulose Synthase-like CslF Genes Mediate the Synthesis of Cell Wall (1,3;1,4)- β -D-Glucans. Science 311, 1940-1942.
- Burton RA, Jobling SA, Harvey AJ, Shirley NJ, Mather DE, Bacic A, Fincher GB (2008) The genetics and transcriptional profiles of the cellulose synthase-like HvCslF gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Physiol., 146: 1821-1833.
- Burton RA, Collins HM, Kibble NAJ, Smith JA, Shirley NJ, Jobling SA, Henderson M, Singh RR, Pettolino F, Wilson SM, Bird AR, Topping DL, Bacic A and Fincher GB (2011) Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- β -D-glucans and alters their fine structure. Plant Biotechnol. J., 9: 117-135.
- Fincher GB (2011) Biochemistry, Physiology and Genetics of Endosperm Mobilization in Germinated Barley Grain. In: Barley: Production, Improvements and Uses. Ed. Ullrich SE, Wiley-Blackwell, Chapter 14, pp 449-477.
- Smith AM, Zeeman S.C, Smith SM (2005) Starch Degradation. Annual Review of Plant Biology 56: 73-98.
- Taketa, S., Yuo, T., Tonooka, T., Tsumuraya, Y., Inagaki, Y., Haruyama, N., Larroque, O., and Jobling, S. A. (2011) Functional characterization of barley beta-glucan-less mutants demonstrates a unique role for CslF6 in (1,3;1,4)- β -D-glucan biosynthesis, J. Exp. Bot. 63, 381-392.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

- a) обеспечение зерна зерновой культуры;
- b) подвергание зерна зерновой культуры стадии проращивания, при этом получая пророщенное зерно, причем указанная стадия проращивания предусматривает инкубацию указанного зерна в водном растворе, пока зерно не будет иметь содержание воды по меньшей мере 30%, причем по меньшей мере 2 л O₂ на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновой культуры пропускают через указанный водный раствор в час;
- c) тонкое измельчение указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 20%; при условии, что указанное зерно зерновой культуры не имеет содержание воды ниже 20% в любое время между стадиями (b) и (c);
- d) получение водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

2. Способ по п.1, в котором зерно зерновой культуры погружают в водный раствор на время всей стадии проращивания.

3. Способ по п.1, в котором стадия проращивания предусматривает:

- i) по меньшей мере одну стадию инкубации указанного зерна в водном растворе, причем по меньшей мере 2 л O₂ на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновой культуры пропускают через указанный водный раствор в час; и
- ii) по меньшей мере одну стадию инкубации указанного зерна зерновой культуры на воздухе.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O₂ на 1 кг в пересчете на сухую массу зерна зерновой культуры пропускают через указанный водный раствор в час.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный O₂ содержится в газовой

смеси, причем газовая смесь представляет собой атмосферный воздух.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором вся стадия проращивания не превышает 72 ч, более предпочтительно не превышает 60 ч, еще более предпочтительно не превышает 54 ч.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерновая культура представляет собой шелушеную зерновую культуру, и способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной шелухи перед инкубацией указанного зерна в водном растворе.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию проращивания осуществляют до достижения содержания в пророщенном зерне самое большее 4 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество).

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию проращивания осуществляют до достижения α -амилазной активности пророщенного зерна по меньшей мере 4 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию проращивания осуществляют до достижения β -амилазной активности пророщенного зерна по меньшей мере 5 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию проращивания осуществляют до достижения активности конечной декстриназы пророщенного зерна по меньшей мере 5 мед/г зерна в пересчете на сухую массу.

12. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, причем указанный способ предусматривает стадии:

А) обеспечение пророщенного зерна зерновой культуры с содержанием воды по меньшей мере 20% при условии, что указанное зерно зерновой культуры не имело содержание воды ниже 20% в любое время после проращивания, причем пророщенное зерно содержит самое большее 4 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г пророщенного зерна зерновых культур (в пересчете на сухое вещество);

В) тонкое измельчение указанного пророщенного зерна, при этом указанное пророщенное зерно имеет содержание воды по меньшей мере 20%;

С) получение водного экстракта указанного размолотого пророщенного зерна, при этом получая водный экстракт зерновой культуры.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором зерновая культура представляет собой ячмень.

14. Способ по любому из пп.12, 13, в котором пророщенное зерно имеет α -амилазную активность по меньшей мере 4 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

15. Способ по любому из пп.12-14, в котором пророщенное зерно имеет β -амилазную активность по меньшей мере 5 ед/г зерна зерновых культур в пересчете на сухую массу.

16. Способ по любому из пп.12-15, в котором пророщенное зерно имеет активность конечной декстриназы по меньшей мере 5 мед/г зерна в пересчете на сухую массу.

17. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

i) получение водного экстракта при помощи способа по любому из предшествующих пунктов;

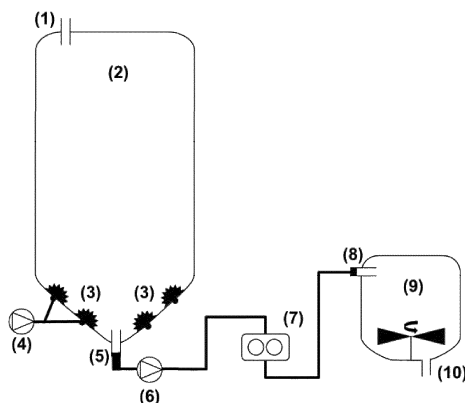
ii) переработка указанного экстракта в напиток.

18. Способ по п.17, в котором стадия (ii) предусматривает стадии:

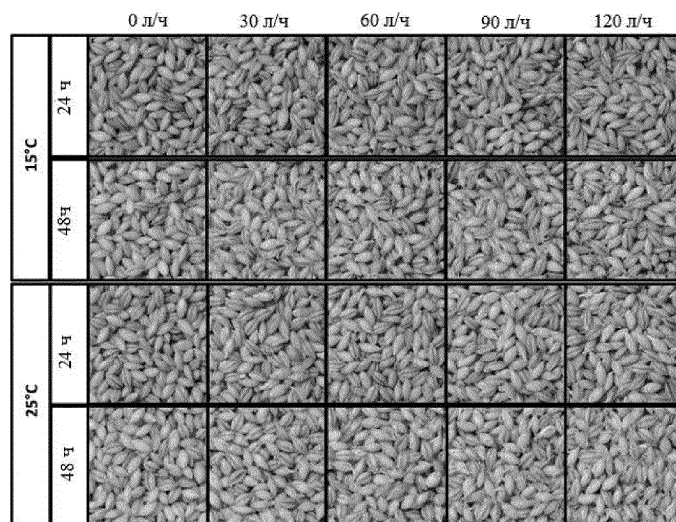
а) нагревание указанного водного экстракта необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;

б) охлаждение водного экстракта;

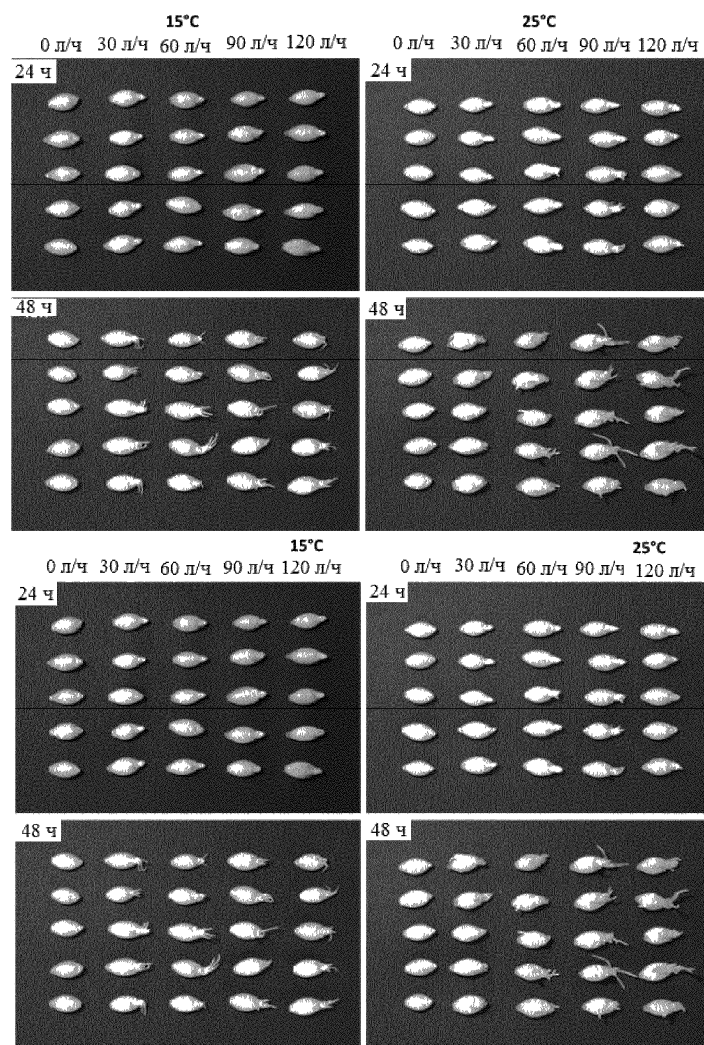
с) ферментация указанного водного экстракта при помощи дрожжей, при этом получая ферментированный напиток.



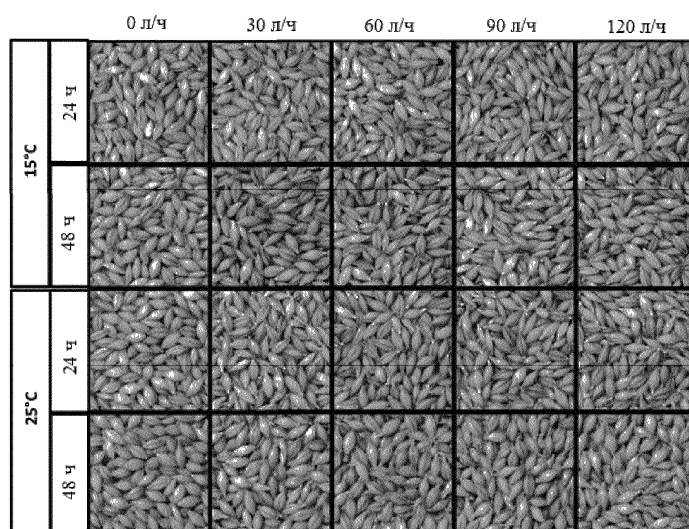
Фиг. 1



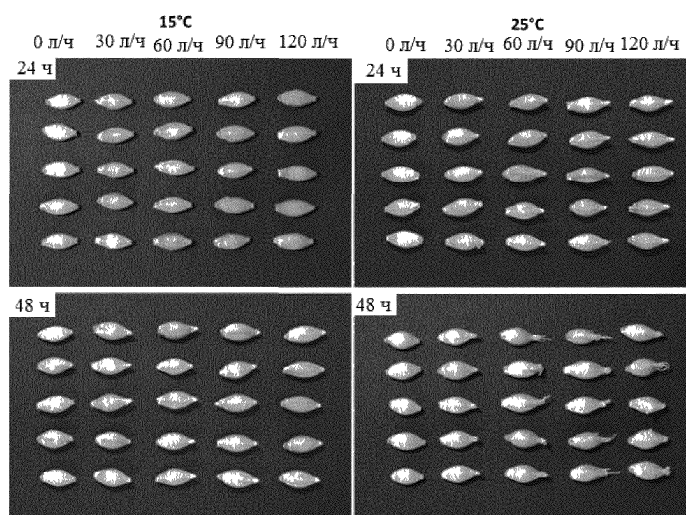
Фиг. 2А



Фиг. 2В

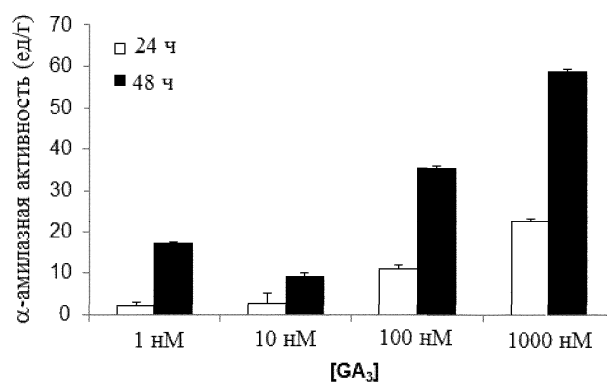


Фиг. 3А

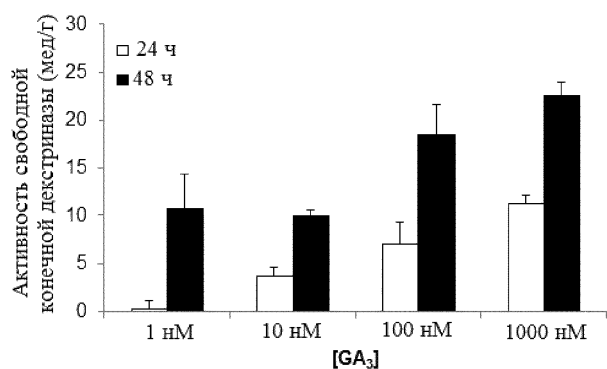
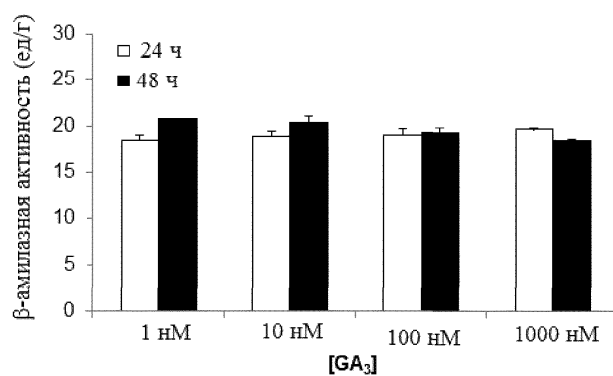


Фиг. 3В

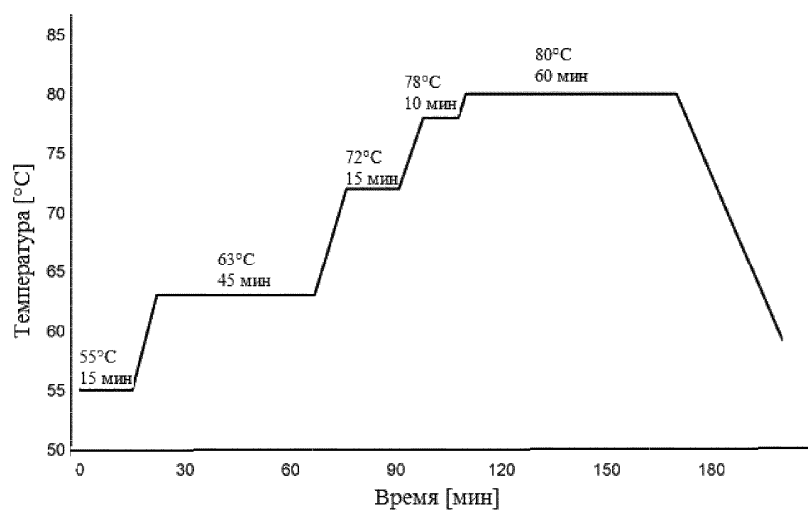
А)



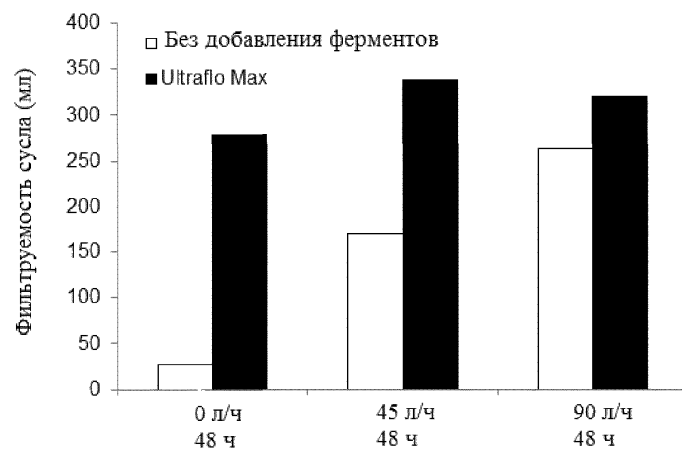
В)



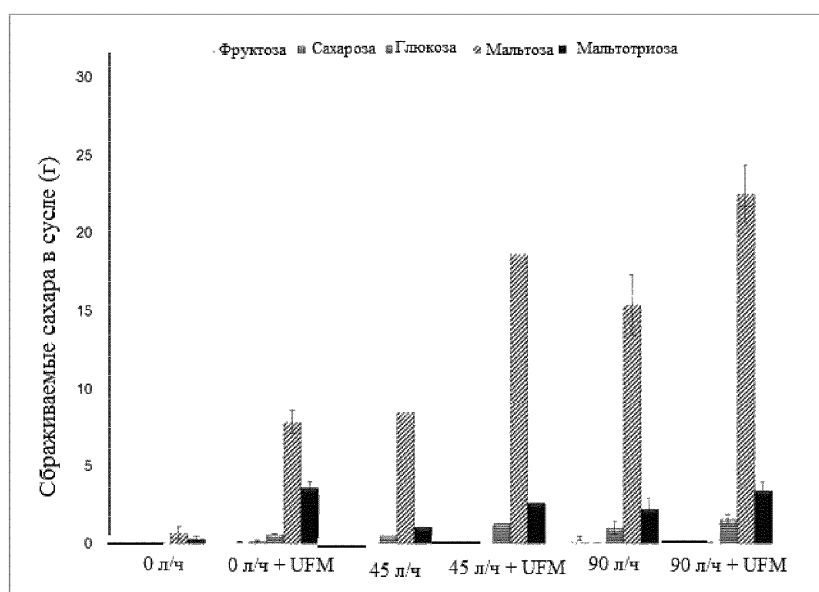
Фиг. 4



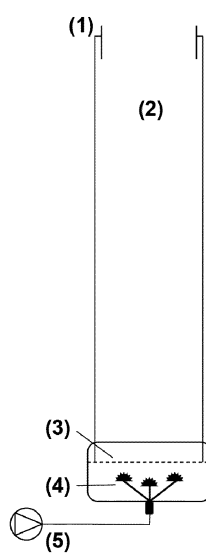
Фиг. 5



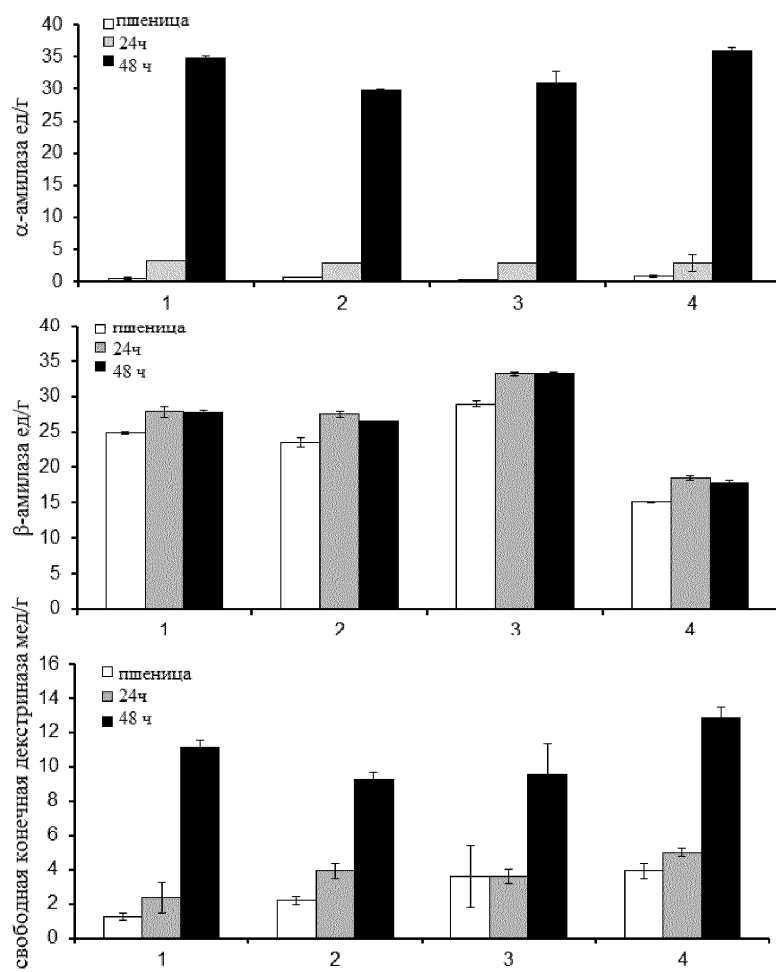
Фиг. 6



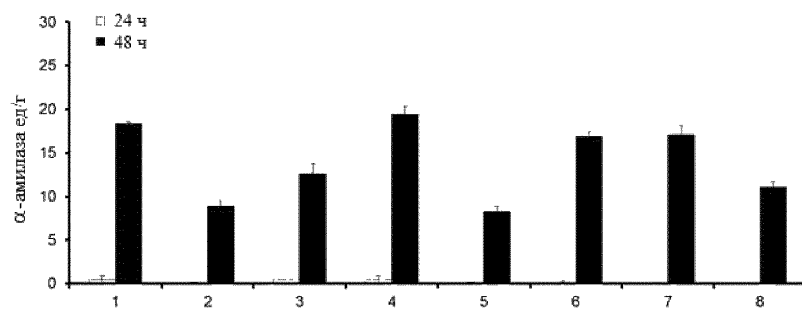
Фиг. 7



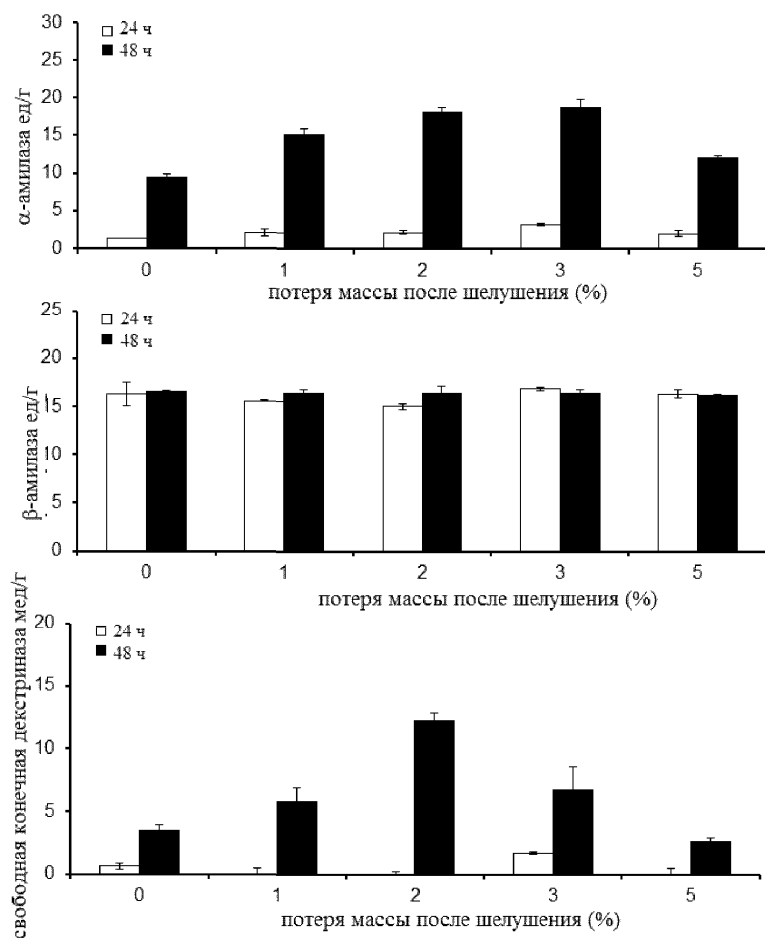
Фиг. 8



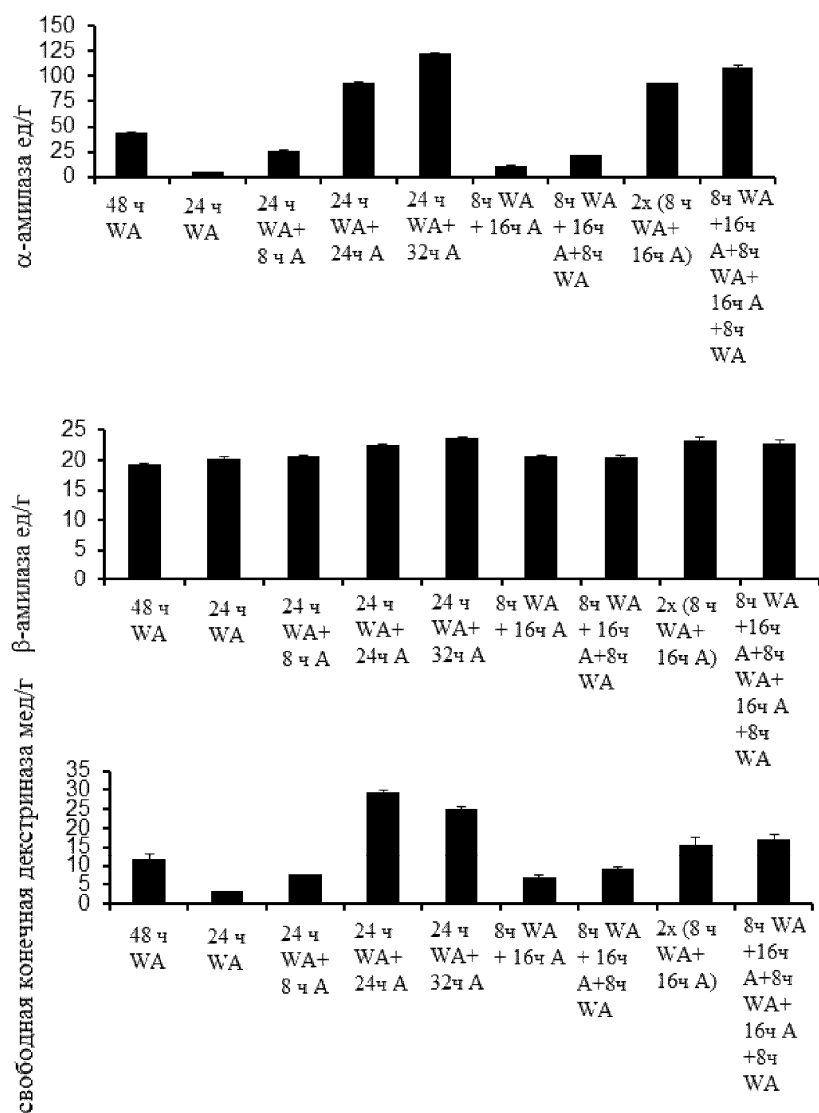
Фиг. 9



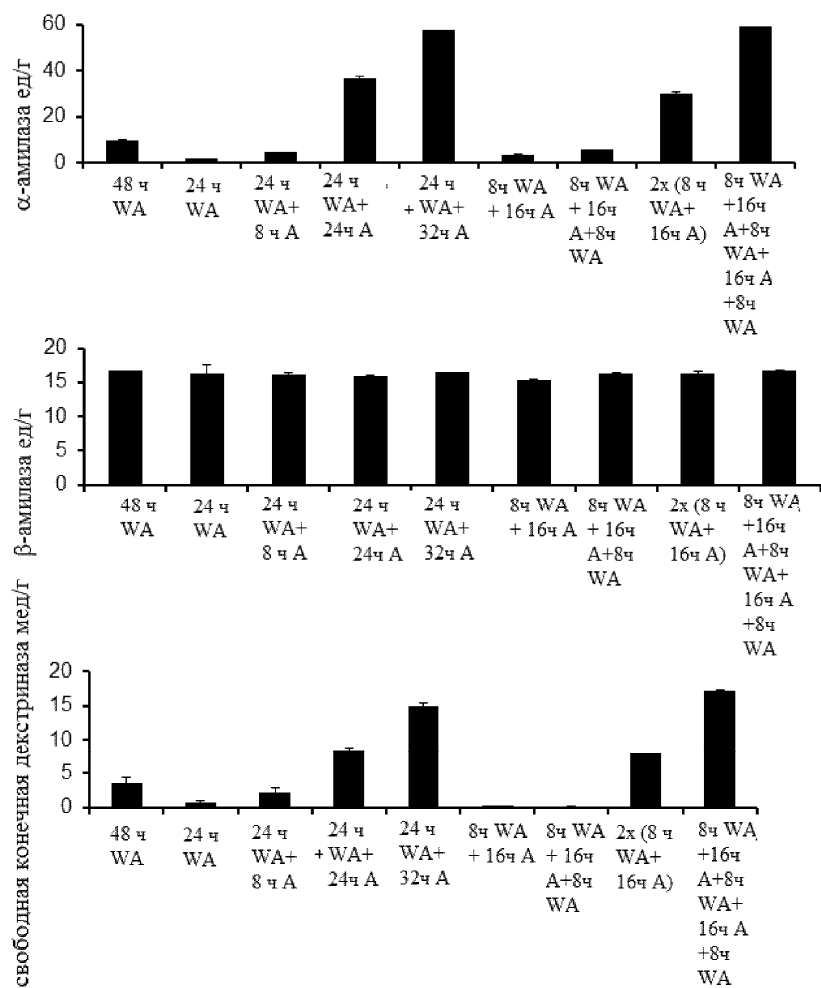
Фиг. 10



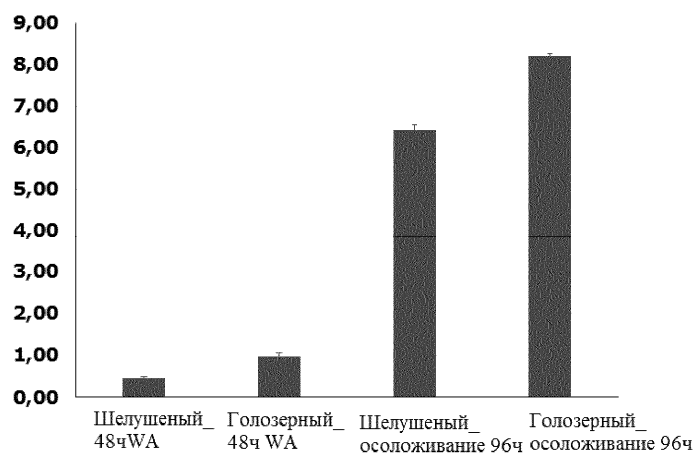
Фиг. 11



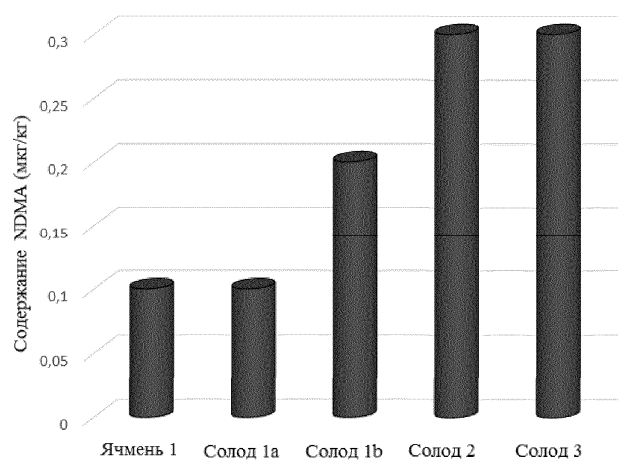
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 13



Фиг. 14

