

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037907**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.04

(21) Номер заявки
201892351

(22) Дата подачи заявки
2017.05.02

(51) Int. Cl. *A23L 2/38* (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 2/66 (2006.01)
C12C 7/00 (2006.01)

(54) **НАПИТКИ, СОДЕРЖАЩИЕ β -ГЛЮКАН ЯЧМЕНЯ**

(31) **РА 2016 70285**

(32) **2016.05.02**

(33) **DK**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/EP2017/060376**

(87) **WO 2017/191109 2017.11.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КАРЛСБЕРГ БРЮИРИЗ А/С;
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОПЕНГАГЕН
(DK)**

(72) Изобретатель:
**Моллер Бирте, Миккелсен Метте
Скау, Йенсен Мортен Георг, Гойкович
Зоран (DK)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) **WO-A1-2015017901
US-A1-2004258829
CN-A-103834709
US-A1-2015216217
JP-A-2015186477**

(57) Изобретение относится к способам приготовления напитка, содержащего по меньшей мере 2 г/л β -глобулина, при этом указанные β -глобулины имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа. Эти способы включают затирание зёрен ячменя, содержащих по меньшей мере 10% β -глобулинов, имеющих отношение DP3/DP4 в указанном β -глобулине, равное по меньшей мере 3, при наличии активности α -амилазы и активности эндо-1,3(4)- β -глобулиназы. Напитки обладают вязкостью, обеспечивающей приятное ощущение во рту, в то же время они содержат β -глобулины, которые способствуют понижению уровней LDL холестерина. Эти напитки в общем являются стабильными и могут храниться месяцами при комнатной температуре без значительного снижения содержания β -глобулинов.

B1**037907****037907****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области напитков для здоровья, а также к способам их приготовления. В частности, изобретение относится к способам изготовления напитков и полуфабрикатов для напитков, имеющих высокое содержание β -глюканов ячменя.

Сведения о предшествующем уровне техники

β -Глюканы имеют ряд замечательных преимуществ для здоровья, включая улучшение работы сердца, нормальный уровень содержания глюкозы в зерне хлебных злаков, они представляют собой длинные линейные полисахариды, состоящие из единиц глюкозы, соединённых (1 $\rightarrow$ 3) или (1 $\rightarrow$ 4)- β -связями. Из всех зёрен злаков наиболее богатым источником волокон β -глюканов является ячмень.

Однако жидкости, содержащие высокий уровень β -глюканов, обычно являются очень вязкими и, таким образом, менее подходящими для применения в качестве напитков.

Сущность изобретения

Следовательно, существует неудовлетворённая потребность в способах и материалах для приготовления напитков, имеющих высокое от природы содержание β -глюкана.

Настоящее изобретение предусматривает, что при применении зёрен ячменя, имеющих высокое отношение DP3 к DP4, и при обработке экстрактов таких зёрен смесью ферментов, обладающей активностью α -амилазы и активностью эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно активностью глюкоамилазы и/или пуллулаказы, можно приготавливать стабильные напитки, обладающие вязкостью, обеспечивающей приятное ощущение во рту, и в то же само время содержащие β -глюканы, которые способны содействовать понижению уровней LDL холестерина (липопротеинов низкой плотности). Напитки предпочтительно являются стабильными и могут месяцами храниться при комнатной температуре без значительного уменьшения содержания β -глюкана.

Таким образом, данное изобретение предусматривает способы приготовления напитка, содержащего по меньшей мере 2 г/л β -глюкана, причём указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в интервале от 80 до 200 кДа, и указанный способ включает стадии:

- а) обеспечения зёрен ячменя, при этом указанные зёрна имеют следующие характеристики:
 - i) содержат по меньшей мере 10% β -глюканов;
 - ii) имеют отношение DP3/DP4 в указанных β -глюканах равное по меньшей мере 3;
- б) затирания указанных зёрен в воде в присутствии ферментной композиции, причём указанная композиция обладает активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы, с получением при этом водного экстракта;
- с) отделения указанного водного экстракта от зёрен ячменя с получением при этом напитка или основы напитка;
- д) необязательного превращения основы напитка в напиток.

Данное изобретение предусматривает также напитки, содержащие по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в интервале от 80 до 200 кДа и указанный напиток получается способами по изобретению для снижения риска появления клинического состояния у субъекта, который нуждается в этом, причём это клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца и диабета.

Данное изобретение предусматривает также способы уменьшения риска появления клинического состояния у субъекта, который нуждается в этом, причём это клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, диабета и инфекций, при этом такой способ включает введение напитков по изобретению в эффективном количестве указанному субъекту.

Данное изобретение предусматривает также способы снижения в крови уровней по меньшей мере одного липида, выбранного из группы, состоящей из триглицеридов, холестерина и LDL у субъекта, нуждающегося в этом, при этом такой способ включает употребление напитка согласно данному изобретению указанным субъектом.

Настоящее изобретение предусматривает также способы уменьшения риска ожирения или уменьшения степени ожирения у субъекта, нуждающегося в этом, при этом такой способ включает употребление указанным субъектом напитка согласно данному изобретению.

Описание рисунков

Фиг. 1 - конечные продукты разложения β -глюкана (β -глюкан ячменя средней вязкости компании Megazyme) под действием Attenuzyme® Flex, Attenuzyme® and Termamyl® SC при 18°C;

фиг. 2 - спектр ^1H - ^1H COSY β -глюкана lys5f, экстрагированного при помощи Termamyl® SC частично расщеплённого под действием побочного действия лихеназы Attenuzyme® Flex при 65°C;

фиг. 3 - кривые адсорбции Лэнгмюра β -глюканов lys5f TA (530 кДа) и lys5f TAF (150 кДа) после добавления увеличивающихся концентраций гликохолята (0, 5, 15, 30, 45 mM) при pH 5;

фиг. 4 - изменение уровня триглицерида (ммол/л) в сравнении с исходным уровнем через 4 нед. после лечения крыс β -глюканом. Средние величины $\pm$ SEM, n=12 на курс лечения;

фиг. 5 - изменение уровня общего холестерина (ммол/л) в сравнении с исходным уровнем через 4

нед. после лечения крыс β -глюканом. Средние величины $\pm$ SEM, $n=12$ на курс лечения;

фиг. 6 - изменение уровня LDL-холестерина (ммол/л) в сравнении с исходным уровнем через 4 нед после лечения крыс β -глюканом. Средние величины $\pm$ SEM, $n=12$ на курс лечения;

фиг. 7 - изменение уровня HDL-холестерина (ммол/л) в сравнении с исходным уровнем через 4 нед после лечения крыс β -глюканом. Средние величины $\pm$ SEM, $n=12$ на курс лечения;

фиг. 8 - разница в общем содержании SCFA (ммол/кг), умноженная на содержимое аппендикса (г) через 4 нед. после лечения крыс β -глюканом. Средние величины $\pm$ SEM, $n=12$ на курс лечения;

фиг. 9 - стабильность содержания β -глюкана (г/л) в бутылках, хранившихся при комнатной температуре в течение 6 мес. Определения в суспензиях Glucagel™ и lys5f TAF проводили методом с окрашиванием калькофлуором. Средние величины $\pm$ SEM, $n=2$ в мес.;

фиг. 10 - выравнивание (последовательностей) между HvNST1 и BT1 маисом;

фиг. 11 показывает величину отношения DP3/DP4 в зёрнах ячменя различных сортов вместе с молекулярной массой (Mw) β -глюканов в вытяжке из указанных зёрен с использованием или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex (TAF), или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® (TA) или Termamyl® (T);

фиг. 12 - величину вязкости вытяжки β -глюкана после экстракции различных сортов ячменя при помощи ферментов T, TA и TAF.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Определения.

Используемые в данной заявке термины могут означать один предмет или более в зависимости от контекста, где они используются.

Применяемый при указании количества термин "примерно" означает $\pm 5\%$, предпочтительно $\pm 2\%$, ещё более предпочтительно $\pm 1\%$.

Термин "пиво", используемый в данной заявке, относится к напитку, приготовленному путём ферментации экстракта (пивного сусла). Предпочтительно указанную ферментацию проводить в присутствии дрожжей.

Термин " β -глюкан со смешанными связями", используемый в данной заявке, относится к полисахаридам на основе мономеров D-глюкозы, соединённых β -(1 $\rightarrow$ 3) или (1 $\rightarrow$ 4) гликозидными связями. Оба типа гликозидных связей могут образовываться в молекуле одного полисахарида. Термины " β -глюкан" и "бета-глюкан" используются в данной заявке как взаимозаменяемые. Термин " β -глюкан", используемый в данной заявке, может относиться к любому β -глюкану, но предпочтительно термин " β -глюкан" относится к " β -глюкану со смешанными связями".

Термин "основа напитка", используемый в данной заявке, относится к жидкости, которая может быть переработана в готовый для питья напиток. В общем, основа напитка может быть превращена в готовый напиток путём добавления одного или более дополнительных соединений и/или дополнительных жидкостей, и/или путём ферментации.

Термин "зерно" означает зерновки злаков, называемые внутренними семенами, лемма и палеа. У большинства сортов ячменя лемма и палеа прикреплены к зерновке и являются частью зерна после молотбы. Однако существуют голозёрные виды ячменя. У этих видов зерновка не содержит структур лемма и палеа и является голозёрной после обмолота, как пшеница. Термины "зерно" и "жито" используются в данной заявке как взаимозаменяемые.

Термин "затирание" означает выдержку зёрен ячменя в воде при определённой(ых) температуре(ах). Часто перед выдержкой в воде зёрна ячменя измельчают.

Величина "отношения количества воды к количеству зёрен ячменя/помола ячменя", равная 1 к X, означает 1 часть воды на X частей зёрен ячменя или размолотого ячменя. Отношения могут быть также указаны как 1 к интервалу XX или YY, что означает 1 часть воды к интервалу количества XX или YY зёрен ячменя или размолотого ячменя. Все отношения приводятся как весовые.

Термин "сусло" означает жидкий экстракт зёрен ячменя, приготовленный путём затирания. Другие виды несоложёного сырья могут быть смешаны с зёрнами ячменя и подвергнуты затиранию для получения сусла. Другие виды несоложёного сырья могут быть добавлены к суслу. Таким несоложёным сырьём может быть любой материал, содержащий крахмал, такой как другие злаки, отличающиеся от ячменя, солода или сиропов.

Способ приготовления напитка.

Изобретение относится к способу приготовления напитка, имеющего природное высокое содержание β -глюкана. Указанный напиток может быть любым из напитков, описанных в данной заявке ниже, в разделе "Напиток".

Этот способ включает затирание зёрен ячменя в воде в присутствии ферментной композиции, обладающей активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы, и необязательно активностью глюкоамилазы и/или пуллулазы. Согласно одному из вариантов изобретения указанные зёрна ячменя предпочтительно не подвергают никакой тепловой обработке перед затиранием. В частности, может быть предпочтительно не проводить затирание зёрен. В особенности, может быть предпочтительно не проводить соло-

жение. Вообще предпочтительно, чтобы указанные зёрна ячменя измельчали перед затиранием. Указанные зёрна имеют высокое содержание β -глюканов (предпочтительно, по меньшей мере равное 10%) и высокое отношение DP3/DP4 в указанном β -глюкане (предпочтительно, по меньшей мере равное 3). Ячмень может быть любым из сортов ячменя, описанных в данной заявке ниже в разделе "Ячмень". Затирание включает выдержку зёрен ячменя, предпочтительно измельчённых (дроблённых) зёрен ячменя, в воде при определённой(ых) температуре(ах). Затирание можно осуществлять любым из способов, описанных ниже в разделе "Затирание". Ферментная композиция обладает активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно также второстепенной активностью глюкоамилазы и/или пуллуланы. Эти виды активности могут быть получены на основе одного или более ферментов. Таким образом, не требуется, чтобы ферментная композиция включала 3 или 4 разных фермента, если некоторые из ферментов обладают более чем одним видом активности. Однако вообще ферментная композиция содержит фермент, который обладает активностью α -амилазы, фермент с активностью пуллуланы и фермент с активностью эндо-1,3(4)- β -глюканазы и фермент с активностью глюкоамилазы. Указанная ферментная композиция может быть любой из ферментных композиций, описанных в данной заявке ниже в разделе "Ферментная композиция".

После затирания водный экстракт отделяют от зёрен ячменя. Указанный водный экстракт может быть также назван в данной заявке "суслом". Водный экстракт может быть готов для употребления в качестве напитка по изобретению. Однако часто водный экстракт нужно обрабатывать дальше для получения напитка. В таких случаях водный экстракт может также называться в данной заявке "основой напитка". Основа напитка может быть переработана в напиток любым из способов, описанных в данной заявке ниже в разделе "переработка основы напитка в напиток".

Таким образом, одна из целей настоящего изобретения состоит в обеспечении способов приготовления любого из напитков, описанных в данной заявке ниже в разделе "Напиток", при этом указанный способ включает стадии:

- a) предоставления зёрен ячменя, который может быть одним из видов ячменя, описанных ниже в данной заявке в разделе "Ячмень";
- b) затирания указанных зёрен любым из способов, описанных в данной заявке ниже в разделе "Затирание", в присутствии ферментной композиции, которая может быть любой композицией, описанной в данной заявке ниже в разделе "Ферментная композиция", с получением при этом водного экстракта;
- c) отделения указанного водного экстракта от зёрен ячменя с получением при этом напитка или основы напитка;
- d) необязательной переработки основы напитка в напиток любым из способов, описанных ниже в данной заявке в разделе "Переработка основы напитка в напиток".

Напиток.

Данное изобретение относится к способам приготовления напитка, имеющего высокое содержание β -глюкана, но в то же самое время обладающего вязкостью, которая является достаточно низкой, чтобы придать напитку способность давать приятное ощущение во рту.

Было установлено, что β -глюканы уменьшают/снижают содержание холестерина в крови. Согласно Европейскому агентству по безопасности продуктов питания (EFSA) положительный эффект может быть получен при употреблении 3 г β -глюкана ячменя ежедневно. Положительный эффект может быть также получен при употреблении пищевого продукта, содержащего по меньшей мере 1 г β -глюкана в применяемом количестве продукта. Соответственно, предпочтительно, чтобы напитки по изобретению содержали достаточное количество β -глюкана для обеспечения дневного потребления, составляющего по меньшей мере 3 г. Так, согласно одному из вариантов напитка по изобретению содержат от 0.5 до 2 г, например от 0.5 до 1.5 г, например примерно 1 г, т.е. 1 г β -глюканов на порцию. В контексте напитков по данному изобретению такая порция составляет обычно или 250, или 330 мл. Таким образом, напитки по изобретению предпочтительно содержат указанные выше количества β -глюканов в 250-330 мл, например в 250 и/или в 330 мл.

Таким образом, напитки, приготовленные согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержат по меньшей мере 2 г/л β -глюканов. Более предпочтительно, когда напитки содержат 3 г/л β -глюканов. Ещё более предпочтительно, когда напитки содержат по меньшей мере 4 г/л β -глюканов. Изобретение также предусматривает, что напитки могут содержать больше β -глюканов, например в пределах от 4 до 20 г/л, в том числе в пределах от 4 до 15 г/л, например в пределах от 4 до 10 г/л. Напиток может быть также концентратом, содержащим очень большое количество β -глюканов, например более 8 г/л, например от 8 до 20 г/л. Такие концентраты могут быть перед употреблением разбавлены.

Содержание β -глюкана в готовом напитке можно регулировать несколькими методами. Один метод регулирования содержания β -глюкана в напитке заключается в регулировании отношения зёрен ячменя к воде во время затирания. Подходящие отношения зёрен ячменя к воде, которые могут быть использованы в способах по изобретению, описаны в разделе "Затирание" ниже в данной заявке. Для того чтобы получить меньшее содержание β -глюкана, основа напитка может быть также разбавлена дополнитель-

ным количеством жидкости.

Данное изобретение предусматривает, что β -глюканы с низкой молекулярной массой оказывают благоприятное действие на здоровье, т.е. что β -глюканы с низкой молекулярной массой способны снижать уровень холестерина в крови и, в частности, способны снижать уровень LDL в крови.

Кроме того, данное изобретение свидетельствует, что напитки, содержащие низкомолекулярные β -глюканы, также имеют низкую вязкость.

Соответственно, предпочтительно, чтобы напитки, приготовленные способами по изобретению, содержали β -глюканы, имеющие в среднем низкую молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа. Например, указанные β -глюканы могут иметь в среднем молекулярную массу в пределах от 110 до 190 кДа, например в пределах от 120 до 180, например в пределах от 130 до 170, например в пределах от 140 до 160 кДа. Согласно одному из вариантов напитка, приготовленные способами по изобретению, содержат β -глюканы, имеющие среднюю молекулярную массу равную примерно 150 кДа.

Среднюю молекулярную массу предпочтительно определять по сравнению со стандартами β -глюкана. Такие стандарты β -глюкана являются коммерчески доступными, например, они могут быть приобретены в компании Megazyme, Ireland. Молекулярную массу можно определять любым подходящим методом, например традиционным методом эксклюзионной хроматографии, используя стандарты β -глюкана, например используя Asahipak фирмы Shodex, US. Предпочтительный метод определения молекулярной массы описан ниже в примере 5а.

Низкомолекулярные β -глюканы, содержащиеся в напитках согласно данному изобретению, полезны для здоровья в той же степени, что и β -глюкан со средней молекулярной массой (530 кДа), экстрагированный в похожих условиях. Например, указанные β -глюканы предпочтительно способны к связыванию солей жёлчных кислот, таких как гликохолят. Предпочтительно указанные β -глюканы предпочтительно способны к связыванию солей желчных кислот, таких как гликохолят при непосредственном молекулярном взаимодействии. Связывание солей жёлчных кислот можно определить, например, путём определения изменения сигналов ($\Delta\delta$) для двух резонансов β -глюкана, когда изменения показывают непосредственное взаимодействие между β -глюканами и солью жёлчной кислоты в растворе, как описано ниже в примере 6. Так, β -глюканы, содержащиеся в напитках, могут характеризоваться увеличением $\Delta\delta^{13}\text{C}$, составляющим по меньшей мере 5 б.д., например 7 б.д. после добавления 50 мМ гликохолята при проведении определения, как описано в примере 6.

Как указано выше, предпочтительно также, чтобы напиток имел достаточно низкую вязкость для того, чтобы напиток имел приятный вкус во рту. Так, предпочтительно, чтобы вязкость напитка составляла максимально 55 мПа·с, например максимально 50 мПа·с, например максимально 40 мПа·с, например максимально 35 мПа·с. Вязкость можно определить с использованием любого стандартного вискозиметра. В частности, вязкость можно определить, как описано в примере 5а.

Напитки согласно данному изобретению предпочтительно являются стабильными, т.е. содержание β -глюкана не уменьшается значительно при хранении. Так, предпочтительно, чтобы содержание β -глюкана в напитках не уменьшалось более чем на 5%, например не уменьшалось более чем на 3% при хранении при комнатной температуре в течение 6 мес. Указанные напитки могут содержать стабилизатор для предотвращения осаждения β -глюкана, например содержание стабилизатора может составлять от 0.01 до 0.050%, например быть равным 0.025% в случае геллановой камеди, как описано ниже.

Напиток по изобретению может быть водным экстрактом, полученным после затирания зёрен ячменя в присутствии ферментной композиции. Этот водный экстракт в данной заявке может также называться суслом. Однако напиток может также быть пивом, полученным путём ферментации водного экстракта при помощи микроорганизмов, например дрожжей. Такой напиток может также быть смесью водного экстракта с одной или более дополнительными жидкостями. Напиток может также быть водным экстрактом, в который добавлены одно или более дополнительных соединений.

Затирание.

Способы согласно изобретению включают стадию затирания зёрен ячменя в присутствии ферментной композиции.

Затирание представляет собой выдержку зёрен ячменя в воде при определённой(ых) температуре(ах). Затирание можно рассматривать как способ получения водного экстракта зёрен ячменя. Для того чтобы сделать водную экстракцию как можно более эффективной, предпочтительно, чтобы зёрна ячменя подвергали дроблению перед затиранием. Предпочтительно, чтобы зёрна ячменя размалывали перед затиранием до получения ячменной муки и проводили затирание с использованием указанной ячменной муки. Измельчённые зёрна ячменя могут называться в данной заявке "измельчённым ячменём", "измельчёнными зёрнами ячменя" или "ячменной мукой".

Зёрна ячменя, например измельчённые зёрна ячменя, затем выдерживают в воде. Таким образом, стадия b) этого способа может включать смешение измельчённых зёрен ячменя с водой.

Отношение зёрен ячменя к воде может быть выбрано таким образом, чтобы достичь желательной концентрации β -глюканов в водном экстракте. В общем, чем выше отношение зёрен ячменя к воде, тем

выше содержание β -глюкана в напитке.

Поскольку предпочтительно, чтобы содержание β -глюканов в напитке составляло по меньшей мере 2 г/л, предпочтительно, чтобы отношение зёрен ячменя к воде было достаточно высоким для получения такого содержания β -глюканов.

Соответственно, предпочтительно, чтобы отношение воды к зёрнам ячменя было равно от 1 до по меньшей мере 10, например от 1 до по меньшей мере 12, в том числе от 1 до по меньшей мере 15. В частности, отношение воды к зёрнам ячменя может составлять от 1 до 10-20, например от 1 до 12-18. Согласно одному из вариантов изобретения отношение воды к зёрнам ячменя составляет от 1 до примерно 15. Указанное отношение приведено в весовых частях воды в расчёте на сухой вес указанных зёрен ячменя.

Согласно вариантам изобретения, когда затирание включает выдержку измельчённого ячменя в воде, предпочтительно, чтобы отношение воды к зёрнам ячменя составляло от 1 до по меньшей мере 10, например от 1 до по меньшей мере 12, например от 1 до по меньшей мере 15. В частности, отношение воды к измельчённому ячменю может составлять от 1 до 10-20, например от 1 до 12-18. Согласно одному из вариантов изобретения отношение воды к измельчённому ячменю составляет от 1 до примерно 15.

Выдержка зёрен ячменя (например, измельчённого ячменя) в воде предпочтительно проводится при определённой температуре. Эта температура может иметь значение, так как её величина может влиять на активность ферментов.

Затирание можно осуществлять в присутствии несоложёного сырья, которое, как понимается, содержит любой источник углеводов, отличающийся от зёрен ячменя, такой как, например, без ограничения, ячмень, сиропы ячменя, маис, рис, сорго, рожь, овёс или пшеница - или в виде целых зёрен, или обработанных продуктов, таких как крупы, сиропы или крахмал. Все из перечисленных добавок можно использовать в основном как дополнительный источник экстракта (сиропы обычно вводятся после проведения затирания).

Затирание с водой может включать использование одного или более дополнительных соединений, например солей или агентов, регулирующих pH. Неограничивающие примеры агентов, регулирующих pH, включают буферы и кислоты, например фосфатный буфер или фосфорную кислоту. Неограничивающим примером подходящих солей является хлористый кальций.

Обычно затирание включает или даже состоит из выдержки при температуре в пределах от 60 до 72°C, например при температуре в пределах от 60 до 70°C, например при температуре от 62 до 68°C, например при температуре в пределах от 64 до 66°C, например при температуре, равной примерно 65°C. Зёрна ячменя, например измельчённый ячмень, могут быть смешаны с водой на любой стадии, но часто могут быть добавлены к воде, как только вода достигла указанной выше температуры.

Выдержка при указанной температуре может продолжаться в течение любого желательного промежутка времени, обычно в пределах от 30 до 120 мин, предпочтительно в пределах от 30 до 60 мин, например в течение примерно в течение 45 мин. Например, величина pH может быть доведена до 5-7, например до 5-6, например до примерно 5.48.

В способах согласно данному изобретению затирание проводится в присутствии ферментной композиции, обладающей активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно также активностью глюкоамилазы и/или пуллуланы, это может быть любая ферментная композиция из композиций, описанных ниже в данной заявке в разделе "Ферментная композиция". Указанная ферментная композиция может быть добавлена перед затиранием или после затирания. Обычно она добавляется, как только температура экстракта или воды для затирания достигнет температуры, указанной выше. Напитки, приготовленные согласно настоящему изобретению, содержат β -глюканы определённой молекулярной массы. Затирание с помощью ферментной композиции по изобретению может влиять на величину молекулярной массы. Соответственно, предпочтительно, чтобы затирание в присутствии ферментной композиции проводили в течение времени и при температуре, которые приводят к образованию β -глюканов со средней молекулярной массой в пределах от 80 до 200 кДа. Этого можно достигнуть, отбирая образцы водного экстракта в определённые моменты времени во время затирания и при разных температурных условиях с последующим измерением средней молекулярной массы β -глюканов, содержащихся в водном экстракте. Таким образом, специалист в данной области сможет выбрать адекватные величины времени и температуры для затирания. Согласно одному из вариантов время и температура выбираются, как описано выше.

В конце стадии затирания часто бывает желательно нагреть смесь вода/зёрна ячменя/ферментная композиция до по меньшей мере 75°C. Это может обеспечить несколько эффектов, включая инактивацию ферментной композиции. Указанный нагрев предпочтительно осуществлять при температуре, равной по меньшей мере 75°C, предпочтительно равной по меньшей мере 85°C, более предпочтительно по меньшей мере 90°C, например при температуре в пределах от 85 до 100°C, например в пределах от 90 до 100°C. Нагрев можно проводить в течение подходящего времени, например в течение 15-120 мин, в том числе в течение 15-60 мин, например в течение примерно 30 мин.

Таким образом, согласно одному из вариантов затирание может состоять из выдержки при температуре 60-72°C, как указано выше, и последующей выдержки при температуре, равной по меньшей мере

85°C, например по меньшей мере при 90°C, как описано выше.

После затирания водный экстракт отделяют от зёрен ячменя (например, от измельчённого ячменя) для того, чтобы получить или напиток, или основу напитка, которая может быть далее превращена в напиток.

Указанное отделение можно проводить любым подходящим методом, например с использованием любого из методов отделения сусла от отработанных зёрен, обычно применяемых в пивоварнях. Неограничивающие методы отделения водного экстракта от зёрен ячменя (например, от измельчённого ячменя) включают центрифугирование, декантацию, фильтрование или применение бочки для сцеживания пивного сусла.

Ячмень.

Настоящее изобретение предусматривает способы приготовления напитков с высоким содержанием β -глюкана из зёрен ячменя. Для того чтобы получить напитки с достаточно высоким содержанием β -глюкана, которые в то же самое время стабильны и имеют низкую вязкость, предпочтительно использовать ячмень, имеющий высокое содержание β -глюканов и содержащий β -глюкан, характеризующийся высоким отношением DP3/DP4.

Ячмень может быть любым растением вида *Hordeum vulgare* (ячмень обыкновенный), включая любую линию скрещивания, или выведенный сорт, или сорт.

Таким образом, ячмень, используемый при осуществлении способов согласно изобретению, может иметь следующие характеристики:

- i) содержит по меньшей мере 10% β -глюканов;
- ii) имеет отношение DP3/DP4 в указанном β -глюкане, равное по меньшей мере 3.

При варке пива обычно предпочитают использовать ячмень с низким уровнем β -глюканов, и поэтому типичные сорта пивоваренного ячменя имеют низкое содержание β -глюканов. β -Глюканы придают суслу вязкость, которая обычно менее желательна. Однако виды ячменя, которые следует использовать согласно данному изобретению, предпочтительно имеют высокое содержание β -глюканов.

Таким образом, предпочтительно, чтобы ячмень, используемый в способах по изобретению, имел зёрна, которые содержат по меньшей мере 10% β -глюканов, более предпочтительно по меньшей мере 11% β -глюканов, даже более предпочтительно по меньшей мере 12% β -глюканов, например по меньшей мере 13% β -глюканов, например по меньшей мере 14% β -глюканов, например по меньшей мере 15% β -глюканов. Указанные количества приведены в % от веса сухого вещества в зёрнах.

Для того чтобы определить процентное содержание β -глюканов в зёрнах ячменя, определяют вес β -глюканов в зёрнах и общий вес сухого вещества в зёрнах. Тогда рассчитывают процентное содержание β -глюкана. Содержание β -глюкана может быть определено путём экстракции β -глюканов, например путём затирания, как описано в данной заявке выше в разделе "Затирание", и определения содержания β -глюкана в водном экстракте. Количество β -глюкана может быть, например, определено с использованием метода окрашивания калькофлуором. Метод окрашивания калькофлуором является флуометрическим методом и может быть осуществлён в соответствии со стандартами Brewing EBC, 1994. Краситель калькофлуор способен связывать β -глюканы, содержащиеся в растворе, и повышать интенсивность их флуоресценции прямо пропорционально содержанию связанного β -глюкана.

Подходящий метод определения процентного содержания β -глюканов в зёрнах ячменя описан в примере 5a ниже в данной заявке.

В дополнение к высокому содержанию β -глюкана важно также, чтобы ячмень имел высокое отношение DP3/DP4. Отношение DP3/DP4 характеризует структуру блок-олигомеров β -глюкана. Так, β -глюкан в ячмене содержит блоки целлотриозы и блоки целлотетраозы, и отношение DP3/DP4 характеризует отношение между блоками целлотриозы и блоками целлотетраозы. Целлотриоза является трисахаридом, в котором три единицы глюкозы соединены 1, 4- β -связями. Целлотетраоза является тетрасахаридом, в котором четыре остатка глюкозы соединены 1, 4- β -связями. Указанное отношение может быть определено путём разложения β -глюкана лихеназой и определения количества высвободившихся блоков DP3 и DP4. Лихеназа представляет собой фермент, катализирующий гидролиз (1 $\rightarrow$ 3)- β -глюкозидных связей, которые расположены следом за (1 $\rightarrow$ 4)- β -глюкозидными связями. Один подходящий способ определения отношения DP3/DP4 описан в примере 5a.

Согласно одному из вариантов настоящее изобретение охватывает затирание зёрен ячменя в присутствии ферментной композиции, обладающей активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно также активностью глюкоамилазы и/или пуллулазы. Ферменты способствуют надлежащей экстракции β -глюкана, и также получению β -глюкана со средней молекулярной массой в пределах от 80 до 200 кДа. Однако, если β -глюкан имеет низкое отношение DP3/DP4, это обычно приводит к более или менее сложному расщеплению β -глюкана ферментной композицией, и, соответственно, затрудняет приготовление напитков с природным высоким содержанием β -глюкана согласно изобретению.

Соответственно, предпочтительно, когда β -глюкан, содержащийся в ячмене, используемом по изобретению, имеет высокое отношение DP3/DP4. В частности, предпочтительно, когда зёрна используемо-

го ячменя содержат β -глюкан, имеющий отношение DP3/DP4, составляющее по меньшей мере 3, например по меньшей мере 3.2. Согласно предпочтительному варианту зёрна используемого ячменя содержат β -глюкан, имеющий отношение DP3/DP4, равное по меньшей мере 3.4, например по меньшей мере 3.6, такое как, например, по меньшей мере 3.7.

Согласно одному из вариантов данного изобретения ячмень содержит мутацию в гене HvNst1. Такие мутации приводят к получению ячменя, содержащего по меньшей мере 10% β -глюканов и имеющего отношение DP3/DP4 в указанном β -глюкане, равное по меньшей мере 3, например по меньшей мере 3.4.

В частности, предпочтительно, чтобы мутация приводила к уменьшенной функции NST1, более предпочтительно, чтобы указанная мутация приводила к полной потере функции NST1. Последовательность NST1 в ячмене дикого типа представлена в виде SEQ ID NO:1. NST1 ячменя является транспортёром ADP-Glc, и термин "полная потеря функции NST1", используемый в данной заявке, относится к одной из следующих ситуаций:

- 1) ячмень не содержит белка NST1;
- 2) ячмень содержит мутантный NST1, при этом указанный мутантный NST1 не способен транспортировать ADP-глюкозу.

Таким образом, согласно одному из вариантов данного изобретения ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, приводящую к уменьшенной экспрессии белка NST1. Так, ячмень может содержать мутацию в гене HvNst1, приводящую к экспрессии белка NST1 со степенью по меньшей мере на 80% уменьшенной по сравнению с экспрессией белка NST1 в ячмене дикого типа, таком как сорт Quench (Квенч).

Согласно другому варианту настоящего изобретения ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1 с потерей функции. В частности, указанный мутантный NST1 содержит по меньшей мере замену одной аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:1, такую как замена по меньшей мере одной консервативной аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:1. В частности, мутантный NST1 содержит замену по меньшей мере одной из аминокислот, отмеченных чёрным прямоугольником на фиг. 10, на другую аминокислоту.

Настоящее изобретение предусматривает также, что ячмень содержит мутацию в гене HvNst1 gene, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1, в котором отсутствует по меньшей мере одна аминокислота по сравнению с SEQ ID NO:1, например отсутствует по меньшей мере одна консервативная аминокислота по сравнению с SEQ ID NO:1. В частности, в мутантном NST1 отсутствует одна или более аминокислот, отмеченных чёрными прямоугольниками на фиг. 10. Так, указанный мутантный белок NST1 может не содержать по меньшей мере 10, например по меньшей мере 20, например по меньшей мере 30, например по меньшей мере 50 аминокислот, отмеченных чёрными прямоугольниками на фиг. 10.

Согласно одному варианту настоящего изобретения ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1, в котором аминокислота в положении 228 в последовательности SEQ ID NO:1 была делецирована или заменена на другую аминокислоту. В частности, ячмень может содержать мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1 в SEQ ID NO:1, где остаток Pro в положении 228 был заменён на остаток Ser.

Согласно другому варианту данного изобретения ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1, где аминокислота 273 в последовательности SEQ ID NO:1 была делецирована или заменена на другую аминокислоту. В частности, ячмень может содержать мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует NST1 в последовательности SEQ ID NO:1, где остаток Val в положении 273 был заменён на остаток Glu.

Одним неограничивающим примером ячменя, содержащего мутацию в гене HvNst1, причём мутантный ген HvNst1 кодирует NST1 в последовательности SEQ ID NO:1, где остаток Val в положении 273 был заменён на остаток Glu, является ячмень, известный как lys5f, доступный в Nordic Genetic Resource Center под номером доступа NGB20030.

Ферментная композиция.

Данное изобретение предусматривает способы приготовления напитков с высоким содержанием β -глюканов из зёрен ячменя путём затирания зёрен ячменя (например, дроблёного ячменя) в присутствии ферментной композиции. Указанная ферментная композиция обладает активностью α -амилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно также активностью глюкоамилазы и/или пуллулазы. Один фермент может обладать одним или более видами указанной активности, но в общем. Ферментная композиция содержит один фермент, обладающий активностью α -амилазы и один фермент, обладающий активностью эндо-1,3(4)- β -глюканазы и необязательно один фермент, обладающий активностью глюкоамилазы и/или один фермент, обладающий активностью пуллулазы.

Согласно одному из вариантов ферментная композиция обладает активностью α -амилазы, глюкоамилазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы.

Согласно одному из вариантов ферментная композиция обладает активностью α -амилазы, глюкоамилазы, пуллулазы и эндо-1,3(4)- β -глюканазы.

Фермент, обладающий активностью α -амилазы, может быть α -амилазой. α -Амилаза согласно изобретению представляет собой фермент, способный катализировать эндогидролиз (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три или более (1 $\rightarrow$ 4)- α -соединённых единиц D-глюкозы. В частности, α -амилаза согласно данному изобретению представляет собой фермент α -амилазу, классифицируемую согласно ЕС 3.2.1.1.

Конкретная α -амилаза, используемая в способах согласно данному изобретению, может быть α -амилазой *Bacillus*. Хорошо известные α -амилазы *Bacillus* включают α -амилазу, полученную из штамма *B.licheniformis*, *B.Amyloliquefaciens* или *B.stearothermophilus*. Согласно одному из аспектов настоящего изобретения используемая α -амилаза *Bacillus* представляет собой α -амилазу, охарактеризованную в заявке WO 99/19467 на стр. 3, строка 18 - стр. 6, строка 27.

Другим примером α -амилазы, используемой согласно данному изобретению, является фермент с последовательностью SEQ ID NO: 3, описанный в заявке WO 99/19467, или его функциональный гомолог, который имеет с этим ферментом по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичности последовательностей. α -Амилаза может также быть α -амилазой, имеющей по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, описанной как SEQ ID NO: 3 в заявке WO 99/19467 с мутациями: 1181* + G182* + N193F. Изобретение предусматривает также α -амилазу Termamyl® SC, доступную в Novozymes A/S, Denmark. Другой конкретной α -амилазой, используемой в способах по изобретению, может быть любая грибковая α -амилаза, например α -амилаза, полученная из вида *Aspergillus*, и предпочтительно из штамма *Aspergillus niger*. Особенно предпочтительной является α -амилаза, представленная как SEQ ID NO: 1 в заявке WO 2002/038787 или её функциональный гомолог, который имеет с ней по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичности последовательностей. Согласно предпочтительному варианту α -амилаза представляет собой полипептид с последовательностью SEQ ID NO:3 или его функциональный гомолог, который имеет с ним по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичности последовательностей.

Количество α -амилазы, которая должна добавляться, зависит от различных параметров и обычно известно специалисту в данной области. Согласно одному аспекту активность α -амилазы в экстракте составляет 0.1-1.0 KNU/г, более предпочтительно 0.2-0.4 KNU/г и наиболее предпочтительно 0.25-0.35 KNU/г в расчёте на сухой вес ячменя. Согласно другому аспекту активность α -амилазы в сусле составляет по меньшей мере 0.1 KNU/г, например по меньшей мере 0.2-0.4 KNU/г, например по меньшей мере 0.25 KNU/г в расчёте на сухой вес ячменя. Согласно другому аспекту активность α -амилазы в сусле находится в пределах от 0.1 до 10 KNU/г, например в пределах 0.1-5 KNU/г, например в пределах от по меньшей мере 0.2 до 5 KNU/г в расчёте на сухой вес ячменя. Одна единица Kilo Novozymes активности α -амилазы (KNU) равняется 1000 NU. Одна единица KNU определяется как количество фермента, которое в стандартных условиях (т.е. при 37°C +/- 0.05; 0.0003M Ca²⁺; и pH 5.6) приводит к декстринизации 5.26 г сухого растворимого крахмального вещества Merck Amylum.

Функциональный гомолог α -амилазы представляет собой фермент, который может катализировать эндогидролиз (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три или более (1 $\rightarrow$ 4)- α -связанных единиц D-глюкозы.

Фермент, обладающий активностью глюкоамилазы, может быть любой глюкоамилазой, но вообще это фермент, имеющий активность глюкан-1,4- α -глюкозидазы. В частности, глюкоамилаза может быть ферментом, успешно катализирующим гидролиз концевых (1 $\rightarrow$)-связанных остатков α -D-глюкозы из невосстанавливающих концов цепей с высвобождением β -D-глюкозы. В частности, глюкоамилаза согласно данному изобретению представляет ферменты α -амилазы, классифицируемые по ЕС 3.2.1.3.

Одним примером глюкоамилаз является Uniprot: B0CVJ1, который выявляет полипептид из *Laccaria bicolor*. Другими примерами являются глюкоамилазы из рода *Trametes cingulata*, описанные в заявке in WO 2006/069289.

Глюкоамилаза может быть также глюкоамилазой из грибка рода *Gloeophyllum*, например из *G.abietinum*, *G.sepiarium* или *G.trabeum*. Такие глюкоамилазы могут быть, например, полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности зрелого полипептида, представленной SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18, описанного в заявке WO 2011/068803, составляющей предпочтительно по меньшей мере 82%, более предпочтительно по меньшей мере 83%, более предпочтительно по меньшей мере 84%, более предпочтительно по меньшей мере 85%,

более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, даже более предпочтительно по меньшей мере 93%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 94% и ещё наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или даже 100%.

Глюкоамилаза может быть также глюкоамилазой из рода *Penicillium oxalicum*, например глюкоамилазой, описанной в публикации Yoshiki YAMASAKI, Agric. Biol. Chem., 41 (5), 755-762, 1977). Глюкоамилаза может быть также глюкоамилазой полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 2 зрелого полипептида, описанного в заявке WO 2011/127802, составляющей предпочтительно по меньшей мере 61.5%, более предпочтительно по меньшей мере 63%, более предпочтительно по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 68%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, даже более предпочтительно по меньшей мере 93%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 94% и даже наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, даже по меньшей мере 96, 97, 98, 99 или 100%.

Фермент, обладающий активностью пуллулаказы, может быть любой пуллулазой. Пуллулаза предпочтительно представляет собой фермент, способный катализировать гидролиз α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозидных связей в пуллулане, амилопектине и гликогене. Пуллулан является линейным полимером, содержащим 1 $\rightarrow$ 6-связанные единицы мальтотриозы. Пуллулаза согласно настоящему изобретению предпочтительно является пуллулазой, классифицированной согласно классификации ЕС 3.2.1.41.

Пуллулаза согласно настоящему изобретению может быть пуллулазой, например, из рода *Rhodococcus* или *Bacillus*, например *Bacillus acidopullulyticus*, например пуллулазой, описанной в публикации Kelly et al., 1994, FEMS Microbial. Letters 115: 97-106, или пуллулазой доступной в Novozymes A/S в виде Promozyme 400L. Пуллулаза может быть также из рода *Bacillus naganensis* или *Bacillus deramificans*, например из *Bacillus deramificans* (патент США № 5736375). Пуллулаза может также быть полученной методом генетической инженерии из, например, штамма *Bacillus*. Пуллулаза может также быть доступной в Novozymes A/S, Denmark как Attenuzyme® Flex. Другие пуллулазы могут быть получены из *Rhodococcus woesei*, описанного в заявке PCT/DK 91/00219, или пуллулаза может быть получена из рода *Fervidobacterium* sp. Ven, описанного в заявке PCT/DK92/00079, или пуллулаза может быть получена из рода *Thermococcus celer*, описанного в заявке PCT/DK95/00097, или пуллулаза может быть получена из рода *Pyrodictium abyssi*, описанного в заявке PCT/DK95/00211, или пуллулаза может быть получена из рода *Fervidobacterium pennavorans*, описанного в заявке PCT/DK95/00095, или пуллулаза может быть получена из рода *Desulforococcus mucosus*, описанного в заявке PCT/DK95/00098.

Наиболее предпочтительно, если пуллулаза получена из рода *Bacillus acidopullulyticus*. Предпочтительная пуллулаза, используемая в способах по изобретению, представляет собой полипептид с последовательностью SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98%.

Пуллулаза может быть добавлена в эффективных количествах, хорошо известных специалисту в данной области. Согласно одному из аспектов пуллулаза добавляется в количестве от 0.1 до 3 PUN/г в расчёте на вес сухого ячменя, например от 0.2 до 2.9, например от 0.3 до 2.8, например от 0.3 до 2.7, например от 0.3 до 2.6, например от 0.3 до 2.5, например от 0.3 до 2.4, например от 0.3 до 2.3, например от 0.3 до 2.2, например от 0.3 до 2.1, например от 0.3 до 2.0, например от 0.3 до 1.9, например от 0.3 до 1.8, например от 0.3 до 1.7, например от 0.3 до 1.6, наиболее предпочтительно добавлять пуллулазу в количестве от 0.3 до 1.5, предпочтительно от 0.4 до 1.4, более предпочтительно от 0.5 до 1.3, более предпочтительно от 0.6 до 1.2, более предпочтительно от 0.7 до 1.1, более предпочтительно от 0.8 до 1.0, более предпочтительно от 0.9 до 1.0. Согласно конкретному варианту этот фермент добавляют в количестве примерно 0.3 PUN/г в расчёте на вес сухого ячменя, например примерно 0.4 PUN/г в расчёте на вес сухого ячменя, например примерно 0.5 PUN/г в расчёте на вес сухого ячменя.

Одна единица пуллулазы (PUN) равна количеству фермента, которое в стандартных условиях (т.е. через 30 мин реакции при 40°C и pH 5.0; и в присутствии 0.2% пуллулана в качестве субстрата) приводит к гидролизу пуллулана, высвобождая восстанавливающий углевод с восстановительной способностью, которая эквивалентна 1 мкмоль глюкозы в минуту. Активность пуллулазы измеряют путём определения увеличенной восстановительной способности сахара.

Функциональный гомолог полипептида последовательности SEQ ID NO:4 представляет собой фермент, который может катализировать гидролиз α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозидных связей в пуллулане, амилопектине и гликогене.

Фермент, обладающий активностью эндо-1,3(4)-β-глюканазы, может быть любой эндо-1,3(4)-β-глюканазой. Эндо-1,3(4)-β-глюканаза предпочтительно представляет собой фермент, способный катализировать эндогидролиз (1→3)- или (1→4)-связей в β-глюканах, когда остаток глюкозы, чья восстановительная группа находится в связи, подвергающейся гидролизу, сам замещён в положении С-3.

Согласно одному из вариантов данного изобретения эндо-1,3(4)-β-глюканаза по данному изобретению является ферментом эндо-1,3(4)-β-D-глюканазой. Согласно предпочтительному варианту настоящего изобретения эндо-1,3(4)-β-глюканаза представляет собой лихеназу, предпочтительно лихеназу, классифицируемую по ЕС 3.2.1.73.

Эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть получена из любого подходящего организма, например эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть лихеназой из *Bacillus subtilis*. Например, эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть полипептидом SEQ ID NO:5 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 75%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 98%.

Согласно другому варианту эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть лихеназой, кодированной геном *GluB Bacillus polymyxa*, или её функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 75%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 98%.

Последовательность лихеназы, кодируемая геном *GluB Bacillus polymyxa*, показана на фиг. 2 в публикации Gosalbes et al., JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 1991, Vol. 173, No. 23, p. p. 7705-7710.

Согласно другому варианту эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть любой из лихеназ, описанных в патенте США № 6103511, в частности эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть полипептидом, представленным SEQ ID NO:2 в патенте США № 6103511 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 75%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 98%.

Согласно одному из вариантов данного изобретения эндо-1,3(4)-β-глюканаза может быть β-глюканазой, классифицируемой по классификации Е.С. 3.2.1.4. β-глюканаза может иметь микробное происхождение, например она может быть получена из штамма бактерий (например, *Bacillus*) или из нитчатого гриба (например, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Предпочтительными являются β-глюканы, полученные из рода *Trichoderma* может быть полипептидом с любой из последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 в заявке WO 2006/066582 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 75%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 98%.

Коммерчески доступные препараты β-глюканы, которые можно использовать, включают CEL-LUCLAST®, CELLUZYME®, CEREFLO® и ULTRAFLO® (доступные в Novozymes A/S), GC 880, LAMINEX™ и SPEZYME® CP (доступные в Genencor Int.) и ROHAMENT® 7069 W (доступен в Rohm, Germany).

Согласно одному из вариантов эндо-1,3(4)-β-глюканаза представляет собой эндоглюканазу, полученную из *Humicola* sp., например эндоглюканазу из *Humicola insolens*, эндоглюканазу из *H. insolens* или из *Thermoascus* sp., например эндоглюканазу из *Thermoascus aurantiacus*, или из *Aspergillus* sp., например эндоглюканазу, полученную из *Aspergillus aculeatus*, из *Trichoderma* sp., предпочтительно, из *T. reesei* и/или *T. viride*, например семейство 5-эндоглюканаз, семейство 7, β-глюканаз или семейство 12, β-глюканаз. Эндо-1,3(4)-β-глюканаза, в частности, может быть полипептидом с любой из последовательностей, представленных в виде SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20 в заявке WO 2005/059084, или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 75%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 85%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 98%.

Функциональный гомолог эндо-1,3(4)-β-глюканы, например полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 5 является ферментом, который может катализировать эндогидролиз (1→3)- или (1→4)-связей в β-глюканах, когда остаток глюкозы, чья восстановительная группа содержится в этих гидролизующихся связях, сам является замещённым в положении С-3.

Количество эндо-1,3(4)-β-глюканы, которое следует добавлять, может зависеть от различных параметров. В общем, добавляется количество β-глюканы, которое приводит к получению β-глюканов, после затирания имеющих среднюю молекулярную массу Mw в пределах 80-200 кДа. В общем предпочтительно, чтобы применялись довольно небольшие количества эндо-1,3(4)-β-глюканы. Так, согласно

одному из вариантов активность эндо-1,3(4)-β-глюканазы в экстракте составляет максимально 0.5 EGU/г и наиболее предпочтительно максимально 0.3 EGU/г в расчёте на вес сухого ячменя, даже максимум 0.1 EGU/г, например максимум 0.05 EGU/г, например максимум 0.03 EGU/г. Согласно другому варианту активность эндо-1,3(4)-β-глюканазы в экстракте находится в пределах от 0.0005 до 0.5 EGU/г, предпочтительно в пределах от 0.005 до 0.3 EGU/г, например в пределах от 0.001 до 0.1 EGU/г, например в пределах от по меньшей мере 0.001 до 0.05 EGU/г в расчёте на вес сухого ячменя. Активность эндо-1,3(4)-β-глюканазы можно измерить в единицах эндо-глюканазы (EGU), определённых при pH 6.0 с карбоксиметилцеллюлозой (СМЦ) в качестве субстрата следующим образом. Готовят раствор субстрата, содержащий 34.0 г/л СМЦ (Hercules 7 LFD) в 0.1М фосфатном буфере при pH 6.0. Образец анализируемого фермента растворяют в том же буфере. 5 мл раствора субстрата и 0.15 мл раствора фермента смешивают и помещают в вибрационный вискозиметр (например, MIVI 3000 фирмы Sofraser, France), затем термостатируют при 40°C в течение 30 мин. Одна единица EGU означает количество фермента, которое приводит к уменьшению вязкости наполовину в указанных условиях.

Используемый в данной заявке термин "X в сусле (экстракте)" относится к количеству X, содержащемуся во время затирания (например, на стадии b) при осуществлении способов, описанных в данной заявке). Активность фермента в сусле можно указывать в единицах на грамм сухого ячменя, который содержится при затирании.

Согласно одному предпочтительному варианту настоящего изобретения ферментная композиция содержит Attenuzyme® Flex, доступный в Novozymes, Denmark. В частности, ферментная композиция может содержать или даже состоять из смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex, которые оба доступны в Novozymes, Denmark.

Переработка основы напитка в напиток.

Настоящее изобретение относится также к способам приготовления напитка, причём эти способы включают затирание зёрен ячменя в присутствии ферментной композиции и отделение водного экстракта от зёрен ячменя (например, дроблёного ячменя).

Указанный водный экстракт может представлять собой напиток. Однако часто водный экстракт является основой напитка, которая затем перед употреблением перерабатывается в готовый напиток.

Основа напитка часто подвергается нагреву до температуры, равной по меньшей мере 75°C. Это может обеспечить несколько эффектов, включая пастеризацию напитка. Указанный нагрев предпочтительно осуществляют при температуре, составляющей по меньшей мере 75°C, предпочтительно по меньшей мере 85°C, более предпочтительно по меньшей мере 90°C, например при температуре в пределах от 85 до 100°C, например в пределах от 90 до 100°C. Нагрев производят в течение любого подходящего промежутка времени, например в пределах от 15 до 120 мин, например в пределах от 15 до 60 мин, например в течение примерно 30 мин. Таким образом, напиток согласно данному изобретению может быть пастеризованным напитком.

Основа напитка может быть подвергнута обработке при ультравысокой температуре (УНТ) при предварительном нагреве до температуры в пределах 70-80°C с последующим нагревом до температуры выше 90°C в течение короткого промежутка времени, например в течение времени от 1 до 5 с, например в течение времени от 1 до 2 с или в течение 4- 5 с.

Напиток может быть также подвергнут гомогенизации, например, обработкой при давлении 100-200 бар.

Часто стадия d) включает добавление одного или более соединений и/или одной или более дополнительных жидкостей к основе напитка, полученной на стадии c), для того, чтобы получить напиток. В таких случаях указанная выше тепловая обработка или УНТ могут проводиться до или после добавления одного или более соединений и/или одной или более дополнительных жидкостей.

Способы согласно изобретению могут включать стадию добавления одного или более дополнительных соединений. Дополнительное соединение может быть, например, вкусовым веществом, консервантом или функциональным ингредиентом. Дополнительное соединение может также быть красителем, подсластителем, агентом, регулирующим pH, или солью. Подсластитель может, например, быть искусственным подсластителем низкокалорийным подсластителем или сахаром. Агент, регулирующий pH, может быть, например, буфером или кислотой, такой как молочная кислота или лимонная кислота.

Функциональные ингредиенты могут быть любым ингредиентом, добавляемым для получения заданной функции. Предпочтительно, функциональный ингредиент делает напиток более полезным для здоровья. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают растворимые волокна, белки, добавляемые витамины или минералы.

Консервант может быть любым пищевым консервантом, например он может быть бензойной кислотой, сорбиновой кислотой, сорбатом (например, сорбатом калия), сульфитом и/или солями указанных кислот.

Дополнительным соединением может также быть CO₂. В частности, CO₂ можно добавлять для получения газированного напитка.

Используемое согласно данному изобретению вкусовое вещество может быть любым подходящим

вкусовым веществом. Вкусовое вещество может, например, выбираться из группы, состоящей из ароматизаторов, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растений и травяных настоев.

Так, вкусовое вещество может быть, например, ароматизатором. Ароматизаторы обычно представляют собой органические соединения, например они могут быть вторичными метаболитами растений. Ароматизатор может быть любым ароматизатором, например фруктовым ароматизатором или ванильным ароматизатором.

Растительный экстракт может быть, например, травяным экстрактом. Неограничивающие примеры травяных экстрактов включают экстракт зелёного чая, чёрного чая, ройбуш, экстракт перечной мяты или хмеля. Растительный экстракт может также быть цветочным экстрактом. Неограничивающие примеры цветочных экстрактов включают экстракты гибискуса, ромашки, цветков бузины, лаванды или цветов липы.

Растительный экстракт может также быть фруктовым экстрактом. Части растений могут быть, например, высушены или используют свежие травы, например гранулы хмеля, высушенные или свежие цветы, или фрукты.

Концентрат растений может быть фруктовым, например фруктовым соком, который концентрировали путём удаления воды.

Неограничивающие примеры фруктов, пригодных для получения вкуса, фруктового экстракта или фруктового концентрата включают апельсины, яблоки, бананы, лимоны, пассифлору, манго, ананас, груши, кумкваты или помело.

Вкусовое вещество может также быть хинином, например в вариантах, где напиток является тонирующим.

По меньшей мере одно дополнительное соединение может также быть стабилизатором. Указанный стабилизатор может быть, например, любым ингредиентом, способным стабилизировать растворимые β -глюканы, например способным стабилизировать растворимые β -глюканы в эластичной гелеобразующей матрице. Указанный стабилизатор может быть, например, геллановой камедью, такой как Kelcogel® LT-100, доступный в CP Kelco, Denmark. Указанный стабилизатор можно добавлять в напиток в любом подходящем количестве, например до получения конечной концентрации, составляющей величину в пределах от 0.001 до 0.1% (вес./вес.), например, до получения конечной концентрации в пределах от 0.01 до 0.05% (вес./вес.).

Дополнительной жидкостью может быть вода. Дополнительной жидкостью может также быть другой напиток, например фруктовый сок, сироп, газированный прохладительный напиток или пиво. В частности, дополнительной жидкостью может быть фруктовый сок.

Стадия d) может также включать ферментацию основы напитка с помощью одного или более микроорганизмов. В частности, основа напитка может ферментироваться с помощью дрожжей для того, чтобы получить алкогольный напиток. Указанные дрожжи могут быть любыми, например, видом *S.cerevisiae* или *S.pastorianus*. Указанные микроорганизмы могут быть также бактериями, например, бактериями *Lactobacillus*, например, *L.lactis*. Например, основу напитка можно подвергать ферментации так же, как проводят ферментацию обычного сусла при получении пива. Таким образом, можно применять любой способ получения пива, при котором обычное сусло заменяют основой пива, приготовленного по способам согласно изобретению.

Клинические условия.

Примечательно, что, как было показано, β -глюканы, полученные согласно способам по изобретению, пригодны для снижения уровня как LDL, так и общего холестерина. Соответственно, напитки, приготовленные согласно данному изобретению, пригодны для уменьшения риска развития нескольких клинических состояний, ассоциированных с повышенным содержанием LDL и холестерина.

Так, согласно одному из аспектов изобретения относится к напитку, содержащему по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, а напиток предназначен для уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, и клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца и диабета.

Настоящее изобретение предусматривает также способ уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, и клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, диабета и инфекций, причём указанный способ включает введение напитка, содержащего по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, указанному субъекту в эффективном количестве.

Предпочтительно, чтобы указанный субъект принимал напитки по изобретению в количестве, достаточном для дневного потребления по меньшей мере 2 г β -глюканов, например по меньшей мере 3 г β -глюканов, например в пределах от 3 до 50 г β -глюканов, например в пределах от 3 до 20 г β -глюканов, например в пределах от 3 до 10 г β -глюканов. Может быть также предпочтительно, чтобы указанный субъект потреблял β -глюканы в количестве в пределах от 0.5 до 2 г, например в пределах от 0.5 до 1.5 г, например примерно 1 г, например 1 г β -глюканов на порцию. В контексте напитков согласно данному

изобретению порция обычно составляет от 250 до 330 мл, например примерно 250 мл и/или примерно 330 мл.

Таким образом, указанное эффективное количество составляет по меньшей мере 2 г β -глюканов, например по меньшей мере 3 г β -глюканов, например от 3 до 50 г β -глюканов, например от 3 до 20 г β -глюканов, например от 3 до 10 г β -глюканов в день.

Данное изобретение предусматривает также способ снижения уровня по меньшей мере одного липида, выбранного из группы, состоящей из триглицеридов, холестерина и LDL в крови у субъекта, нуждающегося в этом, причём указанный способ включает потребление указанным субъектом напитка по изобретению, содержащего по меньшей мере 2 г β -глюканов, например по меньшей мере 3 г β -глюканов, например по меньшей мере от 3 до 50 г β -глюканов, например от 3 до 20 г β -глюканов, например по меньшей мере от 3 до 10 г β -глюканов, в соответствии с любым из пунктов 29-31.

Цель данного изобретения заключается также в создании способов уменьшения риска развития ожирения у субъекта, нуждающегося в этом. Эти способы включают потребление в эффективном количестве, указанном выше, указанным субъектом напитка по изобретению, содержащего по меньшей мере 2 г β -глюканов, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа. Эффективное количество предпочтительно является количеством, указанным выше.

Цель данного изобретения заключается также в создании способов уменьшения степени ожирения у субъекта, нуждающегося в этом. Эти способы включают потребление в эффективном количестве указанным субъектом напитков согласно изобретению, содержащих по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа. Эффективное количество предпочтительно является количеством, указанным выше.

Указанный субъект предпочтительно является человеком. Согласно некоторым вариантам субъектом является человек, страдающий ожирением.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1	Белковая последовательность NST1 ячменя	Номер доступа в банке генов AY560327
SEQ ID NO:2	ДНК последовательность гена Hv.Nst1 ячменя	
SEQ ID NO:3	Белковая последовательность α -амилазы <i>Bacillus stearothermophilus</i>	
SEQ ID NO:4	Белковая последовательность пуллулаказы <i>Bacillus acidopullulyticus</i>	
SEQ ID NO:5	Белковая последовательность лихеназы <i>Bacillus subtilis</i>	Gene Bank accession Z46862.1

Объекты изобретения.

Изобретение характеризуется следующими объектами изобретения.

1) Способ приготовления напитка, содержащего по меньшей мере 2 г/л β -глюкана, при этом указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, включающий стадии:

а) предоставления зёрен ячменя, причём указанные зёрна обладают следующими характеристиками:

i) содержат по меньшей мере 10% β -глюканов;

ii) имеют отношение DP3/DP4 в указанном β -глюкане, составляющее по меньшей мере 3,

б) затирания указанных зёрен с водой в присутствии ферментной композиции, при этом указанная композиция обладает активностью α -амилазы и активностью эндо-1,3(4)- β -глюканазы, с получением при этом водного экстракта;

с) отделения указанного водного экстракта от зёрен ячменя с получением при этом напитка или основы напитка;

д) необязательного превращения основы напитка в напиток.

2) Способ по п.1, где ферментная композиция обладает также активностью глюкоамилазы.

3) Способ по любому из предыдущих пунктов, где ферментная композиция обладает также активностью пуллулаказы.

4) Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток содержит по меньшей мере 3 г/л, например по меньшей мере 4 г/л β -глюканов.

5) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанные зёрна содержат по меньшей мере 11%, например по меньшей мере 12% β -глюканов.

6) Способ по любому из предыдущих пунктов, где отношение DP3/DP4 в указанном β -глюкане составляет по меньшей мере 3.2, например по меньшей мере 3.4, например по меньшей мере 3.6, например по меньшей мере 3.7.

7) Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень имеет мутацию в гене HvNst1.

8) Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень имеет мутацию в гене HvNst1, приводящую к полной потере функции NST1.

9) Способ по любому из пп.7, 8, где мутация приводит к образованию мутировавшего гена HvNst1, кодирующего мутировавший NST1, содержащий замену по меньшей мере одной аминокислоты по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1, причём эта аминокислота выбрана, например, из аминокислоты в положении 228 и аминокислоты в положении 273 последовательности SEQ ID NO: 1.

10) Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, причём мутантный ген HvNst1 кодирует NST1 последовательности SEQ ID NO: 1 и остаток Pro в положении 228 заменён на остаток Ser.

11) Способ по любому из пп.1-10, где ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, причём мутантный ген HvNst1 кодирует NST1 последовательности SEQ ID NO: 1 и остаток Val в положении 273 заменён на Glu.

12) Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень содержит мутацию в гене HvNst1, приводящую к экспрессии белка NST1 со степенью по меньшей мере 80%, уменьшенной по сравнению с экспрессией белка NST1 в ячмене дикого типа, таком как ячмень сорта Quench.

13) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия b) включает смешение измельчённых зёрен ячменя с водой.

14) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия b) включает смешение измельчённых зёрен ячменя с водой при отношении воды к измельчённому ячменю от 1 до 10-20.

15) Способ по любому из предыдущих пунктов, где затирание на стадии b) включает выдержку при температуре в пределах от 60 до 72°C.

16) Способ по любому из предыдущих пунктов, где затирание на стадии b) включает выдержку при температуре в пределах от 60 до 72°C в течение времени от 30 до 60 мин.

17) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная α -амилаза является ферментом, классифицируемым согласно классификации EC 3.2.1.1.

18) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная α -амилаза является полипептидом с SEQ ID NO: 3 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида на по меньшей мере на 70%.

19) Способ по любому из пп.2-18, где глюкоамилаза является ферментом, классифицируемым согласно классификации EC 3.2.1.3.

20) Способ по любому из пп.3-19, где указанная пуллулаза является ферментом, классифицируемым согласно классификации EC 3.2.1.41.

21) Способ по любому из пп.3-20, где указанная пуллулаза является полипептидом с SEQ ID NO: 4 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида на по меньшей мере на 70%.

22) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная эндо-1,3(4)- β -глюканаза является лихеназой.

23) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная эндо-1,3(4)- β -глюканаза является ферментом, классифицируемым по классификации EC 3.2.1.73.

24) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная эндо-1,3(4)- β -глюканаза является полипептидом с SEQ ID NO:5 или его функциональным гомологом, последовательность которого идентична последовательности полипептида на по меньшей мере на 70%.

25) Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанная эндо-1,3(4)- β -глюканаза является ферментом, классифицируемым по классификации E.C.3.2.1.4.

26) Способ по любому из предыдущих пунктов, где активность эндо-1,3(4)- β -глюканазы во время затирания составляет самое большое 0.5 EGU на грамм ячменя (сухой вес), предпочтительно самое большое 0.1 EGU на грамм ячменя (сухой вес).

27) Способ по любому из предыдущих пунктов, где активность эндо-1,3(4)- β -глюканазы во время затирания составляет самое большое 0.05 EGU на грамм ячменя (сухой вес).

28) Способ по любому из предыдущих пунктов, где он включает стадию инактивации ферментной композиции, например, путём выдержки при температуре более 75°C.

29) Способ по любому из предыдущих пунктов, где водный экстракт, полученный на стадии c) представляет собой напиток.

30) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия d) включает нагрев основы напитка до температуры, равной по меньшей мере 75°C.

31) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия d) включает добавление одного или более дополнительных соединений или дополнительных жидкостей к основе напитка, полученной на стадии c), для получения напитка.

32) Способ по п.31, где по меньшей мере одно дополнительное соединение выбрано из группы, состоящей из вкусового вещества, консерванта и функционального ингредиента.

33) Способ по любому из пп.31, 32, где по меньшей мере одна дополнительная жидкость выбрана из группы, состоящей из фруктового сока, воды и пива.

34) Способ по любому из пп.31-33, где по меньшей мере одно дополнительное соединение представляет собой стабилизатор.

35) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия d) включает ферментацию основы напитка с помощью одного или более микроорганизмов.

36) Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия d) включает ферментацию основы напитка с помощью дрожжей для получения алкогольного напитка.

37) Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток имеет вязкость равную самое большое 55 мПа·с.

38) Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток имеет вязкость равную самое большое 50 мПа·с, например самое большое 40 мПа·с, например самое большое 35 мПа·с.

39) Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток имеет вязкость равную самое большое 35 мПа·с.

40) Напиток, содержащий по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, причём указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, и указанный напиток получен способом по любому из предыдущих пунктов.

41) Напиток по п.40, который содержит по меньшей мере 3 г/л, например по меньшей мере 4 г/л β -глюканов.

42) Напиток по любому из пп.40-41, который имеет вязкость самое большое 50 мПа·с, например, самое большое 40 мПа·с, например самое большое 35 мПа·с.

43) Напиток по любому из пп.40-42, который предназначен для уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца и диабета.

44) Способ уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, диабета и инфекций, включающий введение напитка по любому из пп.40-42 указанному субъекту в эффективном количестве.

45) Способ снижения в крови уровня по меньшей мере одного липида, выбранного из группы, состоящей из триглицеридов, холестерина и LDL, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение напитка по любому из пп.40-42 указанному субъекту.

46) Способ уменьшения риска развития ожирения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий потребление указанным субъектом напитка по любому из пп.40-42.

47) Способ по любому из пп.43-46, где указанный субъект является человеком.

48) Способ по любому из пп.44-47, где указанному субъекту ежедневно вводят напиток, содержащий по меньшей мере 3 г β -глюкана.

Примеры

Изобретение далее иллюстрируется следующими примерами, которые не следует считать ограничивающими данное изобретение.

Пример 1. Получение суслу с высоким содержанием β -глюкана.

Получение суслу (экстракта) с высоким содержанием β -глюкана осуществляли в электронном заторном аппарате фирмы Lochner с 8 заторными стаканами. Получали суслу с высоким содержанием β -глюкана - > 8 г/л. В этом примере использовали ячмень сорта Lys5f. Lys5f доступен в Nordic Genetic Resource Center под номером доступа NGB20030. Зёрна ячменя измельчали в мельнице EBC (до 0.5 мм). Отношение вода:мука было равно 1:15 по весу, что эквивалентно 27 г (на сухой вес) ячменной муки, заваренной в 400 мл стандартной воды для пивоварения при 65°C в металлическом стакане объёмом 500 мл. Сразу после смешения измельчённого ячменя с водой добавляли вместе два коммерческих ферментных препарата (концентрация 0.2%/влажный вес - соответствует 400 мкл каждого ферментного препарата), обладающих активностью α -амилазы, α -1,4-глюкозидазы, пуллулаказы и β -глюканазы, для того чтобы облегчить процесс декстринизации крахмала и экстракции β -глюкана. Использовали две разных ферментных смеси, или смесь Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex (TAF), или смесь Termamyl® SC и Attenuzyme® (TA). Все ферменты были куплены в Novozymes, Denmark. Termamyl® SC обладал активностью α -амилазы 120 KNU/г, соответственно примерно 48 KNU α -амилазы на 27 г ячменя (соответствует 1.8 KNU на г ячменя - в расчёте на сухой вес). На этой стадии величину pH устанавливали равной 5.5 добавлением фосфорной кислоты. Через 45 мин выдержки при 65°C температуру постепенно повышали

до 90°C в течение 25 мин и, наконец, выдерживали смесь при 90°C в течение 30 мин. Сусло центрифугировали при 3500 об/мин (RC5C) в течение 10 мин для удаления нерастворимых отработанных зёрен. Всё количество сусла (340 мл) выливали в сосуды Blue Cap b и кипятили при 90°C в течение 30 мин. Измеренное количество β -глюкана составило 8.4 г/л для сусла lys5f TAF (применяли окрашивание калькофлуором (Brewing EBC standards, 1994)) (система β -глюкан Carlsberg 5700 Analyzer, Tecator, Sweden). После кипячения в сусло добавляли коммерческую геллановую смолу в качестве стабилизатора (Kelcogel® LT-100, CP Kelco, Lille Skensved, Denmark) для стабилизации растворимых β -глюканов в мягкой и эластичной гелеобразующей матрице. Конечная концентрация добавленного стабилизатора составляла 0.025%. Сусло с высоким содержанием β -глюкана хранили при 5°C до последующего дображивания и добавления вкусовых веществ.

Пример 2. Получение сусла, содержащего β -глюкан.

По существу, процесс проводили, как описано в примере 1 за исключением того, что сусло получали на пилотной установке (500 л) с применением декантера (скорость потока 700 л/ч) с последующим центрифугированием (475 л/ч, обратное давление 3 бар) для отделения нерастворимого ячменя. Выход сусла составил 85% в расчёте на количество загруженной воды, содержание β -глюкана, определённого окрашиванием калькофлуором, составило 4 г/л. Сусло помещали в пищевые контейнеры, добавляли сорбат калия (25 мг/л), величину pH устанавливали равной 4.0 при помощи раствора лимонной/молочной кислоты и сусло выдерживали при 5°C перед стабилизацией и добавлением вкусовых веществ. Ингредиенты, состоящие из 5% сахара, 0.3% вкусового вещества, 0.1% красителя и 0.025% геллановой камеди, диспергировали в основе с высоким содержанием β -глюкана при комнатной температуре, используя смеситель с высокой скоростью сдвига с последующей низкой скоростью в течение 5 мин и гидратировали в течение 15 мин. После смешения ингредиентов напиток подвергали воздействию УНТ и гомогенизировали для сохранения стабильности. На первой стадии осуществляли предварительный нагрев до 80°C и гомогенизировали при давлении 180 бар. Затем подвергали действию УНТ при 90°C в течение 4 с. Затем напиток охлаждали до 20°C и помещали в стерильные бутылки из PET (250 мл).

Пример 3.

Процесс, по существу, осуществляли, как описано в примере 1 за исключением того, что сусло получали на пилотной установке с применением сушварочных котлов. Использовали опять ячмень lys5f, однако собранный в другой сезон. После проведения затирания жидкость подавали насосом в фильтрационный чан и снижали температуру до 75°C и оставляли для осаждения на 24 ч для удаления нерастворимого ячменя. Всё сусло в количестве 160 л помещали в сушварочный котёл и кипятили при 90°C в течение 30 мин. Определяли содержание β -глюкана при помощи калькофлуора, оно составило 6 г/л сусла.

Пример 4. Описание действия второстепенной активности β -глюканазы ферментов, использованных в примерах 1, 2 и 3.

Наличие действия β -глюканазы в трёх разных коммерческих ферментных смесях, использованных при получении экстракта, проверяли, применяя β -глюкан ячменя средней вязкости (200 кДа) фирмы Megazyme (Ireland). β -глюкан растворяли при осторожном нагреве и вихревом перемешивании до получения концентрации 1 мг в 600 мкл 50 mM фосфата калия в качестве буфера в D₂O (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA), pH 6. Таким образом, получали три образца субстрата и смешивали их с 0.5 мкл раствора фермента (Termamyl® SC, Attenuzyme® или Attenuzyme® Flex соответственно). После окончания реакций проводили *in situ* спектроскопию ядерного магнитного резонанса высокого разрешения (NMR) в течение 240 мин при 18°C. На фиг. 1 показаны конечные продукты разложения β -глюкана с помощью Attenuzyme® Flex, Attenuzyme® и Termamyl® SC при 18°C. Самое высокое побочное действие β -глюканазы показал Attenuzyme® Flex (фиг. 1) с последующим действием Attenuzyme®. В случае Termamyl® SC активность β -глюканазы не наблюдалась. Об активности фермента судили по появлению сигналов восстанавливающих концов, отличных от звеньев глюкозы (содержащейся в ферментных смесях), как показано на фиг. 2, которая иллюстрирует спектр ¹H-¹H COSY β -глюкана lys5f, разложение которого произошло под действием активности β -глюканазы (лихеназы) Attenuzyme® Flex при 65°C.

Сайт-специфическое действие второстепенной активности β -глюканазы изучали, используя образец β -глюкана lys5f, экстрагированного одним Termamyl® SC в реальных условиях процесса (как описано в примере 1), т.е. при 65°C. Спектры ¹H-¹H DQF COSY гомонуклеарных молекул записывали для образцов, разложившихся под действием ферментов, используя спектрометр 800 Гц Bruker (Fallanden, Switzerland). ЯМР спектрометр, снабжённый криопробой TCI и магнитом 18.7 Т (Oxford Magnet Technology, Oxford, UK) использовали для идентификации β -глюканов, образовавшихся под действием ферментной смеси Attenuzyme® Flex (фиг. 2). Назначение сигналов сайтов промежуточных соединений разложения осуществляли путём сравнения спектров 2D с эталонными назначениями по предыдущим работам (Peteresen et al., 2013). Эти назначения показывают, что преобладающие в основном сигналы сайтов разложения могут быть сигналами восстановительных β -(1-3) концов, образовавшихся при разложении активной эн-

до-1,3-1,4-β-D-глюканазой (Lichenase, EC 3.2.1.73) в препаратах Attenuzyme® Flex и Attenuzyme®. Наличие указанной активности эндоглюканазы объясняет быстрое уменьшение молекулярной массы β-глюкана. Согласно данному изобретению предпочтительно использовать второстепенную активность коммерческих препаратов Attenuzyme® Flex и Attenuzyme®, поскольку эта активность приводит к регулируемому разложению β-глюканов ячменя до достижения нужной вязкости.

Пример 5а. Характеристики β-глюкана.

Определение характеристик и количественное определение β-глюкана из ячменного сусла, полученного, как описано в примере 1, описано в этом примере. Сусло приготавливали из нескольких сортов ячменя, включая lys5f и различные коммерческие виды. Общее содержание β-глюкана в зёрнах использованного ячменя приведено в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Количество β-глюкана в различных сортах ячменя (2 параллельных анализа)			
Ячмень	Сухое вещ.	Конц.	Содержание β- глюкана
Мука	(%)	(мг/л)	(% сухого вещества)
lys5f (партия 1)	94	779.6	16.5
lys5f (партия 1)	94	737.6	15.7
lys5f (партия 2)	94	724.4	15.3
lys5f (партия 2)	94	724.1	15.2
Colombus	90	188.7	4.2
Colombus	90	177.2	3.6
Chameleon	91	208.6	4.6
Chameleon	91	217.6	4.7

Для определения содержания β-глюкана в сусле, а также в зёрнах ячменя использовали флуориметрический метод (Brewing EBC standards, 1994). Используемый прибор представлял собой анализатор β-глюкана Carlsberg System 5700 Analyzer, Tecator, Sweden, для анализа впрыска потока, использующий в качестве основных параметров измерения изменения интенсивности флуоресценции красителя калькофлуор, основанные на его способности связываться с β-глюканом. Калькофлуор имеет способность связываться с β-глюканом с молекулярной массой >10-30 кДа, находящимся в растворе и увеличивает его интенсивность флуоресценции прямо пропорционально содержанию связанного β-глюкана.

Стабильность содержания β-глюкана определяли путём хранения сусла (4 г/л β-глюкана) в течение 6 мес. при комнатной температуре и регулярного определения содержания β-глюкана с применением метода окрашивания калькофлуором, описанного выше. Определяли содержание β-глюкана в сусле, полученном из lys5f, как описано в примере 1, и в растворе Glucagel™, результаты показаны на фиг. 9.

Вязкость сусла измеряли вискозиметром Vibro SV-10 (A&D Company Limited, Tokyo) при 20°C в течение 1 ч после центрифугирования сусла (как описано в примере 1). Затем помещали 10 мл экстракт в вискозиметр и записывали результаты измерения вязкости в мПа·с. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Ячмень	Мука : вода	Вязкость сусла (мПа·с)
Chameleon	1:15	2.7
Colombus	1:15	2.4
lys5f (a)	1:20	4.7
lys5f (b)	1:15	8.7
lys5f (c)	1:10	34.1
Вязкость (мПа·с) сусла из различных сортов ячменя, экстрагированного Termamyl® SC + Attenuzyme® Flex (TAF)		

В дополнение, было приготовлено сусло (экстракт) из ячменя разных линий, как описано в примере 1 после экстракции с использованием или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex (TAF), или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® (TA) или Termamyl® (T). Определяли вязкость экстрактов, результаты приведены на фиг. 12. Экстракты ячменя, полученные при использовании TAF, имели очень низкую вязкость.

Перед определением молекулярной массы и отношения DP3/DP4 β-глюканы осаждали из сусла, используя этанол. Осаждение проводили смешением 1:1 сусла, полученного, как описано в примере 1 в 80% этаноле в стеклянном стакане при комнатной температуре. Смесь оставляли для осаждения на 30 мин. Полученный осадок β-глюканов собирали на сите и сушили при замораживании в течение 24 ч. Высушенные осадки β-глюканов взвешивали и размалывали в порошок.

Определение молекулярной массы проводили методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Образцы помещали в колонку Asahipak GS 520HQ (7.5*300 мм) или Asahipak GS 320HQ (7.5*300 мм) (Shodex, US). Колонку калибровали с помощью пяти стандартов β-глюкана; ячмень BG 650000, овёс BG 391000, овёс BG 265000, ячмень BG 229000, овёс BG 70600 и овёс BG 35600 (Megazyme, Ireland). Элюирование проводили с помощью 50 mM буфера NH₄COOH с pH 5 и 0.01% NaN₃ при 60°C с постоянной скоростью потока 0.5 мл/мин. Разделение осуществляли, используя систему GPC (Viscotek 270max, Malvern), снабжённую online дегазатором, насосом и дифференциальным рефрактометром при 40°C. Порошковый образец смачивали 20 мкл 50% этанола перед растворением в буферном растворе. Перед центрифугированием 1 мг/мл раствора нагревали до 80°C в течение 2 ч. Все образцы центрифугировали и фильтровали (0.45 мкм) перед впрыском 50 мкл. Результаты определения молекулярной массы анализировали при помощи программы Omnisec software (версия 4.7.0.406, Malvern), основанной на переходящей калибровке гомополимеров.

Результаты определения молекулярной массы трёх видов β-глюканов показаны в табл. 3.

Таблица 3. Средняя молекулярная масса (Mw) выбранных β-глюканов

β-глюкан	Mw (кДа)		
Glucagel™ (DKSH)	100		
lys5f TAF (экстрагиров. Termamyl® SC & Attenuzyme® Flex)	150		
lys5f TA (экстрагиров. Termamyl® SC & Attenuzyme®)	530		

Как описано в примере 4, Attenuzyme Flex обладает активностью эндо-1,3-1,4-β-D-глюканазы.

Отношение DP3/DP4 (целлотриозы к целлотетраозе) описывает структуру блоков олигомера β-глюкана. Определение отношения DP3/DP4 было основано на полном разложении β-глюкана, осаждённого из сусла, приготовленного как описано выше, лихеназой. Отношение DP3/DP4 определяли для β-глюканов в экстрактах, приготовленных из различных сортов ячменя, а также для β-глюканов коммерческого сорта ячменя Glucagel™. Смесь для анализа состояла из 2.5 мг образца β-глюкана в 500 мкл 10 mM

буфера $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ и 110 мкл суспензии лихеназы (10 Ед.) (Megazyme, Ireland). Перед растворением в буферном растворе образец смачивали 10 мкл этанола (50% об./об.). Полученный раствор нагревали до 96°C в течение 2 ч перед добавлением лихеназы. Образец выдерживали в течение ночи при 60°C. Фермент инактивировали обработкой на бане с кипящей водой в течение 30 мин.

Аминобензамид (2-AB) является распространённой флуоресцентной меткой, прикрепленной к восстановительным концам олигосахаридов путём восстановительного аминирования. Флуоресцентное мечение меткой 2-AB (2-аминобензамидом) до UPLC анализа (Waters) проводили на эталонных стандартах и образцах следующим образом. Глюкозу, мальтозу, мальтотриозу, мальтотетраозу и мальтопентаозу растворяли в воде до получения концентрации 1 мг/мл. 200 мкл такого раствора подвергали лиофилизации. 200 мкл каждого образца также подвергали лиофилизации. К этим растворам добавляли 200 мкл 2-AB и 200 мкл NaBH_3CN . Образцы перемешивали при помощи вихревой мешалки и выдерживали в течение ночи при 60°C, затем охлаждали до комнатной температуры, разбавляли 3.6 мл H_2O и промывали CH_2Cl_2 (2×8 мл). Из каждого слоя собирали 1 мл, центрифугировали в течение 5 мин и разбавляли 1:10 смесью 10 mM буфера формиата аммония (pH 4.5) и ацетонитрила (22:78).

Результаты определения отношения DP3/DP4 приведены в табл. 4.

Таблица 4. Отношение DP3/DP4 в β -глюкане из отобранных сортов ячменя и Glucagel™

β G выбранных сортов ячменя	Отношение DP3/DP4
lys5f	3.8
Glucagel™ (DKSH)	3.1
Chameleon	2.7
Colombus	2.6

Chameleon и Columbus являются коммерчески доступными сортами ячменя.

На фиг. 11 показано отношение DP3/DP4 в зёрнах ячменя различных сортов (показанных на фигуре) вместе с Mw β -глюканов в экстрактах, приготовленных из указанных зёрен ячменя, как описано в примере 1, после экстракции с использованием или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex (TAF), или смеси Termamyl® SC и Attenuzyme® (TA) или Termamyl® (T).

Пример 6. In vitro действие β -глюканов из экстракта (сусла).

Этот опыт проводится для определения того, как молекулярная масса β -глюканов влияет на способность полисахаридов связывать соль жёлчной кислоты in vitro. Мы использовали метод ^1H - ^{13}C ЯМР (800 МГц) высокого разрешения, описанный в публикации Mikkelsen et al. 2014 для зондирования взаимодействия между β -глюканом и гликохолятом на молекулярном уровне. Тестируемые β -глюканы представляли собой следующее.

А. Низкомолекулярный lys5f TAF (LMw - 150 кДа) - экстрагированный из Termamyl® SC и Attenuzyme® Flex, как описано в примере 1.

В. lys5f TA со средней молекулярной массой (MMw - 530 кДа) -экстрагированный из Termamyl® SC и Attenuzyme®, как описано в примере 1

Образцы β -глюкана растворяли (1% вес./об.) в 100 mM буферного раствора ацетата натрия (pH 5) в D_2O и гидратировали при 99°C в течение 30 мин. Ацетатный буфер с pH 5 готовили в H_2O до лиофилизации и последующего растворения в D_2O . Соль жёлчной кислоты смешивали с раствором β G с концентрациями 0, 5, 15, 30 или 45 mM и смеси выдерживали при 37°C в течение 120 мин. После этой выдержки образцы перемещали в трубки 5 мм для ЯМР и анализировали при 37°C методом ^1H - ^{13}C гетероядерной одноквантовой корреляционной спектроскопии (HSQC).

Адсорбцию соли жёлчных кислот β -глюканами оценивали по изотерме адсорбции Лэнгмюра и при использовании разницы химических сдвигов в модели адсорбции Лэнгмюра для количественного определения влияния величины молекулярной массы β -глюканов на взаимодействие с гликохолятом. Результаты показаны на фиг. 3.

Изменения сигналов ($\Delta\delta$) между резонансами двух β -глюканов свидетельствуют о непосредственном взаимодействии между β -глюканами и солью жёлчной кислоты в растворе. Это согласуется с прямым связыванием гликохолята и β -глюканов, полученным в присутствии Termamyl® SC и Attenuzyme® (lys5f TA на фиг. 3) при дополнительной обработке Attenuzyme® Flex (lys5f TAF на фиг. 3). В то время как обнаруживается адсорбция соли жёлчной кислоты обоими β -глюканами, степень связывания соли жёлчной кислоты между двумя препаратами не меняется в значительной степени. Следовательно, эти in vitro результаты подтверждают, что β -глюкан с молекулярной массой 150 кДа lys5f TAF сохраняет способность β -глюкана с молекулярной массой 530 кДа lys5f TA адсорбировать соли жёлчных кислот путём

непосредственного молекулярного взаимодействия.

Пример 7. In-vivo действие β -глюкана из экстракта (сусла).

Цель исследования на животных заключалась в определении того, как вид и качество β -глюкана влияют на метаболизм холестерина в организме гиперхолестеринемических крыс. В этой in vivo модели мы выбрали три разных вида β -глюканов с сильно отличающимися структурами и молекулярными массами. Основное внимание обращалось на понижение уровня холестерина в крови. Тест начинали с подготовительного периода, составившего 3 нед., когда использовали корм с высоким содержанием липидов (2%) (плюс 0.5% хелевой кислоты натриевой соли/соли жёлчной кислоты), который, как было установлено, индуцировал гиперхолестеринемию у самцов крыс линии Wistar.

Использовали тестовый режим питания, когда все порции корма содержали одно и то же количество белка, жира, крахмала и клетчатки (5%). Затем в корм добавляли 2% холестерина. Основываясь на точном определении содержания белка, крахмала и пищевой клетчатки в порошке β -глюкана, состав корма регулировали таким образом, чтобы содержание различных питательных компонентов в ежедневной порции корма было идентичным. Состав корма в трёх экспериментах (А, В, С) был основан на высоком содержании жира (клетчатку см. табл. 5), когда содержалось 5% клетчатки из следующих трёх видов β -глюкана:

А: контрольный β -глюкан - Glucagel™ (DKSH);

В: низкомолекулярный lys5f TAF (LMw) - экстрагированный с помощью Termamyl® S;

С: lys5f ТА со средней молекулярной массой (MMw) - экстрагированный Termamyl® SC & Attenzyme® Flex, как описано в примере 5а.

Lys5f β -глюканы с низкой и средней молекулярной массами получали путём осаждения β -глюканов из экстракта. Экстракт готовили, как описано в примере 1, используя ячмень lys5f, и осаждение проводили, как описано в примере 5а.

Таблица 5. Пищевая композиция с высоким содержанием жира (% от основы)

Ингредиенты:	
Белая пшеничная мука	42.0
β -глюкан	-
Казеин Miprodan 30	19.0
Сахароза	12.0
Соевое масло	5.0
Шпиг	10.0
Холестерин	2.0
Порошковая целлюлоза	5.0
Минеральная смесь AIN 93G	3.5
Смесь витаминов AIN 93	1.0
L-цистин	0.3
Битартрат холина	0.3
% содержание	100.1

В эксперименте использовали всего 36 крыс линии Wistar (12 на группу) в возрасте 5 нед. Тест проводили 2 блоками с 24 или крысами, с промежутком в 3 нед. По прибытии крыс маркировали с помощью чипов и помещали в контейнеры (4/6 на контейнер). По прибытии крыс кормили ad lib (вволю) стандартным кормом AIN93G (в виде гранул), затем кормили ad libitum (без ограничения) испытуемым кормом с высоким содержанием жира в течение 3 нед. Расход корма в каждом контейнере (4-5 животных) записывали еженедельно.

Через 3 нед. животных взвешивали и отбирали кровь из хвостов под общей анестезией для определения уровня липидов в крови. Животных распределяли рандомизированно на 3 группы по весу (похожий вес в группе) и помещали по 4 животных в клетку (одна клетка на группу в блоке) и кормили ad libitum. Еженедельно записывали расход корма и вес животных.

Через 5 нед. крыс размещали по одной в метаболические клетки. Через 3 дня пребывания проводи-

ли тесты по определению усвояемости при ежедневном добавлении 20 г корма/день. Общее количество корма (80г) фиксировали и полученные удобрения собирали в один пакет.

Через 7 нед. каждую крысу взвешивали и умерщвляли под анестезией. Отбирали кровь для определения содержания триглицеридов в плазме, общего холестерина в плазме, HDL в плазме, LDL в плазме из желудка. Содержание твёрдых веществ в% в аппендиксе анализировали по содержанию летучих жирных кислот.

Удобрение из балансового опыта сушили при замораживании и анализировали на содержание сухого вещества и золы.

Результаты изменения липидного профиля после обработки крыс показаны на фиг. 4-7. Содержание всех липидов определяли на анализаторе Pentra 400. Поскольку липопротеины низкой плотности (LDL холестерин) является основным фактором риска развития ишемической болезни сердца, предпочтительно, чтобы содержание LDL снижалось. Точно так же предпочтительно, чтобы снижался уровень общего холестерина. Однако липопротеины высокой плотности (HDL холестерин) известны как "хороший" холестерин, потому что он способствует предотвращению закупорки артерий, и, следовательно, предпочтительно, чтобы уровень HDL не снижался.

Численные изменения общего содержания SCFA определяли после обработки (см. фиг. 8). Определяли общее количество SCFA = масляная кислота, пропионовая кислота и уксусная кислота (ммоль во влажном образце, кг) x вес (г) содержание аппендикса.

Статистический анализ показал значительную разницу общего содержания SCFA между экспериментальным введением β -глюкана (LMw lys5f, MMw lys5f), и коммерчески доступного β -глюкана ячменя GlucageTM. Увеличение общего содержания SCFA после введения β -глюканов рассматривается как благоприятное, поскольку SCFA были связаны с механизмом снижения уровня холестерина и их функция в качестве источника энергии для клеток толстой кишки важна для хорошего здоровья кишечника.

Пример 8. Экстракт ячменя готовили путём затирки ячменной муки в следующих смесях.

Состав экстракта - опыт 1.

27 г т ячменной муки сорта Lys5f;
400 мл воды (водопроводная);
530 мкл 25% фосфорной кислоты;
120 мкл 35% раствора хлорида кальция;
800 мкл Termamyl® Sc;
4 мкл β -глюканазы (Attenuzyme® flex или Ultraflo® max).

Состав экстракта - опыт 2.

27 г т ячменной муки сорта Lys5f;
400 мл воды (водопроводная);
530 мкл 25% фосфорной кислоты;
120 мкл 35% раствора хлорида кальция;
800 мкл Termamyl® Sc;
0.4 мкл β -глюканазы (Attenuzyme flex или Ultraflo max).

Состав экстракта - опыт 3.

27 г т ячменной муки сорта Lys5f;
400 мл воды (водопроводная);
530 мкл 25% фосфорной кислоты;
120 мкл 35% раствора хлорида кальция;
800 мкл Termamyl® Sc;
0,04 мкл β -глюканазы (Attenuzyme® flex или Ultraflo® max).

Termamyl® SC, Attenuzyme® Flex или Ultraflo® max были доступны в Novozymes, Denmark. Для получения небольших количеств фермента использовали разведение 100 мкл фермента + 9,9 мл воды, однако, указанные количества соответствуют объёму первоначального ферментного препарата.

Затирание проводили при 65°C в металлическом стакане объёмом 500 мл. Через 45 мин выдержки при 65°C температуру постепенно повышали до 90°C в течение 25 мин и, наконец, выдерживали экстракт при 90°C в течение 30 мин. Экстракт подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (20-24°C) для удаления нерастворимого отработанного зернистого материала.

Величину вязкости и содержание β -глюкана определяли практически, как описано в примере 5 выше. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

β-глюканаза	Объём β-глюканазы, мкл	Вязкость, мПа·с	β-глюкан г/л*
Attenuzyme flex	4	50,6	10,940
	0.4	52,3	11,528
	0.04	46,3	9,826
Ultraflo max	4	4,36	4,080
	0.4	23,8	9,684
	0.04	52,1	10,856

Согласно данным производителя Attenuzyme® Flex содержит глюкоамилазу, α-амилазу и пуллулазу. Однако, как описано в примере 4 выше в данной заявке, Attenuzyme® Flex также обладает второстепенной активностью β-глюканазы. Когда Attenuzyme® Flex используют в очень небольших количествах, полученный экстракт обладает вязкостью, величина которой находится в дальнем конце предела. Однако, как показано в примере 5а, где применяли большие количества Attenuzyme® Flex, получался экстракт с меньшей вязкостью.

Согласно данным производителя Ultraflo® Max содержит β-глюканазу (700 EGU/г) и ксиланазу (250 FXU/г). Используемое в данной заявке сокращение EGU обозначает единицы эндоглюканазы. При использовании примерно 0.28 EGU Ultraflo® Max на 27 г ячменя (что соответствует 0.01 EGU/г ячменя), получался экстракт с приемлемой концентрацией β-глюкана и приемлемой вязкостью. Когда использовали примерно 2.8 EGU Ultraflo® Max на 27 г ячменя (что соответствует 0.01 EGU/г ячменя), получался экстракт с меньшей, но всё ещё приемлемой концентрацией β-глюканов и приемлемой вязкостью. Когда использовали примерно 0.028 EGU Ultraflo® Max на 27 г ячменя (что соответствует 0.01 EGU/г ячменя), получался экстракт с приемлемой концентрацией β-глюканов, который имел вязкость, величина которой находится в дальнем конце приемлемого предела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ приготовления напитка, содержащего по меньшей мере 2 г/л β-глюкана, при этом указанные β-глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, включающий стадии:
 - а) предоставления зёрен ячменя, причём указанные зёрна обладают следующими характеристиками:
 - i) содержат по меньшей мере 10% β-глюканов;
 - ii) имеют отношение DP3/DP4 в указанном β-глюкане, составляющее по меньшей мере 3,4,
 - б) затирания указанных зёрен с водой в присутствии ферментной композиции, при этом указанная композиция обладает активностью α-амилазы и активностью эндо-1,3(4)-β-глюканазы, с получением при этом водного экстракта;
 - с) отделения указанного водного экстракта от зёрен ячменя с получением при этом напитка или основы напитка.
2. Способ по п.1, где ферментная композиция обладает также активностью глюкоамилазы.
3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ферментная композиция обладает также активностью пуллулазы.
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток содержит по меньшей мере 3 г/л, например по меньшей мере 4 г/л β-глюканов.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанные зёрна содержат по меньшей мере 11%, например по меньшей мере 12% β-глюканов.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где отношение DP3/DP4 в указанном β-глюкане составляет по меньшей мере 3.6, например по меньшей мере 3.7.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень имеет мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1, причём указанный мутантный NST1 содержит замену и/или в указанном мутантном NST1 отсутствует по меньшей мере одна консервативная аминокислота по сравнению с NST1 в SEQ ID NO: 1.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ячмень имеет мутацию в гене HvNst1, причём указанный мутантный ген HvNst1 кодирует мутантный белок NST1 в SEQ ID NO: 1, где остаток Pro в положении 228 был заменён на остаток Ser и/или где остаток Val в положении 273 был заменён на остаток Glu.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где стадия b) включает смешение измельчённых зёрен ячменя с водой при отношении вода:измельчённый ячмень от 1 до 10-20.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ дополнительно включает стадию d), где стадия d) является стадией превращения основы напитка в напиток.

11. Способ по п.10, где стадия d) включает добавление одного или более дополнительных соединений или дополнительных жидкостей к основе напитка, полученной на стадии c), для получения напитка.

12. Способ по п.11, где по меньшей мере одно дополнительное соединение выбрано из группы, состоящей из вкусового вещества, консерванта и функционального ингредиента и/или по меньшей мере одна дополнительная жидкость выбрана из группы, состоящей из фруктового сока, воды и пива.

13. Способ по пп.10-12, где стадия d) включает ферментацию основы напитка с помощью одного или более микроорганизмов.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где напиток имеет вязкость, равную самое большее 50 мПа·с, например самое большее 40 мПа·с, например самое большее 35 мПа·с.

15. Напиток, содержащий по меньшей мере 2 г/л β -глюканов, причём указанные β -глюканы имеют среднюю молекулярную массу в пределах от 80 до 200 кДа, и указанный напиток получен способом по любому из предыдущих пунктов.

16. Напиток по п.15, который имеет вязкость, равную самое большее 50 мПа·с, например самое большее 40 мПа·с, например самое большее 35 мПа·с.

17. Напиток по любому из пп.15, 16, который предназначен для уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца и диабета.

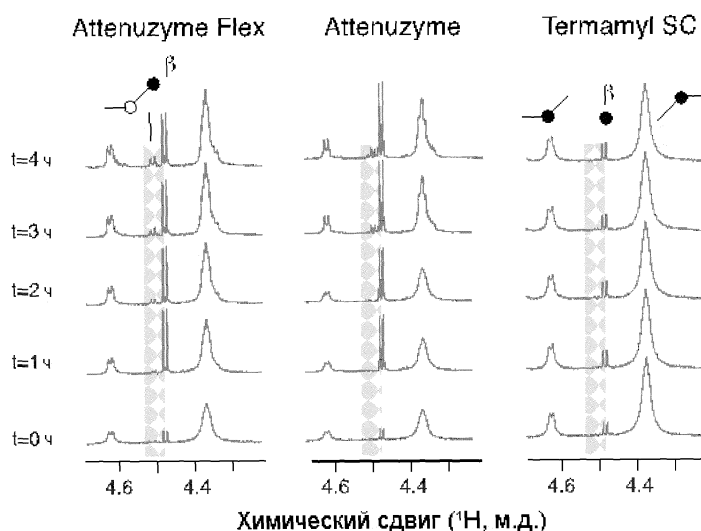
18. Способ уменьшения риска развития клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом клиническое состояние выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, диабета и инфекций, включающий введение напитка по любому из пп.15, 16 указанному субъекту в эффективном количестве.

19. Способ снижения в крови уровня по меньшей мере одного липида, выбранного из группы, состоящей из триглицеридов, холестерина и LDL, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение напитка по любому из пп.15, 16 указанному субъекту.

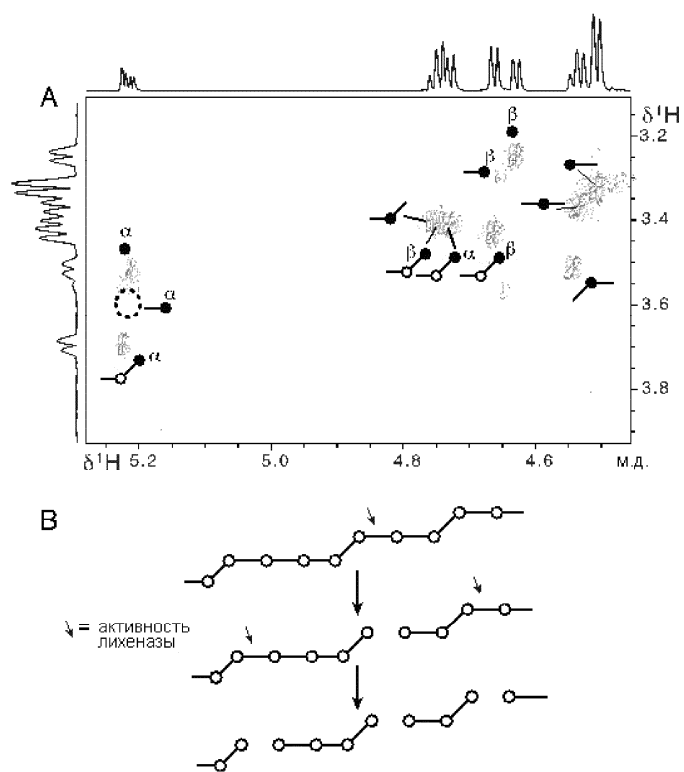
20. Способ уменьшения риска развития ожирения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий потребление указанным субъектом напитка по любому из пп.15-17.

21. Способ по любому из пп.18-20, где субъектом является человек.

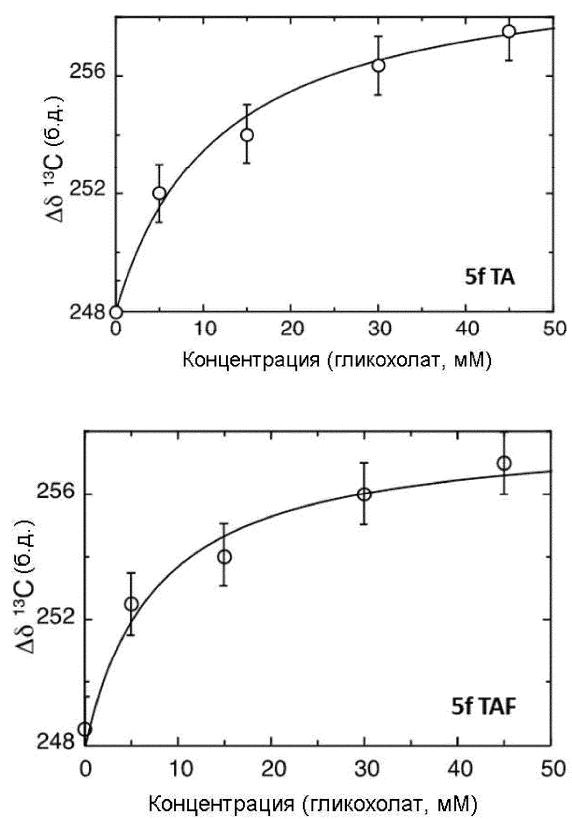
22. Способ по любому из пп.18-21, где указанному субъекту ежедневно вводят напиток, содержащий по меньшей мере 3 г β -глюкана.



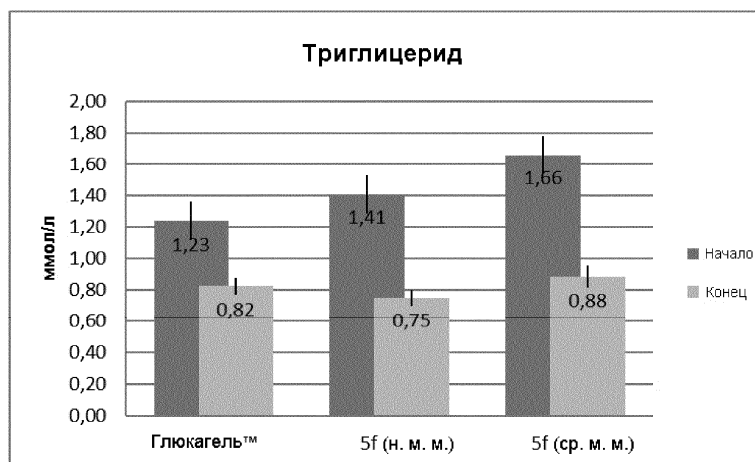
Фиг. 1



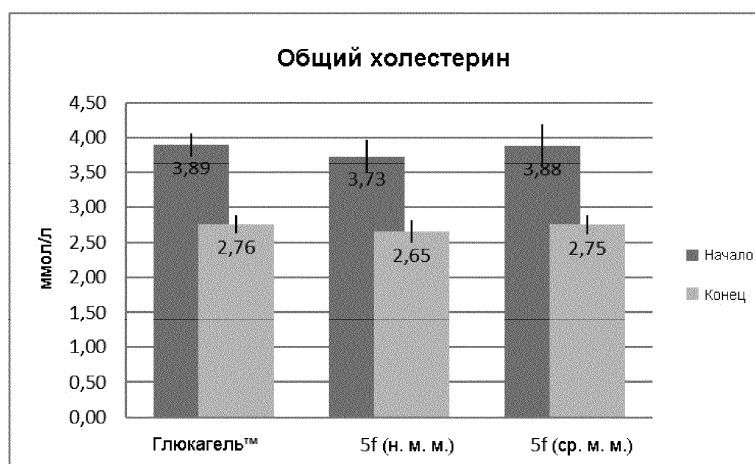
Фиг. 2



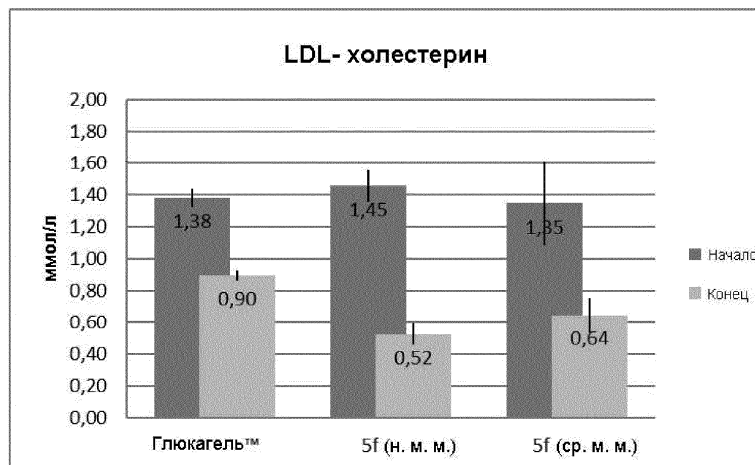
Фиг. 3



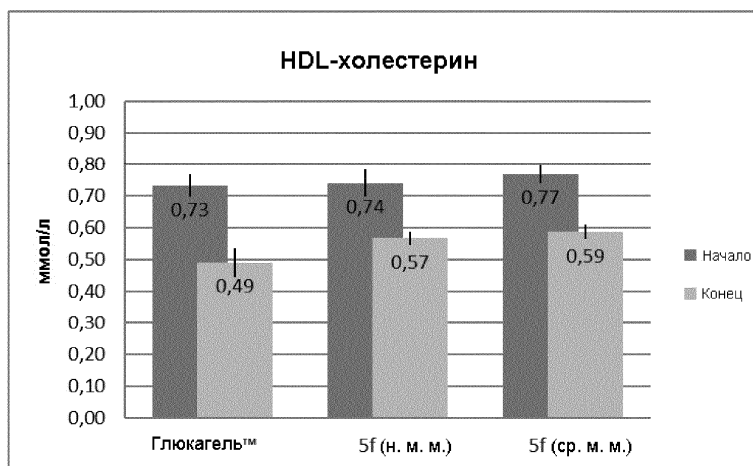
Фиг. 4



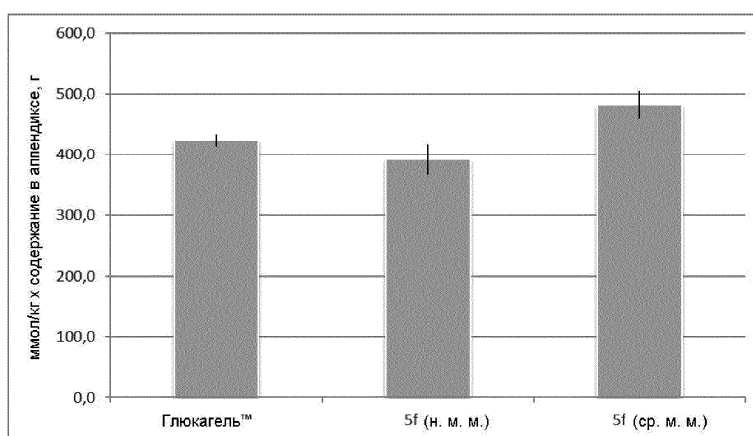
Фиг. 5



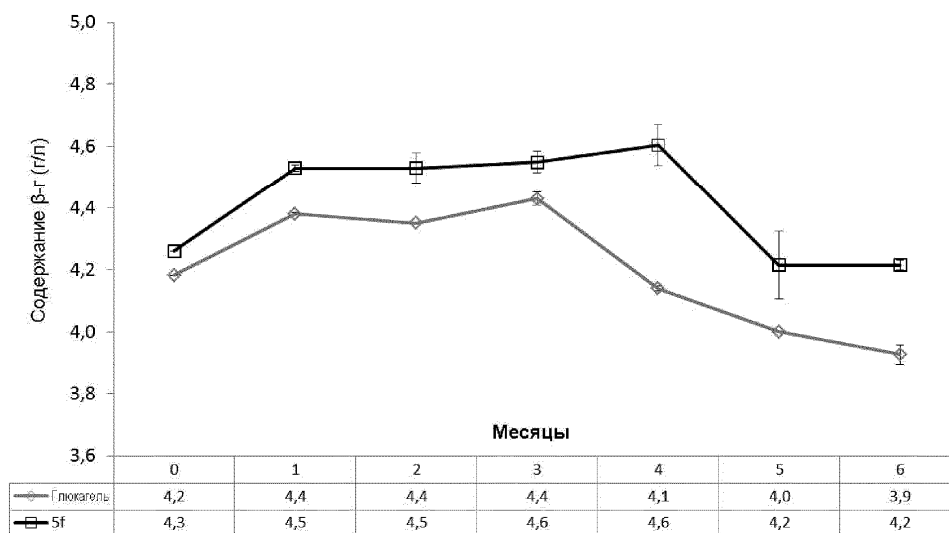
Фиг. 6



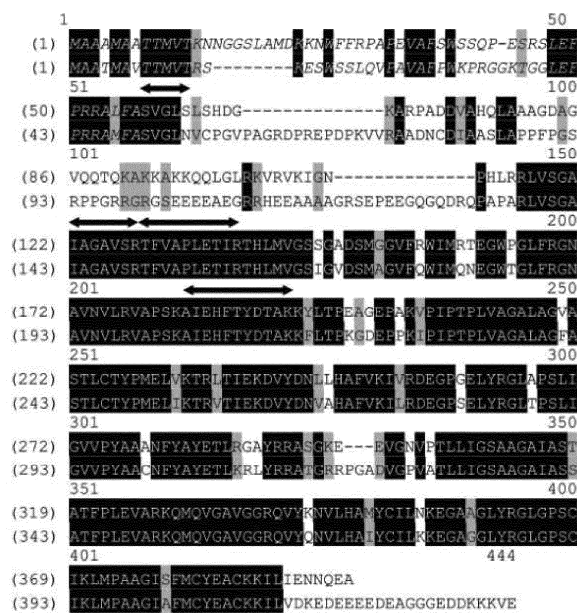
Фиг. 7



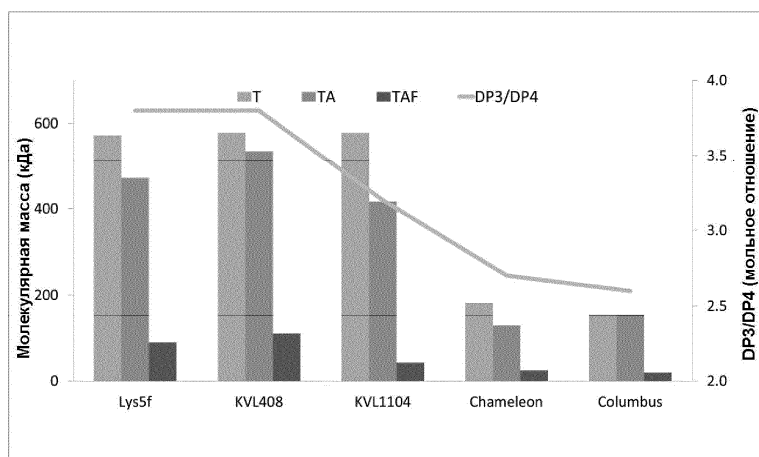
Фиг. 8



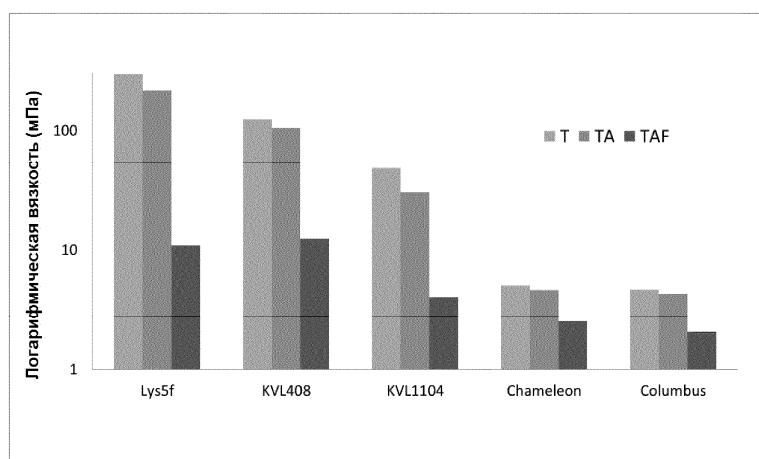
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2