

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045303**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.15

(21) Номер заявки
202091571

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(51) Int. Cl. *C12C 1/027* (2006.01)
C12C 1/047 (2006.01)
C12C 1/125 (2006.01)
C12C 1/18 (2006.01)
C12C 7/00 (2006.01)
C12C 7/01 (2006.01)
C12C 7/04 (2006.01)

(54) БЫСТРЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

(31) 17210963.9

(32) 2017.12.28

(33) EP

(43) 2020.10.12

(86) PCT/EP2018/086702

(87) WO 2019/129731 2019.07.04

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

(72) Изобретатель:
**Кнудсен Сорен, Лок Финн, Крусевич
Катарина, Томсен Ханне, Марри
Лучиа, Вендт Тони, Хархольт Джеспер
(DK)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Строкова О.В. (RU)**

(56) GB-A-1121394
US-A-4052795
WO-A1-2011127372
WO-A1-2010140563
GB-A-1384292
EP-A1-0743361
US-A-3446708
GB-A-1316226
WO-A1-2018001882
US-A-3795745

(57) Изобретение в целом относится к проращиванию и получению водных экстрактов зерновых культур (например, полученных путем затирания), в том числе к процессам, используемым для получения пива. Таким образом, изобретение относится к способам быстрого проращивания и получения водных экстрактов зерновых культур. Способы существенно ускоряют процесс получения сусла для получения напитков на основе зерновых культур с сохранением при этом потенциала для получения указанного сусла с низким содержанием β-глюкана. Изобретение одинаково применимо как в проращивании и получении водных экстрактов зерен других зерновых культур, в том числе риса, сорго, кукурузы, проса и пшеницы, так и в процессах пивоварения, предусматривающих добавки.

B1**045303****045303****B1**

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к проращиванию и получению водных экстрактов зерновых культур (например, полученных путем затирания), в том числе к процессам, используемым для получения пива. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам быстрого проращивания и получения водных экстрактов зерновых культур и способам получения напитка, предусматривающим быстрое проращивание и получение водных экстрактов зерновых культур. Способы значительно ускоряют процесс получения сусла для производства напитков на основе зерновых культур с сохранением при этом возможности получения указанного сусла с высоким содержанием сбраживаемых сахаров, предпочтительно с низким содержанием Р-глюкана и ксилана. Настоящее изобретение в равной степени применимо для проращивания и получения водных экстрактов зерна других зерновых культур, в том числе риса, сорго, кукурузы, проса и пшеницы, а также для процессов пивоварения, предусматривающих добавки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

В коммерческих процессах ослаживания зерна ячменя проращивают или получают солод в контролируемых условиях, что обеспечивает частичную мобилизацию запасов крахмала и белка крахмального эндосперма на протяжении периода 4-6 дней. Процесс ослаживания, как правило, инициируют погружением сухого зерна ячменя в воду. Этот процесс известен как замачивание, при этом целью является не только очистка зерна, но и повышение содержания в нем влаги до приблизительно 40-45% (мас./мас.), чтобы последующая стадия мобилизации эндосперма происходила быстрее. В ходе замачивания один раз сливают воду, чтобы обеспечить повторную аэрацию зерна. Эта стадия известна как "воздушная пауза" и считается необходимой, в первую очередь, потому что погруженное зерно начинает испытывать недостаток кислорода через приблизительно 16 ч. После "воздушной паузы" в течение приблизительно 8 ч зерно повторно погружают в воду для завершения обработки замачиванием на протяжении еще одного 8-часового периода или серии стадий повторного замачивания. Двухстадийный процесс замачивания для увеличения содержания влаги в сухом зерне до 40% или выше занимает в целом приблизительно 32 ч. В некоторых солодовнях используют методики замачивания распылением.

Погруженное зерно распределяют для проращивания, во время которого ферменты, секретируемые из алейроновых и скутеллярных эпителиальных клеток, а также некоторое количество уже имеющихся в крахмалистых клетках эндосперма разлагают клеточные стенки, крахмал и белок. Считают, что в нормальных условиях проращивания фитогормон гиббереллиновая кислота (GA) синтезируется в узловой области или в другом месте зародыша, откуда она диффундирует по градиенту воды (Fincher, 2011).

Солодовщик обычно стремится быстро индуцировать синтез как можно большего количества разлагающих крахмал ферментов в зернах. Во многих коммерческих программах ослаживания добавляют GA, чтобы ускорить процесс секреции фермента из алейронового слоя. Разлагающие крахмал ферменты, которые включают в себя α - и β -амилазы, расщепляющие разветвленную структуру крахмала ферменты и α -глюкозидазы, частично деполимеризуют запасы крахмала зерна до моносахаридов, олигосахаридов и глюкозы (Smith et al., 2005; в отношении указанных β -амилаз следует отметить, что они откладываются в крахмалистом эндосперме во время развития зерна). Продукты деполимеризации крахмала затем используются дрожжевыми клетками в качестве источника углерода и сбраживаются в пивной этанол. Диагностическая мощность является параметром качества ослаживания, который относится к уровням активности набора разлагающих крахмал ферментов, при этом для пивоварения желательны высокие значения.

Другие основные компоненты зерна ячменя включают в себя запасные белки, которые также находятся в мертвых крахмалистых клетках эндосперма и включают в себя гордеины, а также растворимые в воде и соли белки. Деполимеризация их также начинается естественным образом в процессе ослаживания, но пивовар может управлять степенью разложения этих белков, так что выделяется достаточное количество пептидов и аминокислот для поддержки роста дрожжей в ходе последующей стадии проращивания в пивоварне. Однако, если разложение запасных белков происходит слишком сильно, высвобождаемые белки могут вызвать трудности в процессе пивоварения. В частности, высокие количества высвобождаемого растворимого белка могут осаждаться и образовывать нежелательную мутность в конечном пивном продукте или повышать возможность образования альдегида Штреккера во время хранения пива. В спецификациях качества ослаживания желательно адекватное содержание свободного аминного азота (FAN) для роста дрожжей во время ферментации. Индекс Кольбаха является мерой отношения растворимого белка к суммарному белку, при этом солод, характеризующийся адекватным индексом Кольбаха, является предпочтительным. Поэтому степень разложения белка является постоянной проблемой для солодовщика. В дополнение к проблеме пивного осаждения, которая может быть связана с чрезмерно экстрагированными белками, очень высокое содержание FAN также может приводить к трудностям из-за возможности образования постороннего вкуса и запаха.

Солодовщики также пытаются индуцировать высокое содержание ферментов, которые разлагают полисахариды клеточной стенки в зерне ячменя, в частности (1,3; 1,4)- β -глюканы и арабиноксиланы. Не полностью разложившиеся (1,3; 1,4)- β -глюканы могут быть особенно проблематичными для пивоваров, поскольку они могут быть экстрагированы из солода в растворимых формах, которые образуют высоковяз-

кие водные растворы, замедляющие процессы фильтрации в пивоварне, и способствуют нежелательному помутнению в конечном пиве. Таким образом, низкое содержание растворимого (1,3; 1,4)- β -глюкана представляет собой важный параметр качества ослаживания, в то время как высокое содержание ферментов (1,3; 1,4)- β -глюканазы остается важным показателем качества солода.

После контролируемых стадий проращивания влажный солод сушат от содержания влаги приблизительно 40 до 4-5%. Этот процесс сушки, называемый обжигом, является очень энергоемким и составляет основные затраты для промышленности. Весь процесс, включая сушку обжигом, обычно занимает 6-7 дней.

Сушка в печи долгое время считалась важной частью получения пива по нескольким причинам. Одной из важных причин является то, что во время проращивания образуются проростки (также называемые "стеблями"). Проростки имеют горький вкус, который влияет на послевкусие пива, и, кроме того, проростки могут придавать пиву нежелательный цвет (см. Beer Brewing Technology (1999): 183, опублик. Shokuhin Sangyo Shimbun, а также патент США № 9326542). После того как зеленый солод был высушен в печи, проростки можно легко удалить, например, с использованием устройства для удаления стеблей. Согласно общему руководству по "Malts and Malting" D.E. Briggs, затем "стебли необходимо удалить [...], поскольку они являются очень гигроскопичными, богатыми растворимыми азотсодержащими веществами, содержат вещества с плохим запахом и горьким вкусом и могут быть богатыми диоксидом серы и/или нитрозамином. Удаление стеблей следует проводить сразу после извлечения солода из печи, чтобы помочь его охлаждению, и до того как проростки наберут влагу из воздуха, становясь слабыми и мягкими (менее хрупкими), и, таким образом, их сложнее будет разрушать и отделять" (D.E. Briggs, Malts and Malting; p695 First Edition, 1998, опублик. Blackie & Professionals, London, ISBN 0 41229800).

Высушенный в печи солод обычно имеет содержание влаги 4,5-5,0%. Высушенный в печи солод затем транспортируют из солодовни в пивоварню автомобильной дорогой, железной дорогой или морем. Это объясняется тем фактом, что процессы ослаживания и пивоварения традиционно проводили в разных местах и часто разными корпорациями.

В пивоварне высушенный в печи солод перемалывают для разрушения зерна и полученное содержимое экстрагируют горячей водой в процессе, известном как затирание. Экстрагированный материал содержит частично разложившийся крахмал, белок и молекулы клеточных стенок, как описано выше, и далее они разлагаются эндогенными ферментами зерна, которые были экстрагированы из солода. На этой стадии некоторые пивовары добавляют дополнительные и обычно недорогие источники углерода (добавки) для поддержания последующего процесса дрожжевого брожения и для компенсации более высокой стоимости солода. Указанные добавки могут представлять собой ячмень, рис, пшеницу или другую муку зерновых культур из непорощенного зерна, но их добавление может вызвать сопутствующее добавление гидролитических ферментов, поскольку в солоде присутствует недостаточно эндогенных ферментов для разложения компонентов добавки. Добавляемые ферменты обычно получают из неочищенных и относительно недорогих экстрактов грибковых и/или бактериальных культур. Добавление экзогенных ферментов является неправомерным в некоторых странах, в частности, где пиво должно производиться в жестко регулируемых условиях.

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

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к способам получения напитков из водного экстракта зерновой культуры, включающим в себя способы быстрого проращивания и получения водных экстрактов зерновых культур. Способы значительно ускоряют процесс получения сусла для получения напитков на основе зерновых культур с сохранением при этом потенциала для получения указанного сусла с высоким содержанием сбраживаемых сахаров, предпочтительно с низким содержанием β -глюкана и ксилана. В частности, напитки, полученные из указанного сусла, могут отличаться низким уровнем вяжущего вкуса.

Как можно видеть из приведенных в настоящем документе примеров, в частности из примера 7, некоторые важные характеристики сусла и пива, приготовленных согласно способам в соответствии с настоящим изобретением, остаются неизменными по сравнению с традиционным способом, предусматривающим сушку в печи. Например, содержание спирта и действительная степень сбраживания пива, полученного без сушки в печи, аналогичны содержанию в пиве, полученном с сушкой в печи. Подобным образом, не наблюдается существенной разницы в цвете и уровнях пены. Таким образом, авторы настоящего изобретения показывают, что можно получить водный экстракт зерновых культур без сушки в печи, при этом указанный экстракт может быть далее переработан в напиток, обладающий характеристиками, сравнимыми с характеристиками напитка, полученного с сушкой в печи.

Как известно специалисту и как указано выше, стадию сушки в печи считали важной частью произ-

водства пива по многим причинам, в том числе из-за удаления проростков и снижения постороннего вкуса и запаха. До настоящего изобретения было неизвестно, что без стадии сушки в печи можно обойтись. Описываемые в настоящем документе способы, таким образом, преодолевают предубеждение в данной области и решают проблему, которая давно известна в данной области.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения напитка, при этом указанный способ предусматривает стадии

- i) получения водного экстракта способом, предусматривающим стадии
 - a) обеспечения зерен зерновой культуры;
 - b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен;
 - c) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
 - d) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d), с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры; и
- ii) переработки указанного водного экстракта в напиток.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадии

- a) обеспечения зерен зерновой культуры;
- b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен, при этом указанная стадия проращивания предусматривает инкубирование указанных зерен в водном растворе до содержания воды в зернах по меньшей мере 30%, при этом по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухой массы зерен зерновой культуры пропускают через указанный водный раствор в час;
- c) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
- d) получения водного экстракта указанных размолотых мелко измельченных пророщенных зерен, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d), с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры.

Согласно некоторым вариантам осуществления упомянутых выше способов продолжительность всей стадии проращивания может не превышать 96 ч, при этом продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания. Стадия проращивания может быть выполнена на протяжении диапазона времени от 72 до 108 ч, например на протяжении приблизительно 96 ч. В качестве альтернативы стадия проращивания может быть выполнена на протяжении диапазона времени от 65 до 80 ч, например на протяжении приблизительно 72 ч.

После стадии проращивания способы в соответствии с настоящим изобретением предусматривают стадию тонкого измельчения пророщенных зерен зерновой культуры. Особенно интересным аспектом настоящего изобретения является то, что способы в соответствии с настоящим изобретением позволяют проводить мелкое измельчение пророщенных зерен зерновой культуры сразу после проращивания. Следовательно, способы в общем не предусматривают стадию сушки пророщенных зерен зерновой культуры. В частности, способы не предусматривают стадию сушки в печи пророщенных зерен зерновой культуры. Как описано выше, одним важным аспектом сушки в печи является обеспечение простоты удаления проростков. Перед сушкой удаление проростков выполнять сложнее. Однако пророщенные зерна зерновой культуры, полученные согласно способам в соответствии с настоящим изобретением, имеют значительно меньше проростков (обычно менее 6 г на 100 г пророщенного ячменя (в пересчете на сухую массу)), и, как показано в соответствии с настоящим изобретением, стадия сушки в печи не требуется для зерновой культуры, пророщенной согласно способам в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, согласно предпочтительным вариантам осуществления способы получения напитка не требуют стадии сушки в печи пророщенных зерен. Согласно предпочтительным вариантам осуществления способы получения водного экстракта зерновых культур не требуют стадии сушки в печи пророщенных зерен.

Пророщенные зерна зерновой культуры можно, например, мелко измельчать подверганием пророщенных зерен зерновой культуры мокрому размалыванию с последующей стадией получения водного экстракта, например, путем затирания при заранее определенной температуре в течение любого подходящего времени, как описывается в настоящем документе ниже в разделе "Получение водного экстракта". Превращение высвобождающихся сахаридов, например полисахаридов, и белков можно облегчить при затирании добавлением смесей экзогенных ферментов, которые катализируют разложение крахмала, запасных белков и полисахаридов клеточной стенки. Ферменты можно частично очищать из самого ячменя, из солода или из других источников или в качестве альтернативы из грибковых и/или бактериальных ферментных смесей, которые можно приобретать из коммерческих источников.

Таким образом, настоящее изобретение может обеспечивать значительную экономию воды за счет

исключения сушки солода, а также значительную экономию энергии, например, за счет пропуска стадии сушки в печи. Кроме того, общее время, необходимое для получения водного экстракта зерен зерновой культуры и, следовательно, для получения напитка после обработки указанного водного экстракта, может быть значительно уменьшено. Экономии средств на энергию до 50% можно достичь посредством быстрых способов в соответствии с настоящим изобретением, которые могут сильно снизить выбросы углекислого газа промышленностью. Это важно из-за усиления законодательных и налоговых давлений в большинстве стран по всему миру, направленных на сокращение выбросов углекислого газа промышленности осоложивания и пивоварения.

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

Далее настоящее изобретение определяется в прилагаемой формуле изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано схематическое представление примера процесса осоложивания в микромасштабе.

На фиг. 2 показано поглощение воды мутантными и эталонными зернами ячменя в ходе осоложивания.

На фиг. 3 показан рост корня зерна ячменя в ходе осоложивания. Рост корня также измеряли в образце, который погружали в воду при аэрации на 24 ч, а затем проращивали на воздухе в течение 24 ч (24+24).

На фиг. 4 показана экспрессия генов, кодирующих гидролитические ферменты в мутантных и эталонных зрелых зернах ячменя (0) и в зеленом солоде в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, а также в обожженном солоде (день 7). Активность ферментов также измеряли в образце, который погружали в воду на 24 ч, а затем проращивали на воздухе в течение 24 ч (24+24).

На фиг. 5 показаны активности α -амилазы (а), β -амилазы (b) и свободной конечной декстриназы (с), измеренные в мутантных и эталонных зернах в ходе осоложивания.

На фиг. 6 показано содержание (1-3; 1-4)- β -глюкана в мутантных и эталонных зрелых зернах ячменя (день 0) и в зеленом солоде в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, а также в обожженном солоде (день 7).

Определения

Использование в настоящем документе единственного числа может означать один или несколько в зависимости от контекста, в котором используется.

Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" и "около" в отношении числовых значений предпочтительно означает $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$.

Используемый в настоящем документе термин "аминокислота" относится к протеиногенной аминокислоте. Предпочтительно протеиногенная аминокислота является одной из 20 аминокислот, кодируемых стандартным генетическим кодом. Для названия аминокислот используют одно- или трехбуквенные коды IUPAC.

Термин "аминокислота, соответствующая X" используют в настоящем документе для описания аминокислот данного полипептида (например, мутантного полипептида CsIF6) по отношению к аминокислотам эталонного полипептида (например, CsIF6 SEQ ID NO: 1). После выравнивания указанного полипептида и эталонного полипептида аминокислота соответствует X, если она находится в том же положении, что и X при указанном выравнивании.

Термин "кодирующий" или "кодированный" в контексте указанной нуклеиновой кислоты означает содержание информации для трансляции в указанный белок. Нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующие белок, могут включать в себя нетранслируемые последовательности, например интроны, внутри транслируемых областей нуклеиновой кислоты, или могут не иметь таких промежуточных нетранслируемых последовательностей, например, в ДНК. Информация, с помощью которой кодируется белок, определяется использованием кодонов.

Термин "ген" означает сегмент ДНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; он включает в себя области, предшествующие кодирующей области и следующие за таковой (промотор и терминатор). Кроме того, гены растений обычно состоят из экзонов, прерываемых интронами.

Сушка в печи (или обжиг) является частью процесса осоложивания и относится к стадии сушки пророщенных зерен, при этом указанные зерна также могли быть подвергнуты стадии замачивания перед проращиванием. Сушка в печи может быть выполнена при обычных температурах, например по меньшей мере 75°C , например в диапазоне от 80 до 90°C , например в диапазоне от 80 до 85°C . Сушку в печи обычно выполняют при повышенных температурах. Примером процесса сушки в печи является следующее: 12 ч при 60°C , 3 ч при 68°C , 4 ч при 74°C , 3 ч при 80°C . Стадия сушки в печи снижает содержание влаги или воды во влажном солоде от приблизительно 40 до 4-5%. Следовательно, обожженный солод характеризуется содержанием воды от приблизительно 4 до 5%.

Термин "мутации" включает в себя делеции, вставки, замены, трансверсии и точковые мутации в кодирующих и не кодирующих областях гена. Делеции могут захватывать весь ген или только часть гена. Точковые мутации могут касаться изменений одной пары оснований и могут приводить, например, к

преждевременным стоп-кодонам, мутациям со сдвигом рамки считывания, мутации сайта сплайсинга или аминокислотным заменам. Ген, содержащий мутацию, может упоминаться как "мутантный ген". Если указанный мутантный ген включает в себя мутацию и тем самым кодирует полипептид с последовательностью, отличной от таковой дикого типа, то указанный полипептид может называться "мутантным полипептидом".

Используемый в настоящем документе термин "добавка" относится к источникам богатого углеродом сырья, добавляемым в ходе получения пива. Добавкой может быть непророщенное зерно зерновой культуры, которое может быть размолото вместе с пророщенными зёрнами, полученными в соответствии с настоящим изобретением. Добавкой также может быть сироп, сахар или подобное.

Используемый в настоящем документе термин "росток" относится к эмбриональной растущей почке, которая видна на фазе проращивания зерна зерновой культуры.

Используемый в настоящем документе термин "содержание воды" зерна относится к % H_2O мас./мас. в указанном зерне.

Используемый в настоящем документе термин "пророщенное зерно" относится к зёрнам с развивающимся видимым ростком, предпочтительно ростком длиной по меньшей мере 1 мм, таким как по меньшей мере 2 мм, и видимым стеблем.

Используемый в настоящем документе термин "инициация проращивания" относится к моменту времени, когда зерна ячменя с содержанием воды менее 15% вводят в контакт с достаточным количеством воды для инициации проращивания.

Используемый в настоящем документе термин " β -глюкан", если не указано иное, относится к полимеру клеточной стенки зерновой культуры "(1,3; 1,4)- β -глюкану".

Используемый в настоящем документе термин "(1,3; 1,4)- β -глюкансинтаза" следует рассматривать как любой фермент, который катализирует синтез (1,3; 1,4)- β -глюкана и необязательно катализирует полимеризацию глюкопиранозильных мономеров. Например, (1,3; 1,4)- β -глюкансинтаза может представлять собой полипептид, кодируемый геном CsIF, или его функциональный гомолог.

Подобным образом, используемый в настоящем документе термин "ксилан", если не указано иное, относится к полимеру клеточной стенки зерновой культуры "арабиноксилану".

Используемые в настоящем документе термины "высушенный в печи солод" и "обожженный солод" относятся к пророщенным зёрнам зерновой культуры, которые были высушены с помощью сушки в печи. Высушенный в печи солод, как правило, характеризуется содержанием воды от приблизительно 4 до 5%. Солод, который не подвергали сушке в печи, называют "зеленым солодом".

Используемый в настоящем документе термин "замачивание" относится к процессу повышения содержания воды в зёрновке зерновой культуры.

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

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

Используемый в настоящем документе термин "ферментативные активности зерен зерновой культуры" относится к активностям, измеренным в муке, полученной из определенного типа зерна. Например, 10 ед./г α -амилазной активности на грамм зерна зерновой культуры относится к указанной α -амилазной активности (10 ед.), измеренной в водном экстракте, полученном из 1 г муки (в пересчете на сухое вещество) из указанной зерновой культуры. α -Амилазную активность определяют при помощи K-CERA 01/12 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия). Активность конечной декстриназы определяют при помощи T-LDZ1000 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия).

Объем O_2 , как указано в данном документе, относится к объему O_2 при 1 атмосфере и 20°C. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, если O_2 содержится в смеси газов, тогда можно определять общий объем газовой смеси, и объем O_2 можно рассчитывать как процент от общего объема, который составляет O_2 . В качестве примера тогда атмосферный воздух содержит 21% O_2 . Таким образом, объем O_2 в атмосферном воздухе при использовании в настоящем документе составляет 21% общего объема атмосферного воздуха.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Зерна зерновой культуры.

Способы в соответствии с настоящим изобретением предусматривают стадию проращивания зерна зерновой культуры.

Зерно зерновой культуры может быть зерном любой зерновой культуры, например зерновой культуры, выбранной из группы, состоящей из ячменя, риса, сорго, маиса, проса, тритикале, ржи, овса и пше-

ницы. Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения зерна зерновой культуры представляют собой зерна ячменя. Указанные зерна могут быть зернами любого сорта ячменя, таким как любой из сортов ячменя, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Ячень".

Зерна зерновой культуры могут характеризоваться относительно низким содержанием воды перед проращиванием. Например, зерна зерновой культуры могут характеризоваться содержанием воды максимум 30%, предпочтительно максимум 20%, например максимум 15%, например в диапазоне от 5 до 15%.

Перед проращиванием зерно зерновой культуры может быть подвергнуто одной или нескольким стадиям противомикробной обработки. Указанная противомикробная обработка может быть любой пригодной противомикробной обработкой, которая не ухудшает потенциал зерен к проращиванию. Противомикробная обработка может, например, представлять собой обработку одним или несколькими противомикробными средствами. Указанные противомикробные средства могут быть любым противомикробным средством, которое при используемых концентрациях является нетоксичным для зерен зерновой культуры. Например, противомикробное средство может быть хлорсодержащим соединением, например гипохлоритом. Противомикробное средство может также быть пероксидом, например пероксидом водорода и/или перуксусной кислотой. Неограничивающие примеры пригодных коммерческих противомикробных средств включают в себя P3-Hypochloran®, P3-Peroxysan® или P3-Oxonia Active 150®. Зерна зерновой культуры можно обрабатывать гипохлораном при концентрации в диапазоне от 0,1 до 10%, например в диапазоне от 0,5 до 5%, например приблизительно 1%, например 1%. Зерна зерновой культуры можно обрабатывать указанным гипохлораном на протяжении диапазона времени от 15 мин до 10 ч, например в диапазоне от 1 до 5 ч, например на протяжении диапазона времени от 2 до 4 ч. После обработки зерна зерновой культуры можно промывать один или несколько раз.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения противомикробную обработку проводят путем инкубирования зерен зерновой культуры в водном растворе, содержащем противомикробное средство, и, таким образом, противомикробная обработка может быть выполнена как часть стадии замачивания. Сразу после указанного инкубирования можно инициировать стадию проращивания. Таким образом, согласно таким вариантам осуществления не требуется менять водный раствор и тот же водный раствор можно использовать для противомикробной обработки и стадии замачивания. Это, в частности, может быть в случае, если противомикробное средство представляет собой пероксид, например пероксид водорода.

Может быть предпочтительно, чтобы указанные зерна зерновой культуры не были подвергнуты проращиванию перед стадией проращивания в соответствии с настоящим изобретением. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы зерна зерновой культуры не были подвергнуты стадии предварительного проращивания.

Как описывается выше, зерно зерновой культуры может представлять собой зерно любой зерновой культуры. Некоторые зерна зерновой культуры содержат оболочку, тогда как зерна другой зерновой культуры являются голыми. Зерна обрубленной зерновой культуры можно обрабатывать для удаления по меньшей мере части оболочки перед стадией проращивания. В целом обработка для удаления оболочки не требуется, если используется зерно голозерной зерновой культуры. Голозерные зерновые культуры включают в себя, например, голозерные сорта ячменя и пшеницы.

Зерна обрубленной зерновой культуры можно обрабатывать для удаления оболочки путем воздействия на зерна зерновой культуры физической обработкой, удаляющей оболочку. Указанная физическая обработка может быть, например, выбрана из группы, состоящей из шлифовки, обработки песком, шелушения и сглаживания. Предпочтительно физическая обработка приводит к потере оболочки. Потеря оболочки может быть определена как потеря общей массы. Таким образом, физическая обработка предпочтительно приводит к потере по меньшей мере 2%, например в диапазоне от 2 до 7%, предпочтительно к потере по меньшей мере 3%, например, к потере в диапазоне от 3 до 6% общей массы зерен зерновой культуры.

Согласно некоторым вариантам осуществления зерновая культура, используемая в способах в соответствии с настоящим изобретением, не была получена исключительно посредством, по сути, биологического процесса. Потомство растения, полученного с помощью технического процесса, в настоящем документе рассматривают как полученное не исключительно посредством по сути биологического процесса, поскольку родительское растение получают с помощью технического процесса.

Согласно некоторым вариантам осуществления зерна зерновой культуры получают из мутированных растений, содержащих одну или несколько мутаций, при этом указанные мутации были индуцированы химическими и/или физическими средствами.

Ячень.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения зерна зерновой культуры, подлежащие использованию со способами в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой зерна ячменя.

Указанные зерна могут быть зернами любого растения ячменя. Однако согласно некоторым вариантам осуществления растение ячменя может включать в себя одну или несколько конкретных характеристик, например одну или несколько характеристик, описываемых в настоящем документе ниже. Даже

хотя различные характеристики обсуждаются отдельно в настоящем документе ниже, растение ячменя в соответствии с настоящим изобретением может иметь комбинацию этих характеристик.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения ячмень может быть сортом (с.) голозерного ячменя. Также в настоящем изобретении предусматривается, что ячмень является сортом ячменя с тонкой шелухой от природы, таким как сорт Admiral. Например, шелуха может составлять менее 7% общей массы зерна и шелухи.

Растение ячменя может также быть растением ячменя с низким уровнем активности LOX. Такие растения ячменя известны в уровне техники и включают в себя, например, растения ячменя, несущие мутацию в гене, кодирующем LOX-1. Например, растение ячменя может быть растением ячменя, несущим любые мутации в гене LOX-1, описанные в WO 02/053721, WO 2005/087934 и WO 2004/085652.

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

Растение ячменя может также быть растением ячменя с низким уровнем активности MMT. Такие растения ячменя известны в уровне техники и включают в себя, например, растения ячменя, несущие мутацию в гене, кодирующем MMT. В частности, растение ячменя может быть растением ячменя, несущим любые мутации в гене MMT, описанным в WO 2010/063288. Растение ячменя может также быть любыми из растений ячменя, описанных в WO 2011/150933.

Растение ячменя может также быть растением ячменя, характеризующимся повышенной передачей сигнала GA. В частности, растение ячменя может быть растением ячменя, несущим мутацию в гене Slender 7, который кодирует белок DELLA. Например, растение ячменя может быть растением ячменя, несущим любую из мутаций, описанных Chandler et al., 2013, например, в табл. 1 там. Например, растение ячменя может нести мутацию в гене Slender 7, что дает в результате мутантный ген Slender 7, кодирующий мутантный белок DELLA, при этом указанный мутантный белок DELLA несет мутацию в одной или нескольких аминокислотах под номерами 46, 490, 280, 268, 271, 277, 231, 481, 282, 277, 227, 485 или 237, например мутацию, выбранную из группы, состоящей из G46E, S490F, R268H, G271D, A277T, V231M, R481H, V282F, A277T, G227E, S485F и C237Y. Нумерация аминокислот представлена относительно последовательности белка DELLA, доступного под номером доступа в Genbank AK372064 или AF035820 (версия от 4 февраля 2013 г.).

Растения ячменя с низким содержанием β -глюкана.

Как упоминается выше, предпочтительно, чтобы водный экстракт, полученный в ходе затирания, характеризовался вязкостью, достаточно низкой для обеспечения хорошей фильтруемости заторной смеси. Как также подробно описывается выше, растворимые β -глюканы могут способствовать высокой вязкости водного экстракта. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным применение растения зерновой культуры и, в частности, растения ячменя, характеризующегося низким содержанием β -глюкана.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя, подлежащее использованию со способами в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется наличием низкого содержания β -глюкана в зернах. Согласно одному варианту осуществления указанное содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 5%, например в диапазоне от 1 до 5% мас./мас., в пересчете на сухую массу. Согласно предпочтительному варианту осуществления содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 3%, например в диапазоне от 1 до 3% мас./мас., в пересчете на сухую массу.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя, подлежащее использованию со способами в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется наличием низкого содержания β -глюкана в зернах. Согласно одному варианту осуществления указанное содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 60%, например максимум 55%, например в диапазоне от 30 до 60% содержания β -глюкана в зерновках растения ячменя дикого типа, например, иным образом подобного растения ячменя дикого типа, например растения ячменя сорта Paustian.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может характеризоваться содержанием β -глюкана ниже выявляемого уровня, например отсутствием β -глюкана.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя, подлежащее использованию со способами в соответствии с настоящим изобретением, несет мутацию в любом гене, кодирующем β -глюкансинтазу. Указанный ген может представлять собой, например, ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 2, изложенный в заявке на выдачу патента США № US 2012/0030784. Например, растение ячменя может представлять собой ячмень, содержащий ген дефицита β -глюкана, указанный под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 18 в заявке на выдачу патента США № US 2012/0030784.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя, подлежащее использованию со способами в соответствии с настоящим изобретением, может быть несущим мутацию в гене CslF6, приводящую к пониженному содержанию (1,3; 1,4)- β -глюкана. Последовательность последовательности подобного целлюлозосинтазе полипептида CslF6 дикого типа из ячменя *Hordeum vulgare* сорта Sloop представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 1. Последовательность полной кодирующей последова-

тельности подобного целлюлозосинтазы CslF6 (CslF6) дикого типа из ячменя *Hordeum vulgare* сорта Sloop представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 2. В дополнение к последовательности, представленной в настоящем документе под SEQ ID NO: 1, полипептид CslF6 дикого типа также может иметь последовательность под SEQ ID NO: 1, в которой аминокислота в положении 590 была замещена Thr. Таким образом, полипептид под SEQ ID NO: 1, несущий полиморфизм A590T, также можно считать полипептидом CslF6 дикого типа (Taketa et al. (2012)).

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя несет мутацию в гене CslF6. Мутация может представлять собой мутацию, влияющую на уровень экспрессии мРНК CslF6 и/или белка CslF6. Согласно одному варианту осуществления мутация может представлять собой мутацию, дающую указанный мутантный ген CslF6, кодирующий мутантный полипептид CslF6. Мутация в гене CslF6 может представлять собой любую мутацию гена CslF6, например делецию, вставку или точковую мутацию. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения мутация представляет собой точковую мутацию в кодирующей области гена CslF6. Согласно одному варианту осуществления мутация дает преждевременный стоп-кодон. Мутантный полипептид CslF6, кодируемый указанным мутантным геном CslF6, может представлять собой любой мутантный полипептид CslF6. В частности, мутантный полипептид CslF6 может включать в себя замену одной аминокислоты в любом из локализованных в мембране доменов CslF6. Мутантный полипептид CslF6 предпочтительно может включать в себя одну или несколько из следующих замен в локализованном в мембране домене:

замену неполярной аминокислоты заряженной аминокислотой, т.е. неполярная аминокислота замещается заряженной аминокислотой; и

замену полярной аминокислоты неполярной аминокислотой, т.е. полярная аминокислота замещается неполярной аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения мутантный полипептид CslF6 может включать в себя замену одной аминокислоты в любом локализованном в мембране домене CslF6, т.е. аминокислота в любом из локализованных в мембране доменов может быть замещена другой аминокислотой. Локализованные в мембране домены CslF6 показаны в настоящем документе в табл. 1.

Таблица 1

Локализация локализованных в мембране аминокислотных последовательностей в белке CslF6		
Положение AA в SEQ ID №: 1	Последовательность AA	Функциональность
109-128	RVLIFVRLIAFTLFVIWRIS	Трансмембранная
137-158	LWVTSICGEFWFGFSWLLDQLP	Трансмембранная
700-711	<u>LQRVAYINITY</u>	Часть трансмембранной
712-714	<u>PTF</u>	Спиральный линкер в мембране, приводящий к изгибу
715-731	AIFLIFYTTPALUFVT	Часть трансмембранной
741-758	<u>TMFYVYLGVLSLLVIA</u>	Трансмембранная
835-857	<u>ITPPIIFVNIIGSAVAFKVL</u> D	Трансмембранная
864-882	LKVAGGVFFNFVWLFHLYPF	Трансмембранная

Например, мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 847 заряженной аминокислотой, т.е. аминокислота 847 замещается заряженной аминокислотой. Например, указанная замена может представлять собой замену глицина (G) в положении 847 на отрицательно заряженную аминокислоту, например Glu или Asp; другими словами, глицин (G) в положении 847 может быть замещен отрицательно заряженной аминокислотой, например Gly или Asp. Предпочтительно мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 847, при этом указанная замена представляет собой замену глицина (G) в положении 847 на глутаминовую кислоту (E), т.е. глицин (G) в положении 847 замещен глутаминовой кислотой (E). Кроме того, указанный мутантный CslF6 может необязательно нести полиморфизм A590T.

Например, мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 748 заряженной аминокислотой, т.е. аминокислота 748 замещается заряженной аминокислотой. Например, указанная замена может представлять собой замену глицина (G) в положении 748 на отрицательно заряженную аминокислоту, например Glu или Asp, т.е. глицин (G) в положении 748 может быть замещен отрицательно заряженной аминокислотой, например Gly или Asp. Предпочтительно мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 748, при этом указанная замена представляет собой замену глицина (G) в положении 748 на аспарагиновую кислоту (D), т.е. глицин (G) в положении 748 замещается аспарагиновой кислотой (D).

Кроме того, указанный мутантный CslF6 может необязательно нести полиморфизм A590T.

Например, мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 709 неполярной аминокислотой, т.е. аминокислота 709 замещается неполярной аминокислотой. Например, указанная замена может представлять собой замену треонина (T) в положении 709 неполярной аминокислотой, например Leu или Ile, т.е. треонин (T) в положении 709 может быть замещен неполярной аминокислотой, например Leu или Ile. Кроме того, указанный мутантный CslF6 может необязательно нести полиморфизм A590T.

Предпочтительно мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутант CslF6 включает в себя замену аминокислоты 709, при этом указанная замена представляет собой замену треонина (T) в положении 709 изолейцином (I), т.е. треонин (T) в положении 709 замещается изолейцином.

Мутантный полипептид CslF6 также может быть фрагментом полноразмерного полипептида CslF6. Например, мутантный полипептид CslF6 может представлять собой CslF6 под SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутантный ген CslF6 включает в себя преждевременный стоп-кодон, таким образом кодируя усеченный полипептид CslF6. Предпочтительно мутантный полипептид CslF6 может быть кодирован мутантным геном CslF6, при этом мутантный ген CslF6 представлен под SEQ ID NO: 2, за исключением того, что мутантный ген CslF6 включает в себя замену нуклеотида гуанина (G) в положении 2028 кодирующей последовательности на аденин (A) с образованием тем самым стоп-кодона; другими словами, гуанин (G) в положении 2028 замещается аденином (A). Полученный в результате мутантный полипептид CslF6, таким образом, включает в себя замену треонина (T) в положении 676 на стоп-кодон (T676Stop), т.е. треонин (T) в положении 676. Кроме того, указанный мутантный CslF6 может необязательно нести полиморфизм A590T.

Растение ячменя может нести любую мутацию в гене CslF6. Такая мутация может приводить, например, к сайленсингу гена CslF6, что дает зерна ячменя с очень низким содержанием (1,3; 1,4)-β-глюкана (как описано у Taketa et al., 2011). Растение ячменя также может быть мутантом m351 (как описано у Hu et al. (2014)), содержащим мутацию в гене CslF6, которая приводит к очень низкому содержанию (1-3; 1-4)-β-глюкана (<1,6%).

Для целей настоящей заявки на выдачу патента семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначаемого "мутант 2", были депонированы в NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland в соответствии с положениями Будапештского договора. Растение ячменя мутант 2 разместили на депонирование 12 ноября 2018 г. и присвоили номер доступа NCIMB 43273. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12.11.2018 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43273 и названное "мутантом 2"; или его потомство. Таким образом, растение ячменя может представлять собой растение ячменя мутант 2, депонированное 12.11.2018 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43273, или любое его растение-потомок ячменя, при этом растение ячменя несет мутацию G→A в нуклеотиде 2243 кодирующей последовательности гена HvCslF6 (SEQ ID NO: 2) и/или при этом ген HvCslF6 указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvCslF6, содержащий мутацию Gly→Asp в аминокислоте 748 под SEQ ID NO: 1.

Зерна зерновой культуры также могут представлять собой потомство растения, такого как мутантное растение. Согласно некоторым вариантам осуществления зерна ячменя, используемые в способах в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой зерна из растения ячменя, которое не было получено исключительно посредством по сути биологического процесса. Потомство растения ячменя, полученного с помощью технического процесса, в настоящем документе рассматривают как полученное не исключительно посредством по сути биологического процесса, поскольку родительское растение получают с помощью технического процесса.

Способы получения таких растений описывают в находящейся в стадии совместного рассмотрения заявке под названием "Растения зерновой культуры с улучшенными свойствами клеточной стенки", принадлежащей тому же заявителю и имеющей ту же дату подачи, что и настоящая заявка.

Растение ячменя также может нести мутацию в любом другом гене, таком как регуляторный ген, что дает низкое содержание β-глюканов.

Проращивание.

Способы в соответствии с настоящим изобретением, относящиеся к получению водного экстракта зерновых культур или к производству напитка, полученного из таких экстрактов зерновых культур, предусматривают стадию проращивания зерен зерновой культуры.

Зернами зерновой культуры могут быть зерна любой зерновой культуры, описываемые в настоящем документе выше в разделах "Зерна зерновой культуры", "Ячмень" и "Растения ячменя с низким содержанием β-глюкана".

Стадия проращивания может включать в себя одну или несколько стадий замачивания указанных зерен зерновой культуры и одну или несколько стадий проращивания указанных зерен зерновой культуры. Стадии замачивания и проращивания также могут быть объединены или частично объединены, так что

замачивание и проращивание происходит одновременно или по меньшей мере отчасти одновременно.

Перед инициацией проращивания способы также могут предусматривать первоначальную стадию шелушения указанных зерен зерновой культуры, как описывается выше в разделе "Зерна зерновой культуры". Указанное шелушение может быть выгодным для усиления поглощения воды зернами зерновой культуры и последующего индуцирования проращивания, а также для удаления потенциальных микроорганизмов на поверхности зерен зерновой культуры. В качестве дополнения или в качестве альтернативы микроорганизмы на зернах зерновой культуры также могут быть удалены перед проращиванием путем подвергания зерен зерновой культуры одной или нескольким стадиям противомикробной обработки, как описывается выше в разделе "Зерна зерновой культуры".

Замачивание может быть выполнено любым традиционным способом, известным специалисту в данной области. Замачивание выполняют для повышения содержания воды в зернах и инициации тем самым прорастания. Замачивание, как правило, включает в себя одну или несколько стадий инкубирования зерен зерновой культуры во влажных условиях, например, путем погружения зерен зерновой культуры в водный раствор.

Один неограничивающий пример предусматривает замачивание с чередованием сухих и влажных условий. Замачивание может быть выполнено при любой применимой температуре, например при температуре в диапазоне от 10 до 25°C, такой как приблизительно 15°C.

В ходе замачивания, например, зерна зерновой культуры можно инкубировать во влажных условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 10 ч с последующим инкубированием в сухих условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 24 ч и необязательно с повторениями указанного инкубирования во влажных и/или сухих условиях в диапазоне от 2 до 5 раз. Конечное содержание воды после замачивания может находиться, например, в диапазоне от 40 до 50%.

Другой неограничивающий пример предусматривает замачивание, при этом зерна зерновой культуры инкубируют влажными для получения содержания воды в диапазоне от 32 до 37%, такого как приблизительно 35%. Такое влажное инкубирование можно осуществлять, например, на протяжении диапазона времени от 5 до 12 ч, например в диапазоне от 5 до 10 ч, с последующим сухим инкубированием на протяжении диапазона времени от 12 до 30 ч, например в диапазоне от 15 до 20 ч. Зерна зерновой культуры затем можно инкубировать влажными для получения содержания воды от приблизительно 37 до 43%, такого как приблизительно 40%. Этого можно достичь путем влажного инкубирования на протяжении диапазона времени от 2 до 10 ч, например в диапазоне от 3 до 7 ч. Влажное инкубирование может сопровождаться другим сухим инкубированием на протяжении диапазона времени от 10 до 30 ч, например в диапазоне от 15 до 25 ч. Наконец, зерна зерновой культуры можно инкубировать влажными для достижения содержания воды в диапазоне от 43 до 47%, такого как приблизительно 45%. Этого можно достичь путем влажного инкубирования на протяжении диапазона времени от 1 до 10 ч, например в диапазоне от 1 до 5 ч. Неограничивающий пример процесса замачивания показан на фиг. 1.

Согласно одному варианту осуществления указанное замачивание или указанное влажное инкубирование может быть выполнено по меньшей мере частично при аэрации. Таким образом, указанные зерна зерновой культуры могут быть инкубированы в водном растворе с воздушным потоком, например, при пропускании O_2 через водный раствор. Воздушный поток может быть, например, любым из воздушных потоков, описываемых ниже. Согласно другому варианту осуществления указанное замачивание выполняют в отсутствии аэрации.

Проращивание зерен может быть выполнено любым традиционным способом, известным специалисту в данной области. Один неограничивающий пример предусматривает проращивание при температуре в диапазоне от 10 до 25°C, например в диапазоне от 13 до 18°C, необязательно с изменением температуры, на протяжении диапазона времени от 1 до 4 суток. В ходе проращивания зерна зерновой культуры могут быть подвергнуты влажным условиям для поддержания желаемого содержания воды, например содержания воды в диапазоне от 40 до 45%.

Кроме того, зерна зерновой культуры могут быть подвергнуты воздушному потоку в ходе проращивания, например, как описывается более подробно ниже.

Неограничивающий пример проращивания показан на фиг. 1. Указанные влажные условия могут быть получены путем распыления водного раствора на указанные зерна зерновой культуры. Влажные условия также могут быть получены путем пропускания потока влажного воздуха через проращиваемые зерна зерновой культуры.

Указанный воздушный поток может представлять собой любой соответствующий воздушный поток, который может поддерживать проращивание. Специалист в данной области сможет определить соответствующий воздушный поток, например, на основании Briggs et al., 1998; или Kunze, 2014, Technology Brewing and Malting. Воздушный поток может представлять собой поток любого газа, включающего в себя O_2 или даже состоящего из O_2 . Согласно одному варианту осуществления воздушный поток может составлять по меньшей мере 2 л, предпочтительно по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O_2 на кг зерен зерновой культуры в час. Масса указанных зерен зерновой культуры является сухой массой. Например, воздушный поток может находиться в диапазоне от 2 до 100 л, например

в диапазоне от 2 до 75 л, например в диапазоне от 2 до 50 л, например в диапазоне от 4 до 100 л, например в диапазоне от 4 до 75 л, например в диапазоне от 4 до 50 л, например в диапазоне от 6 до 100 л, например в диапазоне от 6 до 75 л, например в диапазоне от 6 до 50 л O₂ на кг зерен зерновой культуры (в пересчете на сухую массу) в час.

Воздушный поток зачастую может иметь форму атмосферного воздуха. Таким образом, воздушный поток может составлять по меньшей мере 10 л, предпочтительно по меньшей мере 15 л, более предпочтительно по меньшей мере 20 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 30 л атмосферного воздуха на кг зерен зерновой культуры в час. Масса указанных зерен зерновой культуры является сухой массой. Например, воздушный поток может находиться в диапазоне от 10 до 500 л, например в диапазоне от 10 до 375 л, например в диапазоне от 10 до 250 л, например в диапазоне от 20 до 500 л, например в диапазоне от 20 до 375 л, например в диапазоне от 20 до 250 л, например в диапазоне от 30 до 500 л, например в диапазоне от 30 до 375 л, например в диапазоне от 30 до 250 л атмосферного воздуха на кг зерен зерновой культуры (в пересчете на сухую массу) в час.

Согласно одному варианту осуществления продолжительность всей стадии проращивания в описываемых в настоящем документе способах получения водного экстракта зерновых культур или производства напитка, полученного из него, не превышает 108 ч. Согласно одному варианту осуществления стадия проращивания не превышает 96 ч. Согласно одному варианту осуществления стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч. Согласно одному варианту осуществления стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 72 до 108 ч, например на протяжении приблизительно 96 ч. Согласно одному варианту осуществления стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 65 до 80 ч, например приблизительно 72 ч.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания, например, продолжительность проращивания может быть измерена от инициации проращивания и до начала мелкого измельчения пророщенных зерен зерновой культуры.

Согласно некоторым вариантам осуществления после проращивания зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 35%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, например в диапазоне от 40 до 45%. Согласно некоторым вариантам осуществления зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды по меньшей мере 30% после проращивания, например по меньшей мере 31%, например по меньшей мере 32%, например по меньшей мере 33%, например по меньшей мере 34%, например по меньшей мере 35%, например по меньшей мере 36%, например по меньшей мере 37%, например по меньшей мере 38%, например по меньшей мере 39%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, например по меньшей мере 46%, например по меньшей мере 47%, например по меньшей мере 48%, например по меньшей мере 49%, например по меньшей мере 50%.

Содержание воды зерен зерновой культуры может быть определено путем определения массы зерен зерновой культуры с последующей сушкой указанных зерен зерновой культуры и определением массы высушенных зерен зерновой культуры. Разницу в массе влажных и сухих зерен зерновой культуры считают водой и содержание воды представляют как массу воды, поделенную на общую массу зерен зерновой культуры (влажных зерен зерновой культуры). Содержание воды также может быть определено путем сравнения массы зерен зерновой культуры перед инициацией проращивания с массой зерен зерновой культуры в ходе или после проращивания, при этом пророщенные зерна зерновой культуры были подвергнуты краткосрочному центрифугированию для удаления какого-либо количества воды с поверхности. Содержание воды, представленное в %, таким образом, представлено как % мас./мас..

Проращивание зерен зерновой культуры может быть выполнено при любой применимой температуре. Однако может быть предпочтительным проращивание зерен зерновой культуры при температуре по меньшей мере 10°C. В частности, зерна зерновой культуры могут быть пророщены при диапазоне от 10 до 25°C, предпочтительно при диапазоне от 12 до 25°C, например при диапазоне от 15 до 20°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько экзогенных ферментов могут быть добавлены в ходе стадии проращивания, например, как описывается в WO 2016/071463. Процесс проращивания необязательно может быть сокращен путем добавления одного или нескольких соединений, способных ускорять проращивание. Например, может быть добавлен фитогормон гиббереллиновая кислота (GA) либо с самого начала, либо в ходе инкубирования. GA "активирует" экспрессию генов в ее целевых клетках, а именно алейронового слоя и эпителия щитка зерна ячменя, в том числе генов, кодирующих эндогенные ферменты, необходимые для гидролиза крахмала, запасных белков и полисахаридов клеточной стенки.

Зерна зерновой культуры предпочтительно мелко измельчают по сути сразу же после проращивания. Следовательно, способы в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно не предусматривают стадию сушки между стадией проращивания и мелким измельчением зерен зерновой культуры. Предпочтительно, чтобы способ в соответствии с настоящим изобретением не предусматривал стадию сушки в печи указанных пророщенных зерен зерновой культуры.

Пророщенные зерна зерновой культуры.

Настоящее изобретение относится к способу получения напитка и к способу получения водного

экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадию получения пророщенных зерен зерновой культуры.

Пророщенные зерна зерновой культуры предпочтительно характеризуются одной или несколькими активностями гидролитических ферментов, например, обеспечиваемых α -амилазами, Р-амилазами, расщепляющими разветвленную структуру крахмала ферментами (такими как конечные декстриназы), α -глюкозидазами и протеазами.

Зачастую начало активности гидролитических ферментов может происходить своевременно и скоординировано, и, таким образом, активность некоторых гидролитических ферментов может использоваться в качестве маркера для других активностей гидролитических ферментов.

Следовательно, предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновой культуры характеризовались соответствующим уровнем измеряемой α -амилазной активности. Предпочтительно пророщенные зерна зерновой культуры характеризуются измеряемой α -амилазной активностью по меньшей мере 30 ед./г, например по меньшей мере 50 ед./г, например по меньшей мере 100 ед./г, зерна зерновой культуры (в пересчете на сухую массу). α -Амилазную активность предпочтительно определяют согласно стандартным способам, например, с использованием набора Ceralpha (K-CERA) от Megazyme, Ирландия. В частности, α -амилазная активность может быть определена, как описывается в примере 5 ниже.

Также может быть предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновой культуры характеризовались соответствующим уровнем измеряемой β -амилазной активности. Предпочтительно пророщенные зерна зерновой культуры характеризуются измеряемой β -амилазной активностью по меньшей мере 5 ед./г, например по меньшей мере 10 ед./г, зерна зерновой культуры (в пересчете на сухую массу). Предпочтительно β -амилазную активность определяют согласно стандартным способам, например, с использованием набора Betamyl (K-BETA3) от Megazyme, Ирландия. В частности, β -амилазная активность может быть определена, как описывается в примере 5 ниже.

Также предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновой культуры характеризовались соответствующим уровнем активности конечной декстриназы. Предпочтительно пророщенные зерна зерновой культуры характеризуются активностью конечной декстриназы по меньшей мере 2 миллиед./г, например по меньшей мере 5 ед./г, например по меньшей мере 10 ед./г, например по меньшей мере 20 ед./г, зерна зерновой культуры (в пересчете на сухую массу). Предпочтительно активность конечной декстриназы определяют согласно стандартным способам, например, с использованием набора Limit Dextrizyme T-LDZ1000 от Megazyme, Ирландия. В частности, активность конечной декстриназы может быть определена, как описывается в примере 5 ниже.

Интересно то, что пророщенные зерна зерновой культуры в соответствии с настоящим изобретением имеют значительно меньше проростков по сравнению с традиционным зеленым солодом. Таким образом, пророщенные зерна зерновой культуры в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержат максимум 10 г проростков на 100 г пророщенного ячменя, например, максимум 8 г проростков на 100 г пророщенного ячменя, предпочтительно максимум 6 г проростков на 100 г пророщенного ячменя, еще более предпочтительно максимум 4 г проростков на 100 г пророщенного ячменя, при этом как масса проростков, так и масса пророщенного ячменя представлена как сухая масса. Массу проростков предпочтительно определяют, как описывается в примере 3 ниже.

Как упоминается выше, предпочтительно, чтобы водный экстракт, полученный в ходе затирания, характеризовался вязкостью, достаточно низкой для обеспечения хорошей фильтруемости заторной смеси. Как также подробно описывается выше, растворимые β -глюканы могут способствовать высокой вязкости водного экстракта. Фильтруемость часто может зависеть от содержания β -глюкана. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы содержание β -глюкана в пророщенных зернах зерновой культуры не было слишком высоким.

Предпочтительно пророщенные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием β -глюкана ниже 5% мас./мас., например ниже 3% мас./мас., например ниже 2% мас./мас., например ниже 1,5% мас./мас., предпочтительно ниже 1,0% мас./мас. в пересчете на сухую массу.

Мелкое измельчение пророщенных зерен зерновой культуры.

Настоящее изобретение относится к способам получения напитка и к способу получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанные способы предусматривают стадию мелкого измельчения пророщенных зерен зерновой культуры.

На момент мелкого измельчения указанных зерен зерновой культуры они предпочтительно все еще характеризуются высоким содержанием воды, предпочтительно указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, например не менее 40%. Согласно некоторым вариантам осуществления зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не менее 30% в любой момент времени после проращивания и до мелкого измельчения зерен зерновой культуры, например не менее 31%, например не менее 32%, например не менее 33%, например не менее 34%, например не менее 35%, например не менее 36%, например не менее 37%, например не менее 38%, например не менее 39%, например не менее 40%, например не менее 45%, например не менее 46%, например не менее 47%, напри-

мер не менее 48%, например не менее 49%, например не менее 50%.

Например, пророщенные зерна зерновой культуры могут быть перенесены непосредственно после проращивания в оборудование для мелкого измельчения зерен зерновой культуры. Следовательно, пророщенные зерна зерновой культуры могут характеризоваться тем же содержанием воды в момент их мелкого измельчения, что и зерна зерновой культуры сразу же после проращивания, например содержанием воды, описываемым в настоящем документе выше в разделе "Проращивание". В частности, способы, как правило, не предусматривают стадию сушки пророщенных зерен зерновой культуры путем воздействия повышенных температур. Предпочтительно пророщенные зерна зерновой культуры не характеризуются содержанием воды менее 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, например не менее 40%, в любой момент времени после проращивания и перед мелким измельчением указанных зерен зерновой культуры. Таким образом, способы предпочтительно не предусматривают стадию сушки в печи пророщенных зерен зерновой культуры.

Пророщенные зерна зерновой культуры могут быть мелко измельчены с использованием любого оборудования, подходящего для мелкого измельчения зерен зерновой культуры, характеризующихся содержанием воды более 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, еще более предпочтительно не менее 40%, еще более предпочтительно не менее 45%. Например, пророщенные зерна зерновой культуры могут быть подвергнуты размалыванию, например мокрому размалыванию. Применимые мельницы для размалывания пророщенных зерен зерновой культуры включают в себя мельницы, доступные от Millstar, США. Пророщенные зерна зерновой культуры также могут быть подвергнуты дроблению.

Зерна зерновой культуры, как правило, мелко измельчают до такой степени, чтобы можно было приготовить водный экстракт сбраживаемых сахаров зерен зерновой культуры. Таким образом, зерна зерновой культуры достаточно измельчают, так что 7 л водного экстракта из 1 кг указанных мелко измельченных зерен зерновой культуры характеризуется удельной плотностью по меньшей мере 8 Плато.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых водный экстракт готовят из пророщенных зерен зерновой культуры и одной или нескольких добавок, указанные добавки также могут быть мелко измельчены. В частности, это может быть в случае, если указанные добавки включают в себя непророщенные зерна зерновой культуры. Указанные добавки могут быть мелко измельчены, например, размолены в отдельных процессах. Однако настоящее изобретение также предусматривает, что добавки мелко измельчают вместе с пророщенными зёрнами зерновой культуры. Подобным образом, если водный экстракт готовят из пророщенных зерен зерновой культуры и высушенного в печи солода, то указанный высушенный в печи солод может быть мелко измельчен, например размолен в отдельных процессах. Однако настоящее изобретение также предусматривает, что высушенный в печи солод мелко измельчают вместе с пророщенными зёрнами зерновой культуры.

Получение водного экстракта.

Способы в соответствии с настоящим изобретением также предусматривают стадию получения водного экстракта мелко измельченных пророщенных зерен зерновой культуры. Указанная стадия, например, может представлять собой стадию затириания.

Упомянутый выше водный экстракт может быть, как правило, получен путем инкубирования мелко измельченных зерен зерновой культуры в воде или в водном растворе, который в настоящем документе также называют "раствором для затириания".

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

Указанные дополнительные средства для затириания могут быть ферментами. Таким образом, раствор для затириания может включать в себя один или несколько ферментов. Указанные ферменты можно добавлять в раствор для затириания с самого начала или потом в ходе процесса.

Указанные ферменты, например, могут представлять собой один или несколько гидролитических ферментов. Подходящие ферменты включают в себя липазы, разлагающие крахмал ферменты (например, амилазы), глюканызы [предпочтительно (1-4)- и/или (1,3; 1,4)-β-глюканызы], и/или ксиланызы (такое как арабиноксиланызы), и/или протеазы, или смеси ферментов, включающие в себя один или несколько из упомянутых выше ферментов, например Cereflo, Ultraflo или Onda Pro (Novozymes). Например, раствор для затириания может включать в себя один или несколько гидролитических ферментов, при этом по меньшей мере один гидролитический фермент выбран из группы, состоящей из α-амилазы, β-амилазы, конечной декстриназы, пуллуланызы, β-глюканызы, ксиланызы, глюкоамилазы и протеазы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения раствор для затириания включа-

ет в себя один или несколько из следующих ферментов:

β-глюканаза, такая как эндо-(1,3; 1,4)-β-глюканаза или эндо-1,4-β-глюканаза;
ксилаза, такая как эндо- или экзо-1,4-ксилаза, арабинофуранозидаза или эстераза феруловой кислоты;

α-амилаза;

пуллулаза или конечная декстриназа;

глюкоамилаза.

Решения о том, нужно ли добавлять ферменты в раствор для затираания или нет, и о том, какие ферменты добавлять, могут зависеть от используемого зерна зерновой культуры. Таким образом, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, если зерновая культура представляет собой растение ячменя с низким содержанием β-глюкана (например, как описано в настоящем документе выше в разделе "Ячмень"), то небольшое количество β-глюканазы может быть добавлено в раствор для затираания или не добавлено вообще.

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно не добавлять экзогенную протеазу в ходе затираания. Добавление протеазы может быть менее предпочтительным, поскольку протеазы могут влиять на ферментативную активность. Согласно одному варианту осуществления предпочтительно не добавлять экзогенную липазу при затираании.

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно использовать максимум 700 ед., предпочтительно максимум 350 ед., экзогенной глюкоамилазы на г пророщенных зерен зерновых культур (в пересчете на сухое вещество) в ходе получения водного экстракта.

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно использовать максимум 400 AGU, предпочтительно максимум 200 AGU, экзогенной глюкоамилазы на кг пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество) в ходе получения водного экстракта. Определение AGU можно выполнять, как описано в патенте США № US 7060468.

Согласно другому варианту осуществления предпочтительно, чтобы объединенные экзогенные глюкоамилаза и α-амилаза, используемые в ходе получения водного экстракта, не превышали 700 ед., предпочтительно не превышали 350 ед./г пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество). Объединенную активность глюкоамилазы и α-амилазы можно, например, определять с использованием K-CERA 01/12 (протокол и набор, доступные от Megazyme, Ирландия).

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно использовать максимум 20 ед. экзогенной пуллулазы или конечной декстриназы на кг пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество) в ходе получения водного экстракта.

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно использовать максимум 100 PUN пуллулазы на кг пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество) в ходе получения водного экстракта. Определение PUN может быть выполнено, как описывается в патенте США № US 7060468.

Указанные дополнительные средства для затираания могут также быть добавками, например непропорощенными зернами зерновой культуры, сиропами или сахарами. Если добавляют добавки, они могут также быть мелко измельченными, например, путем размалывания или дробления. Если добавка представляет собой зерно зерновой культуры, например зерно зерновой культуры, которое не подвергали проращиванию, тогда оно обычно может быть мелко измельченным или размолотым. Если добавка представляет собой сиропы, сахара или подобное, то они будут обычно не размолоты. Добавку, такую как сахара или сиропы, можно добавлять в раствор для затираания в любое время в процессе; однако такие добавки можно также добавлять в водный экстракт или позднее в процессе получения напитка, как описывается ниже. Как правило, добавки добавляют в меньших количествах, чем пророщенные зерна зерновой культуры. Таким образом, по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 70%, например по меньшей мере 90%, углеводов водного экстракта получают из пророщенных зерен зерновой культуры, тогда как добавки предпочтительно только составляют незначительную часть углеводов. Если добавка является непропорощенным зерном зерновой культуры, то предпочтительно, чтобы пророщенные зерна зерновой культуры составляли по меньшей мере 50% (мас./мас.), предпочтительно по меньшей мере 70% (мас./мас.), более предпочтительно по меньшей мере 90% (мас./мас.) всех зерен зерновой культуры, как определено в пересчете на сухую массу.

Дополнительные средства для затираания могут также представлять собой высушенный в печи солод. Если добавляют высушенный в печи солод, то он может также быть мелко измельченным, например, путем размалывания или дробления. Как правило, высушенный в печи солод добавляют в меньших количествах, чем пророщенные зерна зерновой культуры. Таким образом, пророщенные зерна зерновой культуры (т.е. пророщенные зерна зерновой культуры, которые не были высушены в печи) составляют по меньшей мере 80% (мас./мас.), предпочтительно по меньшей мере 90% (мас./мас.), более предпочтительно по меньшей мере 95% (мас./мас.) всех зерен зерновой культуры и солода, как определено в пересчете на сухую массу. Согласно предпочтительным вариантам осуществления высушенный в печи солод не добавляют.

Указанные дополнительные средства для затириания, предпочтительно пищевого качества, также могут представлять собой соль, например CaCl_2 .

Указанные дополнительные средства для затириания также могут представлять собой кислоту, предпочтительно кислоту пищевого качества, например H_3PO_4 .

Водный экстракт обычно получают инкубацией мелко измельченных пророщенных зерен зерновой культуры в растворе для затириания при одной или нескольких заранее определенных температурах. Указанная заранее определенная температура может также называться в настоящем документе "температурой затириания". Указанные температуры затириания могут, например, быть обычными температурами, используемыми при затириании.

Температура затириания, как правило, или поддерживается постоянной (изотермическое затириание), или постепенно повышается, например повышается постепенным образом. В любом случае растворимые вещества в мелко измельченных пророщенных зернах зерновой культуры высвобождаются в указанный раствор для затириания, образуя при этом водный экстракт.

Температура(ы) затириания обычно представляет(ют) собой температуру(ы) в диапазоне от 30 до 90°C, например в диапазоне от 40 до 80°C, например в диапазоне от 50 до 85°C. Температуры затириания можно выбирать согласно используемому типу зерновой культуры. Следовательно, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых зерна зерновой культуры представляют собой ячмень с низким содержанием липоксигеназной (LOX) активности и/или метилметионинтрансферазной (ММТ) активности или без таковых (см. подробности ниже в настоящем документе в разделе "Ячмень"), температура затириания может быть ниже, например, находиться в диапазоне от 35 до 69°C.

Инкубирование в растворе для затириания может быть выполнено в течение любого подходящего количества времени. Время для инкубирования в растворе для затириания в емкости для затириания может, например, находиться в диапазоне от 60 до 300 мин, например в диапазоне от 60 до 240 мин, например в диапазоне от 90 до 300 мин, например в диапазоне от 90 до 240 мин, например в диапазоне от 90 до 270 мин. Например, указанное время для инкубирования в растворе для затириания может быть любым временем, используемым при традиционном затириании. Одним неограничивающим примером подходящего затириания является

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

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

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

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

После инкубирования в растворе для затириания в емкости для затириания мелко измельченные пророщенные зерна зерновой культуры в растворе для затириания можно переносить в другой контейнер, например фильтрационный чан, и инкубировать в течение дополнительного времени при повышенной температуре, например, в диапазоне от 70 до 78°C на протяжении диапазона времени от 30 до 120 мин.

Таким образом, инкубирование в растворе для затириания в дополнение к упомянутому выше стадиям может также предусматривать стадию (5)

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

Неограничивающие примеры можно найти в литературе по пивоварению, например, у Briggs et al. (выше) и Hough et al. (выше).

Предпочтительно, чтобы стадия затириания не включала в себя кипячение мелко измельченных зерен зерновой культуры. Другими словами, в ходе инкубирования экстракта мелко измельченной зерновой культуры в воде или водном растворе температуру все время поддерживают ниже точки кипения. Однако после отделения водного экстракта от отработанных зерен водный экстракт можно кипятить. Как правило, стадию получения водного экстракта мелко измельченных пророщенных зерен зерновой культуры выполняют при температурах значительно ниже температуры кипения, как правило, при температурах ниже 90°C, таких как ниже 85°C, например ниже 80°C.

После инкубирования в растворе для затириания водный экстракт, как правило, можно разделять, например, посредством фильтрации, на водный экстракт и остаточные нерастворившиеся твердые частицы, последние также называют "отработанным зерном". Фильтрацию можно, например, проводить в фильтрационном чане. В качестве альтернативы, фильтрацию может представлять собой фильтрацию через заторный фильтр. Водный экстракт, полученный таким образом, можно также называть "первым суслом".

Дополнительная жидкость, такая как вода, может быть добавлена в отработанные зерна в ходе процесса, также называемого промывание. После промывания и фильтрации может быть получено "второе сусло". Дополнительные сусла могут быть получены путем повторения процедуры.

Таким образом, водный экстракт может представлять собой сусло, например первое сусло, второе

сусло, дополнительное сусло или их комбинацию.

Водный экстракт.

Водный экстракт, полученный способами в соответствии с настоящим изобретением, может обладать рядом полезных свойств, включающих в себя без ограничения свойства, описываемые в данном разделе. Водный экстракт, полученный способами в соответствии с настоящим изобретением, может быть далее переработан в напиток, как описывается в настоящем документе.

Как упоминается выше, водный экстракт может быть подвергнут стадии фильтрация. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы сусло обладало хорошей фильтруемостью. Например, может быть технически сложным фильтровать высоковязкую жидкость - причина, по которой может быть предпочтительно, чтобы водный экстракт имел низкую вязкость.

Фильтруемость можно определять рядом путей. Согласно одному варианту осуществления фильтруемость определяют как количество жидкости, полученное после фильтрации через фильтровальную воронку, снабженную фильтровальной бумагой, в течение 1 ч. Согласно одному варианту осуществления водный экстракт может иметь фильтруемость по меньшей мере 250 мл, когда 400 мл раствора для затирания, содержащего 100 г мелко измельченных зерен зерновой культуры, добавляют в указанную фильтровальную воронку. Фильтруемость можно также определять как процент объема жидкости, полученной после фильтрации в течение 60 мин, как описывается выше, по сравнению с объемом жидкости водного экстракта, добавленного в указанную воронку. Таким образом, согласно одному варианту осуществления фильтруемость, например, может составлять по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60% (об./об.). В частности, фильтруемость можно определять, как описывается в примере 3 международной патентной заявки № PCT/EP2017/065498.

Фильтруемость зачастую может зависеть от содержания β -глюкана. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы содержание β -глюкана не было слишком высоким. Например, согласно одному варианту осуществления водный экстракт может включать в себя максимум 200 мг/л, предпочтительно максимум 150 мг/л β -глюкана.

Согласно некоторым вариантам осуществления водный экстракт зерновой культуры не включает в себя меланоидины.

Способ получения водного экстракта зерен зерновой культуры.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадии

- a) обеспечения зерен зерновой культуры;
 - b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен, при этом указанная стадия проращивания предусматривает инкубирование указанных зерен в водном растворе до содержания воды в зернах по меньшей мере 30%, при этом по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухой массы зерен зерновой культуры пропускают через указанный водный раствор в час;
 - c) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
 - d) получения водного экстракта указанных размолотых мелко измельченных пророщенных зерен, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d),
- с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры.

Согласно одному варианту осуществления стадия проращивания может включать в себя одну или несколько стадий замачивания. Может быть предпочтительно, чтобы продолжительность всей стадии проращивания не превышала 108 ч, например, она может не превышать 96 ч. Согласно одному варианту осуществления стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 72 до 108 ч, например на протяжении приблизительно 96 ч. Согласно одному варианту осуществления стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 65 до 80 ч, например на протяжении приблизительно 72 ч.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания.

Согласно одному варианту осуществления окончание проращивания может быть началом мелкого измельчения пророщенных зерен.

Следует учитывать, что выражение "указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d)" означает, например, что указанные зерна зерновой культуры могут характеризоваться содержанием воды выше 20% в любой момент времени от завершения стадии b) до инициации стадии d).

Способы в соответствии с настоящим изобретением получения водного экстракта зерновой культуры не предусматривают стадию сушки в печи в любой момент времени между упомянутыми выше стадиями b) и d). Согласно некоторым вариантам осуществления способы не предусматривают стадию сушки в печи в любой момент времени между упомянутыми выше стадиями b) и c). Согласно другим вари-

антам осуществления способы не предусматривают стадию сушки в печи в любой момент времени между стадиями с) и d). Как объясняется выше, это связано с тем, что авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что без стадии сушки в печи можно обойтись и что водные экстракты зерновых культур, в частности экстракты, подходящие для производства напитка, могут быть получены без сушки в печи пророщенных зерен. Как можно видеть в примере 3, рост корня зерен ячменя, пророщенных согласно способам в соответствии с настоящим изобретением, неожиданно значительно снижается; следовательно, без стадии сушки в печи можно обойтись.

Зернами зерновой культуры могут быть зерна любой зерновой культуры, описываемые в настоящем документе выше. Согласно одному варианту осуществления растением ячменя является растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12.11.2018 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43273 и называемое "мутантом 2", или его потомство. Таким образом, растением ячменя может быть мутант 2 растения ячменя, депонированный 12.11.2018 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43273, или любое его потомство, при этом растение ячменя несет мутацию G→A в нуклеотиде 2243 кодирующей последовательности гена HvCslF6 (SEQ ID NO: 2) и/или при этом ген HvCslF6 указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvCslF6, включающий в себя мутацию Gly→Asp аминокислоты 748 SEQ ID NO: 1.

Зернами зерновой культуры также может быть потомство растения, такого как мутантное растение. Согласно некоторым вариантам осуществления зерна ячменя, используемые в способах в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой зерна от растения ячменя, которое не было получено исключительно посредством по сути биологического процесса. Потомство растения ячменя, полученного с помощью технического процесса, в настоящем документе рассматривают как не исключительно полученное посредством по сути биологического процесса, поскольку родительское растение получают с помощью технического процесса.

Способы получения таких растений описывают в находящейся в стадии совместного рассмотрения заявке под названием "Растения зерновой культуры с улучшенными свойствами клеточной стенки", принадлежащей тому же заявителю и имеющей ту же дату подачи, что и настоящая заявка.

Важно отметить, что в способах в соответствии с настоящим изобретением не требуется стадия сушки в печи в любой момент времени после проращивания, т.е. сушку в печи не выполняют после проращивания, после размалывания или мелкого измельчения пророщенных зерен или после получения водного экстракта. Следовательно, согласно предпочтительным вариантам осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением не предусматривают стадию сушки в печи в любой момент времени до получения водного экстракта зерновой культуры, который может быть использован для получения напитка, например, путем пивоварения.

Согласно некоторым вариантам осуществления содержание аминокислот, содержащихся в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, сопоставимо с содержанием аминокислот, содержащихся в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание аминокислот, содержащихся в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, находится в диапазоне от 500 до 3000 мг/л, таком как от 600 до 2900 мг/л, таком как от 700 до 2800 мг/л, таком как от 800 до 2700 мг/л, таком как от 900 до 2600 мг/л, таком как от 1000 до 2500 мг/л, таком как от 1100 до 2400 мг/л, таком как от 1200 до 2200 мг/л, таком как от 1300 до 2100 мг/л, таком как от 1400 до 2000 мг/л. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание аминокислот, содержащихся в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, составляет по меньшей мере 500 мг/л, например по меньшей мере 600 мг/л, например по меньшей мере 700 мг/л, например по меньшей мере 800 мг/л, например по меньшей мере 900 мг/л, например по меньшей мере 1000 мг/л, например по меньшей мере 1250 мг/л, например по меньшей мере 1500 мг/л, например по меньшей мере 1600 мг/л, например по меньшей мере 1700 мг/л, например по меньшей мере 1800 мг/л, например по меньшей мере 1900 мг/л, например по меньшей мере 2000 мг/л. Содержание аминокислот представляет собой содержание всех аминокислот в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, например, как измерено после 24, 48, 72, 96 или 108 ч проращивания, предпочтительно как измерено после 48-108 ч проращивания, как описывается в настоящем документе выше. Способы измерения содержания аминокислот известны специалисту в данной области.

Содержание сбраживаемых углеводов, присутствующих в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно не изменяется по сравнению с содержанием сбраживаемых углеводов, присутствующих в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание сбраживаемых углеводов (т.е. сумма всех сбраживаемых углеводов) находится в диапазоне от 5 до 20/100 мл, таком как от 6 до 19/100 мл, таком как от 7 до 18/100 мл, таком как от 8 до 17/100 мл, таком как от 9 до 16/100 мл, таком как от 10 до 15/100 мл, таком как от 10 до 14/100 мл, таком как от 11 до 13/100 мл, например приблизительно 12/100 мл. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание сбраживаемых углеводов в сусле, полученном спо-

собами в соответствии с настоящим изобретением, составляет по меньшей мере 5/100 мл, например по меньшей мере 6 мг/100 мл, например по меньшей мере 7/100 мл, например по меньшей мере 8/100 мл, например по меньшей мере 9/100 мл, например по меньшей мере 10/100 мл, например по меньшей мере 11/100 мл, например по меньшей мере 12/100 мл или больше. Содержание сбраживаемых углеводов представляет собой содержание всех сбраживаемых углеводов в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, например, как измерено после 24, 48, 72, 96 или 108 ч проращивания, предпочтительно как измерено после 48-108 ч проращивания, как описывается в настоящем документе выше. Способы измерения содержания сбраживаемых углеводов известны специалисту в данной области.

Содержание инвертных сахаров в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно не изменяется по сравнению с содержанием в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание инвертных сахаров в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, находится в диапазоне от 1 до 5 г/100 мл, таком как от 1,5 до 4 г/100 мл, таком как от 1,75 до 3,25 г/100 мл, таком как от 2 до 3 г/100 мл, таком как от 2,1 до 2,9 г/100 мл, таком как от 2,3 до 2,8 г/100 мл, таком как от 2,4 до 2,7 г/100 мл, таком как от 2,5 до 2,6 мг/100 мл. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание инвертных сахаров составляет по меньшей мере 1 мг/100 мл, например по меньшей мере 1,5 мг/100 мл, например по меньшей мере 1,6 мг/100 мл, например по меньшей мере 1,7 мг/100 мл, например по меньшей мере 1,8 мг/100 мл, например по меньшей мере 1,9 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,0 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,1 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,2 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,3 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,4 мг/100 мл, например по меньшей мере 2,5 мг/100 мл. Содержание инвертных сахаров представляет собой содержание всех инвертных сахаров в водном экстракте зерновых культур, таком как сусло, например, как измерено после 24, 48, 72, 96 или 108 ч проращивания, предпочтительно как измерено после 48-108 ч проращивания, как описывается в настоящем документе выше. Способы измерения содержания инвертных сахаров известны специалисту в данной области.

Получение напитков.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением также предусматривают стадию переработки водного экстракта, полученного упомянутыми выше способами в соответствии с настоящим изобретением, в напиток.

Таким образом, согласно одному аспекту представлен способ получения напитка, при этом указанный способ предусматривает стадии

- i) получения водного экстракта способом, предусматривающим стадии
 - a) обеспечения зерен зерновой культуры;
 - b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен;
 - c) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
 - d) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d);
- с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры; и
- ii) переработки указанного водного экстракта в напиток.

Водный экстракт можно кипятить с хмелем или без такового, при этом впоследствии его можно называть кипяченым суслом.

Первое, второе и последующие сусла могут быть объединены и после этого подвергнуты нагреванию или кипячению. Водный экстракт можно нагревать или кипятить в течение любого подходящего количества времени, например, в диапазоне от 60 до 120 мин. В ходе нагревания или кипячения объем водного экстракта может быть снижен из-за выпаривания. Может быть предпочтительно, чтобы объем водного экстракта снижался на менее чем 8%, предпочтительно на менее чем 5%. Это может существенно снизить потребление энергии.

Напиток может быть получен путем сбраживания водного экстракта, например, путем сбраживания сусла. Таким образом, напиток может быть получен путем сбраживания водного экстракта с помощью дрожжей.

Согласно одному варианту осуществления напиток может представлять собой алкогольный напиток, такой как пиво. Согласно другим вариантам осуществления напиток может представлять собой неалкогольный напиток на основе пророщенных зерен зерновой культуры. Неалкогольный напиток, например, может представлять собой неалкогольное пиво или другие виды неалкогольных напитков, такие как Maltina. Предпочтительно напиток не является квасным суслом.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления напиток представляет собой пиво. Таким образом, пиво, например, может быть выбрано из группы, состоящей из Altbier, Amber ale, Barley wine, Berliner weisse, Biere de Garde, Bitter, Blonde Ale, Bock, Brown ale, California Common, Cream Ale,

Dortmunder Export, Doppelbock, Dunkel, Dunkelweizen, Eisbock, Fruit lambic, Golden Ale, Gose, Gueuze, Hefeweizen, Helles, India Pale ale, Kölsch, Lambic, Light ale, Maibock, Malt liquor, Mild, Märzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, Steam beer, Stout, Schwarzbier, лагер, Witbier, Weissbier и Weizenbock. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения пиво представляет собой светлое пиво, такое как пиво лагер, Pale ale или Weissbier. Водных экстракт в соответствии с настоящим изобретением получают из пророщенных зерен зерновой культуры, которое не подвергали сушке в печи. Пророщенные зерна зерновой культуры, которые не подвергали сушке в печи, как правило, имеют более светлый цвет, и следовательно, способны в соответствии с настоящим изобретением, являются особенно применимыми для получения более светлых сортов пива, в частности, для получения пива лагер. Более темные сорта пива также могут быть получены способами в соответствии с настоящим изобретением, например, путем добавления одного или нескольких высушенных в печи солодов в ходе затирания, как описывается в разделе "Получение напитков".

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

получения водного экстракта способами в соответствии с настоящим изобретением;

переработки указанного экстракта в напиток.

Алкобольные напитки, такие как пиво, согласно способам в соответствии с настоящим изобретением могут быть изготовлены из пророщенных зерен зерновой культуры. Пророщенные зерна зерновой культуры в добавление к хмелю и дрожжам способствуют вкусу и цвету пива.

После получения водного экстракта его можно перерабатывать в пиво любым способом, в том числе традиционными способами пивоварения. Неограниченные описания примеров подходящих способов для пивоварения можно найти, например, в публикациях Briggs et al. (1981); и Hough et al. (1982). Множество регулярно обновляемых способов анализа ячменных и пивных продуктов доступны, например, без ограничения в Американской ассоциации специалистов по биохимии зерна (1995), Американском обществе специалистов по пивоварению (1992), Европейской конвенции по пивоварению (1998) и Институте пивоварения (1997). Следует признать, что многие специфические процедуры используют для конкретной пивоварни, при этом наиболее значимые вариации относятся к предпочтениям местных потребителей. Любой такой способ получения пива можно использовать с настоящим изобретением.

Первая стадия получения пива из водного экстракта предпочтительно предусматривает нагревание указанного водного экстракта, как описывается в настоящем документе выше, с последующей фазой охлаждения и необязательно вихревого перемешивания. Одно или несколько дополнительных соединений могут быть добавлены в водный экстракт, например одно или несколько дополнительных соединений, описываемых ниже в разделе "Дополнительные соединения". После охлаждения водный экстракт можно переносить в бродильные чаны, содержащие дрожжи, например пивные дрожжи, такие как *S. pastorianus* или *S. cerevisiae*. Водный экстракт можно сбраживать в течение любого подходящего периода времени, как правило, в диапазоне от 1 до 20, таком как от 1 до 10 суток. Сбраживание выполняют при любой применимой температуре, например при температуре в диапазоне от 10 до 20°C. Способы также могут предусматривать добавление одного или нескольких ферментов, например один или несколько ферментов могут быть добавлены в сусло перед сбраживанием или в ходе брожения. В частности, указанный фермент может представлять собой пролин-специфическую эндопротеазу. Неограничивающим примером пролин-специфической эндопротеазы является "Brewer's Clarex", доступная из DSM. Согласно другим вариантам осуществления экзогенные ферменты не добавляют в ходе способов.

На протяжении длящегося несколько суток процесса брожения сахар превращается в спирт и CO₂ одновременно с образованием некоторых вкусовых веществ. Брожение может быть окончено в любое желаемое время, например, как только не будет наблюдаться никакого падения % Р.

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

Пиво, полученное в соответствии с настоящим изобретением, как правило, имеет приятный вкус и не имеет терпкости или имеет только небольшую терпкость. Вкус может быть проанализирован, например, дегустационной комиссией специалистов в области пива.

Напиток.

Напитки, полученные путем переработки водного экстракта в соответствии с настоящим изобретением в напиток, могут обладать рядом полезных свойств, в том числе без ограничения свойств, описываемых в данном разделе.

Как правило, желательно, чтобы напитки в соответствии с настоящим изобретением содержали насколько возможно меньше диацитила. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы напиток содержал диацитил на уровне, который ниже порогового значения, что проявляется посторонним привкусом в светлом пиве. Предпочтительно напиток содержит максимум 30 частей на миллиард диацитила, более предпочтительно максимум 25 частей на миллиард диацитила, еще более предпочтительно макси-

мум 20 частей на миллиард диацетила. В частности, это касается случая, если напиток является пивом, например пивом лагер.

Напиток в соответствии с настоящим изобретением может, например, быть водным экстрактом, как описывается в настоящем документе, который необязательно может быть ферментирован. Таким образом, напиток может включать в себя или состоять из указанного водного экстракта или ферментированного водного экстракта и необязательно одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения могут, например, быть любыми из дополнительных соединений, описываемых в данном документе ниже в разделе "Дополнительные соединения".

Согласно некоторым вариантам осуществления характеристики напитка, такого как пиво, полученного способами в соответствии с настоящим изобретением, по сути подобны характеристикам напитка, такого как пиво, полученного традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. Напиток может представлять собой свежее пиво, т.е. характеристики определяют сразу же после получения, или пиво, которое хранили определенную продолжительность времени. Такие характеристики могут представлять собой любую одну или несколько из содержания спирта, действительной степени сбраживания (RDF), pH, образования пены, содержания желательных соединений и/или содержания нежелательных соединений (например, ацетальдегида, этилацетата, изобутилацетата, пропанола, изоамилацетата, изоамилового спирта, транс-2-нонена (T2N), альдегидов Штреккера, 2-метилпропанола, 2-метилбутанола, 3-метилбутанола, фенилацетальдегида, диметилсульфида (DMS)). Характеристики могут быть, например, измерены после 24, 48, 72, 96 или 108 ч проращивания, предпочтительно измерены после 48-108 ч проращивания, как описывается в настоящем документе выше.

В частности, содержание T2N в напитке, таком как пиво, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, до и/или после хранения, подобно содержанию T2N в напитке, таком как пиво, полученном традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. В частности, содержание T2N ниже порога сенсорной чувствительности, который составляет 0,05 мг/л. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления содержание T2N в пиве, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, до и/или после хранения, например хранения в течение 2 недель при 37°C, ниже 1 мг/л, например ниже 0,09 мг/л, например ниже 0,08 мг/л, например ниже 0,07 мг/л, например ниже 0,06 мг/л, например ниже 0,05 мг/л, например ниже 0,04 мг/л, например ниже 0,03 мг/л, например ниже 0,02 мг/л, например приблизительно 0,01 мг/л или меньше.

Согласно некоторым вариантам осуществления содержание альдегидов Штреккера в напитке, таком как пиво, полученном способами в соответствии с настоящим изобретением, до и/или после хранения, подобно содержанию альдегидов Штреккера в напитке, таком как пиво, полученном традиционными способами, предусматривающими стадию сушки в печи. Согласно некоторым вариантам осуществления содержание альдегидов Штреккера составляет от 5 до 25 мг/л, например от 6 до 24 мг/л, например от 7 до 23 мг/л, например от 8 до 22 мг/л, например от 9 до 21 мг/л, например от 10 до 20 мг/л. Предпочтительно содержание альдегидов Штреккера ниже 25 мг/л, например ниже 24 мг/л, например ниже 23 мг/л, например ниже 22 мг/л, например ниже 21 мг/л, например ниже 20 мг/л.

Дополнительные соединения.

Способы в соответствии с настоящим изобретением могут предусматривать стадию добавления одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения, например, могут представлять собой вкусоароматическое соединение, консервант, функциональный ингредиент, краситель, подсластитель, регулирующее pH средство или соль. Регулирующее pH средство, например, может представлять собой буфер или кислоту, такую как фосфорная кислота.

Функциональные ингредиенты могут представлять собой любой ингредиент, добавляемый для достижения заданной функции. Предпочтительно функциональный ингредиент делает напиток более полезным для здоровья. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают в себя витамины или минералы.

Консервант может представлять собой любой консервант пищевого качества, например, он может представлять собой бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, сорбаты (например, сорбат калия), сульфиты и/или из соли.

Дополнительное соединение также может представлять собой CCh. В частности, CO₂ может быть добавлен для получения газированного напитка.

Вкусоароматическое соединение, подлежащее использованию с настоящим изобретением, может представлять собой любое применимое вкусоароматическое соединение. Вкусоароматическое соединение, например, может быть выбрано из группы, состоящей из душистых веществ, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растений и травяных настоев. В частности, вкусоароматические соединения могут представлять собой хмель.

Последовательности

>SEQ ID №: 1, последовательность подобного целлюлозосинтазе CslF6 (на основании номера NCBI в GenBank: EU267181.1)

MAPAVAGGGRVRSNEPVAAAAAAPAASGKPCVCGFQVCACTGSAAVASAASSL
DMDIVAMGQIGAVNDESWVGVELGEDGETDESGAAVDDRPVFRTEKIKGVLLHPYRVL
IFVRLIAFTLFVIWRISHKNPDAMWLWVTSICGEFWGFSWLLDQLPKLNPINRVPDLAV
LRQRFDRPDGTSTLPGLDIFVTTADPIKEPILSTANSVLSILAADYPVDRNTCYVSDDSGM
LLTYEALAESSKFATLWVPFCRKHGIEPRGPESYFELKSHPYMGRAQDEFVNDRRRVRK
EYDEFKARINSLEHDIKQRNDGYNAIAHSQGVPRPTWMADGTQWEGTWVDASENHR
RGDHAGIVLVLLNHPSHRRQTGPASADNPLDLSGVDVRLPMLVYVSREKRPGHDHQB
KAGAMNALTRASALLSNSPFILNLDCDHYINNSQALRAGICFMVGRSDTVAFVQFPQR
FEGVDPTDLYANHNRIFFDGTLRALDGMQGPPIYVGTGCLFRRITVYGFDPPIRVGGPCF
PRLAGLFAKTKYEKPGLEMTTAKAKAAPVPAKGKHGFLPLPKTYGKSDAFVDTIPRAS
HPSPYAAAAEGIVADEATIVEAVNVTAAAFEKKTGWGKEIGWVYDVTEDVVTGYRM
HIKGWRSRYCSIYPHAFIGTAPINLTERLFQVLRWSTGSLEIFFSKNNPLFGSTYLHPLQR
VAYINITTYPTAIFLIFYTTVPALSFTVGHFIVQRPTTMFYVYLGIIVLSTLLVIAVLEVKW
AGVTVFEWFRNGQFWMTASCSAYLAAVCQVLTKVIFRRDISFKLSKLPSGDEKDPY
ADLYVVRWTPLMITPIIIFVNIIGSAVAFKVLGDGEWTHWLKVAGGVFFNFVWVLFHLYP
FAKGILGKHGKTPVVVLVWWAFTFVITAVLYINIPMHMTSGGKHHTTVHGHGKKLVD
TGLYGLWH

> SEQ ID №: 2, подобный целлюлозосинтазе CslF6 (CslF6) *Hordeum vulgare*, полная кодирующая последовательность (на основании номера NCBI в GenBank: EU267181.1)

ATGGCGCCAGCGGTGGCCGGAGGGGGCCGCGTGCGGAGCAATGAGCCGGTT
GCTGCTGCTGCCGCCGCGCCGCGGCCAGCGCAAGCCCTGCGTGTGCGGCTTCCA
GGTTTGCGCCTGCACGGGGTCGGCCGCGGTGGCCTCCGCCGCTCGTCGCTGGACAT
GGACATCGTGGCCATGGGGCAGATCGGCGCCGTCAACGACGAGAGCTGGGTGGGCG
TGGAGCTCGGCGAAGATGGCGAGACCGACGAAAGCGGTGCCGCCGTTGACGACCGC
CCCGTATTCGCGACCGAGAAGATCAAGGGTGTCTCTCCACCCCTACCGGGTGCTG
ATTTTCGTTCGTCTGATCGCCTTCACGCTGTTCGTGATCTGGCGTATCTCCACAAGA
ACCCAGACGCGATGTGGCTGTGGGTGACATCCATCTGCGGCGAGTTCTGGTTCGGTT
TCTCGTGGCTGCTAGATCAGCTGCCCAAGCTGAACCCCATCAACCGCGTGCCGGACC
TGGCGGTGCTGCGGCAGCGCTTCGACCGCCCCGACGGCACCTCCACGCTCCCGGGG
CTGGACATCTTCGTACCCACGGCCGACCCCATCAAGGAGCCCATCTCTCCACCGCC
AACTCGGTGCTCTCCATCCTGGCCGCGGACTACCCCGTGGACCGCAACACATGCTAC
GTCTCCGACGACAGTGGCATGCTGCTACCTACGAGGCCCTGGCAGAGTCTCCAAG
TTCGCCACGCTCTGGGTGCCCTTCTGCCGCAAGCACGGGATCGAGCCAGGGGTCCG
GAGAGCTACTTCGAGCTCAAGTCACACCTTACATGGGGAGAGCCAGGACGAGTT
CGTCAACGACCGCCCGCGCTTCGCAAGGAGTACGACGAGTTCAAGGCCAGGATCA
ACAGCCTGGAGCATGACATCAAGCAGCGCAACGACGGGTACAACGCCGCCATTGCC
CACAGCCAAGGCGTGCCCCGGCCACCTGGATGGCGGACGGCACCCAGTGGGAGGG
CACATGGGTGACGCTCCGAGAACCACCGCAGGGGCGACCACGCCGGCATCGTAC
TGGTGCTGCTGAACCACCGAGCCACCGCCGCGCAGACGGGCCCCCGGCGAGCGCT
GACAACCCACTGGACTTGAGCGGCGTGGATGTGCGTCTCCCATGCTGGTGTACGTG
TCCCGTGAGAAGCGCCCCGGGCACGACCACAGAGAAGGCCGGTGCCATGAACGC

GCTTACCCGCGCCTCGGCGCTGCTCTCCAACCTCCCCCTTCATCCTCAACCTCGACTGC
 GATCATTACATCAACAACCTCCCAGGCCCTTCGCGCCGGCATCTGCTTCATGGTGGGA
 CGGGACAGCGACACGGTTGCCTTCGTCCAGTTCCCGCAGCGCTTCGAGGGCGTCGAC
 CCCACCGACCTCTACGCCAACCACAACCGCATCTTCTTCGACGGCACCCCTCCGTGCC
 CTGGACGGCATGCAGGGCCCCATCTACGTCGGCACTGGGTGTCTTCCGCCGCATC
 ACCGTCTACGGCTTCGACCCGCCGAGGATCAACGTCGGCGGTCCCTGCTTCCCCAGG
 CTCGCCGGGCTCTTCGCCAAGACCAAGTACGAGAAGCCCGGGCTCGAGATGACCAC
 GGCCAAGGCCAAGGCCGCGCCCGTGCCCGCCAAGGGTAAGCACGGCTTCTTGCCAC
 TGCCCAAGAAGACGTACGGCAAGTCGGACGCGCTTCGTGGACACCATCCCGCGCGCG
 TCGCACCCGTCGCCCTACGCCGCGGCGGTGAGGGGATCGTGGCCGACGAGGCGAC
 CATCGTCGAGGCGGTGAACGTGACGGCCGCCGCTTCGAGAAGAAGACCGGTGGG
 GCAAAGAGATCGGCTGGGTGTACGACACCGTCACGGAGGACGTGGTCACCGGCTAC
 CGGATGCATATCAAGGGGTGGCGGTACGCTACTGCTCCATCTACCCACACGCCTTC
 ATCGGCACCGCCCCATCAACCTCACGGAGAGGCTCTTCCAGGTGCTCCGTGGTCC
 ACGGGATCCCTCGAGATCTTCTTCTCCAAGAACAACCCGCTCTTCGGCAGCACATAC
 CTCCACCCGCTGCAGCGCGTCGCCTACATCAACATCAACCTTACCCCTTACCGCC
 ATCTTCTCATCTTCTACACCACCGTGCCGGCGCTATCCTTCGTCAACCGGCCACTTCA
 TCGTGCAGCGCCCGACCAACATGTTCTACGTCTACCTGGGCATCGTGCTATCCACGC
 TGCTCGTCATCGCCGTGCTGGAGGTCAAGTGGGCCGGGGTCACAGTCTTCGAGTGGT
 TCAGGAACGGCCAGTTCTGGATGACAGCAAGTTGCTCCGCCTACCTCGCCGCCGTCT
 GCCAGGTGCTGACCAAGGTGATATTCGGCGGGACATCTCCTTCAAGCTCACATCCA
 AGCTACCCTCGGGAGACGAGAAGAAGGACCCCTACGCCGACCTCTACGTGGTGCGC
 TGGACGCCGCTCATGATTACACCCATCATCATCTTCGTCAACATCATCGGATCC
 GCCGTGGCCTTCGCCAAGGTTCTCGACGGCGAGTGGACGCACTGGCTCAAGGTCGC
 CGGCGGCGTCTTCTTCAACTTCTGGGTGCTCTTCCACCTTACCCCTTCGCCAAGGGC
 ATCCTGGGGAAGCACGGAAAGACGCCAGTCGTGGTGCTCGTCTGGTGGGCATTAC
 CTTTCGTATCACCGCCGTGCTCTACATCAACATCCCCACATGCATACCTCGGGAGG
 CAAGCACACAACGGTGCATGGTCACCATGGCAAGAAGTTGGTCGACACAGGGCTCT
 ATGGCTGGCTCCATTGA

Таблица 2

Информация о последовательности праймера и зонда анализируемых генов

AMY1	Прямой	GGGTCATGCAGGGATA TG	SEQ ID №: 3	Аmplифицирует несколько транскриптов альфа- амилазы 1, в том числе (HORVU6Hr1G078330.1;
	Обратный	CCCAGTCGAAGAAATG ATC	SEQ ID №: 4	

	Зонд (FAM)	TACATCCTCACGCACCC AG	SEQ ID №: 5	HORVU6Hr1G078360.1; HORVU6Hr1G078420.1; HORVU6Hr1G080790.1; HORVU0Hr1G032700.1)
BGL2	Прямой	TACCAGAACCTGTTCG AC	SEQ ID №: 6	Аmplифицирует несколько транскриптов (1-3; 1-4)-β- глюканазы, в том числе (HORVU7Hr1G120450.1; HORVU1Hr1G057680.1)
	Обратный	ACACCACCAGCTTCAC	SEQ ID №: 7	
	Зонд (FAM)	ACCGTGGACGCCTTCTA C	SEQ ID №: 8	
AGL97	Прямой	GAGTCGCCGGAGATG	SEQ ID №: 9	Аmplифицирует транскрипт альфа- глюкозидазы с высоким значением pI, HORVU7Hr1G106540.2
	Обратный	GACTTCACCTTGATGGC	SEQ ID №: 10	
	Зонд (FAM)	CATGGTAAGGTTTCAGC TGCG	SEQ ID №: 11	
LD	Прямой	CTTCGATGGGGTTTGAA C	SEQ ID №: 12	Аmplифицирует транскрипт конечной декстриназы HORVU7Hr1G027860.4
	Обратный	CCGATTTCTCACCAAA G	SEQ ID №: 13	
	Зонд (FAM)	CCTGTGCAGGTGAATTC ATCA	SEQ ID №: 14	
RefA	Прямой	GTCTATTGCTTCCTCTG C	SEQ ID №: 15	HORVU5Hr1G041120
	Обратный	GATGACCGAAGCCTTA AC	SEQ ID №: 16	
	Зонд (HEX)	TGCGGGCGGCTATCAA A	SEQ ID №: 17	

Пункты.

Далее настоящее изобретение может быть описано следующими пунктами.

1. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадии

- а) обеспечения зерен зерновой культуры;
- б) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен;
- с) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%,
при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями б) и с); и
- д) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна, с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры.

2. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадии

- а) обеспечения зерен зерновой культуры;
- б) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен;
- с) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
- д) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями б) и д),
с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором вся стадия проращивания не превышает

96 ч.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 72 до 108 ч, например на протяжении приблизительно 96 ч.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 65 до 80 ч, например приблизительно 72 ч.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращивание прекращают путем инициации стадии с).

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращивание выполняют при температуре в диапазоне от 10 до 30°C, например от 10 до 25°C.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращивание включает в себя одну или несколько стадий замачивания, выполняемых до достижения содержания воды в зернах зерновой культуры по меньшей мере 30%, например по меньшей мере 35%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, после последней стадии замачивания.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращенные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, еще более предпочтительно не менее 40%, еще более предпочтительно не менее 45%, на момент мелкого измельчения указанных зерен зерновой культуры.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращенные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не менее 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, еще более предпочтительно не менее 40%, еще более предпочтительно не менее 45%, в любой момент времени от завершения стадии проращивания до момента времени мелкого измельчения указанных зерен зерновой культуры.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадию проращивания выполняют, по меньшей мере частично, при аэрации.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадия проращивания включает в себя стадию замачивания зерен зерновой культуры путем инкубирования зерен зерновой культуры во влажных условиях.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадия проращивания не включает в себя стадию погружения зерен зерновой культуры в водный раствор при аэрации.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерна, обеспеченные на стадии а), обрабатывают противомикробным средством.

16. Способ по п.15, при котором противомикробное средство представляет собой пероксид, такой как пероксид водорода.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращенные зерна содержат максимум 10 г, например максимум 8 г, например максимум 6 г, предпочтительно максимум 4 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г проращенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество).

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором проращенные зерна содержат максимум 6 г проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г проращенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество).

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом способ не предусматривает стадию удаления проростков.

20. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой обрушенную зерновую культуру, например обрушенный ячмень.

21. Способ по п.20, при этом способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной оболочки перед инициацией проращивания.

22. Способ по п.21, при котором удаление указанной оболочки приводит к потере по меньшей мере 1%, например к потере по меньшей мере 2%, например к потере в диапазоне от 2 до 7%, например в диапазоне от 3 до 6%, общей массы зерен зерновой культуры.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой голозерную зерновую культуру, например пшеницу или голозерный ячмень.

24. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой ячмень.

25. Способ по п.24, при котором ячмень является голозерным ячменем или сортом ячменя, имеющим тонкую шелуху.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой ячмень, характеризующийся низким содержанием β -глюкана в зернах.

27. Способ по п.26, при котором содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 5%, например находится в диапазоне от 1 до 5% мас./мас., в пересчете на сухую массу.

28. Способ по п.26, при котором содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 3%, например находится в диапазоне от 1 до 3% мас./мас., в пересчете на сухую массу.

29. Способ по любому из пп.24-28, при котором ячмень характеризуется тем, что несет мутацию в гене, кодирующем β -глюкансинтазу.

30. Способ по любому из пп.24-28, при котором ячмень характеризуется тем, что несет мутацию в гене, кодирующем CslF6.

31. Способ по п.30, при котором зерновки указанного растения ячменя характеризуются содержанием β -глюкана максимум 60%, например по меньшей мере 30% и максимум 60%, например по меньшей мере 40% и максимум 60%, содержания β -глюкана в растении ячменя, несущем ген CslF6 дикого типа, но в остальном того же генотипа.

32. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой ячмень, характеризующийся по меньшей мере одним или несколькими из следующего:

A) несет мутацию в гене, кодирующем LOX-1;

B) несет мутацию в гене, кодирующем LOX-2;

C) несет мутацию в гене, кодирующем MMT; и/или

D) несет мутацию, которая приводит к повышенной активности α -амилазы в ходе проращивания, например мутацию в гене, кодирующем DELLA.

33. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна характеризуются активностью α -амилазы по меньшей мере 30 ед./г, например по меньшей мере 50 ед./г, предпочтительно например по меньшей мере 100 ед./г, зерна зерновой культуры в пересчете на сухую массу.

34. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна характеризуются активностью β -амилазы по меньшей мере 5 ед./г, предпочтительно по меньшей мере 10 ед./г, зерна зерновой культуры в пересчете на сухую массу.

35. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна характеризуются активностью конечной декстриназы по меньшей мере 2 миллиед./г, например по меньшей мере 10 миллиед./г, предпочтительно по меньшей мере 20 миллиед./г, зерна зерновой культуры в пересчете на сухую массу.

36. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна характеризуются содержанием β -глюкана ниже 5%, например ниже 3% мас./мас., например ниже 2% мас./мас., например ниже 1,5% мас./мас., предпочтительно ниже 1,0% мас./мас., в пересчете на сухую массу.

37. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадия C включает в себя затирание указанных мелкоизмельченных зерен с раствором для затирания при температуре в диапазоне от 50 до 80°C.

38. Способ по п.37, при котором указанное затирание выполняют в присутствии одного или нескольких дополнительных гидролитических ферментов.

39. Способ по п.38, при котором по меньшей мере один гидролитический фермент выбран из группы, состоящей из разлагающих клеточную стенку и крахмал ферментов, включающих в себя без ограничения α -амилазу, β -амилазу, конечную декстриназу, пуллулазу, β -глюканазу, ксиланазу, глюкоамилазу и протеазу.

40. Способ по любому из пп.37-39, при котором указанное затирание выполняют в присутствии по меньшей мере одной β -глюканазы и по меньшей мере одной ксиланазы.

41. Способ по любому из пп.37-40, при котором максимум 700 ед., предпочтительно максимум 350 ед. экзогенной глюкоамилазы и/или α -амилазы на г пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухую массу) добавляют в ходе указанного затирания.

42. Способ по любому из пп.37-41, при котором максимум 100 PUN экзогенной пуллулазы на г пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухую массу) добавляют в ходе указанного затирания.

43. Способ по любому из пп.37-42, при котором зерновая культура характеризуется низким содержанием β -глюкана в зернах и при котором не добавляют β -глюканазу в ходе затирания.

44. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом способ дополнительно предусматривает стадию фильтрования указанного водного экстракта.

45. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором водный экстракт характеризуется содержанием аминокислот в диапазоне от 500 до 3000 мг/л, таком как от 600 до 2900 мг/л, таком как от 700 до 2800 мг/л, таком как от 800 до 2700 мг/л, таком как от 900 до 2600 мг/л, таком как от 1000 до 2500 мг/л, таком как от 1100 до 2400 мг/л, таком как от 1200 до 2200 мг/л, таком как от 1300 до 2100 мг/л, таком как от 1400 до 2000 мг/л.

46. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором водный экстракт характеризуется содержанием сбраживаемых углеводов в диапазоне от 5 до 20 мг/100 мл, таком как от 6 до 19 мг/100 мл, таком как от 7 до 18 мг/100 мл, таком как от 8 до 17 мг/100 мл, таком как от 9 до 16 мг/100 мл, таком как от 10 до 15 мг/100 мл, таком как от 10 до 14 мг/100 мл, таком как от 11 до 13 мг/100 мл, например приблизительно 12 мг/100 мл.

47. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором водный экстракт характеризуется

содержанием инвертных сахаров в диапазоне от 1 до 5 г/100 мл, таком как от 1,5 до 4 г/100 мл, таком как от 1,75 до 3,25 г/100 мл, таком как от 2 до 3 г/100 мл, таком как от 2,1 до 2,9 г/100 мл, таком как от 2,3 до 2,8 г/100 мл, таком как от 2,4 до 2,7 г/100 мл, таком как от 2,5 до 2,6 мг/100 мл.

48. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом способ не предусматривает стадию сушки в печи, предпочтительно способ не предусматривает стадию сушки в печи в любой момент времени перед стадией d).

49. Способ по любому из предыдущих пунктов, при этом способ не предусматривает стадию дробления пророщенных зерен зерновой культуры и формирования гранул из дробленых пророщенных зерен зерновой культуры.

50. Способ получения напитка, при этом указанный способ предусматривает стадии

i) получения водного экстракта способом по любому из предыдущих пунктов;

ii) переработки указанного экстракта в напиток.

51. Способ по п.50, при котором стадия ii) включает в себя стадии

e) нагревания указанного водного экстракта необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;

f) охлаждения водного экстракта;

g) сбраживания указанного водного экстракта с дрожжами с получением тем самым ферментированного напитка.

52. Способ по п.50, при этом способ дополнительно предусматривает стадию осаждения, выполняемую после стадии e) или стадии f).

53. Способ по любому из пп.50-52, при котором напиток представляет собой пиво.

54. Способ по любому из пп.50-53, при котором напиток представляет собой светлое пиво, например, выбранное из группы, состоящей из пива лагер, Pale ale и пшеничного пива.

55. Способ по любому из пп.50-54, при котором напиток представляет собой пиво лагер.

56. Способ по любому из пп.50-55, при котором напиток характеризуется содержанием T2N ниже 1 мг/л, например ниже 0,09 мг/л, например ниже 0,08 мг/л, например ниже 0,07 мг/л, например ниже 0,06 мг/л, например ниже 0,05 мг/л, например ниже 0,04 мг/л, например ниже 0,03 мг/л, например ниже 0,02 мг/л, таким как приблизительно 0,01 мг/л или меньше.

57. Способ по любому из пп.50-56, при котором напиток характеризуется содержанием альдегидов Штреккера от 5 до 25 мг/л, таким как от 6 до 24 мг/л, таким как от 7 до 23 мг/л, таким как от 8 до 22 мг/л, таким как от 9 до 21 мг/л, таким как от 10 до 20 мг/л.

58. Способ по любому из пп.50-57, при котором стадия i) не включает в себя стадию сушки в печи.

Примеры

Пример 1. Осолаживание в микромасштабе.

Образцы ячменя обрабатывали в трех повторностях, каждый образец весил 50 г. Образцы, помещенные в стаканы из нержавеющей стали, замачивали, согласно схеме, представленной на фиг. 1, в виде принудительной подачи, в пресной воде при 15°C на протяжении приблизительно 7 ч в первый день, 3 ч во второй день и 1 ч в третий день, для достижения содержания воды 35, 40 и 45% соответственно, в конце каждого замачивания. После каждого замачивания содержащие образцы стаканы из нержавеющей стали перемещали в ящик для проращивания при 15°C и держали там до следующей стадии процесса. По завершении последнего сливания воды для замачивания образцы держали в течение 120 ч (дни 3-7) в ящиках для проращивания, уравновешенных до 45% воды, и опрыскивали для компенсации потери воды при дыхании.

По завершении процесса проращивания (день 7) образцы сушили в печи в ящиках из нержавеющей стали в инкубаторе Termaks в течение 21 ч с использованием следующей программы с диапазоном температур:

25-55°C (2°C/ч);

55-85°C (4°C/ч);

85°C в течение 1,5 ч.

Стадии проращивания и сушки в печи выполняли с рециркулированием воздушного потока 80% свежего воздуха.

По завершении каждого дня осолаживания в микромасштабе образцы собирали для анализов в трех повторностях и сушили замораживанием в течение 48 ч.

Исследовали две линии ячменя с использованием данного процесса проращивания: одну регулярную линию ячменя сорта Paustian (эталон) и одну линию ячменя с низким содержанием β-глюкана (мутант). Линия ячменя, характеризующаяся низким содержанием β-глюкана, представляет собой растение ячменя сорта Paustian, которое несет мутацию в гене CslF6, что дает мутантный ген Cslf6, кодирующий мутантный полипептид CslF6, несущий мутацию Gly→Asp в положении 748. Последовательность дикого типа полипептида CslF6 ячменя (SEQ ID NO: 1) доступна под номером доступа NCBI EU267181.1 в базе данных GenBank.

Пример 2. Поглощение воды.

Определяли скорость поглощения воды на протяжении первых 6 ч проращивания путем измерения

точных различий массы зерен зерновой культуры по сравнению с начальной массой после быстрого центрифугирования стаканов для удаления поверхностной воды.

Результаты.

Поглощение воды мутантом в ходе на протяжении первых 6 ч пропитывания оказалось немного быстрее, чем у эталона (фиг. 2).

Пример 3. Рост корня.

Образец пророщенного ячменя сушили замораживанием после каждого дня проращивания, как описывается в примере 1. Высушенный замораживанием образец взвешивали, образовавшиеся проростки удаляли вручную и пророщенный ячменя снова взвешивали. Рост корня вычисляли как процент массы перед обработкой и после таковой.

Результаты.

Рост корня у мутанта и эталона был подобным на протяжении периода осолаживания, но значительно снижался в день четвертый по сравнению с обожженным солодом (фиг. 3).

Пример 4. Экспрессия генов, кодирующих гидролитические ферменты в ходе осолаживания.

Выделение РНК.

Для каждого образца готовили 2-мл пробирку Эппендорфа, содержащую два металлических шарика. Отвешивали приблизительно 80 мг высушенной замораживанием муки в пробирки Эппендорфа, содержащие металлические шарики. Образцы предварительно смачивали 100 мкл не содержащей РНКазы воды с последующим добавлением 1 мл Tri-Reagent. Затем образцы энергично встряхивали. После 5 мин инкубирования при комнатной температуре образцы центрифугировали при 12000×g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость декантировали в 2 мл пробирку PhaseLock (откручивали 30 с, Qiagen, № 129056) и добавляли 0,2 мл хлороформа. Пробирку энергично встряхивали вручную в течение 10-15 с для смешивания хлороформа и Tri-Reagent. Образцы инкубировали в течение 5-15 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 12000×g в течение 5 мин при 4°C. Водную фазу образца декантировали в новую пробирку Эппендорфа и добавляли 500 мкл 2-пропанола. РНК осаждали в холодильнике на протяжении ночи. Образец центрифугировали при 12000×g в течение 5 мин при 4°C и удаляли надосадочную жидкость с изопропанолом. РНК очищали, осадок повторно суспендировали непосредственно в 350 мкл буфера для лизиса из мининабора Aurum Total RNA (BioRad, № 7326820). Добавляли 350 мкл 70% этанола для повторного осаждения РНК. Раствор переносили в связывающую РНК колонку, помещенную в 2-миллилитровую пробирку для промывания без крышки (предоставленную в наборе) и центрифугировали в течение 30 с. Связывающую РНК колонку удаляли и фильтрат отбрасывали. Добавляли 700 мкл раствора для промывания низкой жесткости в связывающую РНК колонку и центрифугировали в течение 30 с. Раствор для промывания низкой жесткости сливали из пробирки для промывания и связывающую колонку снова помещали в ту же пробирку для промывания.

Обработка ДНКазы в колонке.

Предоставленную лиофилизированную ДНКазу I восстанавливали путем добавления 250 мкл 10 mM Tris, pH 7,5, во флакон и перемешивали пипеткой вверх и вниз согласно предоставленному руководству (мининабор BioRad Aurum Total RNA № 7326820). Добавляли 80 мкл разбавленной ДНКазы I в мембранный пакет на дне каждой колонки и обеспечивали расщепление при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 700 мкл раствора для промывания высокой жесткости в связывающую РНК колонку и центрифугировали в течение 30 с. Фильтрат отбрасывали и колонку снова помещали в ту же пробирку для промывания. Добавляли 700 мкл раствора для промывания низкой жесткости в связывающую РНК колонку и центрифугировали в течение 30 с. Фильтрат отбрасывали и колонку снова помещали в ту же пробирку для промывания. Пробирку для промывания и колонку центрифугировали еще 2 мин для удаления остаточного раствора для промывания. Связывающую РНК колонку переносили в 1,5-миллилитровую закрывающуюся микроцентрифужную пробирку и добавляли 80 мкл буфера для элюирования в мембранный пакет на дне связывающей РНК колонки. Обеспечивали пропитывание мембран раствором в течение 1 мин перед центрифугированием в течение 2 мин для элюирования суммарной РНК. Наконец, количественно определяли концентрацию РНК с помощью NanoDrop (Thermo Scientific).

Синтез кДНК и настройки ddPCR.

Синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК iScript™ от BioRad (№ 1708891). Перед синтезом кДНК оценивали концентрацию суммарной РНК на NanoDrop (Thermo Scientific) и нормализовали до 50 нг/мкл не содержащей РНКазы воды. Для синтеза кДНК использовали 200 нг РНК согласно следующему протоколу.

Компонент синтеза кДНК	Объем на реакцию (мкл)
5× реакционная смесь iScript	4
Обратная транскриптаза iScript	1
РНК-матрица, 200 нг	4
Не содержащая нуклеазу вода	11
Суммарный объем:	20

Для контрольных образцов NoRT добавляли воду вместо обратной транскриптазы (RT). Полную реакционную смесь инкубировали в термоциклере с использованием следующего протокола.

Программа синтеза кДНК

Примирование	5 минут при 25°C
Обратная транскрипция	20 минут при 46°C
Инактивация RT	1 минут при 95°C
Выдерживание	∞ при 4°C

Для анализа ddPCR каждый образец анализировали на предмет представляющего интерес гена, а также одного эталонного гена. Выполняли ddPCR с использованием QX200 Droplet Generator и QX200 Droplet Reader от BioRad в соответствии с инструкциями производителя. В этом случае использовали HORVU5Hr1G041120, белок семейства цитозольной пируваткиназы, который стабильно экспрессируется в ходе прорастания, в качестве эталонного гена. В табл. 2 выше в разделе "Последовательности" представлены подробности праймеров и зондов.

Перед анализом кДНК разбавляли в 20 раз водой и формировали каждую реакционную смесь согласно следующему протоколу.

Реакционный компонент ddPCR	1×	
ddPCR Supermix (без dUTP)	1×	11
Зонд FAM (20×)	450 nM/250 nM	0,95
Зонд HEX (20×)	450 nM/250 nM	0,95
кДНК	x	5
Вода	y	4,1

Образцы хорошо перемешивали в 96-луночных планшетах и центрифугировали в течение 1 мин при 4000 об/мин перед созданием капли (BioRad QX200™ Automated Droplet Generator). Планшет с каплями инкубировали в термоциклере согласно следующей программе.

ПЦР-программа для ddPCR	Температура	Время	Ramp	Циклы
Нагревательная крышка	105°C		2°C/секунд	
Стадия 1	95°C	10 минут		1
Стадия 2	94°C	30 секунд		40
Стадия 3	55°C	1 минута		
Стадия 4	98°C	10 минут		1
Стадия 5	8°C	∞		

Наличие FAM- и HEX-позитивных капель выявляли на QX200™ Droplet Reader от BioRad и анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft от BioRad. Пороговое значение устанавливали вручную на 2D-графике, а затем значения концентрации экспортировали в Excel для нормализации к выбранному эталонному гену.

Результаты.

Экспрессию выбранных генов: амилазы (AMY1), (1-3; 1-4)-β-глюканазы (BGL2), альфа-глюкозидазы с высоким значением pI (AGL97) и конечной декстриназы (LD) - анализировали с использованием ddPCR. AGL97 экспрессировался на самом высоком уровне уже в день 2, тогда как три других гена демонстрируют максимальную экспрессию в день 4 (фиг. 4). Мутантные и эталонные линии ячменя демонстрируют сходный паттерн экспрессии отобранных генов, что подтверждает оптимальную экспрессию у мутанта с низким содержанием (1-3; 1-4)-β-глюкана, а также генов, кодирующих разлагающие (1-3; 1-4)-β-глюкан ферменты.

Пример 5. Активность гидролитических ферментов в образцах солода.

Перед анализом активности ферментов образцы солода размалывали с использованием стандартной мельницы Foss Cyclotech, оснащенной шлифовальным кольцом из карбида вольфрама (Foss 10004463), никелированной мешалкой (Foss 10002666) и экраном с выпускными отверстиями в 1 мм (Foss 10001989). Все измерения ферментативной активности в ячменном солоде проводили в течение 48 ч после размалывания сухого образца. Активность альфа-амилазы измеряли в анализах с использованием набора Ceralpha (K-CERA) от Megazyme с помощью стандартного лабораторного оборудования. Анализы амилазы осуществляли в соответствии с протоколом производителя (K-CERA 01/12). Вычисления активности амилазы основаны на формуле в протоколе Megazyme (K-CERA 01/12). Активность бета-амилазы измеряли в анализах с использованием набора Betamyl (K-BETA3) от Megazyme с использованием стандартного лабораторного оборудования. Анализы амилазы осуществляли в соответствии с протоколом производителя (K-BETA3 10/10). Вычисления активности бета-амилазы основаны на формуле в протоколе Megazyme (K-BETA3 10/10). Активность конечной декстриназы измеряли в анализах с использованием набора Pul-

lulanase/Limit Dextrinase Assay Kit (PullG6 Method) (K-PullG6) от Megazyme с использованием стандартного лабораторного оборудования. Анализы конечной декстриназы осуществляли в соответствии с протоколом производителя (K-PullG6 05/17). Вычисления активности конечной декстриназы основаны на формуле в протоколе Megazyme (K-PullG6 05/17).

Результаты.

Суммарные ферментативные активности, измеряемые для α -амилазы, β -амилазы и свободной конечной декстриназы, демонстрируют один и тот же паттерн в мутантных и эталонных линиях ячменя (фиг. 5). Неожиданно, активность конечной декстриназы, по-видимому, немного выше у мутанта, начиная уже в день 3, хотя экспрессия гена конечной декстриназы была несколько ниже (фиг. 4).

Пример 6. Содержание (1-3; 1-4)- β -глюкана.

Пророщенные зерна анализировали на предмет суммарного содержания (1,3; 1,4)- β -глюкана. Размалывали десять мл зерна ячменя на циклонной мельнице Retch. Все образцы анализировали в трех повторностях. Отвешивали двенадцать мг муки в 2-миллилитровой пробирке Эппендорфа, нагревали в течение 2 ч при 100°C в печи, а затем охлаждали до комнатной температуры. Всего добавляли 500 мкл 50% водного раствора метанола и образцы встряхивали при 1400 об/мин в течение 1 ч. После центрифугирования при 16000×g в течение 10 мин надосадочную жидкость отбрасывали и образцы сушили на протяжении ночи. Затем добавляли 400 мкл 20 mM NaHPO₄ при pH 6,5 с 1 ед./мл лихеназы (Megazyme, International, Ирландия) на 10 мг муки и инкубировали при 50°C в течение 2,5 ч. Образец центрифугировали при 16000×g в течение 10 мин, надосадочную жидкость фильтровали через 0,45-мкм фильтры и количественно определяли высвобождающиеся олигомеры Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->3)-Glc (DP3) и Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->3)-Glc (DP4) с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD). Количественно определяли в олигомеры Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->3)-Glc (DP3) и Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->4)-Glc- β -(1->3)-Glc (DP4) с помощью HPLC-PAD с использованием системы Dionex ICS 5000+ DC, оснащенной 4-мкм колонкой SA-10 с размерами 2×250 мм и предварительной колонкой. Условия циклов представляли собой 0,4 мл/мин, температура колонки 40°C, изократический элюент 100 mM NaOH в течение 15 мин. Стандарт для количественного определения готовили расщеплением с помощью 1 ед./мл лихеназы (Megazyme International, Ирландия) известных количеств (1,3; 1,4)- β -глюканов средней вязкости (Megazyme International, Ирландия) в 20 mM NaHPO₄, pH 6,5, исходя из равного молярного отношения PAD ответа DP3 к DP4. Суммарное содержание (1,3; 1,4)- β -глюкана вычисляли как сумму олигомеров DP3 и DP4.

Результаты.

Содержание (1-3; 1-4)- β -глюкана в мутанте и эталоне контролировали в ячмене и в зеленом солоде в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6 процедуры осоложивания (фиг. 1), а также в обожженном солоде (день 7, на фиг. 1). В ходе всего процесса осоложивания содержание (1-3; 1-4)- β -глюкана в мутанте составляло всего лишь 50% такового в эталоне, а в день 5 содержание (1-3; 1-4)- β -глюкана в мутанте было подобным таковому в эталонном обожженном солоде.

Пример 7. Анализ в испытаниях зеленого солода, сусел и сортов пива.

Характеристики сусел и сортов пива, полученных из ячменя, проращиваемого в течение 1, 2, 3, 4 или 5 дней согласно способам в соответствии с настоящим изобретением, т.е. без обжиги или с обжигом ("экспериментальный" обжиг в табл. 3-8), а также из ячменя, проращиваемого в течение 5 дней и подвергающегося обжигу на следующей стадии ("промышленный" обжиг в табл. 3-8), показаны в табл. 3 и 4. Перед проращиванием выполняли замачивание в течение приблизительно 36 ч. Разрабатывали эксперимент для каждодневного сравнений варки пива с зеленым солодом непосредственно и варки пива с солодом, полученным с помощью обжиги. Варку пива с обожженным солодом ("промышленный" в таблицах) осуществляли на следующей стадии. Использовали ячмень сорта Congo.

Сахара в сусле определяли с помощью HPLC с электрохимическим детектированием. Альдегиды Штреккера определяли с помощью GC-MS после дериватизации карбониллов O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)-гидрозиламином, по сути, как описывается у Groenqvist et al, 1993. Сложные эфиры с низкой температурой кипения и высшие спирты в пиве определяли с помощью паровой газовой хроматографии с FID детектированием. Сложные эфиры с высокой температурой кипения, высшие спирты и жирные кислоты экстрагировали из пива с помощью CS₂ и анализировали с помощью паровой газовой хроматографии (ввод жидкости) с FID детектированием. Содержание аминокислот в сусле и пиве определяли, как описывается в европейском патенте № EP 3237601, с помощью UPLC с детектором Photo Diode Array с использованием набора для дериватизации AccQ-Tag Ultra от Waters, по сути, как описано поставщиком. T2N в пиве определяли с помощью GC-MS после дериватизации карбониллов O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)-гидрозиламином, по сути, как описывается у Groenqvist et al, 1993. Определяли действительную степень сбраживания (RDF), спирт, экстракт и цвет с использованием Alcozyer Beer Analyzing System от Anton Paar, как описано поставщиком. Пену измеряли с использованием FT-003 Foam Tester (Lg-automatic aps, Undalsvej 6, 3300 Frederiksvaerk, Дания), как описано поставщиком.

Как можно видеть в табл. 3, отсутствие сушки в печи существенно не влияло ни на pH сусла, ни на

аминокислоты. Разница содержания в сусле бета-глюканов, полученных после проращивания в течение 3, 4 или 5 дней, не считалась значимой. Следовательно, сусло, полученное способами в соответствии с настоящим изобретением, неожиданно содержит достаточно аминокислот, чтобы служить источником питательных веществ для дрожжей при последующем брожении, несмотря на отсутствие стадии сушки в печи. В табл. 4 показано, что отсутствие стадии сушки в печи существенно не изменяет концентрацию сбраживаемых углеводов.

Таблица 3

День в ящике для проращивания	Обжиг	pH сусла	Бета-глюканы в сусле, Maltlab (мг/л)	Аминокислоты в сусле (суммарные, мг/л)
1	Отсутствует	5,1	172,7	967
1	Экспериментальный	5,2	224,9	993
2	Отсутствует	5,3	162,3	1628
2	Экспериментальный	5,2	103	1488
3	Отсутствует	5,3	72,6	1915
3	Экспериментальный	5,2	65,9	1915
4	Отсутствует	5,3	50,9	2328
4	Экспериментальный	5,2	57,7	2399
5	Отсутствует	5,2	49,8	2597
5	Экспериментальный	5,2	43,4	2406
5	Промышленный	5,2	42,7	2247

Таблица 4

Сахара

День в ящике для проращивания	Обжиг	Fru	Fru %P	Glu	Suc	Mal	Maltt	Sum FC	Sum IS
1	Отсутствует	0,09	0,8	2,43	0,09	5,04	0,47	8,14	2,01
1	Экспериментальный	0,1	0,7	2,46	0,14	6,09	0,58	9,38	2,09
2	Отсутствует	0,17	1,2	2,97	0,09	6,46	0,06	9,76	2,49
2	Экспериментальный	0,14	1,1	2,84	0,2	6,24	0,48	9,92	2,49
3	Отсутствует	0,22	1,6	2,85	0,11	6,93	0,65	10,78	2,49
3	Экспериментальный	0,18	1,3	2,89	0,27	7,02	0,57	10,94	2,64
4	Отсутствует	0,27	2,0	2,84	0,16	7,16	0,84	11,29	2,61
4	Экспериментальный	0,28	2,1	2,98	0,25	6,95	0,54	11,02	2,81
5	Отсутствует	0,33	2,4	2,81	0,17	7,22	0,66	11,21	2,67
5	Экспериментальный	0,28	2,0	3,02	0,29	7,29	0,59	11,49	2,89
5	Промышленный	0,29	2,0	2,99	0,39	7,35	0,58	11,61	2,98

Fru: фруктоза;

Fru%P: % плато фруктозы;

Glu: глюкоза;

Suc: сахароза;

Mal: мальтоза;

Maltt: мальтотриоза;

Sum FC: суммарные сбраживаемый углеводы;

Sum IS: суммарные инвертные сахара.

Fru%P представлено в %;

остальные данные представлены в г/100 мл.

Пиво, полученное из водных экстрактов зерновых культур, полученных способами в соответствии с настоящим изобретением, т.е. без обжига, сравнивали с пивом, полученным из водных экстрактов зерно-

вых культур, полученных традиционными способами, т.е. с обжигом, после проращивания в течение 1, 2, 3, 4 или 5 дней. Характеристики сортов пива представлены в табл. 5-8.

В табл. 5 показано, что % спирта в объеме в пиве, полученном без сушки в печи, подобен полученному в пиве, полученном с сушкой в печи. Подобным образом, не существует значительной разницы в действительной степени сбраживания (RDF) или образовании пены. В частности, желательнее получать высокое образование пены. В табл. 6 показано, что отсутствие сушки в печи существенно не влияет на концентрации ацетальдегида (после 2 дней проращивания), этилацетата, изобутилацетата, пропанола, изоамилацетата и изоамилового спирта.

Таблица 5

Конечное пиво						
День в ящике для проращивания	Обжиг	Спирт (объем. %)	RDF (%)	Оригинальный экстракт (%P)	pH	Пена (секунды (LG))
1	Отсутствует	4,85	64,7	11,66	4,1	162
1	Экспериментальный	4,99	64,4	12,05	4,2	155
2	Отсутствует	5,02	68,5	11,4	4,6	170
2	Экспериментальный	4,99	69,8	11,14	4,4	147
3	Отсутствует	5,06	72,6	10,87	4,5	189
3	Экспериментальный	4,96	73,9	10,5	4,4	145
4	Отсутствует	5	75,2	10,39	4,6	149
4	Экспериментальный	5,01	76	10,31	4,6	140
5	Отсутствует	5,06	76,2	10,38	4,6	142
5	Экспериментальный	5,01	76,6	10,22	4,6	144
5	Промышленный	5,01	75,6	10,36	4,6	133

RDF: действительная степень сбраживания.

Таблица 6

Конечное пиво							
День в ящике для проращивания	Обжиг	Ацетальдегид	Этилацетат	Изобутилацетат	Пропанол	Изоамилацетат	Изоамиловый спирт
1	Отсутствует	0,86	15,2	0,09	9,89	2	54,38
1	Экспериментальный	1,58	14,29	0,1	10,15	1,58	58,55
2	Отсутствует	0,97	23,37	0,1	10,93	2,71	47,05
2	Экспериментальный	1,1	32,27	0,17	14,21	3,29	57,46
3	Отсутствует	1,07	28,07	0,13	11,26	3,23	43,86
3	Экспериментальный	0,98	34,75	0,16	15,14	3,69	54,54
4	Отсутствует	1,75	25,9	0,12	9,96	NA	39,81
4	Экспериментальный	1,94	34,85	0,14	11,6	NA	43,72
5	Отсутствует	1,5	31,67	0,13	11,81	3,36	45,97
5	Экспериментальный	1,33	36,8	0,15	11,45	3,67	46,57
5	Промышленный	1,62	40,76	0,15	12,03	4,01	39,56

Концентрации представлены в мг/л.

NA: нет данных.

Концентрации нескольких соединений постороннего вкуса и запаха анализировали в свежем пиве (табл. 7) и в пиве, которое хранили в течение 2 недель при 37°C (табл. 8). В свежем пиве (табл. 7) не наблюдали существенной разницы в альдегидах 2-метил-пропанале, 2-метил-бутанале, 3-метил-бутанале, фенил-ацетальдегиде и суммарных альдегидах Штреккера, которые считают важными компонентами вкуса выдержанного пива. Напротив, в некоторых случаях, наблюдали тенденцию снижения соединений постороннего вкуса и запаха. Сушку солода в печи считают важной для снижения уровня некоторых посторонних вкусов и запахов, например содержания транс-2-ноненаля (T2N), путем инактивации липокси-геназных ферментов, которые инициируют образование T2N. Содержание T2N несколько выше в пиве, приготовленном без сушки в печи; однако измеренное содержание все еще ниже порога сенсорной чувствительности 0,05 мг/л, следовательно, предполагают, что посторонние вкусы и запахи, вызванные T2N, не изменятся в пиве, полученном без сушки в печи.

Подобным образом, концентрации соединений постороннего вкуса и запаха в пиве, которое хранили 2 недели при 37°C (табл. 8), полученном без сушки в печи, показывают незначительную разницу с концентрациями, наблюдаемыми в пиве, полученном с сушкой в печи и хранящемся в тех же условиях.

Таблица 7

Свежее пиво

День в ящике для проращива- ния	Обжиг	2- Me- Pr	2- Me- Bu	3- Me- Bu	Фурф ураль	Мет иона ль	Phe Acal	T2N	St. al.
1	Отсутствует	0,96	0,48	1,71	24	2,77	2,58	0,017	8,5
1	Эксперименталь ный	1,48	0,62	1,92	18,31	2,8	2,42	0,016	9,24
2	Отсутствует	1,85	0,47	1,72	19,77	3,03	2,76	0,015	9,83
2	Эксперименталь	2,08	0,69	2,03	27,28	4,03	3,41	0,011	12,24
	ный								
3	Отсутствует	4,1	0,65	2,38	24,68	3,59	3,37	0,021	14,09
3	Эксперименталь ный	3,6	0,75	2,34	26,53	3,8	3,45	0,01	13,94
4	Отсутствует	5,75	0,66	2,52	23,3	3,79	3,36	0,017	16,08
4	Эксперименталь ный	5,92	0,82	2,91	24,91	4,08	4,81	0,008	18,54
5	Отсутствует	6,87	0,72	2,8	25,64	4,18	4,31	0,017	18,88
5	Эксперименталь ный	6,12	1,01	3,06	29,88	4,5	4,58	0,012	19,27
5	Промышленный	7,56	1	3,12	21,74	4,35	4,21	0,013	20,24

2-Me-Pr: 2-метил-пропаналь;

2-Me-Bu: 2-метил-бутаналь;

3-Me-Bu: 3-метил-бутаналь;

PheAcal: фенил-ацетальдегид;

T2N: транс-2-ноненаль;

St. al.: суммарные альдегиды Штреккера.

Концентрации представлены в мг/л.

Таблица 8

Пиво, которое хранили в течение 2 недель при 37°C

День в ящике для проращива- ния	Обжиг	2-Ме- Pr	2- Ме- Bu	3-Ме- Bu	Фурфу- раль	Мет иона ль	Phe Acal	T2N
1	Отсутствует	1,71	0,61	1,66	111,95	3	2,5	0,038
1	Экспериментальный	2,45	0,81	2,04	80,21	3,1	2,81	0,018
2	Отсутствует	3,31	0,46	3,31	91,94	3,83	4,05	0,037
2	Экспериментальный	4,23	0,82	4,23	115,89	3,9	4,18	0,017
3	Отсутствует	10,07	0,67	10,07	109,4	4,31	5,32	0,033
3	Экспериментальный	10,11	0,93	10,11	128,36	4,44	5,29	0,017
4	Отсутствует	14,61	0,73	14,61	81,65	4,49	5,03	0,025
4	Экспериментальный	20,52	1,18	20,52	119,94	5,33	7,96	0,012
5	Отсутствует	23,88	1,09	23,88	102,96	5,27	6,74	0,024
5	Экспериментальный	16,06	1,05	16,06	123,37	5,45	8,24	0,015
5	Промышленный	21,04	1,12	21,04	105,95	4,9	7,82	0,014

2-Ме-Pr: 2-метил-пропаналь;

2-Ме-Bu: 2-метил-бутаналь;

3-Ме-Bu: 3-метил-бутаналь;

PheAcal: фенил-ацетальдегид;

T2N: транс-2-ноненаль.

Концентрации представлены в мг/л.

В целом приведенные выше данные неожиданно показывают, что на характеристики суслу и свежего или хранящегося пива, полученного способами в соответствии с настоящим изобретением, существенно не влияет отсутствие стадии сушки в печи.

Ссылки

D.E. Briggs, *Malts and Malting*; p695 First Edition, 1998 Published by Blackie & Professionals, London, ISBN0 412 29800.

Chandler et al., *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 6, pp. 1603–1613, 2013, doi:10.1093/jxb/ert022.

Fincher GB (2011) Biochemistry, Physiology and Genetics of Endosperm Mobilization in Germinated Barley Grain. In: *Barley: Production, Improvements and Uses*. Ed. Ullrich SE, Wiley-Blackwell, Chapter 14, pp 449-477.

Groenqvist, A. et al., "Carbonyl compounds during beer production in beer." *Proceedings of the 24th EBC Congress*, Oslo, pp. 421-428 (1993).

Hough, J.S. et al. "Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer." Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165902, 1982.

Hu G, Burton C, Hong Z and Jackson E (2014). A mutation of the cellulose-synthase-like (CslF6) gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) partially affects the b-glucan content in grains. *Journal of Cereal Science* 59, 189-195.

Wolfgang Kunze, *Technology Brewing and Malting*, Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei, 2014 ISBN 3921690773, 9783921690772.

Smith AM, Zeeman S.C, Smith SM (2005) Starch Degradation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 73-98.

Taketa S, Yuo T, Tonooka T, Tsumuraya Y, Inagaki Y, Haruyama N, Larroque O and Jobling SA (2012). Functional characterization of barley betaglucanless mutants demonstrates a unique role for CslF6 in (1,3;1,4)-β-D-glucan biosynthesis. *J Exp Bot.* 63(1):381-92.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения напитка, при этом указанный способ предусматривает стадии
 - i) получения водного экстракта способом, предусматривающим стадии
 - a) обеспечения зерен зерновой культуры;
 - b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона времени от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен, при котором стадия проращивания включает стадию замачивания, включающую инкубирование во влажных условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 12 ч с последующим инкубированием в сухих условиях, при этом продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания, при этом инициация проращивания относится к моменту времени, когда зерна зерновой культуры с содержанием воды менее 15% вводят в контакт с достаточным количеством воды для инициации проращивания;
 - c) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и
 - d) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна, при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d), при этом способ не предусматривает стадию сушки в печи пророщенных зерен, с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры; и
 - ii) переработки указанного водного экстракта в напиток.
2. Способ по п.1, при котором стадия b) проращивания включает стадию замачивания, включающую инкубирование во влажных условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 12 ч с последующим инкубированием в сухих условиях и повторение инкубирования во влажных и/или сухих условиях.
3. Способ по любому из предшествующих пунктов, при котором стадия ii) включает в себя стадии
 - e) нагревания указанного водного экстракта;
 - f) охлаждения водного экстракта;
 - g) сбраживания указанного водного экстракта с дрожжами, с получением тем самым ферментированного напитка.
4. Способ по п.3, при котором стадию e) осуществляют в присутствии хмеля или экстракта хмеля.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором напиток представляет собой пиво.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором напиток представляет собой светлое пиво, например, выбранное из группы, состоящей из пива лагер, Pale ale и пшеничного пива.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадия проращивания не превышает 96 ч.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором стадию проращивания выполняют на протяжении диапазона времени от 72 до 108 ч, например на протяжении приблизительно 96 ч.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, например не менее 25%, например не менее 30%, предпочтительно не менее 35%, еще более предпочтительно не менее 40%, еще более предпочтительно не менее 45%, на момент мелкого измельчения указанных зерен зерновой культуры.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерна, обеспеченные на стадии a), обрабатывают противомикробным средством.
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором пророщенные зерна содержат максимум 10 г, например максимум 8 г, например максимум 6 г, предпочтительно максимум 4 г, проростков (в пересчете на сухое вещество) на 100 г пророщенных зерен зерновой культуры (в пересчете на сухое вещество).
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой зерновую культуру с оболочкой, например ячмень с оболочкой.
13. Способ по п.12, при этом способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной оболочки перед инициацией проращивания.
14. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой голозерную зерновую культуру, например пшеницу или голозерный ячмень.
15. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором зерновая культура представляет собой ячмень, характеризующийся низким содержанием β -глюкана в зернах.
16. Способ по п.15, при котором содержание β -глюкана в зернах составляет максимум 5%, например находится в диапазоне от 1 до 5% мас./мас., в пересчете на сухую массу.
17. Способ по любому из пп.15, 16, при котором ячмень характеризуется тем, что несет мутацию в гене, кодирующем CslF6.
18. Способ получения водного экстракта зерновой культуры, при этом указанный способ предусматривает стадии
 - a) обеспечения зерен зерновой культуры;
 - b) воздействия на зерна зерновой культуры стадии проращивания на протяжении диапазона време-

ни от 48 до 108 ч с получением тем самым пророщенных зерен, при котором стадия проращивания включает стадию замачивания, включающую инкубирование во влажных условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 12 ч с последующим инкубированием в сухих условиях, при этом продолжительность проращивания измеряют от инициации проращивания, при этом инициация проращивания относится к моменту времени, когда зерна зерновой культуры с содержанием воды менее 15% вводят в контакт с достаточным количеством воды для инициации проращивания;

с) мелкого измельчения пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%; и

d) получения водного экстракта указанного мелко измельченного пророщенного зерна,

при условии, что указанные зерна зерновой культуры характеризуются содержанием воды не ниже 20% в любой момент времени между стадиями b) и d),

при этом способ не предусматривает стадию сушки в печи пророщенных зерен,

с получением тем самым водного экстракта зерновой культуры.

19. Способ по п.18, при котором стадия b) проращивания включает стадию замачивания, включающую инкубирование во влажных условиях на протяжении диапазона времени от 30 мин до 12 ч с последующим инкубированием в сухих условиях и повторение инкубирования во влажных и/или сухих условиях.

20. Способ по любому из пп.18, 19, при котором стадии a), b), c) и/или d) определяются в любом из пп.1-17.

21. Способ по любому из пп.18-20, при котором зерна, обеспечиваемые на стадии a), и/или пророщенные зерна зерновой культуры, и/или зерновая культура, и/или водный экстракт зерновой культуры определяются в любом из пп.1-17.

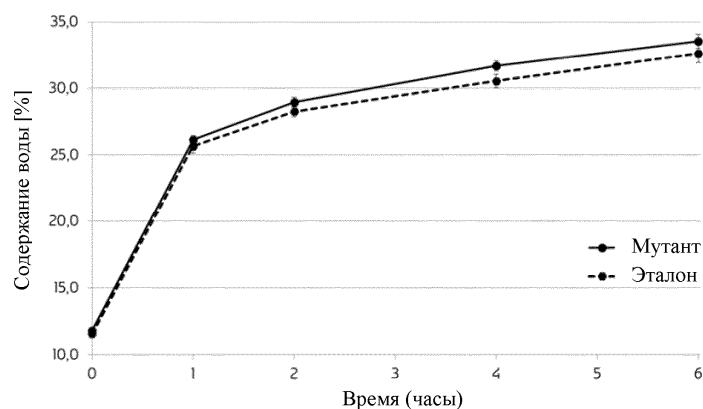
22. Способ по любому из пп.18-21, при котором зерновая культура представляет собой зерновую культуру с оболочкой, например ячмень с оболочкой.

23. Способ по п.22, при этом способ включает в себя стадию удаления по меньшей мере части оболочки перед инициацией проращивания.

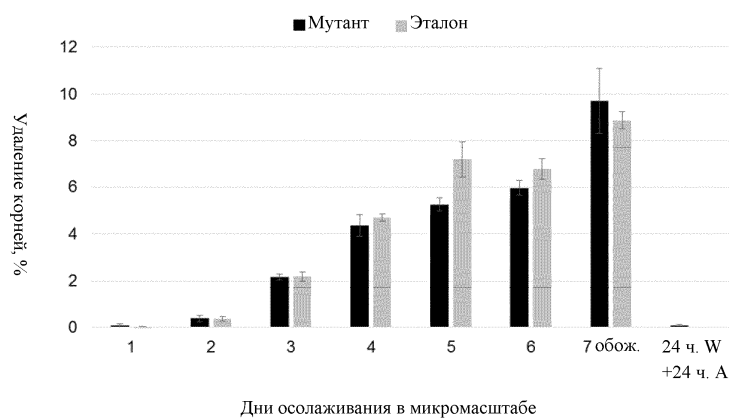
24. Способ по любому из пп.21-23, при котором зерна, обеспеченные на стадии a), обрабатывают противомикробным средством.

День 0	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 7
Сухой ячмень	Начало осоловления						
Содержание воды 12%	Целевое содержание воды 35%	Целевое содержание воды 40%	Целевое содержание воды 45%	Целевое содержание воды 45%	Целевое содержание воды 45%	Целевое содержание воды 45%	Целевое содержание воды 45%
	Замачивание ~ 7 ч	Замачивание ~ 4 ч	Замачивание ~ 2 ч	Уравновешивание содержания воды Проращивание ~24 ч	Уравновешивание содержания воды Проращивание ~24 ч	Уравновешивание содержания воды Проращивание ~24 ч	Перенос в печь
	Проращивание ~17 ч	Проращивание ~20 ч	Проращивание ~22 ч				

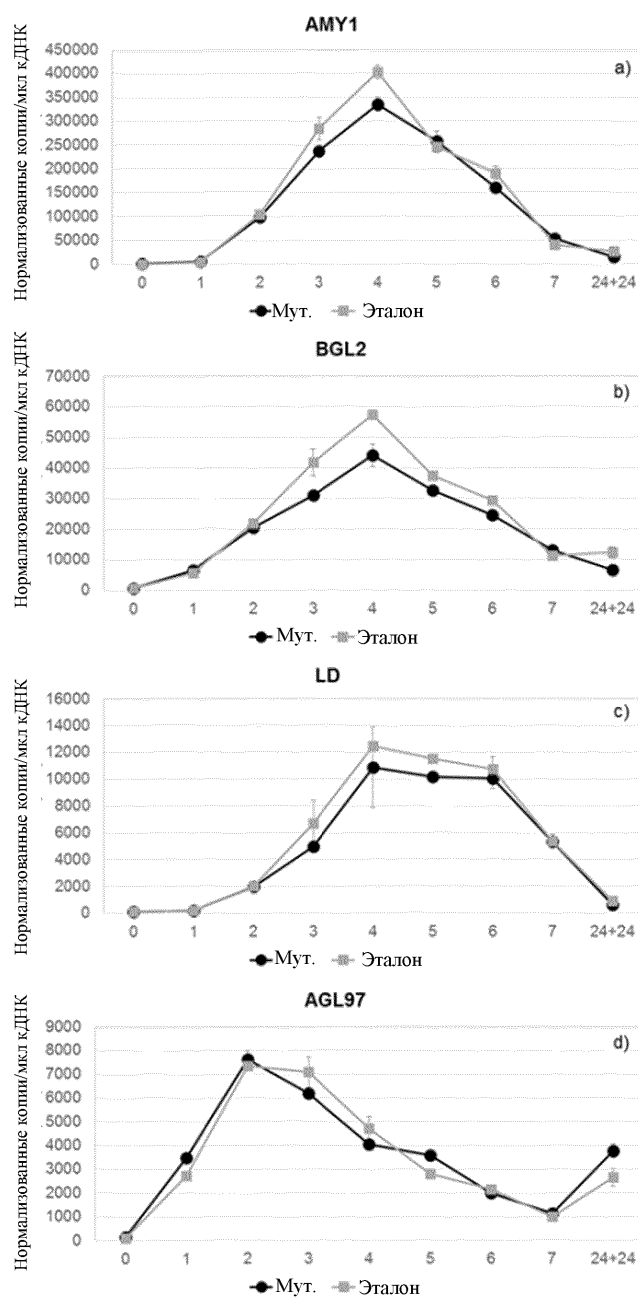
Фиг. 1



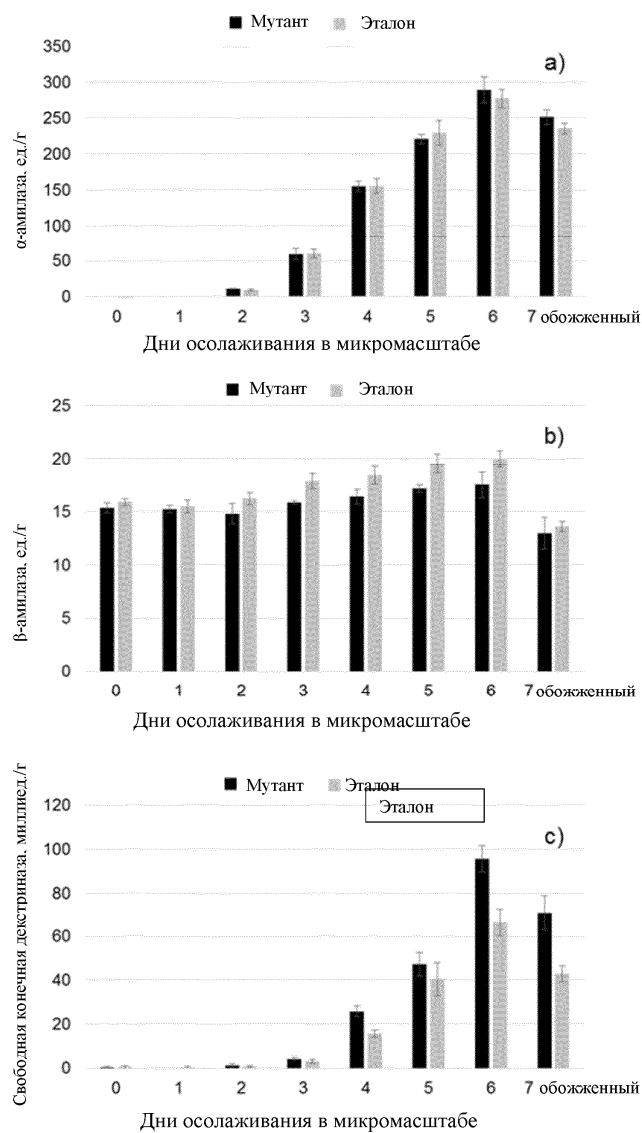
Фиг. 2



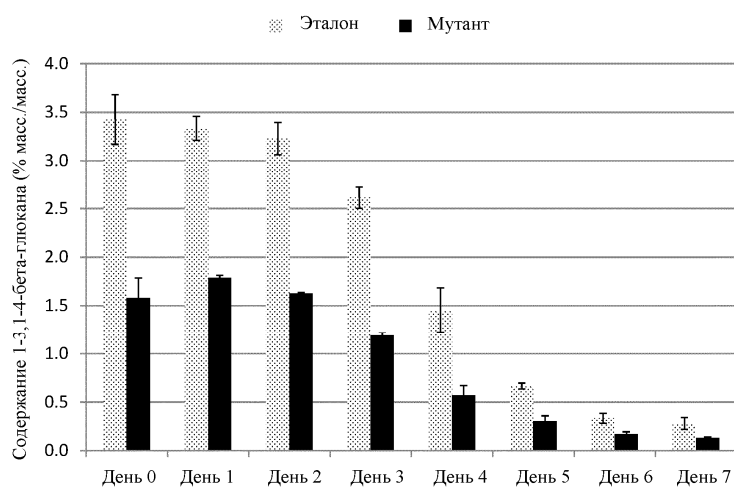
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

