

Bebidas refinadas en base a cereales

Área técnica de la invención

La presente invención se relaciona, en general, con la germinación y preparación de extractos acuosos de cereales (p. ej. preparados mediante maceración), incluyendo los procesos usados para producir cerveza. La invención provee de este modo un proceso de bajos requerimientos, rápido y continuo para preparar cerveza a partir de grano de cebada. Los métodos pueden llevarse a cabo en una única instalación industrial. La presente invención se puede aplicar de la misma manera a la germinación y preparación de extractos acuosos de otros granos de cereal –incluyendo arroz, sorgo, maíz, mijo y trigo– así como a procesos de preparación que comprenden adjuntos.

Antecedentes de la invención

En los procesos de malteado comerciales, los granos de cebada se hacen germinar, o maltean, bajo condiciones controladas que permiten la movilización parcial de las reservas de almidón y proteínas del endosperma almidonoso durante un período de 4-6 d. El proceso de malteado se inicia típicamente sumergiendo el grano de cebada seco en agua. Este proceso se conoce como remojado en donde el objetivo no es sólo limpiar el grano, sino también elevar el contenido de humedad a aproximadamente 40% (p/p) de modo que la etapa que sigue de movilización del endosperma ocurra más rápidamente. Durante el remojado, se drena el agua una vez para permitir la re-aireación del grano. Esta etapa se conoce con el nombre de “descanso en aire” y se lo considera necesario, principalmente porque el grano sumergido agota su oxígeno luego de aproximadamente 16 h. Luego de un “descanso en aire” de aproximadamente 8 h el grano es re-sumergido en agua para completar el tratamiento de remojado por otro período de 8 h –o en una serie de etapas de re-remojado. El proceso de remojado en dos pasos para incrementar al 40% o más el contenido de humedad del grano seco toma aproximadamente 32 h en total. En algunas malterías, se utilizan técnicas de remojado por rociado.

El grano remojado es esparcido para su germinación, durante la cual las enzimas secretadas por la aleurona y las células epiteliales del escudete –junto con algunas pre-existentes en las células almidonosas del endosperma– degradan las

paredes celulares, el almidón y la proteína. Bajo condiciones normales de germinación, se cree que la fitohormona ácido giberélico (GA, por sus siglas en inglés) es sintetizada en la región nodal, u otra parte del embrión, desde donde difunde a través del gradiente acuoso (Fincher, 2011).

- 5 El maltero normalmente busca inducir rápidamente la síntesis de tantas enzimas degradadoras de almidón en el grano como sea posible. En muchos programas de malteado comercial, se agrega GA para acelerar el proceso de secreción de enzimas desde la capa de aleurona. Las enzimas degradadoras de almidón –las cuales incluyen α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras del almidón y
- 10 α -glucosidasas– despolimerizan parcialmente las reservas de almidón del grano a monosacáridos, oligosacáridos, y glucosa (Smith et al., 2005; respecto a dichas β -amilasas, es de destacar que éstas se depositan en el endosperma almidonoso durante el desarrollo del grano). Los productos de despolimerización del almidón son luego usados por células de levadura como fuente de carbono y son fermentados al
- 15 etanol de la cerveza. El poder diastático es un parámetro de calidad del malteado que se refiere a los niveles de actividad de la batería de enzimas degradadoras de almidón, siendo deseables valores elevados para la preparación de cerveza.

- Otros componentes principales del grano de cebada incluyen las proteínas de almacenamiento, las cuales también se encuentran en las células
- 20 almidonosas muertas del endosperma e incluyen a las hordeínas, así como también proteínas solubles en agua y en sal. La despolimerización de éstas también comienza de modo natural en el proceso de malteado, pero el cervecero puede manejar el grado de degradación de estas proteínas de modo tal que se liberen suficientes péptidos y aminoácidos para sostener el crecimiento de las levaduras durante la etapa de
- 25 germinación subsiguiente en la cervecería. Sin embargo, si la degradación de proteínas de almacenamiento continúa demasiado, las proteínas liberadas pueden causar dificultades en el proceso de preparación de la cerveza. En particular, altos niveles de proteína soluble liberada pueden precipitar y formar una turbidez indeseada en el producto final de cerveza o incrementar el potencial para la formación de
- 30 aldehído de Strecker durante el almacenamiento de la cerveza. En las especificaciones de calidad del malteado, es deseable un nivel adecuado de nitrógeno amino libre (FAN, por sus siglas en inglés) para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación. El índice de Kolbach es una medida de la relación proteína

soluble:total, prefiriéndose generalmente la malta que da un índice de Kolbach adecuado. El grado de degradación de proteínas es por lo tanto un desafío permanente para el maltero. Además del problema de la precipitación de la cerveza que puede estar asociado con un exceso de proteínas extraídas, los niveles de FAN
 5 muy elevados también pueden llevar a dificultades, a través de la potencial formación de sabor desagradable.

Los malteros también tratan de inducir altos niveles de enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular en el grano de cebada, en particular los (1,3;1,4)- β -glucanos y arabinosilanos. Los (1,3;1,4)- β -glucanos degradados de manera
 10 incompleta pueden ser especialmente problemáticos para los cerveceros, debido a que estos pueden extraerse de la malta en formas solubles que forman soluciones acuosas muy viscosas que enlentecen los procesos de filtración en la cervecería y contribuyen a una turbidez indeseable en la cerveza terminada. Así, bajos niveles de (1,3;1,4)- β -glucano soluble representan un importante parámetro de calidad del
 15 malteado, mientras que altos niveles de enzimas (1,3;1,4)- β -glucanasa continúan siendo medidas importantes de la calidad de la malta.

Como ya se señaló, el proceso de malteado toma típicamente aproximadamente 4 a 5 d. Luego de los pasos de germinación controlada, la malta mojada se seca desde aproximadamente un contenido de humedad de 40% hasta 4-
 20 5%. Este proceso de secado de la malta, denominado secado en horno (*kilning*) consume mucha energía y representa un costo principal para la industria.

El secado en horno ha sido considerado una parte importante de la producción de cerveza por muchas razones. Una razón importante es que durante la germinación se forman las radículas (*culms*). Las radículas tienen un sabor amargo, lo que afecta el de la cerveza y, además, las radículas pueden agregar un color indeseable a la cerveza (ver Beer Brewing Technology (1999): 183, publicado por Shokuhin Sangyo Shimbun así como US 9.326.542). Una vez que la malta verde ha sido secada, las radículas pueden ser fácilmente removidas p. ej. usando una desbrotadora. De acuerdo con el libro de texto general sobre "Malts y Malting" de D.E.
 25 Briggs luego "las radículas deben ser removidas [...] ya que son extremadamente higroscópicas, ricas en sustancias nitrogenadas solubles, contienen sustancias de mal sabor y amargas y pueden ser ricas en dióxido de azufre y/o nitrosaminas. El desbrote debe llevarse a cabo enseguida después de que la malta es sacada del
 30

horno de secado para ayudar en el enfriamiento y antes de que las radículas absorban humedad del aire, se tornen flojas y flexibles (menos quebradizas) y por lo tanto, más difíciles de romper y separar” (D.E. Briggs, *Malts y Malting*; p695, Primera Edición, 1998 Publicado por Blackie & Professionals, Londres, ISBN0 412 29800).

- 5 La malta secada en horno generalmente tiene un nivel de humedad de 4,5-5,0%. La malta secada en horno es subsiguientemente transportada desde la maltería a la cervecería por carretera, tren o mar. Esto se relaciona con el hecho de que los procesos de malteado y de preparación de la cerveza se han realizado tradicionalmente en distintos sitios y a menudo por diferentes corporaciones.
- 10 En la cervecería, la malta secada en horno es molida para abrir el grano, y el contenido resultante se extrae con agua caliente en un proceso conocido como maceración. El material extraído incluye almidón, proteínas y moléculas de la pared celular parcialmente degradados como ya se describió, y estos son degradados adicionalmente por enzimas endógenas del grano que se extrajeron de la malta. En
15 este punto, algunos cerveceros agregan fuentes de carbono adicionales –y generalmente baratas (adjuntos)- para estimular el subsiguiente proceso de fermentación de la levadura y para compensar el alto costo de la malta. Dichos adjuntos pueden ser cebada, arroz, trigo u otras harinas de cereales obtenidas de granos sin germinar, pero su agregado puede requerir el agregado concomitante de
20 enzimas hidrolíticas, ya que las enzimas endógenas de la malta son insuficientes para degradar los componentes del adjunto. Las enzimas agregadas usualmente provienen de extractos sin purificar y relativamente baratos de cultivos fúngicos y/o bacterianos. El agregado de enzimas exógenas no es legal en algunos países, en particular en donde la cerveza debe ser producida bajo condiciones estrictamente reguladas.
- 25 La degradación ulterior del almidón y otros componentes del endosperma extraídos en el agua caliente continúa en un proceso conocido como sacarificación. Luego de la maceración, los extractos se filtran, a menudo en una cubeta de filtración, y son enfriados. El extracto puede ser hervido en presencia de lúpulo o extracto de lúpulo, y luego de que se enfría se agregan cultivos de levaduras para la fermentación
30 de los azúcares liberados a etanol. La cerveza así producida usualmente se hace madurar y se la filtra antes de embotellarla. La cerveza puede también ser carbonatada antes de embotellarla.

Breve descripción de la invención

La presente invención provee métodos para la rápida germinación y preparación de extractos acuosos de cereales. Los métodos aceleran significativamente el proceso de preparación de mosto para la producción de bebidas en base a cereales, mientras que mantienen el potencial para preparar dicho mosto con altos niveles de azúcares fermentables, preferiblemente con bajos niveles de β -glucano y xilano. En particular, las bebidas preparadas a partir de dicho mosto pueden estar caracterizadas por un nivel bajo de sabor astringente.

La invención demuestra que un proceso de preparación de cerveza continuo e integrado a partir de grano de cebada seco puede llevarse a cabo en un único sitio. Al respecto, la presente invención provee métodos para el remojado y germinación combinados del grano de cereal hasta un contenido de humedad por ejemplo >30%, preferiblemente >35% a través de la aireación constante. La invención puede por lo tanto permitir ahorros significativos de agua mediante la eliminación del secado de la malta así como ahorros significativos de energía, p. ej. por omisión de la etapa de secado en horno.

En la presente invención, los granos se sumergen e incuban en una solución acuosa (típicamente agua), en donde se provee O_2 a dicho líquido. Típicamente, dicho O_2 se provee de forma continua durante la incubación, la que por ejemplo puede estar en el rango de 20 a 72 h y en general permite que el grano no sólo alcance el contenido de humedad apropiado sino también que germine de un modo controlado. La etapa de germinación también puede comprender uno o más descansos en aire, típicamente siguiendo a la etapa de incubación en una solución acuosa bajo aireación. Este proceso de germinación controlada puede acortarse mediante el agregado de uno o más compuestos capaces de acelerar la germinación. Por ejemplo, puede agregarse la fitohormona ácido giberélico (GA) al líquido acuoso – ya sea desde el principio o durante la incubación. El GA ‘activa’ la expresión génica en sus células diana, las cuales son la aleurona y el epitelio del escudete del grano de cebada, incluyendo los genes que codifican para las enzimas endógenas necesarias para la hidrólisis del almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular. De este modo, el tiempo total requerido para el remojado y germinación puede

reducirse de desde más de 5 d en procesos de preparación de cerveza convencionales a 2 d o incluso menos usando la presente invención.

A continuación de los procesos de remojado y germinación combinados, los métodos de la presente invención comprenden una etapa de dividir finamente los
5 granos de cereal germinados. Un aspecto particularmente interesante de la invención es que los métodos de la invención permiten pasar a la división fina de los granos de cereal germinado inmediatamente luego de la germinación. De manera acorde, los métodos en general no comprenden una etapa de secado en horno de los granos de cereal germinados. Como se describió antes, un aspecto importante del secado en
10 horno es permitir la remoción sencilla de las radículas. Antes del secado, la remoción de las radículas es difícil de conseguir. Sin embargo, los granos de cereal preparados de acuerdo con los métodos de la presente invención tienen radículas significativamente reducidas (típicamente menos de 4 g por cada 100 g de cebada germinada (peso seco)), y como lo muestra la presente invención, no se requiere la
15 etapa de secado en horno para el cereal germinado de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Los granos de cereal germinados pueden por ejemplo dividirse finamente sometiendo los granos de cereal germinado a molienda húmeda, seguido de una etapa de preparar un extracto acuoso, por ejemplo, remojando a una temperatura
20 predeterminada durante cualquier período de tiempo adecuado tal como se describe a continuación en la presente en la sección “Preparación de un extracto acuoso”. La conversión de los azúcares liberados, p. ej. polisacáridos, y proteínas puede facilitarse durante el remojado mediante el agregado de mezclas de enzimas exógenas que catalizan la degradación del almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de
25 la pared celular. Las enzimas pueden purificarse de modo parcial a partir de la cebada misma, a partir de malta u otras fuentes –o, alternativamente, a partir de mezclas de enzimas fúngicas y/o bacterianas que pueden adquirirse de fuentes comerciales.

Más allá de los beneficios ya descriptos, la presente invención no sólo elimina la necesidad de secado en horno de la malta, sino que también elimina la
30 necesidad de transportar el grano secado desde la maltería a la cervecería. Mediante esta invención de remojado y germinación combinados pueden alcanzarse ahorros en costo de energía de hasta el 50%, lo que puede reducir en gran medida la huella de carbono de la industria. Esto es importante debido a la presión legislativa y fiscal

crecientes a nivel mundial en la mayoría de los países con el fin de reducir la huella de carbono de las industrias del malteado y cervecera.

Aún en el contexto de la sostenibilidad, la presente invención permite que la producción completa de cerveza se lleve a cabo en equipos de cervecería ya
5 existentes, de modo que se requiere poco gasto adicional de capital.

La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra un ejemplo del equipo útil para llevar a cabo el
10 método de la invención en el cual los granos pueden ser sumergidos en una solución acuosa y ser aireados continuamente. El equipo comprende una entrada para los granos de cereal (1), un tanque, p. ej. un tanque de remojo (2); entradas para gas, p. ej. piedras sinterizadas (3); una bomba p. ej. una bomba de aire (4); una salida para los granos de cereal (5); una bomba para los granos (6); un equipo para dividir
15 finamente los granos de cereal p. ej. un molino (7); una entrada (8); una cuba, p. ej. una cuba de maceración (9), y; una salida (10).

La **Figura 2** muestra granos de cebada sin cascarilla luego de la incubación en agua a 15°C o 25°C durante ya sea 24 h o 48 h bajo el flujo de aire indicado. En **A** se muestran grupos de granos, mientras que **B** muestra granos
20 individuales representativos. Es notorio que ya luego de 24 h a 15°C los granos hayan iniciado la germinación, con un brote de crecimiento embrionario –“*chit*”- visible incluso con un flujo de aire de sólo 30 l/h, y varias radículas pequeñas fueron visibles luego de 48 h. Luego de 24 h a 25°C, los granos habían iniciado la germinación y contenían un brote de crecimiento embrionario visible, incluso con un flujo de aire de sólo 30 l/h.
25 Con un flujo de aire mayor, o luego de 48 h varias radículas pequeñas fueron visibles.

La **Figura 3** muestra granos de cebada con cascarilla luego de la incubación en agua a 15°C o 25°C durante ya sea 24 h o 48 h bajo el flujo de aire indicado. **A** muestra grupos de granos, mientras que **B** muestra granos individuales representativos.

La **Figura 4** muestra diagramas relacionados con la actividad α -amilasa (panel **A**), β -amilasa (panel **B**) y dextrinasa limitante (panel **C**) en granos germinados en presencia de distintas cantidades de GA en agua bajo aireación.

La **Figura 5** muestra un ejemplo de proceso de maceración con granos remojados, germinados y molidos en húmedo.

La **Figura 6** muestra un diagrama de filtrabilidad de mosto, el cual fue preparado a partir de granos germinados bajo aireación variable en presencia o ausencia de la mezcla de enzimas para preparación de cerveza Ultraflo Max (UFM).

La **Figura 7** muestra un diagrama del nivel de azúcares fermentables en mosto preparado a partir de granos germinados durante 48 h a 25°C bajo condiciones de aireación variable. Las muestras suplementadas con la mezcla de enzimas para preparación de cerveza Ultraflo Max (UFM) están marcadas.

La **Figura 8** muestra un ejemplo de equipo útil para llevar a cabo las etapas de la invención en las cuales los granos pueden sumergirse en una solución acuosa y ser aireados de modo continuo. El equipo comprende: una entrada para los granos de cereal (1); un tanque, p. ej. un tanque FlexTank (2); una rejilla o malla, p. ej. una malla meta (3); entradas para gas, p. ej. piedras sinterizadas (4) y; una bomba, p. ej. una bomba de aire (5).

La **Figura 10** muestra la α -amilasa en 8 variedades de cebada luego de la germinación bajo aireación (1 – Alexis, 2 – Chief, 3 – Chill, 4 – Paustian, 5 – Planet, 6 – Prestige, 7 – Quench, 8 – Tipple)

La **Figura 11** muestra la actividad de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante en cebada con cascarilla pelada para remover la cascarilla y luego germinada bajo aireación.

La **Figura 12** muestra la actividad de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante en cebada germinada en solución acuosa bajo aireación (WA) con o sin descanso/s en aire (A) durante los tiempos indicados en la cebada sin cascarilla 01 (Fig. 11A) y en la cebada con cascarilla 02 (Fig. 11B).

La **Figura 13** muestra la pérdida de peso % luego de la remoción de las radículas tanto en cebada con cascarilla y sin cascarilla germinada por incubación en

solución acuosa bajo aireación por 48 h (48hWA) y cebada germinada en condiciones de remojo estándar por 96 h (Malteado 96hs).

La **Figura 14** muestra el contenido de NDMA en cebada sin germinar, en cebada germinada mediante los métodos de la invención (Malta 1a), y en 3 maltas convencionales diferentes (Malta 1b, Malta 2 y Malta 3).

Definiciones

La expresión “aproximadamente” cuando se la usa en la presente en relación a valores numéricos preferiblemente significa $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$.

La expresión “adjunto” tal como se usa en la presente se refiere a fuentes de material crudo rico en carbono agregadas durante la preparación de la cerveza. El adjunto puede ser un grano de cereal sin germinar, el cual puede molerse junto con los granos germinados preparados de acuerdo con la invención. El adjunto también puede ser un jarabe, azúcar o lo similar.

La expresión “*chit*” tal como se usa en la presente se refiere al brote de crecimiento embrionario que es visible durante la fase de germinación de un grano de cereal.

La expresión “contenido de agua” de un grano como se usa en la presente se refiere al % de agua p/p en dicho grano.

La expresión “grano germinado” tal como se usa en la presente se refiere a granos que desarrollaron un brote de crecimiento embrionario visible, preferiblemente un brote de crecimiento embrionario de al menos 1 mm, tal como al menos 2 mm.

La expresión “ β -glucano” tal como se usa en la presente, a menos que se especifique de otro modo, se refiere al polímero de pared celular de cereal “(1,3;1,4)- β -glucano”.

De modo similar, la expresión “xilano” tal como se usa en la presente, a menos que se especifique de otro modo, se refiere al polímero de pared celular de cereal “arabinoxilano”.

5 La expresión “malta secada en horno” tal como se usa en la presente se refiere a granos de cereal germinado, los cuales fueron secados mediante secado en horno.

La expresión “grano brotado” tal como se usa en la presente se refiere a un grano que ha desarrollado un brote de crecimiento embrionario y un tallo visibles.

10 La expresión “remojado” tal como se usa en la presente se refiere al proceso de incrementar el contenido de agua en un grano de cereal.

La expresión “ β -glucanasa” tal como se usa en la presente se refiere a enzimas con el potencial de despolimerizar el β -glucano del cereal. De manera acorde, a menos que se especifique de otro modo, la expresión “ β -glucanasa” se refiere a una endo- o exo-enzima o mezcla de las mismas caracterizada por su actividad (1,3;1,4)- β -y/o (1,4)- β -glucanasa.

15

La expresión “xilanasas” tal como se usa en la presente se refiere a enzimas con el potencial de degradar la cadena principal y las cadenas laterales del xilano y arabinoxilano. De manera acorde, a menos que se especifique de otro modo, la expresión “xilanasas” se refiere a una enzima o una mezcla de enzimas caracterizada por actividades enzimáticas derivadas de una o más de las siguientes clases de enzimas: endo-1,4-xilanasas; exo-1,4-xilanasas; arabinofuranosidasas; feruloil estearasa.

20

Las actividades enzimáticas de los granos de cereal tal como se usa en la presente se refieren a las actividades medidas en harina preparada a partir del tipo de grano especificado. Por ejemplo, 10 U/g de actividad α -amilasa por gramo de grano de cereal se refiere a dicha actividad α -amilasa (10 U) medida en un extracto acuoso derivado de 1 g de harina (peso seco) de dicho cereal. La actividad α -amilasa se determina mediante K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad β -amilasa se determina mediante el K-BETA3 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad dextrinasa limitante se determina mediante el T-LDZ1000 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda).

25

30

El volumen de un gas tal como se lo indica en la presente se refiere al volumen de dicho gas a 1 atm y 20°C.

- El volumen de O₂ tal como se lo indica en la presente se refiere al volumen de O₂ a 1 atm y 20°C. En formas de realización de la invención en las que el
- 5 O₂ está comprendido en una mezcla de gases, entonces puede determinarse el volumen total de la mezcla de gas, y el volumen de O₂ puede calcularse como el porcentaje del volumen total constituido por O₂. A modo de ejemplo el aire atmosférico comprende 21% de O₂. Así, el volumen de O₂ en el aire atmosférico tal como se usa en la presente es 21% del volumen total de aire atmosférico.

10 Descripción detallada

Granos de cereal

- Los métodos de la presente invención comprenden una etapa de germinación, la cual comprende incubar los granos de cereal en una solución acuosa.
- 15 Debe señalarse que la mezcla de solución acuosa y granos de cereal puede ser considerada como una suspensión.

- El grano de cereal puede ser el grano de cualquier cereal, por ejemplo un cereal seleccionado del grupo que consiste en cebada, arroz, sorgo, maíz, mijo, triticale, centeno, avena y trigo. En formas de realización preferidas de la invención los
- 20 granos de cereal son granos de cebada. Dichos granos pueden ser de cualquier variedad de cebada, tal como cualquiera de las variedades de cebada descriptas más adelante en la presente en la sección "Cebada".

- Los granos de cereal pueden tener un contenido de agua relativamente bajo antes de la incubación en dicha solución acuosa. Por ejemplo, los granos de
- 25 cereal pueden tener un contenido de agua de 30% como máximo, preferiblemente 20% como máximo, tal como 15% como máximo, por ejemplo en el rango de 5 a 15%.

- Antes de la incubación en dicha solución acuosa, el grano de cereal puede haber sido sometido a uno o más pasos de tratamiento antimicrobiano. Dicho tratamiento antimicrobiano puede ser cualquier tratamiento antimicrobiano útil, el cual
- 30 no perjudica el potencial de germinación de los granos. El tratamiento antimicrobiano puede ser por ejemplo tratamiento con uno o más agentes antimicrobianos. Dichos

agentes antimicrobianos pueden ser cualquier agente antimicrobiano, el cual no es tóxico para los granos de cereal a las concentraciones usadas. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede ser un compuesto que contenga cloro, p. ej. hipoclorito. El agente antimicrobiano también puede ser peróxido, p. ej. peróxido de hidrógeno y/o ácido peracético. Ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos comerciales útiles incluyen P3-Hypochloran®, P3-peroxysan® o P3-oxonia active 150®. Los granos de cereal pueden ser tratados con hypochloran a una concentración en el rango de 0,1 a 10%, tal como en el rango de 0,5 a 5%, por ejemplo aproximadamente 1%, tal como 1%. Los granos de cereal pueden ser tratados con dicho hypochloran durante el rango de 15 min a 10 h tal como en el rango de 1 a 5 h por ejemplo en el rango de 2 a 4 h. Luego del tratamiento, los granos de cereal pueden ser lavados una o más veces.

En algunas formas de realización de la invención, el tratamiento antimicrobiano se lleva a cabo incubando los granos de cereal en una solución acuosa que comprende el agente antimicrobiano. Inmediatamente luego de dicha incubación, puede iniciarse la etapa de germinación, p. ej., iniciando la aireación. Así, en tales formas de realización, no se requiere cambiar la solución acuosa, puede usarse la misma solución acuosa para el tratamiento antimicrobiano y al menos durante el inicio de la siguiente etapa de germinación. Este puede ser el caso en particular en que el agente antimicrobiano es un peróxido, p. ej. peróxido de hidrógeno.

Puede ser preferible que dichos granos de cereal no hayan sido sujetos a germinación antes de la incubación en la solución acuosa de acuerdo con la invención. De manera acorde, puede preferirse que los granos de cereal no hayan sido sujetos a una etapa de pre-germinación.

Como se describió antes, el grano de cereal puede ser cualquier grano de cereal. Algunos granos de cereal comprenden una cascarilla, mientras que otros granos de cereal no tienen cascarilla. Los granos de cereal con cascarilla pueden ser tratados para remover al menos parte de la cascarilla antes de la etapa de germinación. En general, el tratamiento de remoción de la cascarilla no se requiere si se usa un grano de cereal sin cascarilla. Los cereales sin cascarilla incluyen por ejemplo variedades de cebada y trigo sin cascarilla.

Los granos de cereal con cascarilla pueden ser tratados para eliminar la cascarilla sometiendo a los granos de cereal a un tratamiento físico de remoción de la

- cascarilla. Dicho tratamiento físico puede seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en pulido, lijado, pelado y suavizado. Preferiblemente, el tratamiento físico da como resultado la pérdida de la cascarilla. La pérdida de la cascarilla puede determinarse como una pérdida del peso total. Así, el tratamiento físico conduce a una
- 5 pérdida en el rango de 1 a 4%, tal como una pérdida en el rango de 1,5 a 3,0% del peso total de los granos de cereal.

Germinación

- Los métodos de la presente invención comprenden una etapa de germinación de los granos de cereal. La etapa de germinación comprende una etapa de incubar los granos de cereal en una solución acuosa típicamente bajo aireación.
- 10

Incubación en una solución acuosa bajo aireación

- Los granos de cereal pueden ser cualquiera de los granos de cereal descriptos anteriormente en la presente en la sección "Granos de cereal", y la solución acuosa puede ser cualquiera de las soluciones acuosas descriptas más adelante en la presente en la sección "Solución acuosa".
- 15

- Puede preferirse que durante dicha incubación en solución acuosa, los granos de cereal estén completamente cubiertos por dicha solución acuosa durante toda la incubación. Así, los granos de cereal pueden por ejemplo ser incubados en al menos 1, preferiblemente al menos 1,5, más preferiblemente al menos 2, por ejemplo
- 20 en el rango de 1 a 10, tal como en el rango de 1 a 5, por ejemplo en el rango de 1,5 a 3 litros de solución acuosa por kg de grano de cereal (peso seco).

Así, en algunas formas de realización, los granos de cereal están sumergidos en la solución acuosa durante toda la incubación.

- En otras formas de realización, los granos de cereal de algún modo absorben la solución acuosa, de modo que al final de la incubación en dicha solución acuosa toda dicha solución ha sido absorbida por los granos de cereal.
- 25

En otras formas de realización, solución acuosa remanente luego de la incubación bajo aireación puede ser drenada de los granos de cereal.

En algunas formas de realización, se prefiere que luego de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acosa, la mayoría de los granos de cereal, por ejemplo al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferible al menos 95%, tal como

5 esencialmente todos, contengan un brote de crecimiento embrionario o *chit* visible de al menos 1 mm.

En algunas formas de realización, luego de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acosa, la mayoría de los granos de cereal, por ejemplo al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos

10 90%, incluso más preferible al menos 95%, tal como esencialmente todos, contienen una o más radículas visibles.

En algunas formas de realización, luego de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acosa, la mayoría de los granos de cereal, por ejemplo al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos

15 90%, incluso más preferible al menos 95%, tal como esencialmente todos, contienen una o más radículas visibles y un tallo visible.

En algunas formas de realización, luego de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acosa, los granos de cereal tienen un contenido de agua de al menos 30%, preferiblemente al menos 35%, más preferiblemente al menos

20 37%, por ejemplo en el rango de 35 a 60%, tal como en el rango de 35 a 50%, por ejemplo en el rango de 37 a 60%, tal como en el rango de 37 a 50%.

El contenido de agua de los granos de cereal puede determinarse mediante la determinación del peso de los granos de cereal, seguido del secado de dichos granos de cereal y la determinación del peso de los granos secados. Se

25 considera que la diferencia en peso de los granos de cereal húmedos y secos es agua, y el contenido de agua se provee como el peso del agua dividido por el peso total de los granos de cereal (granos de cereal húmedos). El contenido de agua provisto en % es así un %p/p.

Los granos de cereal pueden ser incubados en dicha solución acuosa

30 por un tiempo suficiente para permitir la germinación de la mayoría de dichos granos de cereal tal como se describió antes. Los granos de cereal también pueden incubarse en dicha solución acuosa por un tiempo suficiente para obtener el contenido de agua

antes mencionado. En algunas formas de realización de la invención, la etapa de germinación comprende una incubación en la solución acuosa seguida de un descanso en aire. En tales formas de realización, la incubación en solución acuosa se lleva a cabo durante un tiempo suficiente como para permitir la actividad enzimática

5 suficiente en los granos de cereal germinados luego del descanso en aire. La actividad enzimática es preferiblemente como se la describe a continuación en la presente en la sección "Granos de cereal germinados".

Típicamente, los granos de cereal se incuban en la solución acuosa por al menos 20 h tal como al menos 24 h. Típicamente, los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa por 72 h como máximo, tal como por 60 h como

10 máximo, por ejemplo 48 h como máximo. Así, en algunas formas de realización los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa durante un rango de 20 a 72 h tal como en el rango de 20 a 60 h por ejemplo en el rango de 20 a 48 h por ejemplo en el rango de 20 a 30 h tal como en el rango de 22 a 26 h.

En algunas formas de realización los granos de cereal se incuban en solución acuosa bajo aireación durante un rango de 24 a 60 h preferiblemente durante un rango de 40 a 55 h más preferible durante el rango de 45 a 50 h. Este puede ser en particular el caso en las formas de realización de la invención, en las cuales la germinación no comprende una etapa de descanso en aire, por ejemplo en formas de

15 realización en donde los granos de cereal son finamente divididos esencialmente inmediatamente luego de la incubación en la solución acuosa.

En algunas formas de realización los granos de cereal se incuban en la solución acuosa bajo aireación durante el rango de 24 a 70 h, preferiblemente durante el rango de 40 a 60 h, más preferiblemente durante el rango de 45 a 55 h.

20 Este puede ser en particular el caso en las formas de realización de la invención, en las cuales la germinación no comprende una etapa de descanso en aire, por ejemplo en formas de realización en donde los granos de cereal son finamente divididos esencialmente inmediatamente luego de la incubación en la solución acuosa.

En algunas formas de realización los granos de cereal se incuban en la solución acuosa bajo aireación durante un rango de 16 a 40 h, preferiblemente durante un rango de 16 a 30 h, más preferiblemente durante un rango de 22 a 26 h.

30

Este puede ser en particular el caso en formas de realización de la invención en las cuales la germinación comprende además una etapa de descanso en aire.

El grano de cereal puede incubarse a cualquier temperatura útil, aunque puede preferirse que la incubación se lleve a cabo a una temperatura lo suficientemente alta como para permitir un rápido incremento del contenido de agua. Tal como se muestra en la presente a continuación en el Ejemplo 1, entonces un incremento en la temperatura puede aumentar de manera significativa el incremento del contenido de agua. Así, puede preferirse que los granos de cereal sean incubados en dicha solución acuosa a una temperatura de al menos 15°C, tal como al menos 20°C, tal como al menos 25°C. En particular, los granos de cereal pueden ser incubados a en el rango de 10 a 35°C, preferiblemente en el rango de a 15 a 30°C, tal como a en el rango de 20 a 30°C, por ejemplo en el rango de 25 a 30°C.

En particular, en formas de realización de la invención en las cuales los granos de cereal son incubados a una temperatura en el rango de 20 a 30°C, dichos granos de cereal pueden ser incubados durante el rango de 20 a 48 h.

Como se describió antes en la presente, frecuentemente los granos de cereal son entonces incubados en dicha solución acuosa, mientras se hace pasar O₂ a través de la solución acuosa. Esto también se denomina como incubar dichos granos de cereal en la solución acuosa bajo aireación. Preferiblemente, el O₂ se hace pasar a través de la solución acuosa de manera continua durante toda la incubación. Dicho O₂ puede ser hecho pasar a través de la solución acuosa de cualquier manera útil, aunque frecuentemente se introduce un gas que contiene O₂ en el fondo y/o en la porción inferior del contenedor que comprende la solución acuosa con los granos de cereal. Típicamente, el gas difundirá a través de la mezcla solución acuosa/grano de cereal y dejará la mezcla solución acuosa/grano de cereal por la parte superior de la solución acuosa. En particular, la incubación puede llevarse a cabo en un aparato tal como se describe más adelante en la presente en la sección "Aparatos". También es posible que gases pesados, en particular CO₂, sean retirados desde el fondo del contenedor, de modo tal que se provea aire fresco/O₂ desde la parte superior del contenedor.

Dicho O₂ puede ser agregado a dicha solución acuosa como O₂ puro. Frecuentemente, sin embargo, dicho O₂ está comprendido en una mezcla gaseosa. En

una forma de realización dicho O_2 está comprendido en aire atmosférico. Así, el método de la invención puede comprender hacer pasar aire atmosférico a través de dicha solución acuosa.

En general, al menos 2 litros, preferiblemente al menos 3 litros, más
 5 preferiblemente al menos 4 litros, aún más preferiblemente al menos 5 litros, incluso más preferiblemente al menos 6 litros de O_2 pasan a través de dicha solución acuosa por cada kg de granos de cereal por h. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el rango de 2 a 100 litros, por ejemplo en el rango de 2 a 75 litros, tal como en el rango de 2 a 50 litros, por ejemplo en el rango de 4 a 100 litros,
 10 por ejemplo en el rango de 4 a 75 litros, tal como en el rango de 4 a 50 litros, por ejemplo en el rango de 6 a 100 litros, por ejemplo en el rango de 6 a 75 litros, tal como en el rango de 6 a 50 litros de O_2 pasan a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por kg de granos de cereal (peso seco) por h.

En una forma de realización se prefiere que al menos 20 g de O_2 por
 15 kg de grano de cereal, más preferiblemente al menos 30 g de O_2 por kg de grano de cereal, aún más preferiblemente al menos 40 a 100 g de O_2 por kg de grano de cereal, tal como en el rango de 40 a 80 g de O_2 por kg de grano de cereal, por ejemplo en el rango de 60 g de O_2 por kg de grano de cereal se hacen pasar a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por h. El peso de los granos de cereal se
 20 provee como peso seco. Durante la incubación los granos de cereal típicamente absorben al menos algo de la solución acuosa y de manera acorde la concentración de O_2 en la solución acuosa típicamente variará durante la incubación. Típicamente, la cantidad de O_2 provista por litro de solución acuosa por h está en el rango de 40 a 200 g, preferiblemente en el rango de 50 a 150 g.

Tal como se señaló antes, frecuentemente lo que se pasa a través de
 25 la solución acuosa es aire atmosférico. Así, el método puede comprender hacer pasar al menos 10 litros, preferiblemente al menos 15 litros, más preferiblemente al menos 20 litros, aún más preferiblemente al menos 25 litros, incluso más preferiblemente al menos 30 litros de aire atmosférico a través de dicha solución acuosa por kg de
 30 granos de cereal por h. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el rango de 10 a 500 litros, por ejemplo en el rango de 10 a 375 litros, tal como en el rango de 10 a 250 litros, por ejemplo en el rango de 20 a 500 litros, por ejemplo en el rango de 20 a 375 litros, tal como en el rango de 20 a 250 litros, por

- ejemplo en el rango de 30 a 500 litros, por ejemplo en el rango de 30 a 375 litros, tal como en el rango de 30 a 250 litros de aire atmosférico se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por h. En una forma de realización en el rango de 50 a 110 litros, preferiblemente 80 a 100 litros de aire
- 5 atmosférico se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por h.

Descanso en aire

- Adicionalmente a dicha incubación en solución acuosa bajo aireación
- 10 los granos de cereal también pueden incubarse en aire (p. ej. en ausencia de solución acuosa). La etapa de incubación en aire también puede denominarse como “descanso en aire”. Así, luego de la incubación en solución acuosa bajo aireación, la solución acuosa remanente puede ser drenada y los granos de cereal pueden incubarse en aire. Alternativamente, luego de la incubación en solución acuosa bajo aireación, toda
- 15 la solución acuosa ha sido absorbida por los granos de cereal, el que puede entonces ser incubado en aire. Dicha incubación en aire se lleva a cabo preferiblemente bajo aireación, por ejemplo puede hacerse pasar O_2 a través del contenedor que comprende los granos de cereal. Preferiblemente, el O_2 se hace pasar a través de dicho contenedor durante todo el descanso en aire. La cantidad de O_2 que se hace pasar a
- 20 través del contenedor que comprende los granos de cereal puede ser la misma cantidad de O_2 que se hace pasar a través de la solución acuosa tal como se describió antes. El O_2 puede ser provisto en la forma de aire atmosférico.

- El descanso en aire puede llevarse a cabo por cualquier cantidad de tiempo adecuada, preferiblemente durante el rango de 18 a 50 h, más preferiblemente
- 25 durante el rango de 18 a 38 h, por ejemplo durante el rango de 22 a 35 h.

Durante el descanso en aire puede agregarse agua o solución acuosa adicional a los granos de cereal, p. ej. por irrigación o rociado. Sin embargo, durante el descanso en aire, los granos de cereal no deben estar sumergidos en solución acuosa.

30

Métodos de germinación

Los métodos de germinación también pueden comprender varias etapas de incubación en solución acuosa y/o varias etapas de descanso en aire. En general la primera etapa es una etapa de incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes. Así, la germinación puede

5 comprender o consistir de las siguientes etapas:

- Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”
- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”

10

En esta forma de realización, la incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación puede ser llevada a cabo por ejemplo durante el rango de 16 a 30 h, tal como en el rango de 20 a 30 h, por ejemplo en el rango de 22 a 26 h, mientras que el descanso en aire puede llevarse a cabo durante el rango de 18 a 38 h, por ejemplo en el rango de 22 a 35 h.

15

La germinación también puede comprender o consistir en las siguientes etapas:

- Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”
- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”
- Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”

20

25

La germinación también puede comprender o consistir en las siguientes etapas:

- Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”

30

- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”
- Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”
- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”

La germinación también puede comprender o consistir en las siguientes etapas:

- 10 • Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”
- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”
- 15 • Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”
- Incubación de los granos de cereal en aire tal como se describió antes en la sección “Descanso en aire”
- 20 • Incubación de los granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación tal como se describió antes en la sección “Incubación en una solución acuosa bajo aireación”

- El tiempo de cada incubación puede variar, aunque típicamente toda la etapa de germinación, es decir el tiempo total para todas las incubaciones en solución acuosa y descanso en aire no excede las 72 h, más preferiblemente no excede las 60 h, incluso más preferiblemente no excede las 54 h. Así, puede preferirse que la etapa de germinación completa se lleve a cabo durante el rango de 20 a 72 h, tal como durante el rango de 24 a 60 h, por ejemplo durante el rango de 24 a 48 h. De manera acorde, si la germinación comprende varias etapas de incubación en solución acuosa y/o descanso en aire, entonces cada etapa de incubación es en general más corta.

Se prefiere que todas las etapas de la germinación sean llevadas a cabo dentro del mismo contenedor. Dicho contenedor en particular puede ser un

tanque, tal como cualquiera de los tanques descriptos a continuación en la presente en la sección "Aparatos".

En algunas formas de realización pueden agregarse una o más enzimas exógenas. Por ejemplo, pueden agregarse una o más enzimas exógenas durante la etapa de germinación p. ej. como se describe en WO2016/071463.

Los granos de cereal preferiblemente son divididos finamente esencialmente inmediatamente luego de la germinación. De manera acorde, los métodos de la invención preferiblemente no comprenden una etapa de secado entre la etapa de germinación y la división fina de los granos de cereal.

10

Granos de cereal germinados

La invención se relaciona con un método que comprende una etapa de producir granos de cereal germinado.

Los granos de cereal germinados preferiblemente comprenden una o más actividades enzimáticas hidrolíticas, por ejemplo provistas por α -amilasas, β -amilasas, enzimas desramificadoras del almidón (tal como dextrinasas limitantes), α -glucosidasas y proteasas.

Frecuentemente, el inicio de la actividad enzimática hidrolítica puede estar ocurriendo de manera coordinada en el tiempo, y así la actividad de algunas enzimas hidrolíticas puede utilizarse como un marcador para las actividades de otras enzimas hidrolíticas.

De manera acorde, se prefiere que los granos de cereal germinado tengan un nivel adecuado de actividad α -amilasa medible. Preferiblemente, los granos de cereal germinado tienen una actividad de α -amilasa medible de al menos 4 U/g, tal como al menos 10 U/g de granos de cereal (peso seco). Así, preferiblemente los granos de cereal germinados pueden tener una actividad de α -amilasa medible de al menos 20 U/g, por ejemplo de al menos 30 U/g, tal como al menos 40 U/g, por ejemplo al menos 50 U/g de granos de cereal (peso seco). En formas de realización de la invención en donde el cereal es trigo, la actividad α -amilasa puede ser de al menos 30 U/g. En algunas formas de realización de la invención, el grano de cereal puede tener

una actividad α -amilasa de al menos 50 U/g, por ejemplo de al menos 60 U/g, tal como al menos 70 U/g de granos de cereal (peso seco). Este puede ser en particular el caso en formas de realización en donde los granos de cereal se incuban en una solución acuosa bajo aireación seguido de un descanso en aire.

- 5 La actividad α -amilasa se determina preferiblemente de acuerdo a métodos estándar, p. ej. usando el kit Ceralpha (K-CERA) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad α -amilasa puede determinarse como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

- 10 También puede preferirse que los granos de cereal germinados tengan un nivel adecuado de actividad β -amilasa medible. Preferiblemente, los granos de cereal germinados tienen una actividad β -amilasa medible de al menos 5 U/g de cereal (peso seco). Así, preferiblemente, los granos de cereal germinados pueden tener una actividad β -amilasa medible de al menos 10 U/g, por ejemplo al menos 15 U/g de granos de cereal (peso seco).

- 15 Preferiblemente, la actividad β -amilasa se determina de acuerdo con métodos estándar, p. ej. utilizando el kit Betamyl (K-BETA3) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad β -amilasa puede determinarse como se describe más adelante en el Ejemplo 2.

- 20 También se prefiere que los granos de cereal germinados tengan un nivel adecuado de actividad dextrinasa limitante. Preferiblemente, los granos de cereal germinado tienen una actividad de dextrinasa limitante de al menos 5 mU/g de grano de cereal (peso seco). Así, preferiblemente los granos de cereal germinado pueden tener una actividad de dextrinasa limitante de al menos 10 mU/g, por ejemplo de al menos 15 mU/g, tal como al menos 20 mU/g de granos de cereal (peso seco). En
- 25 formas de realización de la invención en las cuales el grano de cereal es trigo la actividad dextrinasa limitante puede ser de al menos 8 U/g. En algunas formas de realización de la invención, el grano de cereal puede tener una actividad dextrinasa limitante de al menos 20 U/g, por ejemplo de al menos 22 U/g, tal como al menos 25 U/g de granos de cereal (peso seco). Este puede ser en particular el caso en
- 30 formas de realización en donde los granos de cereal se incuban en una solución acuosa bajo aireación seguido de un descanso en aire.

Preferiblemente la actividad dextrinasa limitante se determina de acuerdo a métodos estándar, p. ej. utilizando el kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad dextrinasa limitante puede determinarse como se describe más adelante en el Ejemplo 2.

5 De manera interesante, los granos de cereal germinado de acuerdo con la invención tienen radículas significativamente reducidas en comparación con malta verde convencional. Así, los granos de cereal germinado de acuerdo con la invención contienen preferiblemente como máximo 4 g de radículas por cada 100 g de cebada germinada, preferiblemente como máximo 3 g de radículas por cada 100 g de cebada germinada, incluso más preferiblemente como máximo 2 g de radículas por cada 100 g de cebada germinada, por ejemplo como máximo 1,1 g de radículas por cada 100 g de cebada germinada, en donde tanto la masa de las radículas como la masa de la cebada germinada se proveen como peso seco. La masa de radículas se determina preferiblemente como se describe más adelante en el Ejemplo 10.

15 Las nitrosaminas (NDMA) son compuestos químicos con la estructura química $R^1N(-R^2)-N=O$, esto es, un grupo nitroso unido a una amina. La mayoría de las nitrosaminas son carcinogénicas. Incluso cuando los niveles de nitrosaminas en las maltas modernas son bajos, los granos de cebada germinados de acuerdo con la invención aún tienen sin embargo un contenido reducido de NDMA en comparación con la malta convencional. En una forma de realización, los granos de cebada germinada de acuerdo con la invención comprenden 0,15 µg/kg como máximo de NDMA, preferiblemente 0,12 µg/kg como máximo de NDMA, por ejemplo 0,10 µg/kg como máximo de NDMA.

25 **Solución acuosa**

La solución acuosa puede ser cualquier solución acuosa. La solución acuosa puede ser considerada una solución incluso si la mezcla de solución acuosa y granos de cereal puede ser considerada como una suspensión. Frecuentemente, la solución acuosa es agua, tal como agua corriente. Pueden agregarse a dicha agua uno o más agentes adicionales, y así la solución acuosa puede ser agua, tal como 30 agua corriente que comprende uno o más agentes adicionales. Dichos agentes

adicionales pueden estar comprendidos en la solución acuosa desde el comienzo o pueden ser agregados durante la incubación.

Dichos agentes adicionales pueden ser, por ejemplo, compuestos capaces de acelerar la germinación de los granos de cereal. Así, la solución acuosa
 5 puede comprender ácido giberélico (GA), por ejemplo la solución acuosa puede comprender GA en una concentración de al menos 100 nM, por ejemplo en una concentración de al menos 1000 nM, tal como en una concentración en el rango de 100 a 100.000 nM, por ejemplo en una concentración en el rango de 500 a 2000 nM. Dicho GA puede estar presente en la solución acuosa desde el comienzo de la
 10 incubación o puede ser agregado durante la incubación. Dicho GA puede ser cualquier GA, p. ej. GA₃ o GA₇. En una forma de realización dicho GA es GA₃.

El agente adicional también puede ser un agente antiespumante. Dicho agente antiespumante puede ser por ejemplo cualquier agente antiespumante de grado alimenticio, por ejemplo Foamzol FCD511 (AB Vickers, UK).

15

Aparatos

Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo usando uno o más aparatos adecuados para llevar a cabo los métodos.

Por ejemplo, la etapa de incubar granos de cereal en una solución
 20 acuosa puede ser llevada a cabo en un contenedor equipado con una o más bombas de aire. El contenedor puede ser cualquier contenedor en el que puedan incubarse granos de cereal en una solución acuosa. En algunas formas de realización, el contenedor puede ser un tanque, p. ej. un tanque como se describe a continuación.

Un ejemplo de un aparato útil para incubar granos de cereal se
 25 provee en la Figura 8. El aparato comprende un tanque (2), el cual debería tener un volumen suficiente para comprender los granos de cereal y la solución acuosa. El tanque que se muestra en la Figura 8 es cilíndrico, pero el tanque que se use con la invención puede tener cualquier forma adecuada, por ejemplo puede ser un tanque cilíndrico, por ejemplo un tanque cilíndrico que tenga una parte inferior cónica. El
 30 tanque puede estar hecho de cualquier material adecuado, p. ej. plástico (tal como Plexiglas) o metal (p. ej. acero inoxidable o cobre).

El tanque comprende al menos una entrada (1) para granos de cereal, la cual puede usarse para agregar granos de cereal al tanque. La entrada también puede utilizarse para agregar otros compuestos al tanque, p. ej. la entrada puede ser usada para agregar la solución acuosa, p. ej. agua. La entrada puede estar
5 posicionada en cualquier posición útil en el tanque, y en algunas formas de realización la entrada está posicionada en la parte superior del tanque, p. ej. en el tope del tanque. La entrada debe ser de un tamaño suficiente para permitir el agregado de granos de cereal. A pesar de no ser un requisito, el tanque puede comprender entradas adicionales además de la entrada para granos de cereal.

10 El tanque puede comprender opcionalmente una rejilla o malla (3) de posición esencialmente horizontal en el tanque. Si está presente, tal rejilla o malla típicamente está posicionada en el 1/3 inferior, tal como en el 1/5 inferior, del tanque. La rejilla o malla preferiblemente sólo contiene aberturas, las cuales son más pequeñas que los granos de cereal. La rejilla o malla puede estar hecha de cualquier
15 material adecuado, tal como plástico o metal, y por ejemplo puede ser una malla metálica. Así, la rejilla o malla puede usarse para separar los granos de cereal del fondo del tanque. Sin embargo, frecuentemente el tanque no comprenderá una malla. En particular, si el tanque comprende una salida para granos de cereal en el fondo o cerca del fondo, entonces dicho tanque en general no comprende una rejilla o malla.

20 Más aún, el tanque comprende una o más entradas para gas (4). Dichas entradas pueden ser cualquier entrada a través de la cual puede hacerse pasar hacia dentro del tanque un gas que comprende O_2 . Las entradas para gas pueden tener una forma que permita que el gas entre a la solución acuosa a alta velocidad asegurando la difusión del gas a través de la solución acuosa. Así, por ejemplo, las
25 entradas para gas pueden ser boquillas, inyectoros, piedras difusoras o piedras sinterizadas. En una forma de realización las entradas para gas son piedras sinterizadas. Las entradas para gas en general están conectadas a una bomba (5), la cual bombea gas dentro del tanque, a través de dichas entradas. La bomba puede ser cualquier bomba capaz de bombear gas, p. ej. aire a través de las entradas para gas.
30 Se prefiere que el tanque comprenda múltiples entradas para gas, p. ej. al menos 2, tal como al menos 3, por ejemplo en el rango de 3 a 20. Las entradas para gas pueden estar posicionadas en cualquier posición en el tanque, pero usualmente están posicionadas en el 1/3 inferior, tal como en el 1/5 inferior del tanque. Esto permite que entre gas a la solución acuosa desde el fondo y se difunda hacia arriba a través de la

solución acuosa. El exceso de gas puede salir del tanque a través de cualquier abertura en el tanque, p. ej. a través de la entrada para agregar cereales. En una forma de realización puede preferirse que dichas entradas (3) estén posicionadas directamente en las paredes laterales del tanque (2), preferiblemente en la parte inferior de las paredes laterales, p. ej. como se muestra en la Figura 1.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de aparato útil para llevar a cabo varias etapas de los métodos de la invención. El aparato comprende una entrada para granos de cereal (1), un tanque (2), entrada/s para gas (3) y una bomba (4) los cuales pueden ser cualquiera de las entradas para granos de cereal, tanques, entradas para gas y bombas descritas antes en la presente en relación con la Figura 8. El tanque (2) puede comprender una salida para granos de cereal (5) posicionada en el 1/3 inferior, tal como el 1/5 inferior del tanque, p. ej. posicionada en el fondo del tanque. Dicha salida puede usarse tanto para sacar los granos de cereal así como para sacar otros componentes que se mantengan en el tanque, p. ej. la solución acuosa. Dicha salida puede estar conectada a una bomba de granos (6), p. ej. vía tubería. Dicha bomba de granos (6) puede ser cualquier bomba capaz de bombear granos desde el tanque (2) al equipo para dividir finamente los granos de cereal (7) y opcionalmente además hacia la cuba de maceración (9).

El aparato comprende un equipo para dividir finamente los granos de cereal (7). Dicho equipo puede ser cualquier equipo capaz de dividir finamente granos de cereal que tengan un contenido de agua superior al 20%, por ejemplo superior al 35%. El equipo puede ser en particular una trituradora o molino, por ejemplo un molino en húmedo. El equipo (7) puede estar conectado al tanque (2) y a la cuba (9) mediante tubería/s. El movimiento de los granos desde el tanque (2) hasta el equipo (7) y adicionalmente a la cuba (9) puede asegurarse mediante una bomba (6).

El aparato también puede comprender una cuba (9). La cuba (9) puede ser cualquier cuba, la cual pueda comprender un extracto acuoso y que pueda soportar las temperaturas usadas para maceración, p. ej. temperaturas de hasta 90°C, tal como hasta 85°C, por ejemplo hasta 80°C. Así, la cuba puede estar hecha de cualquier material que tolere tales temperaturas, p. ej. de metal, tal como acero inoxidable o cobre. La cuba puede tener cualquier forma útil, por ejemplo puede ser esencialmente cilíndrica. La cuba puede estar asociada con equipo para el control de la temperatura. La cuba puede usarse para preparar un extracto acuoso de los granos

de cereal finamente divididos mediante un proceso que implica la incubación a una o más temperaturas predefinidas tal como se describe en la presente en la sección “Preparación de un extracto acuoso”. Dicho equipo para el control de la temperatura es capaz de controlar la temperatura de un líquido dentro de la cuba, incluyendo la

5 capacidad de calentar un líquido dentro de la cuba hasta una temperatura predeterminada, p. ej. hasta cualquiera de las temperaturas descritas en la presente en la sección “Preparación de un extracto acuoso”. La cuba (9) también puede comprender equipo para revolver o rotar cualquier líquido contenido en dicha cuba. En particular, la cuba (9) puede ser una cuba de maceración. Las cubas de maceración

10 son bien conocidas en el arte, y la cuba (9) puede ser cualquier cuba de maceración convencional.

La cuba (9), generalmente, contiene una entrada (8) a través de la cual los granos de cereal germinado finamente divididos pueden entrar en la cuba. Dicha entrada (8) típicamente está posicionada en la mitad superior de la cuba, p. ej.

15 en el 1/3 superior, tal como en el 1/5 superior de la cuba, por ejemplo en el tope de la cuba. Los granos de cereal finamente divididos pueden ser llevados mediante tubería desde el equipo para dividir finamente los granos de cereal (7) a la entrada (8) de la cuba (9).

Generalmente, la cuba (9) también contiene una salida (10), a través de la cual el extracto acuoso puede salir de la cuba luego de la preparación del extracto acuoso (ver detalles del extracto acuoso más adelante en la presente en las secciones “Extracto acuoso” y “Preparación de un extracto acuoso”). La salida está posicionada típicamente en la mitad inferior, por ejemplo en el 1/3 inferior, tal como en el 1/5 inferior de la cuba, por ejemplo en el fondo de la cuba.

20

25

División fina de los granos de cereal germinado

Los métodos de la invención comprenden una etapa de dividir finamente los granos de cereal germinado mediante incubación en una solución acuosa bajo aireación.

30

En el momento en que dichos granos de cereal son divididos finamente preferiblemente aún tienen un alto contenido de agua, preferiblemente dichos granos de cereal tienen un contenido de agua de al menos 20%, más

preferiblemente de al menos 25%, incluso más preferiblemente de al menos 30%, aún más preferiblemente de al menos 35%. Por ejemplo, los granos de cereal germinado pueden transferirse directamente desde la incubación en dicha solución acuosa al equipo para dividir finamente los granos de cereal. De manera acorde, los granos de cereal germinado pueden tener el mismo contenido de agua al momento de ser divididos finamente que los granos de cereal tienen inmediatamente luego de la incubación de los granos de cereal en la solución acuosa, por ejemplo el contenido de agua descrito anteriormente en la presente en la sección "Germinación". En particular, los métodos generalmente no comprenden una etapa de secado de los granos de cereal germinado sometiendo los granos de cereal a temperaturas elevadas. Preferiblemente, los granos de cereal germinado no tienen un contenido de agua menor al 20%, preferiblemente no menor a 25%, incluso más preferiblemente no menor a 30%, aún más preferiblemente no menor a 35% en ningún momento luego de la germinación y antes de dividir finamente dichos granos de cereal. Así, los métodos preferiblemente no comprenden una etapa de secado en estufa de los granos de cereal germinado.

Los granos de cereal germinado pueden ser divididos finamente usando cualquier equipo para dividir finamente granos de cereal que tengan un contenido de agua de más del 20%, tal como más del 25%, por ejemplo más del 30%, tal como más del 35%. Por ejemplo, los granos de cereal germinado pueden ser sometidos a molienda, por ejemplo molienda húmeda. Molinos útiles para moler granos de cereal germinado incluyen los molinos disponibles de Millstar, EEUU. Los granos de cereal germinado también pueden someterse a triturado.

Los granos de cereal, en general, se dividen finamente a un punto tal que pueda hacerse un extracto acuoso de los azúcares fermentables de los granos de cereal. Así, los granos de cereal se dividen lo suficiente, de modo que un extracto acuoso de 7 litros de 1 kg de dichos granos de cereal finamente dividido tenga una gravedad específica de 8 °Plato.

En formas de realización de la invención, en las cuales el extracto acuoso se hace a partir de granos de cereal germinado y uno o más adjuntos, dichos adjuntos también pueden estar finamente divididos. En particular, este puede ser el caso cuando dichos adjuntos comprenden granos de cereal germinado. Dichos adjuntos pueden ser divididos finamente, p. ej. molidos en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que los adjuntos se

- dividan finamente junto con los granos de cereal germinado. De manera similar, si el extracto acuoso se hace a partir de granos de cereal germinado y malta secada en horno, entonces la malta secada en horno puede ser dividida finamente, p. ej. molida en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la
- 5 invención que los adjuntos se dividan finamente junto con los granos de cereal germinado.

Preparación de un extracto acuoso

- Los métodos de la invención también comprenden una etapa de
- 10 preparar un extracto acuoso de los granos de cereal germinado finamente divididos. Dicha etapa, por ejemplo, puede ser una etapa de maceración.

- El extracto acuoso antes mencionado, en general, puede prepararse incubando los granos de cereal finamente divididos en agua o solución acuosa. La solución acuosa para preparar un extracto, en general, es una solución acuosa
- 15 diferente en comparación con la solución acuosa usada para incubar los granos de cereal durante la germinación.

- Con el fin de diferenciar, la solución acuosa para preparar un extracto acuoso también puede denominarse como “solución de maceración”. La solución de maceración puede ser cualquier solución acuosa, pero típicamente consiste de agua,
- 20 tal como agua corriente a la cual se pueden agregar uno o más agentes adicionales. Con el fin de distinguir entre agentes adicionales agregados durante la germinación, estos agentes adicionales pueden denominarse como “agentes de maceración adicionales”. Así, la solución de maceración puede consistir en agua (p. ej. agua corriente) a la cual se agregan uno o más agentes de maceración adicionales. Los
- 25 agentes de maceración pueden estar presentes en la solución de maceración desde el inicio o pueden agregarse durante el proceso de preparación de un extracto acuoso.

- Dichos agentes de maceración adicionales pueden ser enzimas. Así, la solución de maceración puede comprender una o más enzimas. Dichas enzimas pueden agregarse a la solución de maceración desde el inicio, o subsecuentemente,
- 30 durante el proceso.

Dichas enzimas pueden ser, por ejemplo, una o más enzimas hidrolíticas. Enzimas adecuadas incluyen lipasas, enzimas degradadoras del almidón (p. ej. amilasas), glucanasas [preferiblemente (1-4)- y/o (1,3;1,4)- β -glucanasas], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas), y/o proteasas, o mezclas de enzimas que

5 comprenden una o más de las enzimas antes mencionadas, p. ej. Cereflo, Ultraflo, u Ondea Pro (Novozymes). Por ejemplo, la solución de maceración puede comprender una o más enzimas hidrolíticas en donde al menos una enzima hidrolítica está seleccionada del grupo que consiste en α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa limitante, pululanasa, β -glucanasa, xilanasas, glucoamilasa y proteasa.

10 En una forma de realización de la invención la solución de maceración comprende una o más de las siguientes enzimas:

- Una β -glucanasa, tal como una-(1,3;1,4)- β -glucanasa o una endo-1,4- β -glucanasa.
- Una xilanasas, tal como una endo- o exo-1,4-xilanasas, una arabinofuranosidasa o
- 15 una feruloil esterasa
- Una α -amilasa
- Una pululanasa o una dextrinasa limitante
- Una glucoamilasa.

El agregado o no de enzimas a la solución de maceración, y las

20 decisiones acerca de cuáles enzimas agregar, pueden depender de los granos de cereal usados. En formas de realización de la invención en las cuales el cereal es una planta de cebada con bajos niveles de β -glucano (p. ej. como se describe más adelante en la presente en la sección “Cebada”), entonces puede agregarse poco o nada de β -glucanasa a la solución de maceración.

25 En una forma de realización se prefiere que no se agregue proteasa exógena durante la maceración. El agregado de proteasa puede ser menos preferible porque las proteasas pueden afectar la actividad enzimática. En una forma de realización se prefiere que no se agregue lipasa exógena durante la maceración.

En una forma de realización se prefiere el uso de 700 U como

30 máximo, preferiblemente 350 U como máximo de glucoamilasa exógena por g de granos de cereal germinado (peso seco) durante la preparación del extracto acuoso.

En una forma de realización se prefiere el uso de 400 AGU como máximo, preferiblemente 200 AGU como máximo de glucoamilasa exógena por kg de granos de cereal germinado (peso seco) durante la preparación del extracto acuoso. La determinación de AGU puede llevarse a cabo como se describe en US 7.060.468.

- 5 En otra forma de realización se prefiere que el uso combinado de glucoamilasa exógena y α -amilasa durante la preparación del extracto acuoso no exceda las 700 U, preferiblemente que no exceda las 350 U por g de granos de cereal germinado (peso seco). La actividad de glucoamilasa y α -amilasa combinadas puede por ejemplo determinarse usando el kit K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de
- 10 Megazyme, Irlanda).

En una forma de realización se prefiere el uso de 20 U como máximo de pululanasa exógena o dextrinasa limitante por kg de granos de cereal germinado (peso seco) durante la preparación del extracto acuoso.

- En una forma de realización se prefiere el uso de 100 PUN como
- 15 máximo de pululanasa exógena por kg de granos de cereal germinado (peso seco) durante la preparación del extracto acuoso. La determinación de PUN puede llevarse a cabo como se describe en US 7.060.468.

- Dichos agentes de maceración adicionales también pueden ser adjuntos, por ejemplo granos de cereal germinado, jarabes o azúcares. Si se agregan
- 20 adjuntos, estos también pueden haber sido divididos finamente p. ej. mediante molienda o triturado. Si el adjunto es un grano de cereal, por ejemplo un grano de cereal que no ha sido sometido a germinación, entonces típicamente estará dividido finamente o molido. Si el adjunto son jarabes, azúcares o lo similar, estos generalmente no estarán molidos. Los adjuntos tales como azúcares o jarabes pueden
- 25 ser agregados a la solución de maceración en cualquier momento en el proceso; sin embargo, tales adjuntos también pueden ser agregados al extracto acuoso o más tarde durante el proceso para preparar una bebida tal como se describe más adelante. En general, los adjuntos se agregan en cantidades menores que los granos de cereal germinados. Así, al menos 50%, preferiblemente al menos 70%, por ejemplo al menos
- 30 90% de los carbohidratos del extracto acuoso derivan de los granos de cereal germinados, mientras que los adjuntos preferiblemente solo son responsables de una parte menor de los carbohidratos. Si el adjunto es un grano de cereal no germinado,

entonces se prefiere que los granos de cereal germinado constituyan al menos 50% (p/p), preferiblemente al menos 70% (p/p), más preferiblemente al menos 90% (p/p) del total de granos de cereal tal como se determina por peso seco.

Los agentes de maceración adicional también pueden ser malta
5 secada en horno. Si se agrega malta secada en horno, ésta también puede haber sido dividida finamente, p. ej. mediante molienda o trituración. En general, la malta secada en horno se agrega en cantidades menores que los granos de cereal germinado. Así, los granos de cereal germinado constituyen al menos 80% (p/p), preferiblemente al menos 90% (p/p), más preferiblemente al menos 95% (p/p) de los granos de cereal
10 totales y la malta tal como se determina mediante peso seco. En formas de realización preferida, no se agrega malta secada en horno.

Dichos agentes de maceración adicionales, preferiblemente de calidad de grado alimenticio, también pueden ser una sal, por ejemplo CaCl_2 .

Dichos agentes de maceración adicionales también pueden ser un
15 ácido, preferiblemente un ácido de grado alimenticio, por ejemplo H_3PO_4 .

El extracto acuoso generalmente se prepara mediante incubación de los granos de cereal germinado finamente divididos en la solución de maceración a una o más temperaturas predeterminadas. Dicha temperatura predeterminada también puede ser denominada como “temperatura de maceración” en la presente. Dichas
20 temperaturas de maceración por ejemplo pueden ser temperaturas convencionales utilizadas para maceración.

La temperatura de maceración generalmente se mantiene constante (maceración isotérmica) o se incrementa gradualmente, por ejemplo se la incrementa de manera secuencial. En ambos casos, las sustancias solubles en los granos de cereal germinado finamente divididos son liberadas en dicha solución de maceración
25 formando de este modo un extracto acuoso.

La/s temperatura/s de maceración son típicamente temperaturas en el rango de 30 a 90°C, tal como en el rango de 40 a 85°C, por ejemplo en el rango de 50 a 85°C. Las temperaturas de maceración pueden elegirse de acuerdo con el tipo de cereal usado. De manera acorde, en formas de realización de la invención, en donde
30 los granos de cereal son cebada con bajos niveles o carentes de actividad

lipooxigenasa (LOX) y/o de actividad metil metionina transferasa (MMT) (ver detalles más adelante en la sección “Cebada”), la temperatura de maceración puede ser menor, por ejemplo en el rango de 35 a 69°C.

La incubación en la solución de maceración puede llevarse a cabo durante cualquier cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración puede, p. ej. ser del rango de 60 a 300 min, tal como en el rango de 60 a 240 min, por ejemplo en el rango de 90 a 300 min. tal como en el rango de 90 a 240 min, por ejemplo en el rango de 90 a 270 min. Por ejemplo dicho tiempo de incubación en la solución de maceración puede ser cualquier tiempo usado en maceración convencional. Un ejemplo no limitativo de maceración adecuada es:

- (1) Macerar a una temperatura en el rango de 50-60°C, tal como aproximadamente 55°C, en el rango de 10 a 30 min, tal como aproximadamente 15 min.
- (2) Calentar a una temperatura en el rango de 60 a 70°C, preferiblemente en el rango de 60 a 65°C, tal como aproximadamente 62°C, en el rango de 30 a 90 min, tal como aproximadamente 60 min.
- (3) Calentar a una temperatura en el rango de 70 a 75°C, tal como aproximadamente 72°C, en el rango de 5 a 30 min, tal como aproximadamente 15 min.
- (4) Calentar a una temperatura en el rango de 75 a 80°C, preferiblemente en el rango de 75 a 78°C, tal como aproximadamente 78°C, en el rango de 5 a 15 min, tal como aproximadamente 10 min.

Luego de la incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración, los granos de cereal germinado finamente divididos en la solución de maceración pueden ser transferidos a otro contenedor, p. ej. una cubeta de filtración, y se los incuba por un tiempo adicional a elevada temperatura, p. ej. en el rango de 70 a 78°C por el rango de 30 a 120 min.

Así, la incubación en la solución de maceración además de las etapas mencionadas puede comprender una etapa (5) de:

(5) Calentar hasta una temperatura en el rango de 70 a 78°C, preferiblemente en el rango de 75 a 78°C, tal como aproximadamente 78°C, en el rango de 30 a 120 min, tal como aproximadamente 60 min.

Un ejemplo no limitativo de temperaturas de maceración y tiempos
5 útiles se muestra en la presente en la Figura 5. La incubación por los primeros aproximadamente 120 min por ejemplo puede llevarse a cabo en una cuba de maceración, mientras que el resto de la incubación por ejemplo puede ser llevado a cabo en otro contenedor. Otros ejemplos no limitativos pueden encontrarse en la literatura cervecera, p. ej. en Briggs et al. (supra) y Hough et al. (supra).

10 Luego de la incubación en la solución de maceración, el extracto acuoso puede separarse típicamente, p. ej. mediante filtración en extracto acuoso y partículas sólidas no disueltas residuales, éstas últimas también llamadas “grano usado”. La filtración puede llevarse a cabo por ejemplo en una cubeta de filtración. De manera alternativa, la filtración puede ser una filtración a través de un filtro de malla. El
15 extracto acuoso así obtenido también puede denominarse “primer mosto”.

Puede agregarse líquido adicional, tal como agua, a los granos usados durante un proceso también denominado lavado. Luego del lavado y la filtración, puede obtenerse un “segundo mosto”. Pueden prepararse mostos ulteriores repitiendo el procedimiento.

20 Así, el extracto acuoso puede ser mosto, p. ej. un primer mosto, un segundo mosto, un mosto ulterior o una combinación de los mismos.

Extracto acuoso

El extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención
25 puede tener una cantidad de propiedades útiles, incluyendo pero no estando limitadas a, las propiedades descriptas en esta sección.

Tal como ya se mencionó, el extracto acuoso puede ser sometido a una etapa de filtración. De manera acorde, puede preferirse que el mosto tenga buena filtrabilidad. Por ejemplo, el filtrado de un líquido muy viscoso puede ser difícil desde el
30 punto de vista técnico —una razón por la que puede preferirse que el extracto acuoso tenga una baja viscosidad.

La filtrabilidad puede determinarse de varios modos. En una forma de realización la filtrabilidad se determina como la cantidad de líquido obtenido luego de la filtración a través de un embudo de filtrado equipado con un filtro de papel por 1 h. Preferiblemente el extracto acuoso tiene una filtrabilidad de al menos 250 ml, cuando se agregan 400 ml de solución de maceración que comprende 100 g de granos de cereal finamente divididos a dicho embudo de filtrado. La filtrabilidad también puede determinarse como el porcentaje del volumen de líquido obtenido luego de filtración durante 60 min tal como se describió antes, comparado con el volumen de líquido del extracto acuoso agregado a dicho embudo. Así, la filtrabilidad puede ser de al menos 50%, tal como de al menos 60% (v/v). En particular, la filtrabilidad puede ser determinada como se describe más adelante en la presente en el Ejemplo 3.

La filtrabilidad puede depender frecuentemente del nivel de β -glucano. De manera acorde, puede preferirse que el nivel de β -glucano no sea demasiado alto. Por ejemplo el extracto acuoso puede comprender 200 mg/l como máximo, preferiblemente 150 mg de β -glucano /l como máximo.

También se prefiere que el extracto acuoso comprenda un nivel adecuado de azúcares fermentables. En particular, puede preferirse que el extracto acuoso comprenda al menos 10 g, tal como al menos 15 g de maltosa por litro. Por ejemplo, puede preferirse que el extracto acuoso comprenda al menos 1 g/l por °Plato de maltosa. También puede preferirse que dicho extracto acuoso comprenda al menos 1 g, tal como al menos 2 g de glucosa por litro.

En general es deseable que el mosto contenga niveles de nitrógeno amino libre (FAN, por sus siglas en inglés) que sean lo suficientemente altos como para obtener una buena viabilidad de las levaduras, mientras que niveles muy altos pueden ser indeseables. De manera acorde, puede preferirse que el extracto acuoso comprenda en el rango de 150 a 400 mg/l, tal como en el rango de 150 a 300 mg/l, por ejemplo en el rango de 150 a 250 mg/l de FAN.

En general es deseable que el mosto contenga altos niveles del aminoácido valina, debido a que puede reducir la probabilidad de formación indeseada de diacetilo. De manera acorde, puede preferirse que el extracto acuoso comprenda al menos 55 mg/l, por ejemplo al menos 60 mg/l de valina. En una forma de realización, el extracto acuoso comprende al menos 65 mg/l de valina.

Los niveles antes mencionados de azúcares, FAN y aminoácidos preferiblemente son niveles en el extracto acuoso previo a cualquier fermentación.

Preparación de bebidas

En algunas formas de realización, los métodos de la invención también comprenden una etapa de procesar el extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención en una bebida.

El extracto acuoso puede hervirse con o sin lúpulo luego de lo cual puede ser denominado como mosto hervido.

Pueden combinarse primero, segundo y ulteriores mostos, y luego ser sometidos a calentamiento o hervor. El extracto acuoso puede ser calentado o hervido por cualquier período de tiempo adecuado, p. ej. en el rango de 60 min a 120 min. Durante el calentamiento o hervor el volumen de extracto acuoso puede reducirse debido a evaporación. Puede preferirse que el volumen del extracto acuoso se reduzca en menos del 8%, preferiblemente en menos del 5%. Esto puede reducir significativamente el consumo de energía.

La bebida puede prepararse mediante fermentación del extracto acuoso, p. ej. fermentando el mosto. Así, la bebida puede prepararse fermentando el extracto acuoso con levaduras.

En una forma de realización, la bebida puede ser una bebida alcohólica, tal como una cerveza. En otras formas de realización, la bebida puede ser una bebida sin alcohol en base a granos de cereal germinado. La bebida sin alcohol puede ser por ejemplo una cerveza sin alcohol u otras clases de bebidas sin alcohol, tal como maltina.

En una forma de realización preferida la bebida es cerveza, por ejemplo la cerveza puede ser una cerveza lager o una ale. Así, la cerveza puede seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en Altbier, Amber ale, Barley wine, Berliner weisse, Bière 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, lager, Witbier, Weissbier y Weizenbock. El extracto acuoso de acuerdo

con la invención se prepara a partir de los granos de cereal germinado, los cuales no fueron sometidos a secado en horno. Los granos de cereal germinados que no han sido secados en horno en general tienen un color más claro y, de manera acorde, los métodos de la invención son particularmente útiles para la preparación de cervezas más claras, en particular para la preparación de cerveza lager. También pueden prepararse cervezas más oscuras mediante los métodos de la invención, p. ej. agregando una o más maltas secadas en horno durante la maceración tal como se describe en la sección "Preparación de bebidas".

Así, la invención también se refiere a métodos para producir una bebida que comprenden las etapas de:

- Preparar un extracto acuoso mediante el método de acuerdo con la invención.
- Procesar dicho extracto en una bebida.

Bebidas alcohólicas –tal como cerveza- pueden prepararse de acuerdo con los métodos de la invención a partir de granos de cereal germinado. Los granos de cereal germinado, además del lúpulo y las levaduras, contribuyen al color y sabor de la cerveza.

Una vez que el extracto acuoso ha sido preparado puede ser procesado en cerveza mediante cualquier método incluyendo métodos de preparación de cerveza convencionales. Descripciones no limitativas de ejemplos de métodos adecuados para la preparación de cerveza pueden encontrarse, por ejemplo, en publicaciones de Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Numerosos métodos, regularmente actualizados, para el análisis de productos de cebada y cerveza están disponibles de, por ejemplo, pero sin limitarse a, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), e Institute of Brewing (1997). Se reconoce que muchos procedimientos específicos se emplean en una cervecería dada, estando relacionadas las variaciones más significativas a las preferencias del consumidor local. Cualquiera de tales métodos de producción de cerveza puede usarse con la presente invención.

El primer paso para producir cerveza a partir del extracto acuoso preferiblemente implica calentar dicho extracto acuoso como se describió antes en la presente, seguido de una fase subsiguiente de enfriado y opcionalmente descanso con remolino ("*whirlpool*"). Pueden agregarse uno o más compuestos adicionales al

extracto acuoso, p. ej. uno o más de los compuestos adicionales descritos más adelante en la sección "Compuestos adicionales". Luego de ser enfriado, el extracto acuoso puede ser transferido a tanques de fermentación que contengan levaduras, p. ej. levadura de cerveza, tales como *S. pastorianus* o *S. cerevisiae*. El extracto acuoso

5 puede ser fermentado durante cualquier período de tiempo adecuado, en general en el rango de 1 a 20, tal como 1 a 10 d. La fermentación se lleva a cabo a cualquier temperatura útil, p. ej. a una temperatura en el rango de 10 a 20°C. Los métodos también pueden comprender la adición de una o más enzimas, p. ej. pueden añadirse una o más enzimas al mosto antes o durante la fermentación. En particular, dicha

10 enzima puede ser una endoproteasa específica para prolina. Ejemplos no limitativos de una endoproteasa específica para prolina es "Brewer's Clarex" disponible de DSM. En otras formas de realización, no se agregan enzimas exógenas durante los métodos.

Durante el proceso de fermentación de varios días de duración, el

15 azúcar es convertido en alcohol y CO₂ de manera concomitante con el desarrollo de algunas sustancias saborizantes. La fermentación puede ser terminada en cualquier momento deseable, p. ej. una vez que no se observa una caída adicional en el %P.

Subsiguientemente, la cerveza puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo enfriada. También puede ser filtrada y/o estacionada ("*lagered*"), un

20 proceso que desarrolla un aroma agradable y un sabor menos similar a la levadura. También pueden agregarse aditivos. Más aún, puede agregarse CO₂. Finalmente, la cerveza puede ser pasteurizada y/o filtrada, antes de envasarla (p. ej. transferirla a contenedores o barriles, embotellada o enlatada). La cerveza también puede ser pasteurizada mediante métodos estándar.

25 La cerveza producida por los métodos de la invención típicamente tiene un gusto agradable y carece de o tiene sólo un poco de astringencia. El gusto puede ser analizado, por ejemplo, por un panel de especialistas en sabor de cerveza.

Cebada

30 En formas de realización preferida de la invención los granos de cereal a ser usados con los métodos de la invención son granos de cebada.

Dichos granos pueden ser de cualquier planta de cebada. Sin embargo, en algunas formas de realización específica, la planta de cebada puede comprender una o más características específicas, por ejemplo, una o más de las características que se describen a continuación en la presente. Incluso cuando las
5 distintas características se discuten a continuación en la presente de manera individual, la planta de cebada de la invención puede tener una combinación de estas características.

En una forma de realización de la invención, la cebada puede ser una variedad (var.) de cebada sin cascarilla, También está comprendido dentro de la
10 invención que la cebada sea una var. de cebada con cascarilla naturalmente delgada, tal como la var. Admiral. Por ejemplo, la cascarilla puede constituir menos del 7% del peso total del peso de grano y cascarilla.

Como se mencionó anteriormente, es preferible que el extracto acuoso obtenido durante la maceración tenga una viscosidad lo suficientemente baja
15 como para permitir una buena filtrabilidad de la mezcla de maceración. Como también se describió en detalle antes, los β -glucanos solubles pueden contribuir a la alta viscosidad de un extracto acuoso. De manera acorde, en algunas formas de realización de la invención, puede preferirse el uso de una planta de cereal – y en particular una planta de cebada que tenga un bajo nivel de β -glucano, p. ej. que no
20 tenga β -glucano, tal como un nivel de β -glucano que esté por debajo del nivel de detección. Estas plantas de cebada son conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica una β -glucano sintasa. Dicho gen puede ser un gen que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2 descrito en US2012/0030784. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una planta
25 de cebada que comprende un gen de β -glucano deficiente como se describe en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:18 de US2012/0030784. La planta de cebada también puede ser una que contenga un gen CslF6 silenciado, lo que conduce a granos de cebada con niveles de (1,3;1,4)- β -glucano muy bajos (como se describe en Taketa et al., 2011).

30 La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tenga un bajo nivel de actividad LOX. Tales plantas de cebada son conocidas en el arte, e incluyen por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para LOX-1. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una planta de

cebada que porta cualquiera de las mutaciones en el gen LOX-1 descritas en WO 02/053721, WO 2005/087934 y WO 2004/085652.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que porte una mutación en el gen que codifica la lipooxigenasa 1 (LOX-1) y/o en el gen que codifica para LOX-2. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta cualquiera de las mutaciones en el gen LOX-1 y LOX-2 descritas en WO 2010/075860.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tenga un bajo nivel de actividad MMT. Tales plantas de cebada son conocidas en el arte, e incluyen por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para MMT. Específicamente, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta cualquiera de las mutaciones en el gen MMT descritas en WO 2010/063288. La planta de cebada puede ser cualquiera de las plantas de cebada descritas en WO 2011/150933.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada caracterizada por una señalización de GA incrementada. En particular, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta una mutación en el gen *Slender1*, el cual codifica para la proteína DELLA. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta cualquiera de las mutaciones descritas por Chandler et al., *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 6, pp. 1603–1613, 2013, doi:10.1093/jxb/ert022, p. ej. en la Tabla 1 de ese trabajo. Por ejemplo, la planta de cebada puede portar una mutación en el gen *Slender1* que resulte en un gen *Slender1* mutante que codifique para una proteína DELLA mutante, en donde dicha proteína DELLA mutante porta una mutación en uno o más de los aminoácidos número 46, 490, 280, 268, 271, 277, 231, 481, 282, 277, 227, 485 o 237, por ejemplo una mutación seleccionada del grupo que consiste en G46E, S490F, R268H, G271D, A277T, V231M, R481H, V282F, A277T, G227E, S485F y C237Y. La numeración de los aminoácidos se provee en relación a la secuencia de la proteína DELLA disponible en Genbank bajo el número de acceso AK372064 o AF035820 (versión del 4 Febrero de 2013).

Bebida

Las bebidas preparadas mediante el procesado de un extracto acuoso de acuerdo con la invención en una bebida pueden tener una cantidad de propiedades útiles, incluyendo –pero no limitadas a- las propiedades descritas en esta sección.

En general es deseable que las bebidas de acuerdo con la invención contengan tan poco diacetilo como sea posible. De manera acorde, puede preferirse que la bebida comprenda diacetilo a un nivel que esté por debajo del umbral considerado sabor indeseable en cerveza lager. Preferiblemente, la bebida comprende 30 ppb de diacetilo como máximo, más preferiblemente 25 ppb de diacetilo como máximo, incluso más preferiblemente 20 ppb de diacetilo como máximo. Este en particular es el caso si la bebida es cerveza, por ejemplo cerveza lager.

La bebida de acuerdo con la presente invención puede ser por ejemplo un extracto acuoso tal como se describe en la presente, el cual opcionalmente ha sido fermentado. Así, la bebida puede comprender o consistir en dicho extracto acuoso o extracto acuoso fermentado y opcionalmente uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser por ejemplo cualquiera de los compuestos adicionales descritos en la presente en la sección “Compuestos adicionales” a continuación.

20

Compuestos adicionales

Los métodos de la invención pueden comprender la etapa de agregar uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser por ejemplo un compuesto saborizante, un conservante, un ingrediente funcional, un color, un endulzante, un agente regulador del pH o una sal. El agente regulador del pH puede ser por ejemplo un buffer o un ácido, tal como ácido fosfórico.

Los ingredientes funcionales pueden ser cualquier ingrediente agregado para obtener una función dada. Preferiblemente un ingrediente funcional hace que la bebida será más saludable. Ejemplos no limitativos de ingredientes funcionales incluyen vitaminas o minerales.

Los conservantes pueden ser cualquier conservante de grado alimenticio, por ejemplo puede ser ácido benzoico, ácido sórbico, sorbatos (p. ej. sorbato de potasio), sulfitos y/o sales de los mismos.

5 El compuesto adicional también puede ser CO₂. En particular, el CO₂ puede agregarse para obtener una bebida carbonatada.

10 El compuesto saborizante que se usa con la presente invención puede ser cualquier compuesto saborizante útil. El compuesto saborizante puede ser seleccionado por ejemplo del grupo que consiste en aromas, extractos vegetales, concentrados vegetales, partes de plantas e infusiones herbales. En particular, los compuestos saborizantes pueden ser lúpulo.

Ítems

La invención puede ser descrita adicionalmente a través de los siguientes ítems:

- 15 1. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - a. proveer granos de un cereal;
 - 20 b. incubar dichos granos en una solución acuosa hasta que los granos tengan un contenido de agua de al menos 35%, en donde al menos 2 litros de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por h, produciendo de este modo granos germinados;
 - c. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 35%;
 - d. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,
 - 25 produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.
- 30 2. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - a. proveer granos de un cereal;
 - b. someter a los granos de cereal a una etapa de germinación obteniendo de este modo granos germinados, en donde dicha etapa de germinación comprende

- incubar dichos granos en una solución acuosa hasta que los granos tengan un contenido de agua de al menos 30%, en donde al menos 2 litros O_2 por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por h;
- 5 c. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 20%; con la condición de que dichos granos de cereal no tienen un contenido de agua por debajo de 20% en ningún momento entre las etapas b) y c),
- d. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,
- 10 produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.
3. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dichos granos son incubados en dicha solución acuosa durante el rango de 20 a 72 h.
- 15 4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos del cereal están sumergidos en la solución acuosa durante toda la etapa de germinación.
- 20 5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos del cereal son sumergidos en solución acuosa, en donde al menos 2 litros de O_2 por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por h durante el rango de 24 a 60 h, preferiblemente durante el rango de 40 a 55 h.
- 25 6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 3, en donde la etapa de germinación comprende
- 30 i. al menos una etapa de incubar dichos granos en una solución acuosa, en donde al menos 2 litros de O_2 por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por h; y
- ii. al menos una etapa de incubar dichos granos de cereal en aire.

7. El método de acuerdo con el ítem 6, en donde dicha al menos una etapa de incubar dichos granos en una solución acuosa se lleva a cabo durante el rango de 16 a 40 h, preferiblemente durante el rango de 20 a 30 h.
- 5 8. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 6 a 7, en donde la etapa de incubar dichos granos de cereal en aire se lleva a cabo bajo aireación.
9. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 6 a 8, en donde la etapa de incubar dichos granos de cereal en aire se lleva a cabo durante el rango de 10 18 a 50 h, más preferiblemente durante el rango de 18 a 38 h, por ejemplo durante el rango de 22 a 35 h.
10. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde toda la etapa de germinación no excede las 72 h, más preferiblemente no excede 15 las 60 h, incluso más preferiblemente no excede las 54 h.
11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución acuosa es agua.
- 20 12. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el método además comprende agregar ácido giberélico (GA) a la solución acuosa.
13. El método de acuerdo con el ítem 12, en donde dicho GA se agrega a la solución acuosa a una concentración de al menos 100 nM, por ejemplo al menos 1000 nM.
- 25 14. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde al menos 3 litros, más preferiblemente al menos 4 litros, aún más preferiblemente al menos 5 litros, incluso más preferiblemente al menos 6 litros de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por 30 h.
15. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde al menos 20 g de O₂ por kg de grano de cereal, más preferiblemente al menos 30 g de O₂ por kg de grano de cereal, aún más preferiblemente al menos 40 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el rango de 40 a 100 g de O₂ por kg de 35

grano de cereal, tal como en el rango de 40 a 80 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el rango de 60 g de O₂ por kg de grano de cereal (peso seco) se hacen pasar por dicha mezcla de solución acuosa/ grano de cereal por h.

- 5 16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicho O₂ está comprendido en una mezcla gaseosa.

17. El método de acuerdo con el ítem 16, en donde la mezcla gaseosa es aire atmosférico.

- 10 18. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde al menos 10 litros, preferiblemente al menos 15 litros, más preferiblemente al menos 20 litros, aún más preferiblemente al menos 25 litros, incluso más preferiblemente al menos 30 litros de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal se hacen
- 15 pasar a través de dicha solución acuosa por h.

19. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde la solución acuosa además comprende un agente antiespumante.

- 20 20. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde la incubación se lleva a cabo a una temperatura en el rango de 15 a 30 °C, preferiblemente a aproximadamente 25 °C.

21. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los
- 25 granos se mantienen en el mismo recipiente durante la etapa b.

22. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos de cereal son incubados en dicha solución acuosa hasta que tienen un contenido de agua de al menos 35 %, tal como al menos 37 %.

- 30 23. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos provistos en la etapa a., han sido tratados con un agente antimicrobiano.

24. El método de acuerdo con el ítem 23, en donde el agente antimicrobiano es un
- 35 peróxido, tal como peróxido de hidrógeno.

25. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes en donde el método no comprende una etapa de remoción de radículas.
- 5 26. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el cereal es un cereal con cascarilla, por ejemplo una cebada con cascarilla.
27. El método de acuerdo con el ítem 26, en donde el método comprende una etapa de retirar al menos parte de dicha cascarilla antes de incubar dichos granos en una solución acuosa.
- 10
28. El método de acuerdo con el ítem 27, en donde la remoción de dicha cascarilla da por resultado una pérdida en el rango de 1 a 4%, tal como una pérdida en el rango de 1,5 a 3,0% del peso total de los granos de cereal.
- 15
29. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
- a. proveer granos germinados de un cereal que tienen un contenido de agua de al menos 35%;
- 20 b. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 35%;
- c. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos, produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.
- 25 30. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
- a. proveer granos germinados de un cereal que tienen un contenido de agua de al menos 20% con la condición de que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en ningún momento subsiguiente a la germinación;
- 30 b. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 20%;
- c. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos, produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.

31. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos de cereal germinado tienen un contenido de agua de al menos 25%, incluso más preferiblemente de al menos 30%, aún más preferiblemente de al menos 35% al momento de dividir finamente dichos granos de cereal.
5
32. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos de cereal germinado no han tenido un contenido de agua de menos de 25%, incluso más preferiblemente de menos de 30%, aún más preferiblemente de menos de 35% en ningún momento entre la finalización de la etapa de germinación y el momento de dividir finamente dichos granos de cereal.
10
33. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el cereal es cebada.
15
34. El método de acuerdo con el ítem 33, en donde la cebada es una cebada sin cascarilla o una variedad de cebada que tiene una cascarilla delgada.
35. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 32, en donde el cereal es un cereal sin cascarilla, por ejemplo trigo o una cebada sin cascarilla.
20
36. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 33, en donde el cereal es un cereal con cascarilla, tal como una cebada con cascarilla.
37. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el cereal es una cebada caracterizada por uno o más de los siguientes:
25
 - a. llevar una mutación en el gen que codifica una β -glucano sintasa
 - b. llevar una mutación en el gen que codifica LOX-1
 - c. llevar una mutación en el gen que codifica LOX-2
 - d. llevar una mutación en el gen que codifica MMT; y/o
 - e. llevar una mutación en el gen que codifica DELLA
38. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad α -amilasa de al menos 4 U/g, preferiblemente al menos 30 U/g de grano de cereal en base a peso seco.
35

39. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad α -amilasa de al menos 100 U/g de grano de cereal en base a peso seco.
- 5
40. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad β -amilasa de al menos 5 U/g de grano de cereal en base a peso seco.
- 10
41. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad dextrinasa limitante de al menos 5 mU/g de grano de cereal en base a peso seco.
42. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados contienen 4 g de radículas como máximo (peso seco) por 100g de granos de cereal germinado (peso seco).
- 15
43. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados contienen 2 g de radículas como máximo (peso seco) por 100g de granos de cereal germinado (peso seco).
- 20
44. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde los granos germinados tienen inmediatamente antes de la etapa de dividirlos finamente un contenido de nitrosaminas de 0,15 $\mu\text{g/kg}$ como máximo, preferiblemente 0,12 $\mu\text{g/kg}$ como máximo, por ejemplo 0,10 $\mu\text{g/kg}$ de granos de cereal (peso seco) como máximo.
- 25
45. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde la etapa C comprende macerar dichos granos de cereal germinado molidos con una solución de maceración a una temperatura en el rango de 50 a 80°C.
- 30
46. El método de acuerdo con el ítem 45, en donde dicha maceración se lleva a cabo en presencia de una o más enzima/s hidrolíticas agregadas.

- 5 47. El método de acuerdo con el ítem 46, en donde al menos una enzima hidrolítica se selecciona del grupo que consiste en enzimas degradadoras de la pared celular y del almidón incluyendo, pero no estando limitadas a, α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa limitante, pululanasa, β -glucanasa, xilanasa, glucoamilasa y proteasa.
48. El método de acuerdo con el ítem 45, en donde dicha maceración se lleva a cabo en presencia de al menos una β -glucanasa y al menos una xilanasa.
- 10 49. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 45 a 48, en donde durante dicha maceración se agregan 700 U como máximo, preferiblemente 350 U como máximo de glucoamilasa y/o α -amilasa exógenas por g de granos de cereal germinado (peso seco).
- 15 50. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 45 a 49, en donde durante dicha maceración se agregan 100 PUN como máximo de pululanasa exógena por g de grano de cereal germinado (peso seco).
- 20 51. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 45 a 46 y 49 a 50, en donde el cereal está caracterizado por un bajo nivel de β -glucano en los granos, y en donde no se agrega β -glucanasa durante la maceración.
- 25 52. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el método además comprende una etapa de filtrar dicho extracto acuoso.
53. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el extracto acuoso tiene una filtrabilidad de al menos 50%, tal como de al menos 60%.
- 30 54. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el extracto acuoso comprende 200 mg/l como máximo de β -glucano.
- 35 55. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el extracto acuoso comprende al menos 10 g, tal como al menos 15 g de maltosa por litro.

56. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el extracto acuoso comprende en el rango de 150 a 400 mg/l de FAN.
- 5 57. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el extracto acuoso comprende al menos 60 mg/l, preferiblemente al menos 65 mg/l de valina.
58. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde el
10 método no comprende una etapa de secado en horno.
59. Un método para producir una bebida, en donde dicho método comprende las etapas de:
- 15 i. preparar un extracto acuoso de acuerdo con el método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes;
- ii. procesar dicho extracto en una bebida.
60. El método de acuerdo con el ítem 59, en donde la etapa ii comprende las etapas de:
- 20 a. calentar dicho extracto acuoso opcionalmente en presencia de lúpulo o de extracto de lúpulo;
- b. enfriar el extracto acuoso;
- c. fermentar dicho extracto acuoso con levadura, produciendo de este modo una bebida fermentada.
- 25
61. El método de acuerdo con el ítem 60, en donde el método además comprende una etapa de sedimentación llevada a cabo luego de la etapa a o etapa b.
62. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde
30 todo el método se lleva a cabo en un lugar.
63. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 59 a 62, en donde la bebida comprende como máximo 25, tal como 20 ppb como máximo de diacetilo.
- 35

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos, sin embargo, no deben considerarse como limitando la invención. Las muestras de cebada usadas en los ejemplos a continuación se analizaron como sigue:

5 – Ensayo de germinación

Todas las muestras de cebada usadas en los ejemplos se evaluaron en cuanto a los parámetros índice de germinación, energía de germinación y sensibilidad al agua. Los datos se basaron en un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para un ensayo de germinación de 4 ml y un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para un ensayo de germinación de 8 ml de acuerdo con el Método Analytica-EBC 3.6.2 Energía Germinativa de la Cebada (Método BRF).

– Caracterización de las muestras de cebada

Se determinaron los pesos de mil granos mediante conteo automático usando un instrumento Data Count JR, mientras que para el fraccionamiento por tamaño se utilizó un Pfeuffer Sortimat K3 ajustado a 4 clases de grano diferentes con (X): $X > 2,8$ mm; $2,8 < X < 2,5$ mm; $2,5 < X < 2,2$ mm; $X < 2,2$ mm. Los datos de fraccionamiento se calcularon en base a muestras de 100 g de granos.

Los contenidos de proteína, agua y almidón de las muestras de cebada se determinaron usando un instrumento Foss 1241 NIT, usando calibración para cebada (FOSS BY213271; provisto por Foss, DK). Antes de la incubación (p.ej. 24 h) en solución acuosa, se re-determinó el contenido de agua de las muestras de 100 g de granos usando un instrumento Foss 1241 NIT usando calibración para cebada Foss BY303300 (Foss, Dinamarca).

El contenido de agua del grano se determinó midiendo primero el peso de la muestra de cebada correspondiente, seguido del secado de dicha muestra y determinación del peso de la muestra seca. Se considera que la diferencia en peso entre la muestra húmeda y seca es agua, y el contenido de agua es igual al peso del agua dividido por el peso total de la muestra (muestra húmeda).

– Análisis de los granos germinados

Las muestras de granos germinados se evaluaron en cuanto a los siguientes parámetros (p/p): contenido de agua, contenido de proteínas, proteínas

solubles y extracto de la muestra de malta. Los valores se determinaron usando un instrumento Foss 1241 NIT calibrado de acuerdo a los datos provistos por Foss (DK; calibrado MA000010).

5 **Ejemplo 1.** Remojado y germinación en una sola etapa

En los experimentos a escala de laboratorio, se colocó 1 kg de granos de cebada en un cilindro de Plexiglass y se lo aireó constantemente con aire atmosférico desde debajo de la columna de grano. Un dibujo esquemático del equipo usado se provee en la presente en la Figura 8. El grano se aireó desde abajo con niveles variantes de aire atmosférico durante distintos períodos de tiempo, durante los cuales el contenido de humedad del grano se elevó tal como se muestra en la Tabla 1 y se inició la germinación. Para este análisis se usaron diferentes variedades de cebada, tal como se indica en la leyenda de la figura. El flujo de aire se estableció usando un caudalímetro de masa y controlador SmartTrak® 50 (Sierra, CA, EEUU) y la temperatura se controló usando un termómetro de precisión Testo 735 (Testo, Alemania).

Se incorporaron en este sistema los sensores para medir el flujo de aire, temperatura, pH, conductividad, potencial rédox y contenido de O₂ del agua de remojado. Los sensores permiten no sólo monitorear el proceso en tiempo real, sino también ajustar las condiciones de remojado y germinación durante el proceso; este nivel de control no es posible siguiendo los protocolos actuales de malteado y preparación de cerveza.

Granos de una línea de cebada sin cascarilla se transfirieron al cilindro de Plexiglas y se incubaron durante 3 h en P3-hypochloran 1% (Ecolab, Suiza) siguiendo incubación por 45 h en agua ajustada a ácido giberélico (GA) 1 nM y Foamazol FCD511 0,01% (AB Vickers, Burton on Trent, UK). La incubación fue ya sea a 15 o 25°C, y los granos se airearon con ya sea 30, 60, 90 o 120 l/h de aire atmosférico. Las muestras se colectaron luego de 24 h y 48 h. Los resultados se resumen en la Figura 2. Tal como se muestra el acceso al aire promovió fuertemente la germinación de la cebada. Cuando se compara con la muestra no aireada (0 l/h) todas las muestras sometidas a un flujo de aire se caracterizaron por una diferencia notable en el desarrollo de los granos. En particular, los granos tuvieron un brote de crecimiento embrionario visible de más de 1 mm incluso luego de 24 h, a 15°C y flujo

de aire de 30 l/h. El incremento del flujo de aire causó desarrollo adicional del brote de crecimiento embrionario luego de 24 h a 15°C. A 25°C algunos granos desarrollaron radículas visibles (60, 90 o 120 l/h). El incremento del tiempo de incubación condujo a un avance en el desarrollo, y todos los granos sometidos a flujo de aire se

5 caracterizaron por la germinación y el desarrollo de radículas visibles luego de 48 h. Con el incremento de la temperatura de incubación, hubo un desarrollo mejorado de los primordios radiculares y radículas. Un flujo de aire de 90 l/h corresponde a 51g de O₂ por h. Si se calcula como O₂ por litro de H₂O, la cantidad variará a lo largo del tiempo, ya que los granos de cereal absorben agua durante la incubación.

10 Típicamente, un flujo de aire de 90 l/h corresponde a 64-121 g de O₂ por litro de H₂O por h.

El mismo experimento se llevó a cabo usando granos de una línea de cebada con cascarilla y los resultados se resumen en la Figura 3. Los granos de la línea de cebada con cascarilla también tuvieron un brote de crecimiento embrionario

15 visible de más de 1 mm luego de incubación por 24 h, a 25°C y flujo de aire de 30 l/h. El incremento del tiempo de incubación condujo a un avance en el desarrollo de todos los granos sometidos a un flujo de aire de 60 l/h caracterizado por la germinación y el desarrollo de radículas visibles luego de 48 h.

La absorción de agua en los granos se midió determinando el contenido de agua como % (p/p) en una línea de cebada sin cascarilla y en una y

20 línea de cebada con cascarilla, a 15°C y 25°C como ya se describió. Los resultados se resumen en la Tabla 1 (cebada sin cascarilla) y Tabla 2 (cebada con cascarilla) a continuación. El contenido de agua parece no depender mucho del flujo de aire, si el flujo de aire es de al menos 30 l/h. en contraste, el contenido de agua fue mucho

25 mayor luego de 24 h a 25°C que a 15°C.

Tabla 1. Absorción de agua (%), granos de cebada sin cascarilla

Flujo de aire	Temp. (T) = 15°C			T = 25°C		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0 l/h	11,4	31,7 ± 0,6	37,1 ± 1,4	11,4	36,7 ± 1,3	43,3 ± 0,9

30 l/h	11,4	35,5 ± 1,5	41,5 ± 1,8	11,4	40,6 ± 0,5	46,0 ± 0,1
60 l/h	11,4	35,1 ± 1,0	42,0 ± 1,2	11,4	38,9 ± 0,1	46,5 ± 0,6
90 l/h	11,4	34,3 ± 0,9	42,6 ± 1,4	11,4	38,3 ± 1,7	45,7 ± 0,5
120 l/h	11,4	35,5 ± 0,8	43,2 ± 1,1	11,4	38,2 ± 2,2	44,9 ± 0,6

Tabla 2. Absorción de agua (%), granos de cebada con cascarilla

Flujo de aire

Temp. (T) = 15°C

T = 25°C

	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0 l/h	13,6	32,5 ± 0,7	36,5 ± 0,3	13,6	38,3 ± 0,6	42,6 ± 0,7
30 l/h	13,6	33,4 ± 0,3	39,0 ± 0,4	13,6	39,3 ± 0,2	46,7 ± 0,6
60 l/h	13,6	32,9 ± 0,7	39,4 ± 0,6	13,6	39,7 ± 1,2	47,9 ± 0,2
90 l/h	13,6	34,1 ± 0,3	38,5 ± 0,2	13,6	40,3 ± 0,4	47,2 ± 0,5
120 l/h	13,6	33,3 ± 0,5	39,0 ± 0,4	13,6	40,1 ± 0,3	47,3 ± 0,8

5 De manera acorde, los resultados de la presente invención muestran que una temperatura de 25 °C puede ser más preferible para tasas iniciales de absorción de agua por parte del grano y por lo tanto en la velocidad total de germinación.

10 **Ejemplo 2.** Actividad enzimática

Durante la germinación, el grano de cebada comienza a secretar un espectro de enzimas hidrolíticas, tal como α -amilasas, dextrinasas limitantes y (1,3;1,4)- β -glucanasas. Típicamente, estas actividades enzimáticas son detectadas de una manera coordinada, siendo útiles las actividades de la α -amilasa, β -amilasa y/o dextrinasa limitante como un indicador general para la actividad de las enzimas

15

hidrolíticas. Así, las actividades de α -amilasa y dextrinasa limitante se determinaron luego de la germinación llevada a cabo de acuerdo con el método de la invención.

El GA es una fitohormona que activa la capa de aleurona en la cebada en germinación. Muchos malteros agregan GA a una baja concentración durante el proceso de malteado. Aquí, se suplementó el agua de incubación de los granos con GA a diferentes concentraciones al inicio del proceso. Se preparó una solución de GA₃ a partir de ácido giberélico (G7645, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en etanol absoluto y se agregó al agua. Las actividades de las enzimas se monitorearon midiendo las actividades de las enzimas hidrolíticas en extractos de granos a las 24 h y 48 h.

Preparación de las muestras

Antes del análisis de actividad enzimática las muestras de granos germinados se molieron usando un molino Foss Cyclotech estándar (Foss, Dinamarca), equipado con un anillo de triturado de carburo de tungsteno (Foss 10004463), propulsor niquelado (Foss 1000 2666) y un tamiz de salida de 1 mm (Foss 10001989). Todas las mediciones de enzimas en granos de cebada germinados se hicieron dentro de las 48 h luego del molido de la muestra.

Actividad de α -amilasa

La actividad de α -amilasa de los granos germinados se basó en harina preparada como se describió en la sección “Preparación de las muestras” anterior. En las pruebas para la determinación de la actividad α -amilasa se usó un kit Ceralpha de Megazyme usando equipo estándar de laboratorio. Los ensayos se hicieron de acuerdo con el protocolo del fabricante (K-CERA 01/12), incluyendo el cálculo de la actividad α -amilasa.

25 Actividad de β -amilasa

Para medir a actividad beta-amilasa de los granos germinados, la harina se preparó como se describió en la sección “Preparación de las muestras” anterior. Las pruebas de actividad β -amilasa siguieron las recomendaciones provistas con el kit Betamyl de Megazyme (K-BETA3).

30 Actividad dextrinasa limitante:

Para medir la actividad de dextrinasa limitante en granos germinados, la harina se preparó como se describió en la sección “Preparación de las muestras” anterior. La actividad de dextrinasa limitante se determinó usando un kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme. Las pruebas, incluyendo la medición de actividad, se hicieron de acuerdo con el protocolo del fabricante (T-LDZ1000 07/9).

Las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante se determinaron en una línea de cebada sin cascarilla. Los granos de cebada se hicieron germinar esencialmente como se describió en el Ejemplo 1 por incubación en agua en presenciasde Foamzol FCD511 0,01% y cantidades variables de GA bajo aireación. El flujo de aire se fijó en 90 l/h usando un caudalímetro de masa y controlador SmartTrak® 50 (Sierra, CA, EEUU) sin limpieza a 25°C (medido usando un termómetro de precisión Testo 735, Testo, Alemania). Las actividades de las enzimas en los granos germinados se midieron a las 24 y 48 h luego del embebido, con los resultados que se muestran en la Figura 4.

Además, las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante se determinaron tanto en una línea de cebada sin cascarilla como en una línea de cebada con cascarilla. Los granos de cebada se hicieron germinar esencialmente como se describió en el Ejemplo 1 por incubación en agua en presencia de Foamzol FCD511 0,01% y GA 1000 nM bajo aireación. Se usó un flujo de aire variable tal como se indica en las Tablas 3 y 4 a continuación usando un caudalímetro de masa y controlador SmartTrak® 50 (Sierra, CA, EEUU) sin limpieza a 25°C (medido usando un termómetro de precisión Testo 735, Testo, Alemania). Las actividades de las enzimas en los granos germinados se midieron a las 24 y 48 h luego del embebido, con los resultados que se muestran en la Tabla 3 (cebada sin cascarilla) y Tabla 4 (cebada con cascarilla).

Tabla 3. Actividades enzimáticas en granos de cebada sin cascarilla.

<i>Flujo de aire</i>		<i>Temperatura (T) = 15°C</i>			<i>T = 25°C</i>		
		0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0 l/h	$\alpha^*)$	1,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	n.d.	1,1 $\pm$ 0,2	n.d.	n.d.
	$\beta^{**})$	18,6 $\pm$ 0,3	19,4 $\pm$ 0,1	16,2 $\pm$ 2,6	18,6 $\pm$ 0,3	15,8 $\pm$ 0,6	16,8 $\pm$ 1,6
	LD ^{***)}	1,6 $\pm$ 2,2	0,3 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 2,2	1,1 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,8
30 l/h	α	1,1 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	13,6 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,7	33,1 $\pm$ 0,6
	β	18,6 $\pm$ 0,3	13,8 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 1,8	18,6 $\pm$ 0,3	16,3 $\pm$ 0,8	19,6 $\pm$ 0,6
	LD	1,6 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 3,3	5,5 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 2,2	5,2 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 3,1
60 l/h	α	1,1 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	13,4 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,1	48,3 $\pm$ 1,6
	β	18,6 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 1,8	18,6 $\pm$ 2,1	18,6 $\pm$ 0,3	15,5 $\pm$ 2,0	16,9 $\pm$ 3,7
	LD	1,6 $\pm$ 2,2	3,6 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 2,9	1,6 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 1,9	19,6 $\pm$ 2,5
90 l/h	α	1,1 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	13,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,1	59,3 $\pm$ 2,3
	β	18,6 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 1,6	16,9 $\pm$ 1,4	18,6 $\pm$ 0,3	15,1 $\pm$ 3,6	17,7 $\pm$ 2,5
	LD	1,6 $\pm$ 2,2	1,5 $\pm$ 1,4	7,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 2,2	4,0 $\pm$ 1,6	26,0 $\pm$ 3,3
120 l/h	α	1,1 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	12,7 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,1	59,3 $\pm$ 0,9
	β	18,6 $\pm$ 0,3	16,9 $\pm$ 1,8	17,7 $\pm$ 1,7	18,6 $\pm$ 0,3	14,6 $\pm$ 3,1	18,6 $\pm$ 3,4
	LD	1,6 $\pm$ 2,2	2,1 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 2,2	2,0 $\pm$ 0,4	22,4 $\pm$ 0,7

*) Actividad α -amilasa (U/g);**) actividad β -amilasa (U/g);

5 ***) actividad de dextrinasa limitante libre (mU/g)

Tabla 4. Actividades enzimáticas en granos de cebada con cascarilla.*).

<i>Flujo de aire</i>		<i>Temperatura (T) = 15°C</i>			<i>T = 25°C</i>		
		0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0 l/h	α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	β	$17,1 \pm 0,7$	$19,2 \pm 1,7$	$18,2 \pm 1,0$	$17,1 \pm 0,7$	$12,8 \pm 1,4$	$10,7 \pm 0,5$
	LD	n.d.	$2,7 \pm 2,6$	n.d.	n.d.	$1,6 \pm 2,2$	$1,6 \pm 0,2$
30 l/h	α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,9 \pm 2,7$
	β	$17,1 \pm 0,7$	$17,3 \pm 1,7$	$11 \pm 2,7$	$17,1 \pm 0,7$	$12,1 \pm 1,4$	$14,5 \pm 0,4$
	LD	n.d.	$2,7 \pm 0,6$	n.d.	n.d.	$0,3 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,6$
60 l/h	α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$4,4 \pm 6,2$
	β	$17,1 \pm 0,7$	$18,9 \pm 0,5$	$11,0 \pm 0,7$	$17,1 \pm 0,7$	$9,8 \pm 0,9$	$17,5 \pm 1,2$
	LD	n.d.	$0,6 \pm 0,8$	n.d.	n.d.	$0 \pm 1,8$	$5,1 \pm 0,4$
90 l/h	α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$4,1 \pm 5,8$
	β	$17,1 \pm 0,7$	$18,6 \pm 1,0$	$10,3 \pm 1,0$	$17,1 \pm 0,7$	$9,3 \pm 0,6$	$17,2 \pm 1,2$
	LD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0 \pm 1,4$	$9,2 \pm 2,6$
120 l/h	α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$9,3 \pm 0,2$
	β	$17,1 \pm 0,7$	$18,6 \pm 0,6$	$10,9 \pm 1,3$	$17,1 \pm 0,7$	$9,2 \pm 0,6$	$16,0 \pm 1,2$
	LD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$2,4 \pm 0,6$	$8,0 \pm 2,2$

*) Las abreviaciones son idénticas a las de la leyenda de la Tabla 3; n.d. = no determinada.

Como se muestra en la Figura 4, los niveles tanto de α -amilasa como de dextrinasa limitante se incrementaron significativamente luego de la adición de GA.

Ejemplo 3. Maceración

5 Los granos de cebada se hicieron germinar esencialmente como se describió en el Ejemplo 1. Luego de 2 d de remojo continuo y germinación, la fase líquida se drenó de los granos y el grano se molió en húmedo en un homogeneizador de escala de laboratorio (Omega Juicer 8226, Omega, EEUU). La extracción de los granos molidos en agua se hizo usando el cronograma de maceración mostrado en la
10 Figura 5. Este proceso también puede denominarse como “maceración”. Durante la maceración en general también ocurre una sacarificación. Durante la maceración típicamente se agregan CaCl_2 y H_3PO_4 al agua.

Durante el proceso de maceración industrial, pueden agregarse preparaciones de enzimas exógenas para continuar la conversión del almidón parcialmente degradado, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular en azúcares fermentables y aminoácidos que subsiguientemente sostendrán el crecimiento de las levaduras durante la fermentación. Se compararon las características de la maceración en presencia y ausencia de la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max brewing (Novozymes, Dinamarca). Ultraflo
15 Max es una mezcla de enzimas que comprende actividades β -glucanasa y xilanasa. Luego de la maceración, los extractos se filtraron usando un filtro de macerado estándar.

La eficacia de la mezcla de enzimas exógenas se evaluó midiendo la filtrabilidad de la mezcla de macerado que quedó luego del proceso de maceración. La
25 filtrabilidad se determinó usando un embudo de filtrado TOP ID de 140 mm (Urbanti Pequannock, N.J., EEUU) equipado con MN 614 $\frac{1}{4}$ $\varnothing$ 320 mm REF 527032 (Macherey Nagel Düren Alemania). El peso de las muestras se registró usando una balanza estándar (MPB1502 L, Mettler Toledo, Suiza). La filtrabilidad se determinó como la cantidad total de líquido obtenido luego de la filtración por 60 min de una
30 mezcla de macerado que comprendía 400 ml de solución de maceración, previamente suplementada con 100 g de cebada germinada molida.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 6 para granos de una línea de cebada sin cascarilla, la que fue germinada por 48 h a 25°C con aireación como la que se describió para el experimento detallado en el Ejemplo 1.

5 **Ejemplo 4. Mosto**

El mosto se preparó como se detalla en los experimentos del Ejemplo 3, usando granos de cebada germinados preparados como se describe en el Ejemplo 1. Los granos de cebada de una línea sin cascarilla se incubaron por 48 h a 25°C en presencia de GA, como se describió en el Ejemplo 1, bajo aireación con aire atmosférico a ya sea 45 l/h o 90 l/h. Los granos de cebada germinados se molieron en húmedo y se los maceró como se describió en el Ejemplo 3 – tanto en presencia como en ausencia de la mezcla de enzimas Ultraflo Max enzyme (Novozymes, Dinamarca).

Los niveles de azúcares fermentables –fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y maltotriosa- se determinaron de la siguiente manera. Luego de hervir el mosto, se lo diluyó 1:2000 con agua milliQ y subsecuentemente se lo filtró a través de un filtro con membrana de nylon de 0,2- μ m (Titan3 30 mm, Thermo Scientific, CA, EEUU). Alícuotas de 10 μ l se aplicaron primero a una columna CarboPac SA10-4 μ m, y subsiguientemente se analizaron en un Sistema Dionex ICS 5000+ Reagent-Free HPLC equipado con una columna CarboPac SA10-4 μ m Guard (4 $\times$ 50 mm). La elución de moléculas separadas se hizo con una corrida isocrática de KOH 25 mM por 20 min. Los carbohidratos se cuantificaron por integración del área del pico luego de la deducción de la línea de base y empleando carbohidratos puros de grado HPLC como estándares de referencia [D-(+)-glucosa, D-fructosa, D-(+)-maltosa, maltotriosa]. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 5.

Fermentación

El mosto, preparado como se describe en el Ejemplo 3, se hierve en presencia de lúpulo o de extracto de lúpulo, y el proceso de fermentación comienza mediante la inoculación convencional del extracto con una cepa de levadura de

cerveza adecuada. La fermentación, filtración de la cerveza y embotellado se llevan a cabo de acuerdo con protocolos tradicionales.

Preparación de cerveza a pequeña escala

- 5 El ejemplo compara cerveza preparada a partir de dos variedades de cebada, tratadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente con cerveza preparada a partir de cebada sin maltear tratada con una mezcla de enzimas para preparación de cerveza disponible comercialmente. Cuando fue posible, el mosto y las cervezas terminadas se analizaron y compararon con una cerveza lager comercial de referencia (denominada “Referencia” en la presente). Los datos de la cerveza lager de referencia se obtuvieron separadamente a partir de otras fuentes.
- 10

Materiales

A menos que se indique de otro modo los materiales se usaron sin modificar.

15

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
Variedad de Cebada	Sin Cascarilla 01	Con cascarilla 02	Con cascarilla 02	Sin cascarilla 01	80% malta 20% cebada
Tratamiento antes de la molienda	a 90 l/h aire 24 h WA 24 h A	a 90 l/h aire 24 h WA 24 h A	---	---	Malta preparada por método estándar

Molienda

Material tratado

Material sin tratar

Molido en juguera hogareña (Omega J822C)

Molido en MULTICRACKER

Preparación de la cerveza

La preparación de la cerveza se hizo bajo condiciones estándar usando una relación de molidos/agua de 1 a 4.

	Material tratado (ensayos 1 y 2)	Material sin tratar (ensayo 3)	Material sin tratar (ensayo 4)	Referencia
pH	5,20	5,70	5,70	Típicamente 5,20
Agregado de enzimas	Ultraflo® Max, 0,2 g/kg DM Attenuzyme® Flex, 1,0 g/kg DM	OndeaPro®, 2,0 g/kg DM	OndeaPro®, 2,0 g/kg DM	Ultraflo® Max, 0,08 g/kg DM Attenuzyme® Core, 0,2 g/kg DM

La cebada germinada, el material sin tratar y/o la malta se maceraron usando un programa de maceración estándar con 2 etapas de sacarificación en presencia de las enzimas indicadas.

Ultraflo® Max, Attenuzyme® Flex, Attenuzyme® Core y OndeaPro® están disponibles de Novozymes, Dinamarca. De acuerdo con el fabricante:

- Ultraflo® Max comprende β -glucanasa (700 EGU/g) y xilanas (250 FXU/g)
- Attenuzyme® Flex comprende glucoamilasa (400 AGU/g) y pululanasa (80 PUN/g) de acuerdo con la hoja de producto del fabricante
- Attenuzyme® Core comprende glucoamilasa (1600 AGU/g)
- OndeaPro® comprende β -glucanasa, Xilanas, α -amilasa, pululanasa (637 PUN/g), proteasa y lipasa.

Cuando se determinó la actividad de Attenuzyme® Flex tal como se describió en el Ejemplo 2 se halló que la cantidad de Attenuzyme® Flex que se usó correspondió a 16243 mU de actividad de dextrinasa limitante de cebada por g de solución de enzima. Más aún, se halló que la actividad glucoamilasa y α -amilasa combinada fue de 628.863 U por g de solución de enzima.

El mosto frío se colectó luego de filtrado estándar y hervido del mosto, agregándose lúpulo al comienzo del hervor.

- 5 El extracto original se ajustó con agua corriente para alcanzar un Plato final (en %P) de 11,5 luego del hervor y evaporación y el color del mosto se ajustó para lograr un color similar al de la cerveza de referencia.

Fermentation

- Se agregó Brewers Clarex® (disponible de DSM) al mosto frío a 0,1 g/kg de DM
- 10 • El mosto fue sembrado con 8^6 células/ml de levadura lager (*S. pastorianus*),
- El mosto sembrado se aireó con aire por 30 min
- La fermentación se llevó a cabo en un tanque de fermentación sin presurizar a 15 °C hasta el final de la fermentación
- La cerveza completamente fermentada se mantuvo a 4 °C hasta su
- 15 transferencia a un tanque

Transferencia a tanque

- La cerveza con menos de 5^5 células/ml en suspensión se transfirió a un tanque
- Se introdujo en el tanque CO₂ a 0,5 bar antes y después del llenado
- Se agregó CO₂ hasta un exceso de presión de 0,5 bar y la cerveza se mantuvo
- 20 a 4°C hasta la filtración

Filtración

- La cerveza se filtró a través de tres capas de hojas para filtrado profundo
- Se aplicaron 1,2 bar de presión de CO₂ a la cerveza en el tanque luego de la filtración
- 25 • La cerveza se mantuvo a 4 °C hasta el envasado

Envasado

La cerveza se envasó en botellas de 33 cl y se mantuvo a 4°C para los ensayos finales y evaluación sensorial.

Resultados del análisis

Azúcares en el mosto antes de la fermentación

- La concentración de azúcares fermentables totales se determinó esencialmente como se describió en el Ejemplo 4 y los resultados se muestran en la Tabla 5. Los niveles de glucosa son notoriamente más elevados en ambas infusiones preparadas de acuerdo con los métodos de la invención en comparación con la infusión preparada a partir de cebada sin maltear.

10 **Tabla 5**

	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		Referencia	
	g/100g /%P mosto	%	g/100g /%P mosto	%	g/100g /%P mosto	%	g/100g /%P mosto	%	g/100g /%P mosto	%
Sacarosa	0,008	1,9	0,016	1,8	0,019	2,5	0,021	2,2	0,024	3,3
Glucosa	0,202	47,4	0,497	56,3	0,054	7,1	0,046	4,8	0,333	46,1
Fructosa	0,012	2,8	0,014	1,5	0	0,0	0,013		0,016	2,2
Maltosa	0,193	45,3	0,338	38,3	0,533	70,8	0,651	68,7	0,312	43,2
Maltotriosa	0,011	2,6	0,017	1,9	0,147	19,5	0,217	22,9	0,037	5,1

Nitrógeno amino y β -glucano libres

- La concentración de nitrógeno amino libre (FAN) en el mosto antes de la fermentación así como en la cerveza terminada se determinaron de acuerdo con el método colorimétrico del protocolo estándar para FAN Gallary Beermaster de ThermoFisher. Los valores típicos de nitrógeno amino libre (FAN) en el mosto son de 200 mg/l. El FAN es importante para una buena viabilidad de las levaduras durante la fermentación. En general, son deseables niveles de FAN que son suficientemente altos para obtener una buena viabilidad de las levaduras. Los resultados relativos al FAN en mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 6a y en cerveza en la Tabla 6b.

- El β -glucano normalmente se degrada durante el malteado convencional. Niveles de β -glucano demasiado altos son indeseables, ya que esto puede causar una filtración problemática. El nivel de β -glucano en mosto antes de la fermentación así como en la cerveza se determinó usando el kit “Beta-Glucan (High MW)” de Thermo Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los resultados se muestran en la Tabla 6a (mosto antes de la fermentación) y Tabla 6b (cerveza).

Tabla 6a Mosto antes de la fermentación

mg/L	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
FAN	265	177	104	118	219
beta-glucano	143	107	86	151	73

10

Tabla6b - cerveza

mg/L	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
FAN	116	36	50	55	104
beta-glucano	60	50	44	58	46

Aminoácidos en mosto antes de la fermentación

La concentración de todos los aminoácidos estándar en el mosto antes de la fermentación se determinó usando el kit Waters AccQ•Tag Ultra siguiendo el procedimiento descrito en el mismo. Los resultados de aminoácidos en el mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 7.

En particular la concentración de valina antes de la fermentación es importante. Mientras más valina esté presente en el mosto, menor será la probabilidad de formación de “diacetilo indeseado” durante la fermentación –y por lo tanto mayor el tiempo de descanso DA. La concentración de valina es 5 veces (Ensayo 1) y 2 veces (Ensayo 2) más alta en mosto preparado de acuerdo con la invención en comparación al Ensayo 3.

Tabla 7

mg/l mosto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
Histidina	20	30	17	23	56
Asparagina	119	82	77	100	
Serina	8	44	26	43	67
Glutamina	79	45	10	16	
Arginina	92	92	59	77	144
Glicina	58	34	18	21	36
Ácido aspártico	9	54	45	53	79
Ácido glutámico	87	58	36	67	72
Treonina	81	44	26	33	77
Alanina	193	103	45	58	113
Prolina	317	105	38	70	
Cisteína	0	4	0	0	
Lisina	113	77	51	59	104
Tirosina	94	56	36	45	116
Metionina	37	24	17	21	42

mg/l mosto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
Valina	153	71	31	50	132
Isoleucina	80	43	16	28	79
Leucina	214	109	52	69	181
Fenilalanina	139	75	39	47	144
Triptofano	47	32	25	30	
Aminoácidos totales	1960	1212	681	907	

- Se determinaron varios valores clave para la preparación de cerveza y fermentación y se los comparó con la referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Es notorio que las cervezas preparadas por los métodos de la invención
- 5 tuvieron niveles de diacetilo significativamente más bajos. En general se prefiere que los niveles de diacetilo sean lo más bajos posibles.

Tabla 8

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Referencia
Extracto original, %P	11,4	11,5	11,7	11,5	10,1
RDF, %	70,8	70,5	74,9	72,5	70,3
pH	4,06	3,90	4,21	4,15	4,25
Alcohol, vol%	5,2	5,2	5,6	5,4	4,54
Color, unidades EBC	5,4	8,0	5,4	7,1	6,4
Amargor	14	14	16	18	16
Diacetilo, ppb	14	15	27	28	22
SO₂, mg/l	1	1	1	1	3

Panel de evaluación sensorial.

Todas las cervezas preparadas como se describe en este ejemplo se sometieron a la evaluación de un panel sensorial. El valor de sabor total para todas ellas fue aceptable. Una diferencia entre las distintas cervezas fue que la cerveza del

5 Ensayo 3 tuvo la puntuación “notorio” para el sabor “jabonoso, grasoso, diacetilo, rancio aceitoso”, mientras que la cerveza del Ensayo 2 (preparada de acuerdo con la invención) sólo tuvo la puntuación “ligeramente” para este sabor.

Ejemplo 6

10 *Remojado de trigo:*

Cuatro variedades de trigo disponibles comercialmente (1-Benchmark, 2-Creator, 3-Pistoria, 4-Sheriff) se desinfectaron por 1h en hypochloran 0,1%, luego se las remojó e hizo germinar por incubación en un tanque por 24h o 48h en agua corriente que contenía GA₃ 1000 nM y 0,01% de agente antiespumante

15 (Sigma 204). La incubación se llevó a cabo a 25°C, y se hicieron pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

Luego de la incubación se determinó la actividad de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 9. Luego de 48 h de incubación la actividad α -

20 amilasa y dextrinasa limitante se incrementaron de manera significativa.

Ejemplo 7

Remojado de cebada con cascarilla:

Se desinfectaron 8 variedades de cebada comercialmente

25 disponibles (1 – Alexis, 2 – Chief, 3 – Chill, 4 – Paustian, 5 – Planet, 6 – Prestige, 7 – Quench, 8 - Tipple) por 1h en hypochloran 0,1%, luego se las remojó e hizo germinar por incubación en un tanque por 24h o 48h en agua corriente que contenía GA₃1000 nM y 0,01% de agente antiespumante (Sigma 204). La incubación se llevó a cabo a 25°C, y se hicieron pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque

30 durante toda la incubación.

Luego de la incubación se determinó la actividad de α -amilasa esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la

Figura 10. Luego de 48h de incubación la actividad α -amilasa se incrementó de manera significativa

Ejemplo 8

5 *Pelado de cebada con cascarilla:*

Se peló cebada con cascarilla (Con cascarilla 02) mediante tratamiento mecánico con papel de lija por 1, 2, 4 o 16 minutos con el fin de remover parcialmente la cascarilla. El tratamiento resultó en una pérdida de peso de 1, 2, 3 o 5 %. Los granos de cebada pelada se desinfectaron 1h en hypochloran 0,1%, luego se
10 las remojó e hizo germinar por incubación en un tanque por 24h o 48h en agua corriente que contenía GA₃1000 nM y 0,01% de agente antiespumante (Sigma 204). La incubación se llevó a cabo a 25°C, y se hicieron pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

Luego de la incubación se determinó la actividad α -amilasa, β -
15 amilasa y dextrinasa limitante esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 11. El pelado de los granos de cebada hasta una pérdida de peso del 2% resulta en una inducción significativa de las actividades α -amilasa y dextrinasa limitante.

20 **Ejemplo 9**

Descanso en aire de cebada sin cascarilla y de cebada con cascarilla:

Cebada sin cascarilla (Sin cascarilla 01) y con cascarilla (Con cascarilla 02) se desinfectaron 1h en hypochloran 0,1%, luego se las remojó e hizo germinar de acuerdo con diferentes regímenes de remojado.

25 WA = agua/aire:

Incubación en un tanque en agua corriente que contiene GA₃1000 nM y 0,01% de agente antiespumante (Sigma 204) a 25°C, mientras se hacen pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

30 A = aire

Incubación de granos de cereal húmedos en un tanque. Durante toda la incubación se hacen pasar 90 l de aire/h a través de los granos de cereal húmedos desde el fondo del tanque. La incubación se lleva a cabo a 25°C.

Los granos de cereal se incubaron en WA o WA y A durante los tiempos indicados en la Figura 13, y los resultados se muestran en la Figura 13. La Figura 12A muestra los resultados para Sin cascarilla 01 y la Figura 12B muestra los resultados para Con cascarilla 02. Incubación en agua por 24h bajo aireación seguido de 24-32h de incubación sin agua, pero aún bajo aireación resulta en granos de cereal con actividades enzimáticas muy altas.

Ejemplo 10

Se preparó cebada germinada esencialmente como se describió antes en el Ejemplo 1. Más específicamente, granos de cebada de variedades Sin cascarilla 01 y con cascarilla 02 se desinfectaron 1h en hypochloran 0,1%, luego se las remojó e hizo germinar por incubación por 48h en agua corriente que contenía GA1000 nM y 0,01% de agente antiespumante. La incubación se llevó a cabo a 25°C, y se hicieron pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación. La cebada germinada se secó por congelamiento y fue pesada. Las radículas formadas se eliminaron usando equipo Munich antiguo y la cebada germinada se pesó nuevamente. La diferencia en masa antes y después de la eliminación de las radículas se consideró como la masa de las radículas. Se determinó el peso de 4 muestras distintas, pero sólo se incluyen las primeras 3, ya que la última muestra contenía polvo. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa antes (g)	Masa después (g)	Masa de radículas (g)	Masa antes (g)	Masa después (g)	Masa de radículas (g)
1	99,864	98,822	1,042	99,882	99,387	0,495
2	100,024	99,135	0,889	99,871	99,47	0,401
3	98,599	97,629	0,97	99,704	99,282	0,422
media			0,97			0,44
desv est			0,08			0,05

Granos de cebada de la misma partida Sin cascarilla 01 y con cascarilla 02 también se remojaron e hicieron germinar por 96 h mediante métodos

estándar. La cebada germinada se secó por congelamiento y fue pesada. Las radículas formadas se eliminaron usando equipo Munich antiguo. Luego de eliminar las radículas la cebada se pesó nuevamente. La diferencia en masa antes y después de la eliminación de las radículas se consideró como la masa de las radículas. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa antes (g)	Masa después (g)	Masa de radículas (g)	Masa antes (g)	Masa después (g)	Masa de radículas (g)
1	95,167	87,026	8,141	96,343	89,867	6,476
2	95,281	87,046	8,235	95,602	89,102	6,5
3	95,318	87,113	8,205	95,338	89,072	6,266
media			8,19			6,41
desv est			0,05			0,13

La Tabla 11 muestra una comparación entre la masa (en g) de radículas de la cebada germinada por los métodos de la invención (48h WA) y en cebada remojada por métodos convencionales (Malteado 96h). Se evidencia que la cebada germinada por los métodos de la invención tienen una formación de radículas significativamente reducida. La Figura 13 muestra la pérdida de peso luego de la eliminación de radículas en %.

Tabla 11

Con cascarilla 02_ 48hWA	0,44	0,05
Sin cascarilla 01_ 48hWA	0,97	0,08
Con cascarilla 02_ Malteado 96h	6,41	0,13
Sin cascarilla 01_ Malteado 96h	8,19	0,05

Ejemplo 11

La nitrosamina NDMA se forma en particular en las raíces durante el secado en horno de la malta (Wainwright (1986) J Inst Brew 92 73-80). Como se describió antes en el Ejemplo 10, una ventaja de los granos de cereal germinado preparados mediante los métodos de la invención es que comprenden menos raíces

comparados con la malta verde común. El contenido de NDMA en la malta contemporánea es bajo, pero sin embargo puede ser ventajoso reducir aún más sus niveles.

5 El contenido de NDMA se analizó en cebada, en granos de cebada germinada preparados mediante los métodos de la invención (Denominada “Malta 1a” en este Ejemplo) y en tres maltas producidas industrialmente. Todas las maltas producidas industrialmente habían sido tratadas para eliminar las radículas mediante métodos estándar.

10 La cebada-1, Malta-1a y Malta-1b fueron todas preparadas a partir de la misma partida de una variedad de cebada con cascarilla (Con cascarilla 02), mientras que las otras dos muestras de malta Malta-2 y Malta-3 ambas derivaron de otras partidas de cebada. La Malta-1a fue producida esencialmente como ya se describió en el Ejemplo 1. Así los granos de cebada se desinfectaron en un lavado con hypochloran 0,1% por 1h, luego se las remojó e hizo germinar por incubación por 48h
15 en agua corriente que contenía GA_3 1000 nM y 0,01% de agente antiespumante. La incubación se llevó a cabo a 25°C, y se hicieron pasar 90 l de aire/h a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación. La cebada germinada se secó por congelamiento antes de analizar el contenido de NDMA mediante GC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 14. El análisis indica claramente que hay menos
20 NDMA presente en la Malta-1a en comparación con maltas producidas mediante malteado estándar que incluye secado en horno, incluso si el estándar ha sido sometido a eliminación de radículas.

Resumen

25 Los desafíos de futura falta de agua y energía deben ser abordados de una manera social, económica y medioambientalmente responsable. Al respecto, la presente invención contribuye con la sustentabilidad a largo plazo de la producción de cerveza en términos de uso reducido de agua y energía. A través de la eliminación del proceso de secado en horno, combinado con la integración directa del remojo y
30 germinación en el proceso de preparación de la cerveza, la aplicación de los métodos de la presente invención reducen de gran manera el consumo y costos de la fabricación de cerveza.

La presente invención puede contribuir a la reducción de costos y de la presión ambiental en las industrias de malteado y cervecera de muchas maneras, incluyendo:

- 5 – Los procesos de remojado y germinación que actualmente tardan varios días en completarse pueden completarse mucho más rápido
- Los procesos de remojado y germinación pueden llevarse a cabo en un único recipiente en un solo sitio
- Pueden eliminarse las etapas de descanso en aire y segundo remojado tradicionales
- 10 – Los procesos pueden reducir el consumo de agua, por ejemplo en hasta 40%
- Pueden eliminarse los altos costos del secado en horno de la malta
- Pueden eliminarse los altos costos del transporte de la malta desde la maltería hasta la cervecería
- 15 – El equipo y las instalaciones necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención pueden ser compatibles con los equipos existentes en cervecerías y por lo tanto no requerirían nuevos y elevados gastos de capital.

Literatura citada

- Bamforth C (2009) En: Beer: Tap into the art and science of brewing. Oxford University
20 Press.
- Briggs DE (1998) En: Malts and Malting. Blackie &, Professionals.
- Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Medhurst A, Stone BA, Newbigin EJ, Bacic A y Fincher GB (2006) Cellulose Synthase-like CslF Genes Mediate the Synthesis of Cell Wall (1,3;1,4)- β -D-Glucans. Science 311, 1940-1942.
- 25 Burton RA, Jobling SA, Harvey AJ, Shirley NJ, Mather DE, Bacic A, Fincher GB (2008) The genetics y transcriptional profiles of the cellulose synthase-like HvCslF gene family in barley (Hordeum vulgare L.). Plant Physiol., 146: 1821-1833.
- Burton RA, Collins HM, Kibble NAJ, Smith JA, Shirley NJ, Jobling SA, Henderson M, Singh RR, Pettolino F, Wilson SM, Bird AR, Topping DL, Bacic A y Fincher GB
30 (2011) Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- β -D-glucans and alters their fine structure. Plant Biotechnol. J., 9: 117-135.
- Fincher GB (2011) Biochemistry, Physiology and Genetics of Endosperm Mobilization in Germinated Barley Grain. En: Barley: Production, Improvements and Uses. Ed.
35 Ullrich SE, Wiley-Blackwell, Chapter 14, pp 449-477.

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

- 5 Taketa, S., Yuo, T., Tonooka, T., Tsumuraya, Y., Inagaki, Y., Haruyama, N., Larroque, O., y Jobling, S. A. (2011) Functional characterization of barley beta-glucan-less mutants demonstrates a unique role for CslF6 in (1,3;1,4)- β -D-glucan biosynthesis, J. Exp. Bot. 63, 381-392.

Reivindicaciones

1. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - 5 a. proveer granos de un cereal;
 - b. someter a los granos de cereal a una etapa de germinación obteniendo de este modo granos germinados, en donde dicha etapa de germinación comprende
 - 10 incubar dichos granos en una solución acuosa hasta que los granos tengan un contenido de agua de al menos 30%, en donde se hacen pasar a través de dicha solución acuosa al menos 2 litros de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal por h;
 - c. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 20%, con la condición de que dichos granos de cereal no tienen un contenido de agua por debajo de
 - 15 20% en ningún momento entre las etapas b) y c);
 - d. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos, produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los granos de cereal se
 - 20 sumergen en la solución acuosa durante toda la etapa de germinación
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de germinación comprende
 - 25 i. al menos una etapa de incubar dichos granos en una solución acuosa, en donde se hacen pasar a través de dicha solución acuosa al menos 2 litros de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal por h; y
 - ii. al menos una etapa de incubar dichos granos de cereal en aire.
- 30 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se hacen pasar a través de dicha solución acuosa al menos 3 litros, más preferiblemente al menos 4 litros, aún más preferiblemente al menos 5 litros, incluso más preferiblemente al menos 6 litros de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal por h.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho O₂ está comprendido en una mezcla gaseosa, en donde la mezcla gaseosa es aire atmosférico.
- 5 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde toda la etapa de germinación no excede las 72h, más preferiblemente no excede las 60h, incluso más preferiblemente no excede las 54h.
- 10 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cereal es un cereal con cascarilla, y el método comprende una etapa de remover al menos parte de dicha cascarilla antes de incubar dichos granos en una solución acuosa.
- 15 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los granos germinados contienen 4 g de radículas como máximo (peso seco) por cada 100 g de granos de cereal germinado (peso seco).
- 20 9. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - a. proveer granos germinados de un cereal que tienen un contenido de agua de al menos 20% con la condición de que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en ningún momento subsiguiente a la germinación;
 - 25 b. dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tienen un contenido de agua de al menos 20%;
 - c. preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos, produciendo de este modo un extracto acuoso del cereal.
- 30 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cereal es cebada.
- 35 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad α -amilasa de al menos 4 U/g de grano de cereal en base a peso seco.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad β -amilasa de al menos 5 U/g de grano de cereal en base a peso seco.
- 5 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los granos germinados tienen una actividad dextrinasa limitante de al menos 5 mU/g de grano en base a peso seco.
- 10 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los granos germinados contienen 4 g de radículas como máximo (peso seco) por cada 100g de granos de cereal germinado (peso seco).
- 15 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto acuoso comprende al menos 10 g, tal como al menos 15 g de maltosa por litro.
- 16 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto acuoso comprende al menos 60 mg/l de valina.
- 20 17. Un método para producir una bebida, en donde dicho método comprende las etapas de:
- i. preparar un extracto acuoso mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes;
 - ii. procesar dicho extracto en una bebida.
- 25 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la etapa ii comprende las etapas de:
- a. calentar dicho extracto acuoso opcionalmente en presencia de lúpulo o extracto de lúpulo;
 - 30 b. enfriar el extracto acuoso;
 - c. fermentar dicho extracto acuoso con levadura, produciendo de ese modo una bebida fermentada.

Resumen

La presente invención se relaciona con métodos para preparar bebidas basadas en cereales. En particular, la presente invención provee, por ejemplo, métodos para el remojado y germinación del cereal bajo aireación continua. La presente invención también provee la molienda húmeda de granos de cereal germinado y la transferencia directa del grano germinado, sin secado, a la cervecería para su procesamiento ulterior. Comparado con los métodos actuales, los métodos de la presente invención reducen significativamente el consumo de agua, el consumo de energía y la necesidad de transporte.