

**MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CEREAL Y MÉTODO PARA
PROCESAR ESTE EXTRACTO COMO UNA BEBIDA**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere, en términos
generales, a la germinación y preparación de extractos
acuosos de cereales (por ejemplo preparados mediante
maceración), incluyendo los procesos para producir cerveza.
La invención por lo tanto provee un proceso de aporte bajo,
10 rápido y continuo para preparar cerveza a partir de granos
de cebada. Los métodos pueden realizarse en una instalación
individual. La presente invención es igualmente aplicable a
la germinación y preparación de extractos acuosos de otros
granos de cereal - incluyendo arroz, sorgo, maíz, mijo y
15 trigo - así como a procesos de elaboración de cerveza que
comprenden complementos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En los procesos de elaboración de malta
comerciales, los granos de cebada se germinan, o maltean,
20 bajo condiciones controladas que permiten la movilización
parcial de las reservas de almidón y proteínas del
endosperma amiláceo a lo largo de un periodo de 4 a 6 días.
El proceso de elaboración de malta típicamente se inicia
sumergiendo los granos secos de cebada en agua. Este

proceso es conocido como remojo en el cual el objetivo es no solamente limpiar el grano, sino también elevar su contenido de humedad hasta aproximadamente 40-45% (p/p) para que el siguiente paso de movilización del endosperma ocurra más rápidamente. Durante el remojo, el agua se drena una vez para permitir la re-aireación del grano. Este paso es conocido como el "descanso de aire" y se considera necesario, principalmente debido a que el grano sumergido se queda sin oxígeno después de aproximadamente 16 horas. Después de un "descanso de aire" de aproximadamente 8 horas, el grano se vuelve a sumergir en agua para completar el tratamiento de remojo durante otro periodo de 8 horas - o en una serie de pasos de volver a remojar. El proceso de remojo de dos pasos para incrementar el contenido de humedad del grano seco hasta 40%, o más alto, toma aproximadamente 32 horas en total. En algunas malterías, se utilizan técnicas de remojo por aspersión.

Los granos remojados se extienden para la germinación, durante la cual las enzimas secretadas a partir de la aleurona y las células del epitelio escutelar - junto con algunas que pre-existen en las células del endosperma amiláceo - degradan las paredes celulares, el almidón y las proteínas. Bajo condiciones normales de germinación, se cree que la fitohormona ácido giberélico

(GA por sus siglas en inglés) es sintetizada en la región nodal, o en otra parte en el embrión, desde donde ésta se difunde a lo largo del gradiente de agua (Fincher, 2011).

El malteador normalmente tiene como objetivo
5 inducir rápidamente en los granos la síntesis de la mayor cantidad de enzimas degradadoras de almidón como sea posible. En muchos programas de malteado comerciales, se agrega GA para acelerar el proceso de secreción de enzima desde la capa de aleurona. Las enzimas que degradan el
10 almidón – las cuales incluyen α - y β -amilasas, enzimas que des-ramifican el almidón y α -glucosidasas – parcialmente despolimerizan las reservas de almidón del grano a monosacáridos, oligosacáridos, y glucosa (Smith et al., 2005; con respecto a dichas β -amilasas, es notable que
15 éstas son depositadas en el endosperma amiláceo durante el desarrollo del grano). Los productos de despolimerización del almidón posteriormente son utilizados por las células de levadura como una fuente de carbono y se fermentan hasta etanol de cerveza. El poder diastásico es un parámetro de
20 calidad del malteado que se refiere a los niveles de actividad de la batería de enzimas que degradan el almidón, con valores altos deseables para elaborar cerveza.

Otros componentes principales del grano de cebada incluyen proteínas de almacenamiento, las cuales también se

encuentran en las células muertas del endosperma amiláceo e incluyen hordeínas así como agua y proteínas solubles en sal. La despolimerización de éstas también comienza de manera natural en el proceso de malteado, pero el cervecero puede controlar el grado de degradación de estas proteínas de modo que se liberen suficientes péptidos y aminoácidos para apoyar el crecimiento de las levaduras durante el paso de germinación subsiguiente en la cervecería. Sin embargo, si la degradación de las proteínas de almacenamiento se produce en exceso, las proteínas liberadas pueden causar dificultades en el proceso de elaboración de cerveza. En particular, niveles elevados de proteína soluble liberada pueden precipitar y formar turbidez indeseable en el producto final de cerveza o incrementar el potencial para formación de aldehído de Strecker durante el almacenamiento de la cerveza. En las especificaciones de la calidad del malteado, es deseable un nivel adecuado de nitrógeno de amino libre (FAN por sus siglas en inglés) para el crecimiento de la levadura durante la fermentación. El Indicie Kolbach es una medida de la relación de proteína soluble:proteína total, generalmente prefiriéndose malta que dé origen a un índice Kolbach adecuado. El grado de degradación de proteína es, por lo tanto, un desafío continuo para el malteador. Además del problema de precipitación de la cerveza que puede ser asociado con

exceso de proteína extraída, los niveles muy altos de FAN también pueden llevar a dificultades, a través del potencial para formación de mal sabor.

Los malteadores también tratan de inducir niveles altos 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 arabinoxilanos. Los (1,3;1,4)- β -glucanos no completamente degradados pueden ser especialmente problemáticos para los cerveceros, debido a que éstos pueden ser extraídos de la malta en formas solubles que forman soluciones acuosas altamente viscosas que hacen lentos los procesos de filtración en la cervecería y contribuyen a turbidez indeseable en la cerveza final. Por lo tanto, los niveles bajos de (1,3;1,4)- β -glucano soluble representan un parámetro importante de la calidad del malteado, mientras que niveles altos de enzimas (1,3;1,4)- β -glucanasa siguen siendo medidas importantes de la calidad del malteado.

Como se indicó anteriormente, el proceso de germinación típicamente toma aproximadamente 4 a 5 días. Después de los pasos de germinación controlada, la malta húmeda se seca desde un contenido de humedad de aproximadamente 40% hasta 4 a 5%. Este proceso de secado, denominado horneado, consume mucha energía y representa un costo importante para la industria.

El secado en horno ha sido considerado una parte importante de la producción de cerveza por múltiples razones. Una razón importante es que durante la germinación se forman raicillas (también referidos como "culmos"). Las

5 raicillas tienen un sabor amargo, el cual afecta el sabor residual de la cerveza, y además, las raicillas pueden añadir un color indeseable a la cerveza (véase Beer Brewing Technology (1999):183, publicado por Shokuhin Sangyo Shimbun así como el documento US 9,326,542). Una vez que la

10 malta verde ha sido secada con horno las raicillas se pueden retirar fácilmente utilizando por ejemplo un desraizador. De conformidad con el libro de texto general "Malts and Malting" de D.E. Briggs después los "culmos se deben retirar [...] debido a que éstos son extremadamente

15 higroscópicos, ricos en sustancias nitrogenadas solubles, contienen sustancias amargas y con poco sabor y pueden ser ricos en dióxido de azufre y/o nitrosaminas. El desraizado se debe realizar poco después de quitar la malta del horno para ayudar a enfriarla y antes que las raicillas recojan

20 humedad del aire, se vuelvan aguadas y plegables (menos quebradizas) y por lo tanto, más difícil de romper y separar" (D.E. Briggs, Malts and Malting; p695 First Edition, 1998 Published by Blackie & Professionals, London, ISBN0 412 29800)

25 La malta secada en horno generalmente tiene un

nivel de humedad de 4.5-5.0%. La malta secada en horno se transporta posteriormente desde la maltería hacia la cervecería por carretera, ferrocarril o mar. Esto se relaciona con el hecho que los procesos de malteado y elaboración de cerveza tradicionalmente han sido llevados a cabo en diferentes ubicaciones y a menudo por diferentes entidades corporativas.

En la cervecería, la malta secada en horno se muele para romper el grano, y el contenido resultante se extrae con agua caliente en un proceso conocido como maceración. El material extraído incluye almidón, proteína y moléculas de la pared celular parcialmente degradados como se describió anteriormente, y éstos son degradados adicionalmente por enzimas del grano endógenas que se extrajeron de la malta. En esta etapa, algunos cerveceros agregan fuentes de carbono adicionales – y generalmente más baratas (complementos) – para apoyar la fermentación de levadura subsiguiente y para compensar los costos más altos de la malta. Dichos complementos pueden ser cebada, arroz, trigo u otras harinas de cereales provenientes de granos no germinados, pero su adición podría necesitar la adición concomitante de enzimas hidrolíticas, debido a que no hay suficientes enzimas endógenas en la malta para degradar los componentes del complemento. Las enzimas añadidas por lo

general provienen de extractos no purificados y relativamente baratos de cultivos fúngicos y/o bacterianos. La adición de enzimas exógenas no es legal en algunos países, particularmente en donde la cerveza se debe producir en entornos estrictamente regulados.

La degradación adicional del almidón, y otros componentes del endosperma extraídos en agua caliente, procede en un proceso conocido como sacarificación. Después de la maceración, los extractos se filtran, con frecuencia en una cuba de filtración, y se enfrían. El extracto se puede hervir en presencia del lúpulo o extractos del lúpulo, y después que se enfría se agregan los cultivos de levadura para la fermentación de los azúcares liberados hasta etanol. La cerveza producida de esta manera por lo general se madura y filtra antes de embotellar. La cerveza también se puede carbonatar antes del embotellado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para la germinación y preparación rápida de extractos acuosos de cereales. Los métodos aceleran significativamente el proceso de preparación del mosto para la producción de bebidas basadas en cereales, al tiempo que mantienen el potencial para preparar dicho mosto con niveles elevados de azúcares fermentables, y de preferencia con niveles bajos de β -glucano y xilano. En particular, las bebidas

preparadas a partir de dicho mosto se pueden caracterizar por un nivel bajo de sabor astringente.

La invención demuestra que se puede llevar a cabo un proceso de elaboración de cerveza continuo e integrado yendo desde grano de cebada seco hasta cerveza en una locación individual. En ese sentido, la presente invención provee métodos para el remojo y germinación combinados de grano de cereal a un contenido de humedad de por ejemplo >30 %, de preferencia >35 %, mediante aireación constante. De esta manera la invención puede proveer ahorros significativos de agua mediante la eliminación del secado de la malta así como ahorros significativos de energía por ejemplo mediante omisión del paso de secado en horno.

En un aspecto de la presente invención, los granos se sumergen e incuban en una solución acuosa (típicamente agua), en la cual el O₂ se suministra opcionalmente a dicho líquido. Típicamente, dicho O₂ se suministra continuamente durante toda la incubación, la cual por ejemplo puede estar en el intervalo de 20 a 72 horas y en general permite que el grano alcance no solamente el contenido de humedad apropiado sino también que germine en una manera controlada. El paso de germinación también puede comprender uno o más descansos de aire típicamente después del paso de incubación en solución acuosa bajo aireación.

Este proceso de germinación controlada se puede acortar mediante la adición de uno o más compuestos capaces de acelerar la germinación. Por ejemplo, se puede agregar la fitohormona ácido giberélico (GA) al líquido acuoso - ya sea desde el inicio o durante la incubación. El GA "activa" la expresión de gen en sus células objetivo, específicamente la aleurona y el epitelio escutelar del grano de cebada, incluyendo genes que codifican para enzimas endógenas necesarias para la hidrólisis de almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular. Por lo tanto, el tiempo total requerido para el remojo y germinación se puede reducir desde más de 5 días en los procesos de elaboración de cerveza convencionales hasta aproximadamente 2 días o menos utilizando la presente invención. Sin embargo, en algunas modalidades no se agrega GA exógeno durante la germinación.

Después de los pasos de germinación, la presente invención puede comprender un paso de tratamiento térmico de los granos de cereales terminados. A través de todos los pasos de germinación, la temperatura de preferencia se controla a un nivel predeterminado, el cual típicamente es menor de 35 °C. En un aspecto de la invención, los pasos de germinación son seguidos por un paso de tratamiento térmico a un intervalo de temperatura de por ejemplo 35 a 55 °C. Mediante la invención se demuestra que dicho tratamiento

térmico mejora las propiedades benéficas del grano germinado, tales como niveles mejorados de α -amilasa y limita la dextrinasa temprano durante la germinación.

En otro aspecto de la presente invención, el
5 cereal es un cereal con cascarilla que se descascarilla antes de la germinación con el fin de retirar por lo menos parte de dicha cascarilla. Estos pasos de descascarillar y/o tratamiento térmico han demostrado ser altamente benéficos para incrementar el nivel de enzimas hidrolíticas
10 en los granos germinados para preparar mosto con niveles elevados de azúcares fermentables.

Después del paso de germinación y/o tratamiento térmico, los métodos pueden comprender un paso de dividir finamente los granos de cereal germinados y/o tratados con
15 calor. Un aspecto particularmente interesante de la invención es que los métodos de la invención permiten proceder a dividir finamente los granos de cereal germinados inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico. Por consiguiente, los métodos en
20 general no comprenden un paso de secado de los granos de cereal germinados. En particular, los métodos no comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. El secado en horno es un paso que consume mucha energía, y la omisión del secado en horno por lo tanto lleva a ahorros
25 significativos de energía. Como se describió anteriormente,

un aspecto importante del secado en horno es permitir la fácil remoción de las raicillas. Antes del secado, es difícil lograr la remoción de las raicillas. Sin embargo, los granos de cereal germinados preparados de conformidad con los métodos de la presente invención tienen raicillas significativamente reducidas (típicamente menos de 4 g por 100 g de cebada germinada (peso seco)), y como se demuestra mediante la presente invención, el paso de secado en horno no es requerido con respecto al cereal germinado de conformidad con los métodos de la invención.

Los granos de cereal germinados se pueden dividir finamente, por ejemplo, sometiendo los granos de cereal germinados a molienda en húmedo, seguido por un paso de preparar un extracto acuoso, por ejemplo, macerando a una temperatura predeterminada durante cualquier tiempo adecuado como se describe en la presente solicitud más adelante en la sección "Preparar un extracto acuoso". La conversión de los sacáridos liberados, por ejemplo polisacáridos, y proteínas se puede facilitar durante la maceración mediante la adición de mezclas de enzimas exógenas que catalizan la degradación de almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular. Las enzimas se pueden purificar parcialmente a partir de la cebada misma, de la malta o de otras fuentes - o, de manera alternativa, a partir de mezclas de enzimas fúngicas y/o

bacterianas que se pueden adquirir a partir de fuentes comerciales.

Además de los beneficios descritos anteriormente, la presente invención evita no solamente la necesidad de
5 secar la malta en horno, sino también la necesidad de transportar el grano seco desde la maltería hacia la cervecería. Se pueden lograr ahorros en los costos de energía de hasta 50% a través de esta invención de remojo y germinación combinados, lo cual puede reducir en gran
10 medida la huella de carbono de la industria. Esto es importante debido a las presiones legislativas y fiscales cada vez mayores a nivel mundial en la mayoría de los países para reducir las huellas de carbono de las industrias de producción de malta y de cerveza.

Además en el contexto de sustentabilidad, la presente invención permite que la producción completa de
15 cerveza se pueda realizar en equipo de cervecería ya existente, por lo que se requiere un pequeño gasto de capital adicional.

Por consiguiente, en un aspecto se provee un
20 método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

- a) proveer granos de un cereal;
- c) someter los granos de cereal a un paso de
25 germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y e); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

Se debe entender que la frase "dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en cualquier momento entre los pasos c) y e)" incluye por ejemplo que dichos granos de cereal puedan tener un contenido de por encima de 20 % en cualquier momento durante los pasos c), d) y e), en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta la finalización del paso e) o en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta el inicio del paso e).

En otro aspecto se provee un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

b) tratar dichos granos de cereal para retirar la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C;

d) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20%; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en cualquier momento entre los pasos c) y d); y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

5 En otro aspecto se provee un método para producir una bebida, dicho método comprende los pasos de:

i. preparar un extracto acuoso mediante los métodos descritos en la presente solicitud;

ii. procesar dicho extracto como una bebida.

10 La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones anexadas a la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un ejemplo de equipo útil para realizar el método de la invención en el cual los granos se pueden sumergir en una solución acuosa y airear continuamente. El equipo comprende una entrada para los granos de cereal (1), un tanque, por ejemplo un tanque de remojo (2); entradas para gas, por ejemplo piedras sinterizadas (3); una bomba por ejemplo una bomba de aire (4); una salida para granos de cereal (5); una bomba para los granos (6); un equipo para dividir finamente los granos de cereal por ejemplo un molino (7); una entrada (8); una cuba, por ejemplo una cuba de maceración (9), y; una salida (10).

25 La Figura 2 muestra un ejemplo de equipo útil

para realizar los pasos de la invención en el cual los granos se pueden sumergir en una solución acuosa y airear continuamente. El equipo comprende: una entrada para los granos de cereal (1); un tanque (2); una rejilla o una malla, por ejemplo una malla de metal (3); entradas para gas, por ejemplo piedras sinterizadas (4) y; una bomba, por ejemplo una bomba de aire (5).

Las Figuras 3A-3B muestran granos de cebada sin cascarilla después de incubación en agua a 15 °C o 25 °C ya sea durante 24 horas o 48 horas bajo el flujo de aire indicado. En la Figura 3A se muestra una población de granos, mientras que la Figura 3B muestra granos representativos individuales. Es notable que ya después de 24 horas a 15 °C, los granos han iniciado la germinación (con un brote visible incluso con un flujo de aire de solamente 30 L/hora, y varias raicillas pequeñas son visibles después de 48 horas. Después de 24 horas a 25 °C, los granos han iniciado la germinación y contienen un brote visible, incluso con un flujo de aire de solamente 30 L/hora. Con un flujo de aire más alto, o después de 48 horas, son visibles varias raicillas pequeñas.

Las Figuras 4A-4B muestran granos de cebada con cascarilla después de incubación en agua a 15 °C o 25 °C ya sea durante 24 horas o 48 horas bajo el flujo de aire indicado. La Figura 4A muestra una población de granos,

mientras que la Figura 4B muestra granos representativos individuales.

Las Figuras 5A-5C muestran la actividad enzimática después de 24 horas de incubación a 25 °C en agua con aireación (90 l/h/kg) (WA) seguido por 18 horas de incubación a 25 °C en aire con aireación (90 l/h/kg) (A) seguido por descanso de aire con aire atmosférico a diferentes temperaturas (25-40-50-60°C) durante 6 horas (gris) o 24 horas (negro) de la Figura 5A) α -amilasa, Figura 5B) β -amilasa y Figura 5C) actividad de dextrinasa límite libre, para cebada con cascarilla.

Las Figuras 6A-6C muestran la actividad enzimática después de 24 horas de incubación a 25 °C en agua con aireación (90 l/h/kg) (WA) seguido por incubación de 24 horas a 25 °C en aire con aireación (90 l/h/kg) (A) seguido por 2 (gris) o 4 (negro) horas adicionales de aireación a diferentes temperaturas (40, 50, 60°C) de Figura 6A) α -amilasa, Figura 6B) β -amilasa y Figura 6C) actividad de dextrinasa límite libre, para cebada con cascarilla.

Las Figuras 7A-7C muestran el efecto de combinar diferentes tratamientos individuales para optimizar la producción de enzima hidrolítica en granos de cebada incubados en un tanque bajo aireación (Tratamiento 1, 48 horas WA de remojo (gris) 48 horas de incubación en agua

que contiene 0.01 % de H_2O_2 , 1000 nM de GA3 y 0.01 % de antiespumante con aireación con aire 90 l/h/kg, a 25 °C (WA); Tratamiento 2, descascarillado_24h WA+ 24h A de remojo, negro: 24 horas de incubación en agua de la llave
5 que contiene 0.01 % de H_2O_2 , 1000 nM de GA3 y 0.01 % de antiespumante, bajo aireación con aire 90 l/h/kg, seguido por 24 horas de incubación en aire bajo aireación a 90 l/h/kg de aire 25°C). Los números 1 a 10 indican los resultados de diferentes cultivares de cebada.

10 La Figura 8 muestra el % de pérdida de peso después de la remoción de las raicillas tanto en cebada con cascarilla como en cebada sin cascarilla germinada mediante incubación en solución acuosa bajo aireación durante 48 horas (48hWA) y cebada germinada bajo condiciones de remojo
15 estándar durante 96 horas (Malteado 96 horas).

La Figura 9 muestra el contenido de NDMA en cebada no germinada, en cebada germinada mediante los métodos de la invención (Malta 1a), y en 3 diferentes maltas convencionales (Malta 1b, Malta 2 y Malta 3).

20 La Figura 10 muestra un ejemplo de un proceso de maceración con granos remojados, germinados y molidos en húmedo.

La Figura 11 muestra un diagrama de la capacidad de filtración del mosto, el cual ha sido preparado a partir
25 de granos germinados bajo aireación variable en presencia o

ausencia de la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max (UFM por sus siglas en inglés).

La Figura 12 muestra un diagrama sobre el nivel de azúcares fermentables en mosto preparado a partir de granos germinados durante 48 horas a 25 °C bajo condiciones de aireación variables. Las muestras suplementadas con la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max están marcadas con UFM.

Definiciones

El término "aproximadamente" cuando se utiliza en la presente solicitud con relación a valores numéricos de preferencia significa $\pm 10 \%$, de manera más preferida $\pm 5 \%$, de manera incluso más preferida $\pm 1 \%$.

El término "complemento" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a fuentes de materia prima ricas en carbono agregadas durante la preparación de cerveza. El complemento puede ser un grano de cereal no germinado, el cual se puede moler junto con los granos germinados preparados de conformidad con la invención. El complemento también puede ser un jarabe, azúcar o similares.

El término "brote" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la yema de crecimiento embrionario que es visible durante la fase de germinación de un grano de cereal.

El término "contenido de agua" de un grano tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al % de agua p/p en dicho grano.

5 El término "grano germinado" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a granos que han desarrollado un brote visible, de preferencia un brote de por lo menos 1 mm, tal como de por lo menos 2 mm.

10 El término "inicio de la germinación" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al punto en el tiempo en el cual los granos de cebada con un contenido de agua de menos de 15 % se ponen en contacto con suficiente agua para iniciar la germinación.

15 El término " β -glucano" tal como se utiliza en la presente solicitud, a menos que se especifique de otra manera, se refiere al polímero de la pared celular del cereal "(1,3;1,4)- β -glucano".

20 De manera similar, el término "xilano" tal como se utiliza en la presente solilcitud, a menos que se especifique de otra manera, se refiere al polímero de la pared celular del cereal "arabinoxilano".

25 Los términos "malta secada en horno" y "malta horneada" tal como se utiliza en la presente solicitud se refieren a granos de cereal germinados, los cuales se han secado mediante secado en horno. La malta secada en horno típicamente tiene un contenido de agua de aproximadamente 4

a 5 %.

El término "grano retoñado" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un grano que ha desarrollado un brote visible y un tallo visible.

5 El término "remojo" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al proceso de incrementar el contenido de agua de un grano de cereal.

El término " β -glucanasa" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a enzimas con el potencial para despolimerizar el β -glucano del cereal. Por
10 consiguiente, a menos que se especifique de otra manera, el término " β -glucanasa" se refiere a una endo-enzima o exo-enzima o mezclas de las mismas caracterizada por actividad de (1,3;1,4)- β -glucanasa y/o (1,4)- β -glucanasa.

15 El término "xilanasa" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a enzimas con el potencial de degradar las cadenas principales y secundarias de xilano y arabinoxilano. Por consiguiente, a menos que se especifique de otra manera, el término "xilanasa" se refiere a una
20 enzima o una mezcla de enzimas caracterizada por actividades enzimáticas derivadas por una o más de las siguientes clases de enzimas: endo-1,4-xilanasa; exo-1,4-xilanasa; arabinofuranosidasa; ácido ferúlico esterasa.

Actividades de enzima de granos de cereal tal
25 como se utiliza en la presente solicitud se refiere a las

actividades medidas en harina preparada a partir del tipo de grano especificado. Por ejemplo, 10 U/g de actividad de α -amilasa por gramo de grano de cereal se refiere a dicha actividad de α -amilasa (10 U) medida en un extracto acuoso derivada a partir de 1 g de harina (materia seca) de dicho cereal. La actividad de α -amilasa se determina mediante K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad de β -amilasa se determina mediante K-BETA3 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad de dextrinasa límite se determina mediante T-LDZ1000 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda).

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

El volumen de O₂ como se indica en la presente solicitud se refiere al volumen de O₂ a 1 atm y 20 °C. En modalidades de la invención en las cuales el O₂ está comprendido en una mezcla de gases, entonces se puede determinar el volumen total de la mezcla de gases, y el volumen de O₂ puede ser calculado como el porcentaje del volumen total constituido por O₂. A manera de ejemplo entonces el aire atmosférico comprende 21 % de O₂. Por lo tanto el volumen de O₂ dentro del aire atmosférico tal como se utiliza en la presente solicitud es 21 % del volumen total del aire atmosférico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONGranos de cereal

Los métodos de la presente invención son métodos para producir un extracto acuoso de un cereal o métodos para producir una bebida a partir de dicho extracto acuoso de un cereal. Los presentes métodos comprenden un paso de germinación, el cual comprende incubar granos de cereal en una solución acuosa. Se debe indicar que la mezcla de solución acuosa y granos de cereal se puede considerar una suspensión.

El grano de cereal puede ser el grano de cualquier cereal, por ejemplo un cereal que se selecciona a partir del grupo que consta de cebada, arroz, sorgo, maíz, mijo, triticale, centeno, avena y trigo. En modalidades preferidas de la invención los granos de cereal son granos de cebada. Dichos granos pueden ser granos de cualquier variedad de cebada, tal como cualquiera de las variedades de cebada descritas más adelante en la presente solicitud 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 cereal pueden tener un contenido de agua de cuando mucho 30 %, de preferencia cuando mucho 20 %, tal como cuando mucho 15 %, por ejemplo en el intervalo de 5 a 15 %.

Antes de la incubación en dicha solución acuosa, el grano de cereal pudo haber sido sometido a uno o más pasos de tratamiento antimicrobiano. Dicho tratamiento antimicrobiano puede ser cualquier tratamiento antimicrobiano útil, el cual 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, que a las concentraciones utilizadas no sea tóxico para los granos de cereal. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede ser un compuesto que contenga cloro, por ejemplo hipoclorito. El agente antimicrobiano también puede ser peróxido, por ejemplo peróxido de hidrógeno y/o ácido peracético. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos comerciales útiles incluyen P3-Hipocloran®, P3-peroxisan® o P3-oxonia activo 150®. Los granos de cereal se pueden tratar con hipocloran a una concentración en el intervalo de 0.1 a 10 %, tal como en el intervalo de 0.5 a 5 %, por ejemplo aproximadamente 1 %, tal como 1 %. Los granos de cereal se pueden tratar con dicho hipocloran durante un intervalo de 15 minutos a 10 horas, tal como en el intervalo de 1 a 5 horas, por ejemplo durante un intervalo de 2 a 4 horas. Después del tratamiento, los granos de cereal se pueden lavar una o más veces.

En algunas modalidades de la invención, el tratamiento antimicrobiano se lleva a cabo incubando granos de cereal en una solución acuosa que comprende el agente antimicrobiano. Inmediatamente después de dicha incubación, se puede iniciar el paso de germinación, por ejemplo iniciando la aireación. Por lo tanto, en dichas modalidades, no se requiere cambiar la solución acuosa, y la misma solución acuosa se puede utilizar para el tratamiento antimicrobiano y por lo menos durante el inicio del paso de germinación subsiguiente. Esto puede ser, en particular, el caso, cuando el agente antimicrobiano es un peróxido, por ejemplo peróxido de hidrógeno.

Se podría preferir que dichos granos de cereal no hayan sido sometidos a germinación antes de la incubación en solución acuosa de conformidad con la invención. Por consiguiente, se podría preferir que los granos de cereal no hayan sido sometidos a un paso de pre-germinación.

Como se describió anteriormente el grano de cereal puede ser cualquier grano de cereal. Algunos granos de cereal comprenden una cascarilla, mientras que otros granos de cereal son sin cascarilla. Los granos de cereal con cascarilla pueden ser tratados para retirar por lo menos parte de la cascarilla antes del paso de germinación. En general, el tratamiento para retirar la cascarilla no es requerido si se utiliza un grano de cereal sin cascarilla.

Los cereales sin cascarilla incluyen por ejemplo variedades de cebada sin cascarilla y trigo.

Los granos de cereal con cascarilla se pueden tratar para retirar la cascarilla sometiendo los granos de cereal a tratamiento físico que retire la cascarilla. Dicho
5 tratamiento físico se puede seleccionar por ejemplo a partir del grupo que consta de pulido, enarenado, descascarillado y alisado. De preferencia, el tratamiento físico da como resultado una pérdida de la cascarilla. La
10 pérdida de la cascarilla se puede determinar como una pérdida de peso general. Por lo tanto, el tratamiento físico de preferencia lleva a una pérdida de por lo menos 2 %, por ejemplo por lo menos 3 % del peso total de los granos de cereal. Por ejemplo, dicho tratamiento físico
15 puede llevar a una pérdida en el intervalo de 2 a 7 %, tal como una pérdida en el intervalo de 3 6 % del peso total de los granos de cereal.

Germinación

Los métodos de la presente invención comprenden
20 un paso de germinación de granos de cereal. El paso de germinación puede comprender un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa típicamente bajo aireación. El paso de germinación comprende un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa, el cual opcionalmente se
25 lleva a cabo bajo aireación. En algunas modalidades, el

paso de germinación comprende un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa sin aireación. En otras modalidades, el paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa se lleva a cabo bajo aireación.

5 Incubación en una solución acuosa bajo aireación

Los granos de cereal pueden ser cualquiera de los granos de cereal descritos anteriormente en la presente solicitud en la sección "Granos de cereal", y la solución acuosa puede ser cualquiera de las soluciones acuosas descritas más adelante en la presente solicitud en la sección "Solución acuosa".

Se podría preferir que durante dicha incubación en solución acuosa, los granos de cereal sean completamente cubiertos por dicha solución acuosa durante la incubación completa. Por lo tanto, los granos de cereal por ejemplo se pueden incubar en por lo menos 1, de preferencia por lo menos 1.5, de manera más preferida por lo menos 2, por ejemplo en el intervalo de 1 a 10, tal como en el intervalo de 1 a 5, por ejemplo en el intervalo de 1.5 a 3 L de solución acuosa por kg de grano de cereal (peso seco).

Por lo tanto, en algunas modalidades, los granos de cereal se sumergen en la solución acuosa durante la incubación completa en dicha solución acuosa.

En otras modalidades, los granos de cereal absorben la solución acuosa en una manera, de modo que al

final de la incubación en dicha solución acuosa el total de dicha solución acuosa es absorbida por los granos de cereal.

En otras modalidades, la solución acuosa que queda después de la incubación bajo aireación puede ser drenada de los granos de cereal.

En algunas modalidades, se prefiere que después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, de preferencia por lo menos 80 %, de manera más preferida por lo menos 90 %, de manera incluso más preferida, por lo menos 95 %, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen un brote visible de por lo menos 1 mm.

En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, tal como por lo menos 80 %, por ejemplo por lo menos 90 %, tal como por lo menos 95 %, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen una o más raicillas visibles.

En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, tal como por lo menos 80 %, por ejemplo por lo menos 90 %, tal como por lo menos 95%, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen una o más raicillas visibles y un tallo

visible.

En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces los granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 30 %, de preferencia por lo menos 35 %, de manera más preferida de por lo menos 37 %, por ejemplo en el intervalo de 35 a 60 %, tal como en el intervalo de 35 a 50 %, por ejemplo en el intervalo de 37 a 60 %, tal como en el intervalo de 37 a 50 %. En algunas modalidades, los granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 30 % después de la incubación de los granos de cereal en la solución acuosa, tal como por lo menos 31 %, tal como por lo menos 32 %, tal como por lo menos 33 %, tal como por lo menos 34 %, tal como por lo menos 35 %, tal como por lo menos 36 %, tal como por lo menos 37 %, tal como por lo menos 38 %, tal como por lo menos 39 %, tal como por lo menos 40 %, tal como por lo menos 45 %, tal como por lo menos 46 %, tal como por lo menos 47 %, tal como por lo menos 48 %, tal como por lo menos 49 %, tal como por lo menos 50 %, tal como por lo menos 51 %, tal como por lo menos 52 %, tal como por lo menos 53 %, tal como por lo menos 54 %, tal como por lo menos 55 %, tal como por lo menos 56 %, tal como por lo menos 57 %, tal como por lo menos 58 %, tal como por lo menos 59 %, tal como 60 %.

El contenido de agua de los granos de cereal se

puede determinar determinando el peso de los granos de cereal, seguido por secado de dichos granos de cereal y determinación del peso de los granos de cereal secos. La diferencia en peso de los granos de cereal húmedos y secos se considera que es agua, y el contenido de agua se provee como el peso del agua dividido entre el peso total de los granos de cereal (granos de cereal o menos). El contenido de agua provisto en % es por lo tanto un p/p %.

Los granos de cereal se pueden incubar en dicha solución acuosa durante el tiempo suficiente para permitir la germinación de la mayoría de dichos granos de cereal como se describió anteriormente. Los granos de cereal también se pueden incubar en dicha solución acuosa durante el tiempo suficiente con el fin de obtener el contenido de agua antes mencionado. Típicamente, los granos de cereal se incuban en la solución acuosa durante por lo menos 20 horas, tal como por lo menos 24 horas. Típicamente, los granos se incuban en dicha solución acuosa cuando mucho durante 72 horas, tal como cuando mucho durante 60 horas, por ejemplo cuando mucho durante 48 horas.

En algunas modalidades los granos de cereal se incuban en la solución acuosa bajo aireación durante un intervalo de 20 a 72 horas, de preferencia durante un intervalo de 40 a 55 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 45 a 50 horas. Esto puede ser el caso en

particular en modalidades de la invención, en las cuales la germinación no comprende un paso de descanso de aire.

En algunas modalidades de la invención, el paso de germinación comprende una incubación en la solución acuosa seguido por un descanso de aire. En dichas modalidades la incubación en solución acuosa se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para permitir suficiente actividad de enzima en los granos de cereal germinados después del descanso de aire. La actividad de enzima de preferencia es como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Granos de cereal germinados".

En dichas modalidades, los granos de cereal se pueden incubar por ejemplo en la solución acuosa durante por lo menos 16 horas, tal como por lo menos 20 horas. Típicamente, los granos se incuban en dicha solución acuosa cuando mucho durante 72 horas, tal como cuando mucho durante 40 horas, tal como durante cuando mucho 35 horas, por ejemplo cuando mucho durante 30 horas. Por lo tanto, en algunas modalidades los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa durante un intervalo de 20 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 20 a 60 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 48 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 30 horas, tal como durante un intervalo de 22 a 26 horas.

En algunas modalidades los granos de cereal se

incubaban en la solución acuosa bajo aireación durante un intervalo de 16 a 40 horas, de preferencia durante un intervalo de 20 a 35 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 22 a 26 horas. Esto puede ser el caso en particular en modalidades de la invención, en las cuales la germinación también comprende un paso de descanso de aire.

El grano de cereal se puede incubar a cualquier temperatura útil, sin embargo se podría preferir que la incubación se lleve a cabo a una temperatura lo suficientemente alta para permitir un incremento rápido en el contenido de agua. Como se muestra en la presente solicitud más adelante en el Ejemplo 3, entonces un incremento en la temperatura puede avanzar de manera significativa el incremento en contenido de agua. Por lo tanto, se podría preferir que los granos de cereal se incuben en dicha solución acuosa a una temperatura de por lo menos 15 °C, tal como por lo menos 20 °C, tal como por lo menos 25 °C. En particular, los granos de cereal se pueden incubar en el intervalo de 10 a 35 °C, de preferencia en el intervalo de 15 a 30 °C, tal como en el intervalo de 20 a 30 °C, por ejemplo en el intervalo de 25 a 30 °C, tal como aproximadamente a 25 °C.

En particular, en modalidades de la invención en las cuales los granos de cereal se incuban a una

temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C, entonces dichos granos de cereal se pueden incubar durante un intervalo de 20 a 48 horas, tal como en el intervalo de 16 a 30 horas.

Como se describió anteriormente en la presente solicitud, entonces dichos granos de cereal se incuban frecuentemente en dicha solución acuosa, mientras se pasa O_2 a través de la solución acuosa. Esto también es referido como dichos granos de cereal son incubados en la solución acuosa bajo aireación. De preferencia, el O_2 se hace pasar a través de la solución acuosa de manera continua durante la incubación completa. Dicho O_2 se puede hacer pasar a través de la solución acuosa en cualquier modo útil, sin embargo frecuentemente se introduce un gas que contiene O_2 en el fondo y/o en la parte más baja del contenedor que comprende la solución acuosa con los granos de cereal. Típicamente, el gas se difunde a través de la mezcla de solución acuosa/grano de cereal y sale de la mezcla de solución acuosa/grano de cereal desde la parte alta de la solución acuosa. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en un aparato como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Aparato". También es posible que los gases pesados, especialmente CO_2 , se extraigan desde el fondo del contenedor, con lo cual se puede proveer aire fresco// O_2 desde la parte superior del contenedor.

Dicho O_2 se puede agregar a dicha solución acuosa como O_2 puro. Con frecuencia, sin embargo, dicho O_2 está comprendido dentro de una mezcla de gases. En una modalidad dicho O_2 está comprendido dentro del aire atmosférico. Por lo tanto, el método de la invención puede comprender pasar aire atmosférico a través de dicha solución acuosa.

En general, por lo menos 2 L, de preferencia por lo menos 3 L, de manera más preferida por lo menos 4 L, de manera incluso más preferida por lo menos 5 L, de manera incluso más preferida por lo menos 6 L de O_2 pasan a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal por hora. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el intervalo de 2 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 2 a 75 L, tal como en el intervalo de 2 a 50 L, por ejemplo en el intervalo de 4 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 4 a 75 L, tal como en el intervalo de 4 a 50 L, por ejemplo en el intervalo de 6 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 6 a 75 L, tal como en el intervalo de 6 a 50 L O_2 pasan a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por kg de granos de cereal (peso seco) por hora.

En una modalidad se prefiere que por lo menos 20 g de O_2 por kg de grano de cereal, de manera más preferida por lo menos 30 g de O_2 por kg de grano de cereal, de manera incluso más preferida por lo menos 40 g de O_2 por kg

de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 40 a 100 g de O_2 por kg de grano de cereal, tal como en el intervalo de 40 a 80 g de O_2 por kg de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 60 g de O_2 por kg de grano de cereal se
5 pasa a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por hora. El peso del grano de cereal se provee como peso seco. Durante la incubación los granos de cereal típicamente absorben por lo menos algo de la solución acuosa y por consiguiente la concentración de O_2 en la
10 solución acuosa típicamente va a variar durante la incubación. Típicamente, la cantidad de O_2 suministrada por L de solución acuosa por hora está en el intervalo de 40 a 200 g, de preferencia en el intervalo de 50 a 150 g.

Como se indicó anteriormente, frecuentemente es
15 aire atmosférico el que se pasa a través de la solución acuosa. Por lo tanto, el método puede comprender pasar por lo menos 10 L, de preferencia por lo menos 15 L, de manera más preferida por lo menos 20 L, de manera incluso más preferida por lo menos 25 L, de manera incluso más
20 preferida por lo menos 30 L de aire atmosférico a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal por hora. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el intervalo de 10 a 500 L, por ejemplo en el intervalo de 10 a 375 L, tal como en el intervalo de 10 a
25 250 L, por ejemplo en el intervalo de 20 a 500 L, por

ejemplo en el intervalo de 20 a 375 L, tal como en el intervalo de 20 a 250 L, por ejemplo en el intervalo de 30 a 500 L, por ejemplo en el intervalo de 30 a 375 L, tal como en el intervalo de 30 a 250 L de aire atmosférico se
5 pasa a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por hora. En una modalidad en el intervalo de 50 a 110 L, de preferencia 80 a 100 L de aire atmosférico se pasa a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por hora.

10 Descanso de aire

Además de dicha incubación en solución acuosa bajo aireación, los granos de cereal también se pueden incubar en aire (por ejemplo en ausencia de solución acuosa). El paso de incubación en aire también puede ser
15 referido como "descanso de aire". Por lo tanto, después de la incubación en solución acuosa bajo aireación, la solución acuosa remanente se puede drenar y los granos de cereal se pueden incubar en aire. De manera alternativa, después de la incubación en solución acuosa bajo aireación,
20 toda la solución acuosa ha sido absorbida por los granos de cereal, los cuales después se pueden incubar en aire. Dicha incubación en aire de preferencia se lleva a cabo bajo aireación, por ejemplo el O_2 se puede pasar a través del contenedor que comprende los granos de cereal De
25 preferencia, el O_2 se hace pasar a través de dicho

contenedor durante el descanso de aire completo. La cantidad de O₂ que se hace pasar a través del contenedor que comprende los granos de cereal, puede ser la misma cantidad de O₂ que se hace pasar a través de la solución acuosa como se describió anteriormente. El O₂ se puede proveer en forma de una mezcla de gases, tal como por ejemplo aire atmosférico.

El descanso de aire se puede llevar a cabo durante cualquier cantidad de tiempo apropiada, por ejemplo durante un intervalo de 18 a 50 horas. En una modalidad preferida, el descanso de aire se lleva a cabo durante por lo menos 20 horas, de preferencia durante por lo menos 22 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 20 a 38 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas, tal como en el intervalo de 22 a 26 horas.

El descanso de aire se puede llevar a cabo a temperaturas ambientales, tal como a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C, tal como por ejemplo en el intervalo de 23 a 27 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C. En particular, el descanso de aire se puede llevar a cabo durante por lo menos 20 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C.

En algunas modalidades de la presente invención

el descanso de aire se lleva a cabo a un flujo de aire en el intervalo de 85 a 95 L/h, por ejemplo en el intervalo de 87 a 93 L/h, tal como aproximadamente 90 L/h de aire atmosférico o una mezcla de gases que comprenda alrededor de 20 % de O₂ por kg de grano de cereal seco. En otras modalidades de la presente invención el descanso de aire se lleva a cabo a un flujo de aire en el intervalo de 17 a 21 L/h, tal como en el intervalo de 18 a 20 L/h, por ejemplo aproximadamente 19 L/h de O₂ por kg de grano de cereal seco.

Durante el descanso de aire se puede agregar agua o solución acuosa adicional a los granos de cereal, por ejemplo mediante riego o rociado. Sin embargo, durante el descanso de aire, los granos de cereal no se deben sumergir en solución acuosa.

Métodos de germinación

En una modalidad, los granos de cereal se pueden germinar utilizando métodos estándar como es sabido en la técnica para obtener granos germinados. La duración de dicha germinación de preferencia puede ser de cuando mucho 96 horas, de manera más preferida cuando mucho 72 horas. La germinación también puede comprender incubación en solución acuosa bajo aireación y opcionalmente descanso de aire subsiguiente como se definió anteriormente.

La germinación también puede comprender varios

pasos de incubación en solución acuosa y/o varios pasos de descanso de aire. En general el primer paso es un paso de incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente. Por lo tanto, la germinación puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"
- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

En esta modalidad, la incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación se puede llevar a cabo por ejemplo durante un intervalo de 16 a 30 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 26 horas, mientras que el descanso de aire se puede llevar a cabo durante un intervalo de 20 a 38 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 35 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 26 horas.

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación".

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire".

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución

acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

5 • incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación".

El tiempo para cada incubación puede variar, sin embargo típicamente el paso completo de germinación, es
10 decir el tiempo total para todas las incubaciones en solución acuosa y todos los descansos de aire no excede 72 horas, de manera más preferida no excede 60 horas, de manera incluso más preferida no excede 54 horas. Por lo tanto, se podría preferir que el paso completo de
15 germinación se lleva a cabo durante un intervalo de 20 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 24 a 60 horas, por ejemplo durante un intervalo de 24 a 48 horas. Por consiguiente, si la germinación comprende varios pasos de incubación en solución acuosa y/o descansos de aire,
20 entonces cada paso de incubación generalmente es más corto.

En una modalidad el paso completo de germinación se lleva a cabo durante por lo menos 44 horas, tal como durante por lo menos 46 horas, por ejemplo durante por lo menos 48 horas. Por lo tanto, el paso completo de
25 germinación se puede llevar a cabo durante un intervalo de

44 a 72 horas, por ejemplo durante un intervalo de 46 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 48 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 46 a 60 horas. El tiempo de germinación se puede determinar por ejemplo desde el inicio de la germinación hasta el inicio del tratamiento térmico como se describe más adelante. En modalidades de la invención que carecen del paso del tratamiento térmico, el tiempo de germinación se puede determinar por ejemplo desde el inicio de la germinación hasta el inicio de dividir finamente los granos de cereal.

En algunas modalidades se pueden agregar una o más enzimas exógenas. Por ejemplo, se pueden agregar una o más enzimas durante el paso de germinación por ejemplo como se describe en el documento WO2016/071463.

En una modalidad la germinación se lleva a cabo sin acidulación de los granos durante la germinación. La acidulación es la aplicación de sustancias ácidas a los granos durante la germinación. Dichas sustancias ácidas pueden ser por ejemplo ácidos orgánicos o inorgánicos fuertes a moderadamente fuertes, tales como ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido fosfórico o ácidos monocarboxílicos o sales ácidas de los mismos. En este sentido, los componentes del aire atmosférico y ácido giberélico no se consideran sustancias ácidas.

Tratamiento térmico

En una modalidad de la presente invención los granos de cereal germinados se someten a tratamiento térmico después del paso de germinación o como la parte final del paso de germinación. El tratamiento térmico provee niveles mejorados de enzimas hidrolíticas en el grano de cereal germinado.

Durante los pasos de germinación y tratamiento térmico, la temperatura de preferencia se controla. La temperatura se puede controlar mediante cualesquiera medios convencionales. Durante la germinación en el paso de incubación en una solución acuosa, la temperatura se puede controlar controlando la temperatura de dicha solución acuosa. Durante la germinación en el paso de incubación en aire, la temperatura se puede controlar controlando la temperatura del aire, por ejemplo mediante el uso de un flujo de aire con una temperatura controlada. El paso de germinación por sí mismo puede desarrollar calor, y por lo tanto podría ser necesario controlar la temperatura hasta el nivel deseado mediante enfriamiento.

Durante el paso de tratamiento térmico, la temperatura se puede controlar mediante diversos medios. Por ejemplo, la temperatura se puede controlar mediante un flujo de aire o mediante incubación en una solución acuosa con temperatura controlada. Como se mencionó anteriormente,

la germinación por sí misma puede desarrollar calor, y por lo tanto incluso durante el paso de tratamiento térmico la temperatura se puede controlar mediante enfriamiento. El enfriamiento se puede llevar a cabo con aire o agua.

5 Es un aspecto de la presente invención que el tratamiento de descanso de aire a una temperatura de cuando mucho 30 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C, como se describió anteriormente, se lleva a cabo durante por lo menos 20 horas, tal como por ejemplo por lo menos 22 horas,
10 de preferencia durante por lo menos 24 horas antes del tratamiento térmico.

 En una modalidad, la duración del paso de tratamiento térmico se lleva a cabo durante por lo menos 1 hora, tal como por lo menos 2 horas, por ejemplo durante un
15 intervalo de 1 a 12 horas, de preferencia durante un intervalo de 1 a 5 horas, tal como en el intervalo de 2 a 4 horas. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C, tal como por ejemplo en el intervalo de 40 a 50 °C.

20 Se prefiere que todos los pasos de la germinación y/o tratamiento térmico se lleven a cabo dentro del mismo contenedor. Dicho contenedor puede ser en particular un tanque, tal como cualquiera de los tanques descritos más adelante en la presente solicitud en la sección "Aparato".

25 El paso de tratamiento térmico si está presente

generalmente se lleva a cabo de tal manera que el contenido de agua de los granos de cereal germinados que se someten a dicho tratamiento térmico se reduzca hasta debajo de 20 % en cualquier momento entre el inicio de la germinación y el tratamiento térmico. En otras palabras, el paso de tratamiento térmico no es un paso de secado en horno. En algunas modalidades, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de agua de menos de 25 %, de manera incluso más preferida de menos de 30 %, de manera incluso más preferida de menos de 35 %, en cualquier momento durante el paso de tratamiento térmico.

Los granos de cereal de preferencia se dividen finamente esencialmente inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico. Por consiguiente, los métodos de la invención de preferencia no comprenden un paso de secado entre el paso de germinación y/o tratamiento térmico y dividir finamente los granos de cereal. Por lo tanto es un aspecto de la presente invención que los granos de cereal germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 25 %, de preferencia de por lo menos 30 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 35 % al momento de dividir finamente dichos granos de cereal. También es un aspecto de la presente invención que los granos de cereal germinados no tengan un contenido de agua de menos de 25 %, de preferencia de menos de 30 %, de manera incluso más

preferida de menos de 35 % en cualquier momento entre el momento de finalización del paso de germinación y el paso de dividir finamente dichos granos de cereal.

Los métodos de la invención de preferencia no comprenden un paso de enfriar activamente los granos de cereal tratados con calor antes de dividirlos finamente. Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención que la temperatura de los granos germinados sea mayor de 35 °C en cualquier punto entre el paso de tratamiento térmico y el paso de dividir finamente los granos germinados.

Granos de cereal germinados

La invención se refiere a un método que comprende un paso de producir granos de cereal germinados y opcionalmente un paso de tratamiento térmico de dichos granos germinados.

Los granos de cereal germinados y/o tratados con calor de preferencia comprenden una o más actividades de enzima hidrolítica, por ejemplo provistas por α -amilasas, β -amilasas, enzimas que des-ramifican el almidón (tal como dextrinasas límite), α -glucosidasas y proteasas.

Frecuentemente, el inicio de actividad de enzima hidrolítica puede estar ocurriendo en una manera coordinada oportuna, y por lo tanto la actividad de algunas enzimas hidrolíticas se puede utilizar como un marcador para otras actividades de enzima hidrolítica.

Por consiguiente, se prefiere que los granos de cereal germinados y/o tratados con calor tengan un nivel adecuado de actividad mensurable de α -amilasa. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad mensurable de α -amilasa de por lo menos 40 U/g, tal como por lo menos 50 U/g de grano de cereal (peso seco). En algunas modalidades de la invención, el grano de cereal puede tener una actividad de α -amilasa de por lo menos 50 U/g, tal como por lo menos 60 U/g de granos de cereal (peso seco).

La actividad de α -amilasa de preferencia se determina de conformidad con métodos estándar, por ejemplo utilizando el kit Ceralpha (K-CERA) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de α -amilasa se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

También se puede preferir que los granos de cereal germinados tengan un nivel adecuado de actividad mensurable de β -amilasa. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad mensurable de β -amilasa de por lo menos 5 U/g de grano de cereal (peso seco). Por lo tanto, de preferencia los granos de cereal germinados pueden tener una actividad mensurable de β -amilasa de por lo menos 10 U/g, por ejemplo por lo menos 15 U/g de granos de cereal (peso seco).

De preferencia, la actividad de β -amilasa se

determina de conformidad con métodos estándar, por ejemplo utilizando el kit Betamyl (K-BETA3) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de β -amilasa se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

5 También se prefiere que los granos de cereal germinados y/o tratados con calor tengan un nivel adecuado de actividad de dextrinasa límite. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 5 mU/g de grano de cereal (peso seco). Por lo
10 tanto, de preferencia los granos de cereal germinados pueden tener una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 9 mU/g de granos de cereal (peso seco).

De preferencia la actividad de dextrinasa límite se determina de conformidad con métodos estándar, por
15 ejemplo utilizando el kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de dextrinasa límite se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

De manera interesante, los granos de cereal
20 germinados y/o tratados con calor de conformidad con la invención tienen raicillas significativamente reducidas en comparación con la malta verde convencional. Por lo tanto, los granos de cereal germinados de conformidad con la invención de preferencia contienen cuando mucho 4 g de
25 raicillas por 100 g de cebada germinada, de preferencia

cuando mucho 3 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, de manera incluso más preferida cuando mucho 2 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, por ejemplo cuando mucho 1.1 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, en donde tanto la masa de las raicillas como la masa de la cebada germinada se proveen como peso seco. La masa de las raicillas de preferencia se determina como se describe en el Ejemplo 6 más adelante. Por lo tanto, en una modalidad, el método de la invención no comprende un paso de remoción de raicillas.

Las nitrosaminas (NDMA por sus siglas en inglés) son compuestos químicos de la estructura química $R^1N(-R^2)-N=O$, es decir, un grupo nitroso unido a una amina. La mayoría de las nitrosaminas son carcinógenas. Aunque los niveles de nitrosaminas en las maltas modernas son bajos, los granos de cebada germinados de conformidad con la invención no obstante aún tienen un contenido significativamente reducido de NDMA en comparación con la malta convencional. En una modalidad, los granos de cebada germinados de conformidad con la invención comprenden cuando mucho 0.15 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA, de preferencia cuando mucho 0.12 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA, por ejemplo cuando mucho 0.10 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA.

Solución acuosa

La solución acuosa puede ser cualquier solución

acuosa. La solución acuosa se puede considerar una solución aunque la mezcla de solución acuosa y granos de cereal puede ser considerada como una suspensión. Con frecuencia, la solución acuosa es agua, tal como agua de la llave. Se
5 pueden agregar uno o más agentes adicionales a dicha agua, y por lo tanto la solución acuosa puede ser agua, tal como agua de la llave que comprende uno o más agentes adicionales. Dichos agentes adicionales pueden estar comprendidos en la solución acuosa desde el inicio o éstos
10 se pueden agregar durante la incubación.

Dichos agentes adicionales pueden ser, por ejemplo, compuestos capaces de acelerar la germinación de los granos de cereal. Por lo tanto, la solución acuosa puede comprender ácido giberélico (GA), por ejemplo la
15 solución acuosa puede comprender GA a una concentración de por lo menos 100 nM, por ejemplo a una concentración de por lo menos 1000 nM, tal como a una concentración en el intervalo de 100 a 100,000 nM, por ejemplo a una concentración en el intervalo de 500 a 2000 nM. Dicho GA
20 puede estar presente en la solución acuosa desde el inicio de la incubación, o éste se puede agregar durante la incubación. Dicho GA puede ser cualquier GA, por ejemplo GA₃ o GA₇. En una modalidad dicho GA es GA₃.

El agente adicional también puede ser un agente
25 antiespumante. Dicho agente antiespumante puede ser por

ejemplo cualquier agente antiespumante de grado alimenticio, por ejemplo Foamzol FCD511 (AB Vickers, RU).

Aparato

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando uno o más aparatos apropiados para llevar a cabo los métodos.

Por ejemplo, el paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa se puede llevar a cabo en un contenedor equipado con una o más bombas de aire. El contenedor puede ser cualquier contenedor en el que se puedan incubar los granos de cereal en una solución acuosa. En algunas modalidades, el contenedor puede ser un tanque, por ejemplo un tanque como se describe más adelante.

Un ejemplo de un aparato útil para incubar granos de cereal se provee en la Figura 2. El aparato comprende un tanque (2), el cual debe tener un volumen suficiente para contener los granos de cereal y la solución acuosa. El tanque mostrado en la Figura 2 es cilíndrico, pero el tanque a ser utilizado con la invención puede tener cualquier forma apropiada, por ejemplo éste puede ser un tanque cilíndrico, por ejemplo un tanque cilíndrico que tenga una parte inferior cónica. El tanque se puede preparar a partir de cualquier material apropiado, por ejemplo plástico (tal como Plexiglas) o metal (por ejemplo acero inoxidable o cobre).

El tanque comprende por lo menos una entrada (1) para los granos de cereal, la cual se puede utilizar para agregar los granos de cereal al tanque. La entrada también se puede utilizar para agregar otros compuestos al tanque, por ejemplo la entrada se puede utilizar para agregar la solución acuosa, por ejemplo agua. La entrada se puede posicionar en cualquier posición útil en el tanque, y en algunas modalidades la entrada está posicionada en la parte superior del tanque, por ejemplo en la parte alta del tanque. La entrada debe ser de un tamaño suficiente para permitir la adición de los granos de cereal. Aunque no se requiera, el tanque puede comprender entradas adicionales además de la entrada para los granos de cereal.

El tanque puede comprender opcionalmente una rejilla o malla (3) posicionada de manera esencialmente horizontal en el tanque. Si está presente, dicha rejilla o malla típicamente está posicionada en el $\frac{1}{3}$ inferior, tal como en el $\frac{1}{5}$ inferior, del tanque. La rejilla o malla de preferencia solamente contiene aberturas, las cuales son más pequeñas que los granos de cereal. La rejilla o malla se puede elaborar a partir de cualquier material apropiado, tal como plástico o metal, y puede ser por ejemplo una malla de metal. Por lo tanto, la rejilla o malla se puede utilizar para separar los granos de cereal desde la parte inferior del tanque. Sin embargo, el tanque con frecuencia

no comprende 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.

5 Asimismo, el tanque comprende una o más entradas para gas (4). Dichas entradas pueden ser cualquier entrada a través de la cual se pueda pasar un gas que comprende O_2 hacia el tanque. Las entradas para gas pueden tener una forma, que permita que el gas ingrese a la solución acuosa
10 a una alta velocidad que asegure la difusión del gas a través de la solución acuosa. Por lo tanto, por ejemplo las entradas para gas pueden ser boquillas, chorros, piedras de difusión o piedras sinterizadas. En una modalidad the entradas para gas son piedras sinterizadas. Las entradas
15 para gas en general están concetadas a una bomba (5), que bombea gas al interior del tanque, a través de dichas entradas. La bomba puede ser cualquier bomba capaz de bombear gas, por ejemplo aire a través de las entradas para gas. Se prefiere que el tanque comprenda múltiples entradas
20 para gas, por ejemplo por lo menos 2, tal como por lo menos 3, por ejemplo en el intervalo de 3 a 20. Las entradas para gas se pueden posicionar en cualquier posición en el tanque, pero por lo general, éstas están posicionadas en el 1/3 inferior, tal como en el 1/5 inferior del tanque. Esto
25 permite que el gas ingrese a la solución acuosa desde el

fondo y se difunda hacia arriba a través de la solución acuosa. El exceso de gas puede dejar el tanque a través de cualquier abertura en el tanque, por ejemplo a través de la entrada para agregar los cereales. En una modalidad se
5 podría preferir que dichas entradas (3) estén posicionadas directamente en las paredes laterales del tanque (2), de preferencia en la parte inferior de las paredes laterales, por ejemplo como se muestra en la Figura 1.

Un ejemplo de un aparato útil para llevar a cabo
10 varios pasos de los métodos de la invención se muestra en la Figura 1. El aparato comprende una entrada para los granos de cereal (1), un tanque (2), entrada(s) para gas (3) y una bomba (4), que pueden ser cualquiera de las entradas para granos de cereal, tanques, entradas para gas
15 y bombas descritas en la presente solicitud con relación a la Figura 2. 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, por ejemplo posicionada en el fondo del tanque. Dicha salida se puede utilizar tanto
20 para retirar los granos de cereal así como para la remoción de otros componentes mantenidos en el tanque, por ejemplo la solución acuosa. Dicha salida puede ser conectada a una bomba para los granos (6), por ejemplo mediante tubería. Dicha bomba para granos (6) puede ser cualquier bomba capaz
25 de bombear los granos desde el tanque (2) hacia el equipo

para dividir finamente los granos de cereal (7) y opcionalmente también 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 los granos de cereal que tienen un contenido de agua por encima de 20 %, por ejemplo por encima de 35 %. El equipo puede ser en particular una trituradora o un molino, por ejemplo un molino húmedo. El equipo (7) se puede conectar al tanque (2) y a la cuba (9) mediante tubería(s). El movimiento de los granos desde el tanque (2) hacia el equipo (7) y también hacia la cuba (9) se puede asegurar mediante una bomba (6).

El aparato también puede comprender una cuba (9). La cuba (9) puede ser cualquier cuba, que pueda contener un extracto acuoso y que pueda soportar las temperaturas utilizadas para la maceración, por ejemplo temperaturas de hasta 90 °C, tal como hasta 85 °C, por ejemplo hasta 80 °C. Por lo tanto, la cuba se puede elaborar a partir de cualquier material que tolere dichas temperaturas, por ejemplo de metal, tal como acero inoxidable o cobre. La cuba puede tener cualquier forma útil, por ejemplo ésta puede ser esencialmente cilíndrica. La cuba puede estar asociada con equipo para control de temperatura. La cuba se puede utilizar para preparar un extracto acuoso de los

granos de cereal finamente divididos a través de un proceso que implica incubación a una o más temperaturas predefinidas como se describe en la presente solicitud en la sección "Preparar un extracto acuoso". Dicho equipo para control de temperatura es capaz de controlar la temperatura de un líquido dentro de la cuba, incluyendo ser capaz de calentar un líquido dentro de la cuba a una temperatura predeterminada, por ejemplo a cualquiera de las temperaturas descritas en la presente solicitud en la sección "Preparar un extracto acuoso". La cuba (9) también puede comprender equipo para agitar o hacer girar cualquier líquido contenido en dicha cuba. En particular, la cuba (9) puede ser una cuba de maceración. Las cubas de maceración son bien conocidas en la técnica, y la cuba (9) puede ser cualquier cuba de maceración convencional.

La cuba (9), en general, contiene una entrada (8), a través de la cual los granos de cereal germinados finamente divididos pueden entrar a la cuba. Dicha entrada (8) típicamente está posicionada en la mitad superior de la cuba, por ejemplo en el 1/3 superior, tal como en el 1/5 superior de la cuba, por ejemplo en la parte alta de la cuba. Los granos de cereal finamente divididos pueden ser conducidos a través de la tubería desde el equipo para dividir finamente los granos de cereal (7) hacia la entrada (8) de la cuba (9).

En términos generales, la cuba (9) también contiene una salida (10), a través de la cual el extracto acuoso puede salir de la cuba después de la preparación del extracto acuoso (ver detalles sobre el extracto acuoso en la presente solicitud más adelante en las secciones "Extracto acuoso" y "Preparar un extracto acuoso". La salida típicamente está posicionada 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.

10 Dividir finamente los granos de cereal germinados

Los métodos de la invención comprenden un paso de dividir finamente los granos de cereal que han sido descascarillados y/o germinados y/o calentados de conformidad con los métodos definidos en la presente solicitud.

Al momento en que dichos granos de cereal son finamente divididos éstos de preferencia siguen teniendo un contenido elevado de agua, de preferencia dichos granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, de manera más preferida de por lo menos 25 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 30 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 35 %. Por ejemplo, los granos de cereal germinados se pueden transferir directamente desde la germinación y/o tratamiento térmico hacia el equipo para dividir finamente los granos de

cereal. Por consiguiente, los granos de cereal germinados pueden tener el mismo contenido de agua al momento de ser finamente divididos que tienen los granos de cereal inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento

5 término de los granos de cereal, por ejemplo el contenido de agua descrito anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En particular, los métodos en general no comprenden un paso de secar los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los métodos de preferencia no

10 comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. Como se indicó anteriormente, el secado en horno da como resultado una reducción del contenido de agua hasta un nivel de aproximadamente 4.5-5 %. De preferencia, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de

15 agua menor de 20 %, de preferencia no menor de 25 %, de manera incluso más preferida no menor de 30 %, de manera incluso más preferida no menor de 35 % en cualquier momento después de la germinación y/o tratamiento térmico y antes de dividir finamente dichos granos de cereal.

20 En algunas modalidades de la presente invención, los granos de cereal germinados se someten a tratamiento térmico después del paso de germinación. Los métodos de la invención de preferencia no comprenden un paso de enfriar activamente los granos de cereal tratados con calor antes

25 de dividirlos finamente. Por lo tanto, es un aspecto de la

presente invención que la temperatura de los granos germinados esté por encima de 35 °C en cualquier punto entre el paso de tratamiento térmico y el paso de dividir finamente los granos germinados.

5 Los granos de cereal germinados se pueden dividir finamente utilizando cualquier equipo apropiado para dividir finamente los granos de cereal que tienen un contenido de agua de más de 20 %, tal como más de 25 %, por ejemplo más de 30 %, tal como más de 35 %. Por ejemplo, los
10 granos de cereal germinados se pueden someter a molienda, por ejemplo molienda en húmedo. Los molinos útiles para moler los granos de cereal germinados incluyen los molinos disponibles de Millstar, EE.UU. Los granos de cereal germinados también se pueden someter trituration.

15 Los granos de cereal por lo general se dividen finamente hasta un grado tal que se pueda elaborar un extracto acuoso de los azúcares fermentables de los granos de cereal. Por lo tanto, los granos de cereal están lo suficientemente divididos, de modo tal que 7-L de un
20 extracto acuoso de 1 kg de dichos granos de cereal finamente divididos tengan una gravedad específica de por lo menos 8 °Platón.

 En modalidades de la invención, en las cuales el extracto acuoso se elabora a partir de los granos de cereal
25 germinados y uno o más complementos, dichos complementos

también pueden estar finamente divididos. En particular, este puede ser el caso cuando dichos complementos comprenden granos de cereal no germinados. Dichos complementos pueden ser finamente divididos, por ejemplo
5 molidos en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que los complementos sean finamente divididos junto con los granos de cereal germinados. De manera similar, si el extracto acuoso se elabora a partir de los granos de cereal
10 germinados y malta secada en horno, entonces dicha malta secada en horno puede ser finamente dividida, por ejemplo molida en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que la malta secada en horno se divida finamente junto con los granos de cereal
15 germinados.

Preparar un extracto acuoso

Los métodos de la invención también comprenden un paso de preparar un extracto acuoso de los granos de cereal germinados finamente divididos. Dicho paso puede ser, por
20 ejemplo, un paso de maceración.

El extracto acuoso antes mencionado se puede preparar, en general, incubando en agua o en una solución acuosa los granos de cereal finamente divididos. La solución acuosa para preparar un extracto acuoso es, en
25 general, una solución acuosa diferente en comparación con

la solución acuosa utilizada para incubación de los granos de cereal durante la germinación.

Con el fin de distinguir, la solución acuosa para preparar un extracto acuoso también puede ser referida como "solución de maceración". La solución de maceración puede ser cualquier solución acuosa, pero típicamente ésta consiste de agua, tal como agua de la llave a la cual se pueden agregar uno o más agentes adicionales. Con el fin de distinguir entre los agentes adicionales agregados durante la germinación, estos agentes adicionales pueden ser referidos como "agentes de maceración adicionales". Por lo tanto, la solución de maceración puede constar de agua (por ejemplo agua de la llave) a la cual se agregan uno o más agentes de maceración adicionales. Los agentes de maceración pueden estar presentes en la solución de maceración desde el inicio o éstos pueden ser agregados durante el proceso de preparar un extracto acuoso.

Dichos agentes de maceración adicionales pueden ser enzimas. Por lo tanto, la solución de maceración puede comprender una o más enzimas. Dichas enzimas se pueden agregar a la solución de maceración desde el inicio, o posteriormente, durante el proceso.

Dichas enzimas pueden ser, por ejemplo, una o más enzimas hidrolíticas. Las enzimas apropiadas incluyen lipasas, enzimas degradadoras de almidón (por ejemplo

amilasas), glucanasas [de preferencia (1-4)- y/o (1,3;1,4)-
 β -glucanasas], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas),
 y/o proteasas, o mezclas de enzimas que comprenden una o
 más de las enzimas antes mencionadas, por ejemplo Cereflo,
 5 Ultraflo, u Ondea Pro (Novozymes). Por ejemplo, la solución
 de maceración puede comprender una o más enzimas
 hidrolíticas en las cuales por lo menos una enzima
 hidrolítica se selecciona a partir del grupo que consta de
 α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa límite, pululanasa, β -
 10 glucanasa, xilanasas, glucoamilasa y proteasa.

En una modalidad de la invención la solución de
 maceración comprende una o más de las siguientes enzimas:

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

Que se agregue o no enzimas a la solución de
 maceración, y las decisiones sobre cuáles enzimas agregar,
 puede depender de los granos de cereal utilizados. Por lo
 tanto, en modalidades de la invención, en las cuales el
 25 cereal es una planta de cebada con niveles bajos de β -

glucano (por ejemplo como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Cebada"), entonces se puede agregar poco o nada de β -glucanasa a la solución de maceración.

5 En una modalidad se prefiere que no se agregue proteasa exógena durante la maceración. La adición de proteasa puede ser menos preferible, debido a que las proteasas pueden afectar la actividad de enzima. En una modalidad se prefiere que no se agregue lipasa exógena
10 durante la maceración.

 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 700 U, de preferencia cuando mucho 350 U de glucoamilasa exógena por gramo de granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del
15 extracto acuoso.

 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 400 AGU, de preferencia cuando mucho 200 AGU de glucoamilasa exógena por kg de granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del
20 extracto acuoso. La determinación de AGU se puede llevar a cabo como se describe en el documento US7060468.

 En otra modalidad se prefiere que la glucoamilasa exógena y α -amilasa combinadas utilizadas durante la preparación del extracto acuoso no excedan 700 U, de
25 preferencia no excedan 350 U por gramo de granos de cereal

germinados (materia seca). La actividad combinada de glucoamilasa y α -amilasa se puede determinar por ejemplo utilizando K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda).

5 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 20 U de pululanasa exógena o dextrinasa limitada per de kg granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del extracto acuoso.

10 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 100 PUN de pululanasa por kg de granos de cereal germinados (materia seca) is durante la preparación del extracto acuoso. La determinación de PUN se puede llevar a cabo como se describe en el documento US7060468.

15 Dichos agentes de maceración adicionales también pueden ser complementos, por ejemplo granos de cereal no germinados, jarabes o azúcares. Si se agregan complementos, estos también pueden haber sido finamente divididos por ejemplo mediante molienda o trituración. Si el complemento es un grano de cereal, por ejemplo un grano de cereal que
20 no ha sido sometido a germinación, entonces éste típicamente puede estar finamente dividido o molino. Si el complemento son jarabes, azúcares o similares, éstos por lo general no serán molidos. Complementos tales como azúcares o jarabes se pueden agregar a la solución de maceración en
25 cualquier momento en el proceso; sin embargo, dichos

complementos también se pueden agregar al extracto acuoso o posteriormente durante el proceso para preparar una bebida como se describe más adelante. En general, los complementos se agregan en cantidades más pequeñas que la de los granos de cereal germinados. Por lo tanto, por lo menos 50 %, de preferencia por lo menos 70 %, por ejemplo por lo menos 90 % de los carbohidratos del extracto acuoso se derivan de los granos de cereal germinados, mientras que los complementos de preferencia solamente dan cuenta de una cantidad pequeña de los carbohidratos. Si el complemento es un grano de cereal no germinado, entonces se prefiere que los granos de cereal germinados constituyan por lo menos 50 % (p/p), de preferencia por lo menos 70 % (p/p), de manera más preferida por lo menos 90 % (p/p) de los granos de cereal totales según se determina por el peso seco.

Los agentes de maceración adicionales también pueden ser malta secada en horno. Si se agrega malta secada en horno, ésta también pudo haber sido finamente dividida por ejemplo mediante molienda o trituración. En general, la malta secada en horno se agrega en cantidades más pequeñas que la de los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los granos de cereal germinados constituyen por lo menos 80 % (p/p), de preferencia por lo menos 90 % (p/p), de manera más preferida por lo menos 95 % (p/p) de los granos de cereal totales y malta según se determina por peso seco. En

modalidades preferidas, no se agrega malta secada en horno.

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

5 Dichos agentes de maceración adicionales también puede ser un ácido, de preferencia un ácido grado alimenticio, por ejemplo H_3PO_4 .

El extracto acuoso generalmente se prepara mediante incubación de los granos de cereal germinados
10 finamente divididos en la solución de maceración a una o más temperaturas predeterminadas. Dicha temperatura predeterminada también puede ser referida como "temperatura de maceración" en la presente solicitud. Dichas temperaturas de maceración pueden ser por ejemplo
15 temperaturas convencionales utilizadas para la maceración.

La temperatura de maceración en general se mantiene constante (maceración isotérmica), o se incrementa gradualmente, por ejemplo se incrementa en una manera secuencial. En cualquier caso, las sustancias solubles en
20 los granos de cereal germinados finamente divididos son liberados hacia dicha solución de maceración con lo cual se forma un extracto acuoso.

La(s) temperatura(s) de maceración típicamente son temperaturas en el intervalo de 30 a 90 °C, tal como en
25 el intervalo de 40 a 85 °C, por ejemplo en el intervalo de

50 a 85 °C. Las temperaturas de maceración se pueden elegir de conformidad con el tipo de cereal utilizado. Por consiguiente, en modalidades de la invención, en las cuales los granos de cereal son cebada con niveles bajos de o
5 carente de actividad de lipoxigenasa (LOX) y/o actividad de metil metionina transferasa (MMT) (ver los detalles más adelante en la presente solicitud en la sección "Cebada"), la temperatura de maceración puede ser más baja, por ejemplo en el intervalo de 35 a 69 °C.

10 La incubación en la solución de maceración se puede llevar a cabo durante cualquier cantidad de tiempo apropiada. El tiempo de incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración puede ser, por ejemplo, durante un intervalo de 60 a 300 minutos, tal como en el
15 intervalo de 60 a 240 minutos, por ejemplo en el intervalo de 90 a 300 minutos, tal como en el intervalo de 90 a 240 minutos, por ejemplo en el intervalo de 90 a 270 minutos. Por ejemplo dicho tiempo de incubación en la solución de maceración puede ser cualquier tiempo utilizado en la
20 maceración convencional. Un ejemplo no limitativo de una maceración apropiada es:

(1) Macerar a una temperatura en el intervalo de 50-60 °C, tal como aproximadamente 55 °C, en el intervalo de 10 a 30 minutos, tal como aproximadamente 15 minutos.

25 (2) Calentar a una temperatura en el intervalo de

60 a 70 °C, de preferencia en el intervalo de 60 a 65 °C, tal como aproximadamente 62 °C, en el intervalo de 30 a 90 minutos, tal como aproximadamente 60 minutos.

(3) Calentar a una temperatura en el intervalo de 70 a 75 °C, tal como aproximadamente 72 °C, en el intervalo de 5 a 30 minutos, tal como aproximadamente 15 minutos.

(4) Calentar a una temperatura en el intervalo de 75 a 80 °C, de preferencia en el intervalo de 75 a 78 °C, tal como aproximadamente 78 °C, en el intervalo de 5 a 15 minutos, tal como aproximadamente 10 minutos.

Posterior a la incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración, los granos de cereal germinados finamente divididos en la solución de maceración se pueden transferir a otro contenedor, por ejemplo una cuba de filtración e incubar durante tiempo adicional a temperatura elevada, por ejemplo en el intervalo de 70 a 78 °C durante un intervalo de 30 a 120 minutos.

Por lo tanto, la incubación en la solución de maceración puede comprender también, además de los pasos antes mencionados, un paso (5) de:

(5) Calentar a una temperatura en el intervalo de 70 a 78 °C, de preferencia en el intervalo de 75 a 78 °C, tal como aproximadamente 78 °C, en el intervalo de 30 a 120 minutos, tal como aproximadamente 60 minutos.

Un ejemplo no limitativo de temperaturas y tiempo

de maceración útiles se muestra en la presente solicitud en la Figura 10. La incubación para la primera aproximadamente 120 minutos se puede llevar a cabo por ejemplo en una cuba de maceración, mientras que el resto de la incubación por ejemplo se puede llevar a cabo en otro contenedor. Otros ejemplos no limitativos se pueden encontrar en la literatura de elaboración de cerveza, por ejemplo en Briggs et al. (*supra*) y Hough et al. (*supra*).

Después de la incubación en la solución de maceración, el extracto acuoso típicamente puede separarse, por ejemplo mediante filtración en el extracto acuoso y partículas sólidas no disueltas residuales, éstas últimas también denominadas "grano gastado". La filtración se puede llevar a cabo por ejemplo en una cuba de filtración. De manera alternativa, la filtración puede ser filtración a través de un filtro de mosto. El extracto acuoso así obtenido también puede ser denotado "primer mosto".

Se puede agregar líquido adicional, tal como agua a los granos gastados durante un proceso también denotado rociado con agua caliente. Después del rociado con agua caliente y la filtración, se puede obtener un "segundo mosto". Se pueden obtener mostos adicionales repitiendo el procedimiento.

Por lo tanto, el extracto acuoso puede ser mosto, por ejemplo un primer mosto, un segundo mosto, un mosto

adicional o una combinación de los mismos.

Extracto acuoso

El extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención puede tener un número de propiedades
5 útiles, incluyendo - pero sin limitarse a - las propiedades descritas en esta sección.

Como se mencionó anteriormente, el extracto acuoso se puede someter a un paso de filtración. Por consiguiente, se podría preferir que el mosto tenga buena
10 capacidad de filtración. Por ejemplo, sería técnicamente desafiante filtrar líquido altamente viscoso - una razón que se podría preferir que el extracto acuoso tenga una viscosidad baja.

La capacidad de filtración se puede determinar en
15 un número de maneras. En una modalidad la capacidad de filtración se determina como la cantidad de líquido obtenido después de filtración a través de un embudo de filtración equipado con un papel filtro durante 1 hora. De preferencia el extracto acuoso tiene una capacidad de
20 filtración de por lo 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 filtración. La capacidad de filtración también se puede determinar como el porcentaje del volumen de líquido obtenido después de
25 filtración durante 60 minutos como se describió

anteriormente en comparación con el volumen de líquido del extracto acuoso agregado a dicho embudo. Por lo tanto, la capacidad de filtración puede ser por lo menos 50 %, tal como por lo menos 60 % (v/v). En particular, capacidad de filtración se puede determinar como se describe más adelante en la presente solicitud en el Ejemplo 8.

La capacidad de filtración puede depender con frecuencia del nivel de β -glucano. Por consiguiente, se podría preferir que el nivel de β -glucano no sea muy alto. Por ejemplo el extracto acuoso puede comprender cuando mucho 200 mg/L, de preferencia cuando mucho 150 mg de β -glucano/L.

También se prefiere que el extracto acuoso comprenda un nivel adecuado de azúcares fermentables. En particular se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 10 g, tal como por lo menos 15 g de maltosa por L. Por ejemplo, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 1 g/L por °Platón de maltosa. También se podría preferir que dicho extracto acuoso comprenda por lo menos 1 g, tal como por lo menos 2 g de glucosa por L.

Por lo general es deseable que el mosto contenga nitrógeno de amino libre (FAN) a niveles que sean lo suficientemente altos para obtener buena viabilidad de la levadura, mientras que niveles muy altos podrían ser

indeseables. Por consiguiente, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda en el intervalo de 150 a 400 mg/L, tal como en el intervalo de 150 a 300 mg/L, por ejemplo en el intervalo de 150 a 250 mg de FAN/L.

5 Por lo general es deseable que el mosto contenga niveles altos del aminoácido valina, debido a que éste puede reducir la probabilidad de formación indeseada de diacetilo. Por consiguiente, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 55 mg/L, por ejemplo
10 por lo menos 60 mg de valina/L. En una modalidad, el extracto acuoso comprende por lo menos 65 mg de valina/L.

Los niveles antes mencionadas de azúcares, FAN y aminoácidos de preferencia son niveles en el extracto acuoso antes de cualquier fermentación.

15 Método para producir un extracto acuoso de granos de cereal con cascarilla

En una modalidad la invención se refiere a métodos para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

20 a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

 b) tratar dichos granos de cereal para retirar la cáscara, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos
25 de cereal, por ejemplo pérdida en el intervalo de 2 a 7 %

del peso total de dichos granos de cereal, tal como una pérdida en el intervalo de 3 a 6 % del peso total de dichos granos de cereal;

5 c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación puede comprender

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, en el cual por lo menos 2 L de
10 O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

15 iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 20 a 50 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C bajo un flujo de por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal por hora;

20 d) dividir finamente dichos granos germinados, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y d), con
25 lo cual se obtienen granos germinados molidos; y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

5 Se debe entender que la frase "dichos granos de cereal no tienen un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y d)" incluye por ejemplo que dichos granos de cereal pueden tener un contenido de agua por encima de 20 % en cualquier momento
10 durante los pasos c) y d), en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta la finalización del paso d) o en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta el inicio del paso d).

 Al momento en que dichos granos de cereal son
15 finamente divididos éstos de preferencia siguen teniendo un contenido elevado de agua, de preferencia dichos granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, de manera más preferida de por lo menos 25 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 30 %, de manera
20 incluso más preferida de por lo menos 35 %. Por ejemplo, los granos de cereal germinados se pueden transferir directamente desde la germinación y/o tratamiento térmico hacia el equipo para dividir finamente los granos de cereal. Por consiguiente, los granos de cereal germinados
25 pueden tener el mismo contenido de agua al momento de ser

finamente divididos que el que tienen los granos de cereal inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico de los granos de cereal, por ejemplo el contenido de agua descrito anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En particular, los métodos en general no comprenden un paso de secar los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los métodos de preferencia no comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. Como se indicó anteriormente, el secado en horno da como resultado una reducción del contenido de agua hasta un nivel de aproximadamente 4.5-5 %. De preferencia, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de agua de menos de 20 %, de preferencia no menor de 25 %, de manera incluso más preferida no menor de 30 %, de manera incluso más preferida no menor de 35 % en cualquier momento después de la germinación y/o tratamiento térmico y antes de dividir finamente dichos granos de cereal.

El método puede comprender un paso de tratamiento térmico como se describió anteriormente en la presente solicitud en la sección "tratamiento térmico".

La cantidad de O_2 que se hace pasar a través de los granos de cereal en la solución acuosa o en aire puede ser cualquiera de las cantidades de O_2 descritas anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En una modalidad en el intervalo de 85 a 95

L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal se pasa a través de dicha solución acuosa por hora durante el paso i. En una modalidad la incubación en aire del paso iii se lleva a cabo bajo un flujo en el intervalo de 85 a 95 L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal.

El paso de dividir finamente los granos germinados puede ser como se describió anteriormente en la presente solicitud en la sección "Dividir finamente granos de cereal germinados".

El paso de preparar un extracto acuoso de cereal puede ser como se describe en la sección "extracto acuoso" anteriormente en la presente solicitud.

Preparación de bebidas

En algunas modalidades, los métodos de la invención también comprenden un paso de procesar como una bebida el extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención. Se puede utilizar cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente solicitud para obtener un extracto acuoso de un cereal, el cual después se procesa en una bebida.

El extracto acuoso se puede hervir con o sin lúpulo después de lo cual puede ser referido como mosto hervido.

El primer mosto, segundo mosto, y mostos

adicionales se pueden combinar, y después de esto someter a calentamiento o ebullición. El extracto acuoso se puede calentar o hervir durante cualquier cantidad de tiempo apropiada, por ejemplo en el intervalo de 60 minutos a 120 minutos. Durante el calentamiento o ebullición se puede reducir el volumen del extracto acuoso debido a la evaporación. Se podría preferir que el volumen del extracto acuoso se reduzca en menos de 8 %, de preferencia en menos de 5 %. Esto puede reducir significativamente el consumo de energía.

La bebida se puede preparar mediante fermentación del extracto acuoso, por ejemplo mediante fermentación del mosto. Por lo tanto, la bebida se puede preparar mediante fermentación del extracto acuoso con levadura.

En una modalidad, la bebida puede ser una bebida alcohólica, tal como cerveza. En otras modalidades, la bebida puede ser una bebida no alcohólica basada en granos de cereal germinados. La bebida no alcohólica, puede ser por ejemplo una cerveza no alcohólica u otros tipos de bebidas no alcohólicas, tal como maltina.

En una modalidad preferida la bebida es cerveza, por ejemplo la cerveza puede ser una cerveza lager o una ale. Por lo tanto, la cerveza se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo que consta de Altbier, Amber ale, vino de cebada, Berliner weisse, Bière de Garde,

Bitter, Blonde Ale, Bock, Brown ale, California Common, Cream Ale, Dortmunder Export, Doppelbock, Dunkel, Dunkelweizen, Eisbock, Lambic afrutada, Golden Ale, Gose, Gueuze, Hefeweizen, Helles, India pale ale, Kölsch, Lambic, Light ale, Maibock, licor de Malta, Mild, Märzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, cerveza Steam, Stout, Schwarzbier, lager, Witbier, Weissbier y Weizenbock. El extracto acuoso de conformidad con la invención se prepara a partir de granos de cereal germinados, los cuales no han sido sometidos a secado en horno. Los granos de cereal germinados, que no han sido secados en horno, por lo general tienen un color más claro, y por consiguiente, los métodos de la invención son particularmente útiles para la preparación de cervezas más claras, en particular para la preparación de cerveza lager. También se pueden preparar cervezas más oscuras mediante los métodos de la invención, por ejemplo agregando una o más maltas secadas en horno durante la maceración como se describe en la sección "Preparar un extracto acuoso".

Por lo tanto, la invención también se refiere a métodos para producir una bebida que comprende los pasos de:

- Preparar un extracto acuoso mediante el método de conformidad con la invención.

- Procesar dicho extracto como una bebida.

Las bebidas alcohólicas - tal como cerveza - se pueden fabricar, de conformidad con los métodos de la invención, a partir de granos de cereal germinados. Los
5 granos de cereal germinados, además de los lúpulos y levadura, contribuyen al sabor y color de la cerveza.

Una vez que se ha preparado el extracto acuoso éste se puede procesar como una cerveza mediante cualquier método incluyendo métodos de elaboración de cerveza
10 convencionales. Los ejemplos no limitativos de ejemplos de métodos apropiados para elaborar cerveza se pueden encontrar, por ejemplo, en publicaciones de Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Están disponibles numerosos métodos, regularmente actualizados para análisis de
15 productos de cebada y cerveza, por ejemplo, pero sin limitarse a, la Asociación Americana de Químicos de los Cereales (American Association of Cereal Chemists) (1995), la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros (American Society of Brewing Chemists) (1992), la Convención Europea
20 de Cervecería (European Brewery Convention) (1998), y el Instituto de Cervecería (Institute of Brewing) (1997). Se reconoce que muchos procedimientos específicos se emplean para una cervecería dada, con las variaciones más significativas relacionadas a las preferencias de
25 consumidores locales. Cualquiera de dichos métodos para

producir cerveza se puede utilizar con la presente invención.

El primer paso para producir cerveza a partir del extracto acuoso de preferencia implica calentar dicho extracto acuoso como se describió en la presente solicitud anteriormente, seguido por una fase posterior de enfriamiento y opcionalmente descanso de remolino. Se pueden agregar uno o más compuestos adicionales al extracto acuoso, por ejemplo uno o más de los compuestos adicionales descritos más adelante en la sección "Compuestos adicionales". Después de enfriar, el extracto acuoso se puede transferir a tanques de fermentación que contienen levadura, por ejemplo levadura para elaborar cerveza, tal como *S. pastorianus* o *S. cerevisiae*. El extracto acuoso se puede fermentar durante cualquier periodo de tiempo apropiado, por lo general en el intervalo de 1 a 20, tal como 1 a 10 días. La fermentación se efectúa a cualquier temperatura útil por ejemplo a una temperatura en el intervalo de 10 a 20 °C. Los métodos también pueden comprender la adición de una o más enzimas, por ejemplo se pueden agregar una o más enzimas al mosto antes de o durante la fermentación. En particular, dicha enzima puede ser una endoproteasa específica de prolina. Un ejemplo no limitativo de una endoproteasa específica de prolina es "Brewer's Clarex" disponible de DSM. En otras modalidades,

no se añade ninguna enzima exógena durante los métodos.

Durante el proceso de fermentación de varios días de duración, el azúcar se convierte en alcohol y CO₂ de manera concomitante con el desarrollo de algunas sustancias aromatizantes. La fermentación se puede terminar en ningún momento deseable, por ejemplo una vez que no se observa ninguna caída adicional en el %P.

Posteriormente, la cerveza se puede procesar adicionalmente, por ejemplo enfriar. Ésta también se puede filtrar y/o almacenar en frío - un proceso que desarrolla un aroma agradable y un sabor menos tipo levadura. También se pueden agregar aditivos. Además, se puede agregar CO₂. Por último, la cerveza se puede pasteurizar y/o filtrar, antes que sea envasada (por ejemplo transferida a contenedores o barriles, embotellada o enlatada). La cerveza también se puede pasteurizar utilizando métodos estándar.

Las cervezas producidas mediante los métodos de la invención típicamente tienen un sabor agradable, y carecen de o solamente tienen poca astringencia. El sabor puede ser analizado, por ejemplo, por un panel de especialistas en el catado de cerveza.

Cebada

En modalidades preferidas de la invención los granos de cereal que se van a utilizar con los métodos de

la invención son granos de cebada.

Dichos granos pueden ser granos de cualquier planta de cebada. Sin embargo, en algunas modalidades, la planta de cebada puede comprender una o más características específicas, por ejemplo, una o más de las características como se describe más adelante en la presente solicitud. Aunque las diversas características se discutan individualmente más adelante en la presente solicitud, la planta de cebada de la invención puede tener una combinación de dichas características.

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

Como se mencionó anteriormente, es preferible que el extracto acuoso obtenido durante la maceración tenga una viscosidad lo suficientemente baja para permitir una buena capacidad de filtración de la mezcla de macerado. Como también se describió con detalle anteriormente, los β -glucanos solubles pueden contribuir a la viscosidad elevada de un extracto acuoso. Por consiguiente, en algunas modalidades de la invención, se puede preferir utilizar una

planta de cereal - y en particular una planta de cebada que tiene un nivel bajo de β -glucano, por ejemplo sin β -glucano, tal como un nivel de β -glucano que está por debajo del nivel de detección. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para una β -glucano sintetasa. Dicho gen puede ser un gen que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO:2 indicado en el documento US2012/0030784. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una cebada que comprende un gen deficiente de β -glucano como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:18 del documento US2012/0030784. La planta de cebada también puede ser una que contiene un gen CslF6 silenciado, lo que lleva a granos de cebada con niveles muy bajos de (1,3;1,4)- β -glucano (como es descrito por Taketa et al., 2011).

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tiene un nivel bajo de actividad de LOX. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica, 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 los documentos WO 02/053721, WO 2005/087934 y WO 2004/085652.

La planta de cebada también puede ser una planta

de cebada que porta una mutación en el gen que codifica para lipoxigenasa 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 los genes LOX-1 y LOX-2 descritas en el documento WO 2010/075860.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tiene un nivel bajo de actividad de MMT. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para MMT. De manera específica, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta cualquiera de las mutaciones en el gen MMT descritas en el documento WO 2010/063288. La planta de cebada también puede ser cualquiera de las plantas de cebada descritas en el documento WO 2011/150933.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada caracterizada por señalización de GA incrementada. En particular, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta una mutación en el gen *Slender1*, que 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, por ejemplo en la

Tabla 1 del mismo. Por ejemplo, la planta de cebada puede portar una mutación en el gen *Slender1* lo que da como resultado un gen *Slender1* mutante que codifica para una proteína DELLA mutante, en el cual 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 que se selecciona a partir del grupo que consta de G46E, S490F, R268H, G271D, A277T, V231M, R481H, V282F, A277T, G227E, S485F y C237Y. La numeración de aminoácido se provee con relación a la secuencia de la proteína DELLA disponible bajo el no. de accesión de Genbank AK372064 o AF035820 (versión a partir del 4 de febrero de 2013).

Bebida

Las bebidas preparadas procesando un extracto acuoso de conformidad con la invención como una bebida pueden tener un número de propiedades útiles, incluyendo - pero sin limitarse a - las propiedades descritas en esta sección.

En términos generales es deseable que las bebidas de conformidad con la invención contengan la menor cantidad de diacetilo posible. Por consiguiente, se puede preferir que la bebida comprenda diacetilo a un nivel, que esté por debajo del umbral considerado de mal sabor en la cerveza lager. De preferencia, la bebida comprende cuando mucho 30

ppb de diacetilo, de manera más preferida cuando mucho 25 ppb de diacetilo, incluso de manera más preferida cuando mucho 20 ppb de diacetilo. En particular éste es el caso si la bebida es cerveza, por ejemplo cerveza lager.

5 La bebida de conformidad con la presente invención puede ser, por ejemplo, como se describe en la presente solicitud, la cual opcionalmente ha sido fermentada. Por lo tanto, la bebida puede comprender o constar de dicho extracto acuoso o extracto acuoso fermentado y opcionalmente uno o más compuestos
10 adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser, por ejemplo, cualquiera de los compuestos adicionales descritos a continuación en la presente solicitud en la sección "Compuestos adicionales".

15 Compuestos adicionales

 Los métodos de la invención pueden comprender el paso de agregar uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser, por ejemplo, un compuesto saborizante, un conservador, un ingrediente
20 funcional, un colorante, un edulcorante, un agente regulador del pH o una sal. El agente regulador del pH puede ser, por ejemplo, un amortiguador o un ácido, tal como ácido fosfórico.

 Los ingredientes funcionales pueden ser cualquier
25 ingrediente agregado para obtener una función dada. De

preferencia un ingrediente funcional hace a la bebida más saludable. Los ejemplos no limitativos de ingredientes funcionales incluyen vitaminas o minerales.

5 El conservador puede ser cualquier conservador de grado alimenticio, por ejemplo éste puede ser ácido benzoico, ácido sórbico, sorbatos (por ejemplo sorbato de potasio), sulfitos y/o sales de los mismos.

10 El compuesto adicional también puede ser CO₂. En particular, se puede agregar CO₂ para obtener una bebida carbonatada.

El compuesto saborizante que se va a utilizar con la presente invención puede ser cualquier compuesto saborizante. El compuesto saborizante, por ejemplo, se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de
15 aromas, extractos vegetales, concentrados vegetales, partes vegetales e infusiones de hierbas. En particular el compuesto saborizante puede ser lúpulo.

Ítems

20 La invención se puede describir adicionalmente mediante los siguientes ítems:

1. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

- a) proveer granos de un cereal;
- b) someter los granos de cereal a un paso de
25 germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

c) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

d) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos b) y d); y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

2. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún

momento entre los pasos c) y e); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del
5 cereal.

3. El método de conformidad con el ítem 1, en el cual el paso b) se efectúa durante cuando mucho 72 horas.

4. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación
10 comprende incubar dichos granos en una solución acuosa hasta que dichos granos tengan un contenido de agua de por lo menos 30 %, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora.

15 5. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 4, en el cual el paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos
20 de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante
25 un intervalo de 20 a 50 horas a una temperatura en el

intervalo de 15 a 30°C.

6. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 5, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla y en el cual el método comprende un paso inicial de remover por lo menos parte de dicha cascarilla.

7. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secar en horno los granos germinados.

8. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

b) tratar dichos granos de cereal para remover la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30°C;

5 d) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún
10 momento entre los pasos c) y d); y

 e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

 con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

15 9. El método de conformidad con el ítem 8, en el cual el método comprende un paso adicional después del paso de germinación y antes del paso de dividir finamente, dicho paso adicional comprende someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el
20 intervalo de 35 a 55 °C.

 10. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 9, en el cual el paso de incubar los granos húmedos en aire se efectúa con un flujo en el intervalo de 85 a 95 L/h de aire atmosférico por kg de granos de cereal
25 secos.

11. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 9, en el cual el paso de incubar los granos húmedos en aire se efectúa con un flujo en el intervalo de 17 a 21 L/h de O₂ por kg de granos de cereal secos.

5 12. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el tratamiento térmico se efectúa a una temperatura en el intervalo de 40 a 50 °C.

10 13. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la duración del tratamiento térmico está en el intervalo de 1 a 5 horas.

14. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes en el cual la temperatura se controla por ejemplo mediante enfriamiento.

15 15. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso d) es opcional.

16. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 15, en el cual dichos granos se incuban en dicha solución acuosa durante un intervalo de 20 a 72 horas.

20 17. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 16, en el cual el paso i) comprende incubar los granos en dicha solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como por ejemplo 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas.

25 18. El método de conformidad con cualquiera de

los ítems 5 a 17, en el cual los granos del cereal se sumergen en la solución acuosa durante todo el paso i) de la germinación.

19. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4, 6 y 12 a 18, en el cual los granos se sumergen en la solución acuosa durante todo el paso de germinación.

20. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 19, en el cual los granos del cereal se sumergen en solución acuosa, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora durante un intervalo de 20 a 72 horas.

21. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 20, en el cual los granos del cereal se sumergen en solución acuosa, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como por ejemplo 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas.

22. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 21, en el cual el paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire se efectúa bajo aireación.

23. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 22, en el cual la duración del paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire está en el

intervalo de 20 a 50 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 20 a 35 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 30 horas.

24. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 23, en el cual la temperatura del paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire está en el intervalo de 20 a 30 °C.

25. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo no excede las 72 horas, de manera más preferida no excede las 60 horas, incluso de manera más preferida no excede las 54 horas.

26. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa durante por lo menos 44 horas, tal como durante por lo menos 46 horas.

27. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa durante un intervalo de 44 a 72 horas.

28. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C, tal como en el intervalo de 20 a 30 °C.

29. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 28, en el cual dicha solución acuosa es agua.

30. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 29, en el cual el método comprende también agregar ácido giberélico (GA) a la solución acuosa.

5 31. El método de conformidad con el ítem 30, en el cual dicho GA se agrega a la solución acuosa a una concentración de por lo menos 100 nM, por ejemplo por lo menos 1000 nM.

10 32. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 31, en el cual la solución acuosa comprende también un agente antiespumante.

15 33. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 32, en el cual por lo menos 3 L, de manera más preferida por lo menos 4 L, incluso de manera más preferida por lo menos 5 L, incluso de manera más preferida por lo menos 6 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se pasa a través de dicha solución acuosa por hora.

20 34. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 33, en el cual por lo menos 20 g de O₂ por kg de grano de cereal, de manera más preferida por lo menos 30 g de O₂ por kg de grano de cereal, incluso de manera más preferida por lo menos 40 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 40 a 100 g de O₂ por kg de grano de cereal, tal como en el intervalo de 40 a 80 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el
25 intervalo de 60 g de O₂ por kg de grano de cereal (materia

seca) se pasa a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por hora.

35. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 34, en el cual dicho O₂ está comprendido dentro de una mezcla de gas.

36. El método de conformidad con el ítem 35, en el cual la mezcla de gas es aire atmosférico.

37. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 36, en el cual por lo menos 10 L, de preferencia por lo menos 15 L, de manera más preferida por lo menos 20 L, incluso de manera más preferida por lo menos 25 L, incluso de manera más preferida por lo menos 30 L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal se pasan a través de dicha solución acuosa por hora.

38. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 37, en el cual la incubación en solución acuosa se efectúa a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C.

39. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 38, en el cual los granos se mantienen en el mismo contenedor durante los pasos de germinación y el paso de tratamiento térmico.

40. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 39, en el cual los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa hasta que éstos tengan un

contenido de agua de por lo menos 35 %, tal como por lo menos 37 %.

41. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos provistos en el paso a., han sido tratados con un agente antimicrobiano.

42. El método de conformidad con el ítem 40, en el cual el agente antimicrobiano es un peróxido, tal como peróxido de hidrógeno.

43. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 42, en el cual el método no comprende un paso de eliminación de raicillas.

44. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la remoción de dicha cascarilla da como resultado una pérdida en un intervalo de 2.5 a 7.5 %, tal como una pérdida en un intervalo de 3 a 6 % del peso total de los granos de cereal.

45. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos de cereal germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 25 %, incluso de manera más preferida de por lo menos 30 %, incluso de manera más preferida de por lo menos 35 % al momento de dividir finamente dichos granos de cereal.

46. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos de cereal germinados no han tenido un contenido de agua menor de 25

%, incluso de manera más preferida menor de 30 %, incluso de manera más preferida menor de 35 % en ningún momento entre la finalización del paso de germinación y el momento de dividir finamente dichos granos de cereal.

5 47. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la temperatura de los granos germinados está por encima de 35 °C en ningún momento entre la finalización del paso de tratamiento térmico y el momento de dividir finamente dichos granos de
10 cereal.

 48. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el cereal es cebada.

 49. El método de conformidad con el ítem 48, en el cual la cebada es una cebada sin cascarilla o una
15 variedad de cebada que tiene una cáscara delgada.

 50. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es un cereal sin cascarilla, por ejemplo trigo o una cebada sin cascarilla.

 51. El método de conformidad con cualquiera de
20 los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla, tal como una cebada con cascarilla.

 52. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es una cebada caracterizada por una o más de las siguientes:

25 B. portar una mutación en el gen que codifica

para una β -glucano sintetasa

C. portar una mutación en el gen que codifica para LOX-1

5 D. portar una mutación en el gen que codifica para LOX-2

E. portar una mutación en el gen que codifica para MMT; y/o

F. portar una mutación en el gen que codifica para DELLA.

10 53. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados tienen una actividad de α -amilasa de por lo menos 40 U/g, tal como por ejemplo por lo menos 50 U/g de grano de cereal, de preferencia por lo menos 60 U/g de grano de cereal en una base en peso seco.

15 54. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados tienen una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 5 mU/g, de preferencia por lo menos 9 U/g de grano en una base en peso seco.

20 55. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 4 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

25 56. El método de conformidad con cualquiera de

los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 2 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

5 57. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados inmediatamente antes del paso de dividirlos finamente tienen un contenido de nitroaminas de cuando mucho 0.15 µg/kg, de preferencia cuando mucho 0.12 µg/kg, por ejemplo cuando mucho 0.10 µg/kg de granos de cereal (materia seca).

10 ~~58. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso C. comprende macerar dichos granos germinados molidos con una solución de macerado a una temperatura en el intervalo de 50 a 80 °C.~~

15 ~~59. El método de conformidad con el ítem 58, en el cual dicho macerado se efectúa en presencia de una o más enzimas hidrolíticas agregadas.~~

20 ~~60. El método de conformidad con el ítem 59, en el cual por lo menos una enzima hidrolítica se selecciona a partir del grupo que consta de enzimas degradadoras de pared celular y de almidón, incluyendo, pero sin limitarse a, α-amilasa, β-amilasa, dextrinasa límite, pululanasa, β-glucanasa, xilanasas, glucoamilasa y proteasa.~~

25 ~~61. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 58 a 60, en el cual dicho macerado se efectúa en~~

~~presencia de por lo menos una β -glucanasa y por lo menos una xilanasa.~~

~~62. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 58 a 61, en el cual se agregan cuando mucho 700 U, de preferencia cuando mucho 350 U de glucoamilasa y/o α -amilasa exógena por g de granos de cereal germinados (peso seco) durante dicho macerado.~~

~~63. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 58 a 62, en el cual se agregan cuando mucho 100 PUN de pululanasa exógena por g de granos de cereal germinados (peso seco) durante dicho macerado.~~

~~64. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 58 a 59 y 62 a 63, en el cual el cereal se caracteriza por un nivel bajo de β -glucano en los granos, y en el cual no se agrega ninguna β -glucanasa durante la maceración.~~

58~~65~~. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método comprende también un paso de filtrar dicho extracto acuoso.

59~~66~~. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso tiene una capacidad de filtración de por lo menos 50 %, tal como de por lo menos 60 %.

60~~7~~. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso

comprende cuando mucho 200 mg/L de β -glucano.

618. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende por lo menos 10 g, tal como por lo menos 15 g de maltosa por L.

629. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende un intervalo de 150 a 400 mg/L de FAN.

6370. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende por lo menos 60 mg/L, de preferencia por lo menos 65 mg/L de valina.

6471. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secado en horno.

6572. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secar en horno los granos germinados.

6673. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de eliminación de raicillas.

6774. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 4 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

6875. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 2 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

5 6976. Un método para producir una bebida, dicho método comprende los pasos de:

 i. preparar un extracto acuoso mediante el método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes;

 ii. procesar dicho extracto como una bebida.

10 707. El método de conformidad con el ítem 6976, en el cual el paso ii. comprende los pasos de:

 a) calentar dicho extracto acuoso opcionalmente en presencia de lúpulo o extracto de lúpulo;

 b) enfriar el extracto acuoso;

15 c) fermentar dicho extracto acuoso con levadura, con lo cual se produce una bebida fermentada.

718. El método de conformidad con el ítem 707, en el cual el método comprende también un paso de sedimentación efectuado después del paso a. o el paso b.

20 729. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método completo se efectúa en un sitio.

~~8730~~. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 6976 a 729, en el cual la bebida comprende cuando
25 mucho 25, tal como cuando mucho 20 ppb de diacetilo.

~~7481~~. Una bebida producida mediante el método de conformidad con cualquiera de los ítems ~~6976~~ a ~~7380~~.

~~7582~~. Un extracto de cereal acuoso producido mediante el método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a ~~6875~~.

~~7683~~. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55°C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos b) y d); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

~~778~~. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el

cereal es un cereal con cascarilla;

b) tratar dichos granos de cereal para remover la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30°C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos c) y d); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

EJEMPLOS

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. No obstante, éstos no se deben considerar como limitativos para la invención. Las muestras de cebada utilizadas en los ejemplos a continuación en la presente solicitud se analizan todos de la siguiente manera:

10 - Prueba de germinación

Todas las muestras de cebada utilizadas en los ejemplos se evalúan respecto a los parámetros índice de germinación, energía de germinación y sensibilidad al agua. Los datos se basan en un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para una prueba de germinación de 4 mL y un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para una prueba de germinación de 8 mL de conformidad con el Método 3.6.2 Energía Germinativa de la Cebada (Método BRF) de Analytica-EBC.

20 - Caracterización de las muestras de cebada

· Se determinan los pesos de mil granos mediante conteo automático utilizando un instrumento Data Count JR, mientras que el fraccionamiento de tamaño utiliza un instrumento Pfeuffer Sortimat K3 ajustado a 4 clases de granos 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 de tamaño se calculan tomando como base muestras de grano de 100 g.

· Se determinan los contenidos de proteína, agua y almidón de muestras de cebada utilizando un instrumento Foss 1241 NIT, utilizando calibración para cebada (FOSS BY213271; provisto por Foss, DK). Antes de la incubación (por ejemplo 24 horas) en solución acuosa, el contenido de agua de las muestras de grano de 100 g se vuelve a determinar utilizando un instrumento Foss 1241 NIT utilizando calibración para cebada Foss BY303300 (Foss, Dinamarca).

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

- Análisis de granos germinados

Las muestras de granos germinados se analizan respecto a los siguientes parámetros (p/p): contenido de agua, contenido de proteína, proteína soluble y extracto de la muestra de malta. Los valores se determina utilizando un

instrumento Foss 1241 NIT calibrado de conformidad con los datos provistos por Foss (DK; calibración MA000010).

EJEMPLO 1

Método general para remojo y germinación

5 Se coloca grano de cebada seco en una solución acuosa en un cilindro de plexiglás y se airea constantemente con aire atmosférico desde debajo de la columna de grano. Se provee un dibujo esquemático del equipo utilizado en la presente solicitud en las Figuras 1
10 y 2. El flujo de aire se configura utilizando un medidor y controlador de flujo másico SmartTrak® 50 (Sierra, CA, E.U.A.) y la temperatura se mide utilizando un termómetro de precisión Testo 735 (Testo, Alemania).

 Se incorporan detectores para medir el flujo de
15 aire, temperatura, pH, conductividad, potencial redox y contenido de O₂ del agua para remojo en este sistema. Los detectores no solo permiten que el procedimiento sea monitoreado en tiempo real, sino también permiten ajustar las condiciones de remojo y germinación durante los
20 procedimientos; este nivel de control no es posible siguiendo los protocolos de malteado y elaboración de cerveza actuales.

 GA es una fitohormona que activa la capa de aleurona en la cebada en germinación. Muchos malteadores
25 agregan GA a baja concentración durante el procedimiento de

malteado. En la presente, se suplementan diversas concentraciones de GA al agua para la incubación de los granos al inicio del procedimiento. Se prepara una solución GA₃ a partir de ácido giberélico (G7645, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) en etanol absoluto y se agrega al agua.

En términos generales, la cebada se remoja y se germina de conformidad con regímenes de remojo diferentes:

WA = agua/aire:

Incubación en un tanque en agua de la llave que contiene GA₃ y agente antiespumante a 25 °C, al tiempo que se conduce el aire a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

A = descanso de aire

Incubación de granos de cereal húmedos en el tanque. Durante toda la incubación se conduce aire a través de los granos de cereal húmedos desde el fondo del tanque.

EJEMPLO 2

Métodos para determinar la actividad enzimática

Durante la germinación, el grano de cebada comienza a secretar una gama de enzimas hidrolíticas, tales como α -amilasas, dextrinasas límite y (1,3;1,4)- β -glucanasas. Típicamente, dichas actividades enzimáticas se detectan en una manera oportunamente coordinada, con las actividades de α -amilasa, β -amilasa y/o dextrinasa límite útiles como marcadores generales para la actividad de

enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, se monitorean las actividades de α -amilasa y dextrinasa límite midiendo las actividades de enzima hidrolítica en el grano y se determinan después de la germinación efectuada de conformidad con el método de la invención.

Preparación de la muestra

Antes del análisis de la actividad enzimática las muestras de grano germinado se muelen utilizando un molino Cyclotech Foss estándar (Foss, Dinamarca), equipado con un anillo triturador de carburo de tungsteno (Foss 10004463), impulsor niquelado (Foss 1000 2666) y un tamiz de salida de 1 mm (Foss 10001989). Todas las mediciones de actividad enzimática en granos de cebada germinados se hacen dentro de 48 horas después de moler la muestra.

Actividad de α -amilasa

La actividad de α -amilasa de granos germinados se basa en harina preparada como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". Las pruebas para la determinación de la actividad de α -amilasa utilizan un kit Ceralpha de Megazyme utilizando equipo de laboratorio estándar. Las pruebas se realizan de conformidad con el protocolo del fabricante (K-CERA 01/12), que incluyen el cálculo de la actividad de α -amilasa.

Actividad de β -amilasa

Cuando se mide la actividad de beta-amilasa de

los granos germinados, la harina se elabora como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". Las pruebas de actividad de β -amilasa siguen las recomendaciones provistas con el kit Betamyl de Megazyme (K BETA3).

Actividad de dextrinasa límite

Para la medición de la actividad de dextrinasa límite en granos germinados, la harina se elabora como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". La actividad de dextrinasa límite se determina utilizando un kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme. Las pruebas, que incluyen mediciones de la actividad, se realizan de conformidad con el protocolo del fabricante (T LDZ1000 07/9).

15

EJEMPLO 3

Desarrollo del grano durante el procedimiento de remojo y germinación

Se incuban una línea de cebada sin cascarilla y líneas de cebada con cascarilla en un cilindro de plexiglás de conformidad con el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1. El procedimiento de incubación se efectúa a 15 °C y 25 °C. Los granos se airean desde abajo con niveles variables de aire atmosférico durante diferentes periodos de tiempo, durante los cuales el contenido de humedad del grano se eleva y se inicia la germinación. El desarrollo de

grano se analiza después de 24 horas y 48 horas de incubación y se verifica la absorción de agua en los granos determinando el contenido de agua como % (p/p).

En detalle, los granos de la línea de cebada sin cascarilla se transfieren al cilindro de plexiglás y se incuban utilizando el régimen WA. Los granos primero se incuban durante 3 horas en P3-hipocloran al 1% (Ecolab, Suiza) después de incubación durante 45 horas en agua ajustada a 1000 nM de ácido giberélico (GA) y Foamazol al 0.01% FCD511 (AB Vickers, Burton on Trent, Reino Unido). La incubación es ya sea a 15 o 25 °C, y los granos se airean ya sea con 30, 60, 90 o 120 L/h de aire atmosférico. Las muestras se recolectan después de 24 horas y 48 horas. Los resultados se resumen en las Figuras 3A-3B. Tal como se muestra, el acceso de aire promueve fuertemente la germinación de la cebada. Cuando se comparan con la muestra no aireada (0 L/hr) todas las muestras sometidas a un flujo de aire se caracterizan por una diferencia notable en el desarrollo de grano. En particular, los granos tienen un brote visible de más de 1 mm incluso después de 24 horas, a 15 °C y 30 L/h de flujo de aire. Incrementar el flujo de aire ocasiona el desarrollo de brotes adicionales después de 24 horas a 15 °C. A 25 °C algunos granos incluso desarrollan raicillas visibles (60, 90 o 120 L/h). Incrementar el tiempo de incubación conduce a avance en el

desarrollo, con todos los granos sometidos a flujo de aire caracterizados por la germinación y desarrollo de raicillas visibles después de 48 horas. Con temperatura de incubación incrementada, hay desarrollo mejorado de brotes y raicillas. Un flujo de aire de 90 L/h corresponde a 51 g de O_2 por hora. Si se calcula como O_2 por L de H_2O , la cantidad variará con el tiempo, debido a que los granos de cereal absorben agua durante la incubación. Típicamente, un flujo de aire de 90 L/h corresponde a 64-121 g de O_2 por L de H_2O por hora.

El mismo experimento se efectúa utilizando granos de una línea de cebada con cascarilla y los resultados se resumen en las Figuras 4A-4B. Los granos de la línea de cebada con cascarilla también tienen un brote visible de más de 1 mm después de incubación a las 24 horas, a 25 °C y 30 L/h de flujo de aire. Incrementar el tiempo de incubación conduce a avance en el desarrollo con todos los granos sometidos a flujo de aire de 60 L/h caracterizados por la germinación y desarrollo de raicillas visibles después de 48 horas.

Los resultados de absorción de agua en los granos se resumen en la Tabla 1 (cebada sin cascarilla) y la Tabla 2 (cebada con cascarilla) a continuación. El contenido de agua parece no ser altamente dependiente del flujo de aire, si el flujo de aire es por lo menos 30 L/h. En contraste,

el contenido de agua es mucho más alto después de 24 horas a 25 °C que a 15 °C.

TABLA 1**Absorción de agua (%), granos de cebada sin cascarilla**

5

Flujo de aire *Temperatura. (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

10

TABLA 2**Absorción de agua (%), granos de cebada con cascarilla**

15

Flujo de aire *Temperatura. (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

20

Por consiguiente, los resultados de la presente invención muestran que una temperatura de 25 °C puede ser más preferible para velocidades de absorción de agua

25

tempranas por parte del grano y por tanto en la velocidad total de la germinación.

EJEMPLO 4

El efecto de las temperaturas del descanso de aire en las
5 **actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite**
 libre

Se incuba cebada con cáscara en un cilindro de plexiglás (WA) durante 24 horas seguido por tratamiento con descanso de aire (A) durante 24 horas a diferentes
10 intervalos de temperatura. Posteriormente, se analizan las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite libre como se describe en el ejemplo 2.

La incubación en agua con aireación también puede ser referida como "WA" en la presente solicitud, mientras
15 que la incubación en aire con aireación puede ser referida como "A".

En un primer experimento, se remoja cebada con cascarilla (Con cascarilla 03) durante 24 horas (WA) en agua de la llave que contiene en H_2O_2 al 0.01 %, 1000 nM de
20 GA_3 y agente antiespumante al 0.01 % Sigma 204. Durante la incubación WA, se burbujea aire a 90 l/h por kg de granos de cebada secos a 25 °C. La imbibición en agua es seguida por descanso de aire (A) a diferentes intervalos de temperatura; a) 18 horas de aireación (90 l/h) a 25 °C
25 seguido por 6 horas de aireación (90 l/h) ya sea a 40 °C,

50 °C o 60 °C, o b) 24 horas de aireación (90 l/h) ya sea a 40 °C, 50 °C o 60 °C (Figuras 5A-5C). La aireación durante el descanso de aire se efectúa conduciendo 90 l de aire a través de los granos de cebada por hora por kg de granos de cebada secos.

Se efectúa un segundo experimento utilizando las mismas condiciones para imbibición en agua (WA) seguido por 24 horas de descanso de aire (A) con aireación (90 l/h) a 25 °C. Posteriormente, el periodo de descanso de aire se prolonga con c) 2 o d) 4 horas adicionales a 40 °C, 50 °C o 60 °C (Figuras 6A-6C).

Los regímenes de descanso de aire con a) 18 horas a 25 °C seguido por 6 horas a 40 °C o b) 24 horas a 40 °C afectan de manera adversa la actividad de α -amilasa en comparación con 24 horas a 25 °C (Figuras 5A-5C y 7A-7C). En contraste, incrementar la temperatura después de 24 horas a 25 °C hasta 40 o 50 °C durante c) 2 o d) 4 horas afecta de manera positiva las actividades α -amilasa y en un grado menor las de dextrinasa límite (Figuras 6A-6C). Por lo tanto, con el fin de obtener actividades elevadas de enzima hidrolítica, se prefiere un descanso de aire inicial durante la germinación a temperatura óptima (25 °C o 30 °C) durante por lo menos 24 horas seguido por un incremento en la temperatura (incrementándola óptimamente hasta 40 °C durante 4 horas). En la presente se demuestra que este

tratamiento incrementa la actividad total de α -amilasa y en un grado menor las actividades de dextrinasa límite.

EJEMPLO 5

Efecto del descascarillado antes de la germinación

5 Se analiza el efecto del descascarillado antes de la germinación tomando como base las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite libre en un panel de 10 líneas diferentes de cebada con cascarilla. Se compara un tratamiento que comprende a) descascarillado, 24 horas de incubación WA y 24 horas de descanso de aire (A) con b) 10 48 horas de incubación WA sin descascarillado.

Tratamiento 1 (que incluye descascarillado)

Se descascarillan líneas de cebada con cascarilla (1-10) mediante tratamiento mecánico con lija durante 1 15 minuto con el fin de remover parcialmente la cáscara. El tratamiento da como resultado una pérdida de peso de 3-6 %, dependiendo de la línea de cebada con cascarilla. La cebada descascarillada después se incuba (WA) a 25 °C durante 24 horas en agua aireada con 90 l/h que contiene H₂O₂ al 0.01 20 %, agente antiespumante al 0.01 % Sigma 204, 1000nM de GA₃, seguido por 24 hora de aireación (A) a 25 °C, 90 l/h.

Tratamiento 2 (sin descascarillado)

Se incuba cebada con cascarilla (1-10) (WA) durante 48 horas en agua aireada 90 l/h que contiene H₂O₂ al 25 0.01 %, 1000 nM de GA₃ y antiespumante al 0.01 % a 25 °C.

Los resultados demuestran que el tratamiento 1, que comprende un descascarillado inicial, incrementa las actividades de α -amilasa y de dextrinasa límite hasta diez veces e incrementa la actividad de β -amilasa en un grado menor en comparación con el tratamiento 2 (Figuras 7A-7C).

EJEMPLO 6

Evaluación de la formación de raicillas

Se prepara cebada germinada de conformidad con los métodos generales descritos en el ejemplo 1. De manera más específica, se sanitizan granos de cebada de las variedades Sin cascarilla 01 y Con cascarilla 02 con lavado con hipocloran al 0.1 % durante 1 hora, después se remojan y se germinan mediante incubación durante 48 horas en agua de la llave que contiene 1000 nM de GA y agente antiespumante al 0.01%. La incubación se efectúa a 25 °C, y se conducen 90 l/h de aire a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación. La cebada germinada se seca por congelación y se pesa. Las raicillas formadas se retiran utilizando equipo "old Munich" y la cebada germinada se pesa otra vez. La diferencia en masa antes y después de la remoción de raicillas, se considera la masa de las raicillas. Se determina el peso de 3 muestras diferentes. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa	Masa	Masa de las	Masa	Masa	Masa de las
	antes de (g)	después de (g)	raicillas (g)	antes de (g)	después de (g)	raicillas (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
Promedio			0.97			0.44
Desv. Est.			0.08			0.05

En un segundo experimento, se remojan y germinan granos de cebada provenientes del mismo lote de Sin cascarilla 01 y Con cascarilla 02 durante 96 horas utilizando métodos estándar. La cebada germinada se seca por congelación y se pesa y las raicillas se retiran utilizando equipo "old Munich". Después de la remoción de las raicillas la cebada se pesa nuevamente y la diferencia en masa antes y después de la remoción de raicillas se considera la masa de las raicillas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa	Masa	Masa de las	Masa	Masa	Masa de las
	antes de (g)	después de (g)	raicillas (g)	antes de (g)	después de (g)	raicillas (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
Promedio			8.19			6.41
Desv. Est.			0.05			0.13

La Tabla 5 muestra una comparación entre la masa (en g) de raicillas de la cebada germinada mediante los métodos de la invención (WA 48 horas) y en cebada remojada mediante métodos convencionales (Malteado 96 horas). Es evidente que la cebada germinada mediante los métodos de la invención tiene formación de raicilla significativamente reducida. La Figura 8 muestra la pérdida de peso después de remoción de raicilla en %.

TABLA 5

Cebada_método	Masa promedio de las raicillas (g)	Desv. Est.
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 7**Evaluación del contenido de NDMA**

La nitrosamina NDMA se forma particularmente en las raíces durante el horneado de la malta (Wainwright (1986) J Inst Brew 92 73-80). Tal como se describe en el Ejemplo 6, una ventaja de los granos de cereal germinados preparados mediante los métodos de la invención es que éstos comprenden menos raíces en comparación con malta verde ordinaria. El contenido de NDMA en malta contemporánea es bajo, sin embargo puede ser conveniente

reducir los niveles incluso más.

El contenido de NDMA se analiza en cebada (Cebada-1), en granos de cebada germinados preparados de conformidad con los métodos de la invención (denotados
5 "Malta 1a" en este Ejemplo) y en tres maltas producidas industrialmente (Malta-1b, Malta 2 y malta 3). Las maltas producidas industrialmente han sido todas tratadas para remover las raicillas mediante métodos estándar. La cebada-1, Malta-1a y Malta-1b se preparan todas a partir del mismo
10 lote de una variedad de cebada con cascarilla (Con cascarilla 02), mientras que las otras dos muestras de malta Malta-2 y Malta-3 se obtienen ambas a partir de otros lotes de cebada.

La Malta-1a se produce de conformidad con los
15 métodos generales descritos en el ejemplo 1. En detalle, se sanitizan granos de cebada con lavado de hipocloran al 0.1 % durante 1 hora, después se remoja y se germina mediante incubación (WA) durante 48 horas en agua de la llave que contiene 1000 nM de GA y agente antiespumante al 0.01 %. La
20 incubación se efectúa a 25 °C, y se conducen 90 L/h de aire a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

La cebada germinada se seca por congelación antes de analizar el contenido de NDMA mediante GC-MS. Los
25 resultados se muestran en la figura 9. Los análisis indican

claramente que menos NDMA está presente en la Malta-1a en comparación con maltas producidas mediante malteado estándar que incluyen horneado, aunque el patrón haya sido sometido a desraizado.

5

EJEMPLO 8

Maceración

Se germinan granos de cebada sin cascarilla como se describió en la presente solicitud anteriormente en el Ejemplo 7 con diferente flujo de aire (0, 45 o 90 L/h).
10 Después de 2 días de remojo y germinación continuos, se drena la fase líquida de los granos y el grano se muele en húmedo en un homogeneizador a escala de laboratorio (Omega Juicer 8226, Omega, E.U.A.). La extracción de los granos molidos en agua se realiza utilizando el programa de
15 maceración expuesto en la Figura 10. Este procedimiento también se puede referir como "maceración". Durante la maceración también ocurre una sacarificación en términos generales. Durante la maceración típicamente se agregan CaCl_2 y H_3PO_4 al agua.

20

Durante el procedimiento de maceración industrial, se pueden agregar preparaciones de enzimas exógenas para continuar la conversión de almidón, proteína de almacenamiento y polisacáridos de pared celular parcialmente degradados en azúcares fermentables y
25 aminoácidos que posteriormente apoyarán el crecimiento de

la levadura durante la fermentación. Se comparan las características de la maceración en presencia y ausencia de la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max (Novozymes, Dinamarca). Ultraflo Max es una mezcla de
5 enzimas que comprende actividades de β -glucanasa y xilanasas. Después de la maceración, los extractos se filtran utilizando un filtro de mosto estándar.

La eficacia de la mezcla de enzimas exógenas se analiza midiendo la capacidad de filtración de la mezcla de
10 macerado que permanece después del procedimiento de maceración. La capacidad de filtración se determina utilizando un embudo de filtración TOP ID de 140-mm (Urbanti Pequannock, N.J. E.U.A.) equipado con MN 614 Ø $\frac{1}{4}$ 320 mm REF 527032 (Macherey Nagel Düren Alemania). El peso
15 de las muestras se registra utilizando una báscula estándar (MPB1502 L, Mettler Toledo, Suiza). La capacidad de filtración se determina como la cantidad total de líquido obtenido después de filtración durante 60 minutos de una
mezcla de macerado que comprende 400 mL de solución de
20 maceración, previamente suplementada con 100 g de cebada germinada, molida.

Los resultados experimentales se resumen en la Figura 11 y demuestran que el flujo de aire incrementado durante la incubación da como resultado una capacidad de
25 filtración del mosto incrementada.

EJEMPLO 9**Mosto**

El mosto se prepara como se detalla en los experimentos del Ejemplo 8, utilizando granos de cebada germinados preparados como se describió en el Ejemplo 7. Los granos de cebada germinados se muelen en húmedo y se maceran como se describió en el Ejemplo 8 - ya sea en presencia o ausencia de la mezcla de enzimas Ultraflo Max (Novozymes, Dinamarca).

Los niveles de azúcares fermentables - fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y maltotriosa - se determinan de la siguiente manera. Después de hervir el mosto, éste se diluye 1:2000 con agua milliQ y posteriormente se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0.2 μm (Titan3 30 mm, Thermo Scientific, CA, E.U.A.). Primero se aplican alícuotas de 10 μL a una columna CarboPac SA10-4 μm , y posteriormente se analiza en un sistema de HPLC libre de reactivos Dionex ICS 5000+ equipado con una columna de guarda CarboPac SA10-4 μm (4 x 50 mm). La elución de moléculas separadas se realiza con una corrida con KOH 25 mM isocrático en el transcurso de 20 minutos. Después de la resta de la línea basal y de emplear carbohidratos puros de grado HPLC como patrones de referencia [D-(+)-glucosa, D-fructosa, D-(+)-maltosa maltotriosa], los carbohidratos se cuantifican mediante integración de área pico.

Los resultados se muestran en la Figura 12 y demuestran que el flujo de aire incrementado durante la incubación da como resultado cantidades incrementadas de azúcares fermentables.

5

EJEMPLO 10

Elaboración de cerveza a escala pequeña

Fermentación

El mosto, preparado como se describió en el Ejemplo 8, se hierve en presencia lúpulo o extracto de lúpulo y el proceso de fermentación se inicia a través de la inoculación convencional del extracto con una cepa de levadura para elaborar cerveza apropiada. La fermentación, filtración de la cerveza y el embotellado se efectúan de conformidad con protocolos tradicionales.

15

Elaboración de cerveza a escala pequeña

El ejemplo compara cerveza preparada a partir de dos variedades de cebada, tratadas de conformidad con los métodos descritos en la presente solicitud, con cerveza preparada a partir de cebada no malteada tratada con una mezcla de enzimas para elaboración de cerveza disponible comercialmente. El mosto y las cervezas finales se analizan y comparan con una cerveza lager comercial de referencia (denotada como "Referencia" en la presente solicitud) cuando sea posible. Los datos acerca de la cerveza lager de

20

referencia se obtienen por separado a partir de otras fuentes.

Material

A menos que se indique lo contrario el material se utiliza tal como es.

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Variedad de cebada	Sin cascarilla 01	Con cascarilla 02	Con cascarilla 02	Sin cascarilla 01	80% de malta 20% de cebada
Tratamiento antes de la molienda	A 90 l/h de aire 24 h WA 24 h A	A 90 l/h de aire 24 h WA 24 h A	---	---	Malta preparada mediante procedimiento estándar

Molienda

Material tratado

Material no tratado

Molido en un extractor doméstico (Omega J822C)	Molido en MULTICRACKER
---	------------------------

Elaboración de cerveza

La elaboración de cerveza se realiza bajo condiciones estándar utilizando una relación de sémola/agua de 1 a 4.

La cebada germinada, el material no tratado y/o la malta se maceran utilizando un programa de maceración estándar con una sacarificación de 2 pasos en presencia de las enzimas indicadas.

5

	Material tratado (prueba 1 y 2)	Material no tratado (prueba 3)	Material no tratado (prueba 4)	Referencia
pH	5.20	5.70	5.70	Tipicamente 5.20
Adición de enzima	UltraFlo® Max, 0.2 g/kg de DM Attenuzyme® Flex, 1.0 g/kg de DM	Ondeapro®, 2.0 g/kg de DM	Ondeapro®, 2.0 g/kg de DM	UltraFlo® Max, 0.08 g/kg de DM Attenuzyme® Core, 0.2 g/kg de DM

10 Ultraflo® Max, Attenuzyme® Flex, Attenuzyme® Core
y Ondeapro® están disponibles de Novozymes, Dinamarca. De
conformidad con el fabricante:

- Ultraflo® Max comprende β -glucanasa (700 EGU/g) y
xilanasa (250 FXU/g)
- Attenuzyme® Flex comprende glucoamilasa (400
15 AGU/g) y pululanasa (80 PUN/g) de conformidad con la hoja
del producto del fabricante
- Attenuzyme® Core comprende glucoamilasa (1600
AGU/g)
- Ondeapro® comprende β -glucanasa, Xilanasa, α -
20 amilasa, Pululanasa (637 PUN/g), Proteasa y Lipasa.

Cuando se determina la actividad de Attenuzyme®
Flex como se describió en el Ejemplo 2 se encontró que se
utiliza una cantidad de Attenuzyme® Flex que corresponde a
16243 mU de actividad de dextrinasa límite de cebada por g
25 de solución de enzima. Asimismo, se descubrió que la

actividad de glucoamilasa y α -amilasa combinada es de 628,863 U por g de solución de enzima.

El mosto frío se recolecta después de filtración estándar y ebullición del mosto con lúpulo agregado al
5 inicio de la ebullición.

El extracto original se ajusta con agua de la llave para obtener un platón final (en %P) de 11.5 después de ebullición y evaporación y el color del mosto se ajusta para obtener un color similar al color de la cerveza de
10 referencia.

Fermentación

- se agrega Brewers Clarex® (disponible de DSM) al mosto frío a 0.1 g/kg de DM
- el mosto se inocula (pitched) con 8E6 células/ml
15 de levadura lager (*S. pastorianus*),
- el mosto inoculado se airea con aire durante 30 minutos
- la fermentación se lleva a cabo en un tanque de fermentación sin presión a 15 °C hasta el final de la
20 fermentación
- la cerveza fermentada final se mantiene a 4 °C hasta la transferencia a un tanque

Transferencia al tanque

- la cerveza con menos de 5E5 células/ml en
25 suspensión se transfiere a un tanque

- el tanque se enjuaga con CO₂ a 0.5 barías antes y después del llenado
- el CO₂ se agrega a una sobrepresión de 0.5 barías y la cerveza se mantiene a 4 °C hasta la filtración

5 Filtración

- la cerveza se filtra a través de tres capas de láminas de filtro de profundidad
- se aplican 1.2 barías de presión con CO₂ a la cerveza en el tanque después de la filtración
- la cerveza se mantiene a 4 °C hasta el envasado

10

Envasado

La cerveza se envasa en botellas de 33 cl y se mantiene a 4 °C para las pruebas finales y evaluación sensorial.

15 Resultados del análisis

Azúcares en el mosto antes de la fermentación

20

La concentración de azúcares fermentables totales se determina esencialmente como se describió en el Ejemplo 9 y los resultados se muestran en la Tabla 6. Los niveles de glucosa son notablemente más altos en ambas cervezas preparadas de conformidad con los métodos de la invención (prueba 1 y 2) en comparación con la cerveza preparada a partir de cebada no malteada (prueba 3 y 4).

TABLA 6

	Prueba 1		Prueba 2		Prueba 3		Prueba 4		referencia	
	g/100	%	g/100	%	g/100	%	g/100	%	g/100	%
	g/%P		g/%P		g/%P		g/%P		g/%P	
	de		de		de		de		de	
	mosto		mosto		mosto		mosto		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 de amino libre y β -glucano

Las concentraciones de nitrógeno de amino libre (FAN) en el mosto antes de la fermentación así como en la cerveza final se determinan de conformidad con el protocolo estándar Gallary Beermaster de ThermoFisher para FAN, método colorimétrico. Los valores típicos de nitrógeno de amino libre (FAN) en el mosto son de 200 mg/L. FAN es importante para una buena viabilidad de la levadura durante la fermentación. En términos generales, son deseables niveles de FAN que sean lo suficientemente altos para obtener una buena viabilidad de la levadura. Los resultados de FAN en mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 7a y en cerveza en la Tabla 7b.

El β -glucano habitualmente es degradado durante el malteado convencional. Los niveles muy altos de β -

glucano son indeseables, debido a que esto puede ocasionar una filtración problemática. El nivel de β -glucano en mosto antes de la fermentación así como en cerveza se determina utilizando el kit "Beta-Glucan (High MW)" de Thermo Scientific de conformidad con las instrucciones del fabricante y los resultados se muestran en la Tabla 7a (mosto antes de la fermentación) y la Tabla 7b (cerveza).

TABLA 7a**Mosto antes de la fermentación**

10

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

TABLA 7b**Cerveza**

15

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

20

Aminoácidos en mosto antes de la fermentación

Se determina la concentración de todos los aminoácidos estándar en el mosto antes de la fermentación utilizando el kit AccQ•Tag de Waters siguiendo el procedimiento descrito en el mismo. Los resultados acerca

de los aminoácidos en mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 8.

En particular la concentración de valina antes de la fermentación es importante. Entre más valina esté presente en el mosto, menor será la probabilidad de formación de "diacetilo indeseado" durante la fermentación - y por tanto más largo el tiempo de descanso de DA. La concentración de valina es 5 veces (Prueba 1) y 2 veces (Prueba 2) más alta en mosto preparado de conformidad con la invención en comparación con la Prueba 3.

TABLA 8

mg/L de mosto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 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
Valina	153	71	31	50	132

TABLA 8 (cont.)

mg/L de mosto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Isoleucina	80	43	16	28	79
Leucina	214	109	52	69	181
Fenilalanina	139	75	39	47	144
Triptófano	47	32	25	30	
Aminoácidos totales	1940	1182	664	907	

Números clave de la elaboración de cerveza y fermentación

Se determinan diversos números clave de la elaboración de cerveza y de la fermentación y se comparan con la referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Es notable que las cervezas preparadas mediante los métodos de la invención tienen niveles de diacetilo significativamente más bajos. Por lo general se prefiere que los niveles de diacetilo sean tan bajos como sea posible.

TABLA 9

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 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, % en volumen	5.2	5.2	5.6	5.4	4.54
Color, unidades EBC	5.4	8.0	5.4	7.1	6.4

TABLA 9 (cont.)

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Amargor	14	14	16	18	16
Diacetilo, ppb	14	15	27	28	22
SO₂, mg/L	1	1	1	1	3

5

Evaluación del panel sensorial

Todas las cervezas preparadas como se describe en este ejemplo se someten a evaluación por parte de un panel sensorial. La calificación total del sabor para todas es aceptable. Una diferencia entre las diferentes cervezas es que la cerveza de la Prueba 3 tiene la calificación "notablemente" para el sabor "jabonoso, grasoso, a diacetilo, grasiento rancio", mientras que la cerveza de la Prueba 2 (preparada de conformidad con la invención) solamente tiene la calificación "ligeramente" para este sabor.

10

15

Resumen

Los desafíos de la escasez futura de agua y energía se deben resolver en una manera social, económica y ambientalmente responsable. En este sentido, la presente invención contribuye a la sustentabilidad a largo plazo de la producción de cerveza en términos del uso reducido de agua y energía. A través de la eliminación del procedimiento de secado en horno tradicional, combinado con la integración directa del remojo, la germinación y el

20

25

descanso de aire al procedimiento de elaboración de cerveza, la aplicación de los métodos de la presente invención reducen en gran medida los costos de entrada y funcionamiento de la fabricación de cerveza.

5 La presente invención puede contribuir a reducir los costos de entrada y reducir la presión ambiental en las industrias de malteado y elaboración de cerveza de numerosas maneras, incluyendo:

10 - Los procedimientos de remojo y germinación que actualmente toman varios días para completarse se pueden completar mucho más rápido

 - Los procedimientos de remojo y germinación se pueden llevar a cabo en un solo recipiente en una sola ubicación

15 - El segundo paso de remojo tradicional del procedimiento de malteado se puede eliminar

 - Los procedimientos pueden reducir el consumo de agua, por ejemplo hasta en 40%

20 - Los costos elevados de calefacción para secar en horno la malta se pueden eliminar

 - Los costos elevados de transporte para trasladar la malta desde la maltería hasta la cervecería se pueden eliminar

25 - El equipo y planta requeridos para llevar a cabo los métodos de la invención pueden ser compatibles con el

equipo existente en cervecerías y por lo tanto no requerirán gastos grandes de capital nuevo.

Literatura citada

Briggs DE (1998) In: Malts and Malting. Blackie
5 &, Professionals.

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

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

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

**MÉTODO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE CEREAL Y MÉTODO PARA
PROCESAR ESTE EXTRACTO COMO UNA BEBIDA**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere, en términos
generales, a la germinación y preparación de extractos
acuosos de cereales (por ejemplo preparados mediante
maceración), incluyendo los procesos para producir cerveza.
La invención por lo tanto provee un proceso de aporte bajo,
10 rápido y continuo para preparar cerveza a partir de granos
de cebada. Los métodos pueden realizarse en una instalación
individual. La presente invención es igualmente aplicable a
la germinación y preparación de extractos acuosos de otros
granos de cereal - incluyendo arroz, sorgo, maíz, mijo y
15 trigo - así como a procesos de elaboración de cerveza que
comprenden complementos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 En los procesos de elaboración de malta
comerciales, los granos de cebada se germinan, o maltean,
20 bajo condiciones controladas que permiten la movilización
parcial de las reservas de almidón y proteínas del
endosperma amiláceo a lo largo de un periodo de 4 a 6 días.
El proceso de elaboración de malta típicamente se inicia
sumergiendo los granos secos de cebada en agua. Este

proceso es conocido como remojo en el cual el objetivo es no solamente limpiar el grano, sino también elevar su contenido de humedad hasta aproximadamente 40-45% (p/p) para que el siguiente paso de movilización del endosperma ocurra más rápidamente. Durante el remojo, el agua se drena una vez para permitir la re-aireación del grano. Este paso es conocido como el "descanso de aire" y se considera necesario, principalmente debido a que el grano sumergido se queda sin oxígeno después de aproximadamente 16 horas. Después de un "descanso de aire" de aproximadamente 8 horas, el grano se vuelve a sumergir en agua para completar el tratamiento de remojo durante otro periodo de 8 horas - o en una serie de pasos de volver a remojar. El proceso de remojo de dos pasos para incrementar el contenido de humedad del grano seco hasta 40%, o más alto, toma aproximadamente 32 horas en total. En algunas malterías, se utilizan técnicas de remojo por aspersión.

Los granos remojados se extienden para la germinación, durante la cual las enzimas secretadas a partir de la aleurona y las células del epitelio escutelar - junto con algunas que pre-existen en las células del endosperma amiláceo - degradan las paredes celulares, el almidón y las proteínas. Bajo condiciones normales de germinación, se cree que la fitohormona ácido giberélico

(GA por sus siglas en inglés) es sintetizada en la región nodal, o en otra parte en el embrión, desde donde ésta se difunde a lo largo del gradiente de agua (Fincher, 2011).

El malteador normalmente tiene como objetivo
5 inducir rápidamente en los granos la síntesis de la mayor cantidad de enzimas degradadoras de almidón como sea posible. En muchos programas de malteado comerciales, se agrega GA para acelerar el proceso de secreción de enzima desde la capa de aleurona. Las enzimas que degradan el
10 almidón – las cuales incluyen α - y β -amilasas, enzimas que des-ramifican el almidón y α -glucosidasas – parcialmente despolimerizan las reservas de almidón del grano a monosacáridos, oligosacáridos, y glucosa (Smith et al., 2005; con respecto a dichas β -amilasas, es notable que
15 éstas son depositadas en el endosperma amiláceo durante el desarrollo del grano). Los productos de despolimerización del almidón posteriormente son utilizados por las células de levadura como una fuente de carbono y se fermentan hasta etanol de cerveza. El poder diastásico es un parámetro de
20 calidad del malteado que se refiere a los niveles de actividad de la batería de enzimas que degradan el almidón, con valores altos deseables para elaborar cerveza.

Otros componentes principales del grano de cebada incluyen proteínas de almacenamiento, las cuales también se

encuentran en las células muertas del endosperma amiláceo e incluyen hordeínas así como agua y proteínas solubles en sal. La despolimerización de éstas también comienza de manera natural en el proceso de malteado, pero el cervecero puede controlar el grado de degradación de estas proteínas de modo que se liberen suficientes péptidos y aminoácidos para apoyar el crecimiento de las levaduras durante el paso de germinación subsiguiente en la cervecería. Sin embargo, si la degradación de las proteínas de almacenamiento se produce en exceso, las proteínas liberadas pueden causar dificultades en el proceso de elaboración de cerveza. En particular, niveles elevados de proteína soluble liberada pueden precipitar y formar turbidez indeseable en el producto final de cerveza o incrementar el potencial para formación de aldehído de Strecker durante el almacenamiento de la cerveza. En las especificaciones de la calidad del malteado, es deseable un nivel adecuado de nitrógeno de amino libre (FAN por sus siglas en inglés) para el crecimiento de la levadura durante la fermentación. El Indicie Kolbach es una medida de la relación de proteína soluble:proteína total, generalmente prefiriéndose malta que dé origen a un índice Kolbach adecuado. El grado de degradación de proteína es, por lo tanto, un desafío continuo para el malteador. Además del problema de precipitación de la cerveza que puede ser asociado con

exceso de proteína extraída, los niveles muy altos de FAN también pueden llevar a dificultades, a través del potencial para formación de mal sabor.

Los malteadores también tratan de inducir niveles
5 altos 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 arabinoxilanos. Los (1,3;1,4)- β -glucanos no completamente degradados pueden ser especialmente problemáticos para los cerveceros, debido a que éstos
10 pueden ser extraídos de la malta en formas solubles que forman soluciones acuosas altamente viscosas que hacen lentos los procesos de filtración en la cervecería y contribuyen a turbidez indeseable en la cerveza final. Por lo tanto, los niveles bajos de (1,3;1,4)- β -glucano soluble
15 representan un parámetro importante de la calidad del malteado, mientras que niveles altos de enzimas (1,3;1,4)- β -glucanasa siguen siendo medidas importantes de la calidad del malteado.

Como se indicó anteriormente, el proceso de
20 germinación típicamente toma aproximadamente 4 a 5 días. Después de los pasos de germinación controlada, la malta húmeda se seca desde un contenido de humedad de aproximadamente 40% hasta 4 a 5%. Este proceso de secado, denominado horneado, consume mucha energía y representa un
25 costo importante para la industria.

El secado en horno ha sido considerado una parte importante de la producción de cerveza por múltiples razones. Una razón importante es que durante la germinación se forman raicillas (también referidos como "culmos"). Las

5 raicillas tienen un sabor amargo, el cual afecta el sabor residual de la cerveza, y además, las raicillas pueden añadir un color indeseable a la cerveza (véase Beer Brewing Technology (1999):183, publicado por Shokuhin Sangyo Shimbun así como el documento US 9,326,542). Una vez que la

10 malta verde ha sido secada con horno las raicillas se pueden retirar fácilmente utilizando por ejemplo un desraizador. De conformidad con el libro de texto general "Malts and Malting" de D.E. Briggs después los "culmos se deben retirar [...] debido a que éstos son extremadamente

15 higroscópicos, ricos en sustancias nitrogenadas solubles, contienen sustancias amargas y con poco sabor y pueden ser ricos en dióxido de azufre y/o nitrosaminas. El desraizado se debe realizar poco después de quitar la malta del horno para ayudar a enfriarla y antes que las raicillas recojan

20 humedad del aire, se vuelvan aguadas y plegables (menos quebradizas) y por lo tanto, más difícil de romper y separar" (D.E. Briggs, Malts and Malting; p695 First Edition, 1998 Published by Blackie & Professionals, London, ISBN0 412 29800)

25 La malta secada en horno generalmente tiene un

nivel de humedad de 4.5-5.0%. La malta secada en horno se transporta posteriormente desde la maltería hacia la cervecería por carretera, ferrocarril o mar. Esto se relaciona con el hecho que los procesos de malteado y elaboración de cerveza tradicionalmente han sido llevados a cabo en diferentes ubicaciones y a menudo por diferentes entidades corporativas.

En la cervecería, la malta secada en horno se muele para romper el grano, y el contenido resultante se extrae con agua caliente en un proceso conocido como maceración. El material extraído incluye almidón, proteína y moléculas de la pared celular parcialmente degradados como se describió anteriormente, y éstos son degradados adicionalmente por enzimas del grano endógenas que se extrajeron de la malta. En esta etapa, algunos cerveceros agregan fuentes de carbono adicionales – y generalmente más baratas (complementos) – para apoyar la fermentación de levadura subsiguiente y para compensar los costos más altos de la malta. Dichos complementos pueden ser cebada, arroz, trigo u otras harinas de cereales provenientes de granos no germinados, pero su adición podría necesitar la adición concomitante de enzimas hidrolíticas, debido a que no hay suficientes enzimas endógenas en la malta para degradar los componentes del complemento. Las enzimas añadidas por lo

general provienen de extractos no purificados y relativamente baratos de cultivos fúngicos y/o bacterianos. La adición de enzimas exógenas no es legal en algunos países, particularmente en donde la cerveza se debe producir en entornos estrictamente regulados.

La degradación adicional del almidón, y otros componentes del endosperma extraídos en agua caliente, procede en un proceso conocido como sacarificación. Después de la maceración, los extractos se filtran, con frecuencia en una cuba de filtración, y se enfrían. El extracto se puede hervir en presencia del lúpulo o extractos del lúpulo, y después que se enfría se agregan los cultivos de levadura para la fermentación de los azúcares liberados hasta etanol. La cerveza producida de esta manera por lo general se madura y filtra antes de embotellar. La cerveza también se puede carbonatar antes del embotellado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para la germinación y preparación rápida de extractos acuosos de cereales. Los métodos aceleran significativamente el proceso de preparación del mosto para la producción de bebidas basadas en cereales, al tiempo que mantienen el potencial para preparar dicho mosto con niveles elevados de azúcares fermentables, y de preferencia con niveles bajos de β -glucano y xilano. En particular, las bebidas

preparadas a partir de dicho mosto se pueden caracterizar por un nivel bajo de sabor astringente.

La invención demuestra que se puede llevar a cabo un proceso de elaboración de cerveza continuo e integrado yendo desde grano de cebada seco hasta cerveza en una locación individual. En ese sentido, la presente invención provee métodos para el remojo y germinación combinados de grano de cereal a un contenido de humedad de por ejemplo >30 %, de preferencia >35 %, mediante aireación constante. De esta manera la invención puede proveer ahorros significativos de agua mediante la eliminación del secado de la malta así como ahorros significativos de energía por ejemplo mediante omisión del paso de secado en horno.

En un aspecto de la presente invención, los granos se sumergen e incuban en una solución acuosa (típicamente agua), en la cual el O₂ se suministra opcionalmente a dicho líquido. Típicamente, dicho O₂ se suministra continuamente durante toda la incubación, la cual por ejemplo puede estar en el intervalo de 20 a 72 horas y en general permite que el grano alcance no solamente el contenido de humedad apropiado sino también que germine en una manera controlada. El paso de germinación también puede comprender uno o más descansos de aire típicamente después del paso de incubación en solución acuosa bajo aireación.

Este proceso de germinación controlada se puede acortar mediante la adición de uno o más compuestos capaces de acelerar la germinación. Por ejemplo, se puede agregar la fitohormona ácido giberélico (GA) al líquido acuoso - ya sea desde el inicio o durante la incubación. El GA "activa" la expresión de gen en sus células objetivo, específicamente la aleurona y el epitelio escutelar del grano de cebada, incluyendo genes que codifican para enzimas endógenas necesarias para la hidrólisis de almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular. Por lo tanto, el tiempo total requerido para el remojo y germinación se puede reducir desde más de 5 días en los procesos de elaboración de cerveza convencionales hasta aproximadamente 2 días o menos utilizando la presente invención. Sin embargo, en algunas modalidades no se agrega GA exógeno durante la germinación.

Después de los pasos de germinación, la presente invención puede comprender un paso de tratamiento térmico de los granos de cereales terminados. A través de todos los pasos de germinación, la temperatura de preferencia se controla a un nivel predeterminado, el cual típicamente es menor de 35 °C. En un aspecto de la invención, los pasos de germinación son seguidos por un paso de tratamiento térmico a un intervalo de temperatura de por ejemplo 35 a 55 °C. Mediante la invención se demuestra que dicho tratamiento

térmico mejora las propiedades benéficas del grano germinado, tales como niveles mejorados de α -amilasa y limita la dextrinasa temprano durante la germinación.

En otro aspecto de la presente invención, el
5 cereal es un cereal con cascarilla que se descascarilla antes de la germinación con el fin de retirar por lo menos parte de dicha cascarilla. Estos pasos de descascarillar y/o tratamiento térmico han demostrado ser altamente benéficos para incrementar el nivel de enzimas hidrolíticas
10 en los granos germinados para preparar mosto con niveles elevados de azúcares fermentables.

Después del paso de germinación y/o tratamiento térmico, los métodos pueden comprender un paso de dividir finamente los granos de cereal germinados y/o tratados con
15 calor. Un aspecto particularmente interesante de la invención es que los métodos de la invención permiten proceder a dividir finamente los granos de cereal germinados inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico. Por consiguiente, los métodos en
20 general no comprenden un paso de secado de los granos de cereal germinados. En particular, los métodos no comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. El secado en horno es un paso que consume mucha energía, y la omisión del secado en horno por lo tanto lleva a ahorros
25 significativos de energía. Como se describió anteriormente,

un aspecto importante del secado en horno es permitir la fácil remoción de las raicillas. Antes del secado, es difícil lograr la remoción de las raicillas. Sin embargo, los granos de cereal germinados preparados de conformidad con los métodos de la presente invención tienen raicillas significativamente reducidas (típicamente menos de 4 g por 100 g de cebada germinada (peso seco)), y como se demuestra mediante la presente invención, el paso de secado en horno no es requerido con respecto al cereal germinado de conformidad con los métodos de la invención.

Los granos de cereal germinados se pueden dividir finamente, por ejemplo, sometiendo los granos de cereal germinados a molienda en húmedo, seguido por un paso de preparar un extracto acuoso, por ejemplo, macerando a una temperatura predeterminada durante cualquier tiempo adecuado como se describe en la presente solicitud más adelante en la sección "Preparar un extracto acuoso". La conversión de los sacáridos liberados, por ejemplo polisacáridos, y proteínas se puede facilitar durante la maceración mediante la adición de mezclas de enzimas exógenas que catalizan la degradación de almidón, proteínas de almacenamiento y polisacáridos de la pared celular. Las enzimas se pueden purificar parcialmente a partir de la cebada misma, de la malta o de otras fuentes - o, de manera alternativa, a partir de mezclas de enzimas fúngicas y/o

bacterianas que se pueden adquirir a partir de fuentes comerciales.

Además de los beneficios descritos anteriormente, la presente invención evita no solamente la necesidad de
5 secar la malta en horno, sino también la necesidad de transportar el grano seco desde la maltería hacia la cervecería. Se pueden lograr ahorros en los costos de energía de hasta 50% a través de esta invención de remojo y germinación combinados, lo cual puede reducir en gran
10 medida la huella de carbono de la industria. Esto es importante debido a las presiones legislativas y fiscales cada vez mayores a nivel mundial en la mayoría de los países para reducir las huellas de carbono de las industrias de producción de malta y de cerveza.

Además en el contexto de sustentabilidad, la presente invención permite que la producción completa de
15 cerveza se pueda realizar en equipo de cervecería ya existente, por lo que se requiere un pequeño gasto de capital adicional.

Por consiguiente, en un aspecto se provee un
20 método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

- a) proveer granos de un cereal;
- c) someter los granos de cereal a un paso de
25 germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y e); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

Se debe entender que la frase "dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en cualquier momento entre los pasos c) y e)" incluye por ejemplo que dichos granos de cereal puedan tener un contenido de por encima de 20 % en cualquier momento durante los pasos c), d) y e), en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta la finalización del paso e) o en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta el inicio del paso e).

En otro aspecto se provee un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

b) tratar dichos granos de cereal para retirar la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C;

d) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20%; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20% en cualquier momento entre los pasos c) y d); y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

5 En otro aspecto se provee un método para producir una bebida, dicho método comprende los pasos de:

i. preparar un extracto acuoso mediante los métodos descritos en la presente solicitud;

ii. procesar dicho extracto como una bebida.

10 La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones anexadas a la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un ejemplo de equipo útil para realizar el método de la invención en el cual los granos se pueden sumergir en una solución acuosa y airear continuamente. El equipo comprende una entrada para los granos de cereal (1), un tanque, por ejemplo un tanque de remojo (2); entradas para gas, por ejemplo piedras sinterizadas (3); una bomba por ejemplo una bomba de aire (4); una salida para granos de cereal (5); una bomba para los granos (6); un equipo para dividir finamente los granos de cereal por ejemplo un molino (7); una entrada (8); una cuba, por ejemplo una cuba de maceración (9), y; una salida (10).

25 La Figura 2 muestra un ejemplo de equipo útil

para realizar los pasos de la invención en el cual los granos se pueden sumergir en una solución acuosa y airear continuamente. El equipo comprende: una entrada para los granos de cereal (1); un tanque (2); una rejilla o una malla, por ejemplo una malla de metal (3); entradas para gas, por ejemplo piedras sinterizadas (4) y; una bomba, por ejemplo una bomba de aire (5).

Las Figuras 3A-3B muestran granos de cebada sin cascarilla después de incubación en agua a 15 °C o 25 °C ya sea durante 24 horas o 48 horas bajo el flujo de aire indicado. En la Figura 3A se muestra una población de granos, mientras que la Figura 3B muestra granos representativos individuales. Es notable que ya después de 24 horas a 15 °C, los granos han iniciado la germinación (con un brote visible incluso con un flujo de aire de solamente 30 L/hora, y varias raicillas pequeñas son visibles después de 48 horas. Después de 24 horas a 25 °C, los granos han iniciado la germinación y contienen un brote visible, incluso con un flujo de aire de solamente 30 L/hora. Con un flujo de aire más alto, o después de 48 horas, son visibles varias raicillas pequeñas.

Las Figuras 4A-4B muestran granos de cebada con cascarilla después de incubación en agua a 15 °C o 25 °C ya sea durante 24 horas o 48 horas bajo el flujo de aire indicado. La Figura 4A muestra una población de granos,

mientras que la Figura 4B muestra granos representativos individuales.

Las Figuras 5A-5C muestran la actividad enzimática después de 24 horas de incubación a 25 °C en agua con aireación (90 l/h/kg) (WA) seguido por 18 horas de incubación a 25 °C en aire con aireación (90 l/h/kg) (A) seguido por descanso de aire con aire atmosférico a diferentes temperaturas (25-40-50-60°C) durante 6 horas (gris) o 24 horas (negro) de la Figura 5A) α -amilasa, Figura 5B) β -amilasa y Figura 5C) actividad de dextrinasa límite libre, para cebada con cascarilla.

Las Figuras 6A-6C muestran la actividad enzimática después de 24 horas de incubación a 25 °C en agua con aireación (90 l/h/kg) (WA) seguido por incubación de 24 horas a 25 °C en aire con aireación (90 l/h/kg) (A) seguido por 2 (gris) o 4 (negro) horas adicionales de aireación a diferentes temperaturas (40, 50, 60°C) de Figura 6A) α -amilasa, Figura 6B) β -amilasa y Figura 6C) actividad de dextrinasa límite libre, para cebada con cascarilla.

Las Figuras 7A-7C muestran el efecto de combinar diferentes tratamientos individuales para optimizar la producción de enzima hidrolítica en granos de cebada incubados en un tanque bajo aireación (Tratamiento 1, 48 horas WA de remojo (gris) 48 horas de incubación en agua

que contiene 0.01 % de H_2O_2 , 1000 nM de GA3 y 0.01 % de antiespumante con aireación con aire 90 l/h/kg, a 25 °C (WA); Tratamiento 2, descascarillado_24h WA+ 24h A de remojo, negro: 24 horas de incubación en agua de la llave
5 que contiene 0.01 % de H_2O_2 , 1000 nM de GA3 y 0.01 % de antiespumante, bajo aireación con aire 90 l/h/kg, seguido por 24 horas de incubación en aire bajo aireación a 90 l/h/kg de aire 25°C). Los números 1 a 10 indican los resultados de diferentes cultivares de cebada.

10 La Figura 8 muestra el % de pérdida de peso después de la remoción de las raicillas tanto en cebada con cascarilla como en cebada sin cascarilla germinada mediante incubación en solución acuosa bajo aireación durante 48 horas (48hWA) y cebada germinada bajo condiciones de remojo
15 estándar durante 96 horas (Malteado 96 horas).

La Figura 9 muestra el contenido de NDMA en cebada no germinada, en cebada germinada mediante los métodos de la invención (Malta 1a), y en 3 diferentes maltas convencionales (Malta 1b, Malta 2 y Malta 3).

20 La Figura 10 muestra un ejemplo de un proceso de maceración con granos remojados, germinados y molidos en húmedo.

La Figura 11 muestra un diagrama de la capacidad de filtración del mosto, el cual ha sido preparado a partir
25 de granos germinados bajo aireación variable en presencia o

ausencia de la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max (UFM por sus siglas en inglés).

La Figura 12 muestra un diagrama sobre el nivel de azúcares fermentables en mosto preparado a partir de granos germinados durante 48 horas a 25 °C bajo condiciones de aireación variables. Las muestras suplementadas con la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max están marcadas con UFM.

Definiciones

El término "aproximadamente" cuando se utiliza en la presente solicitud con relación a valores numéricos de preferencia significa $\pm 10 \%$, de manera más preferida $\pm 5 \%$, de manera incluso más preferida $\pm 1 \%$.

El término "complemento" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a fuentes de materia prima ricas en carbono agregadas durante la preparación de cerveza. El complemento puede ser un grano de cereal no germinado, el cual se puede moler junto con los granos germinados preparados de conformidad con la invención. El complemento también puede ser un jarabe, azúcar o similares.

El término "brote" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la yema de crecimiento embrionario que es visible durante la fase de germinación de un grano de cereal.

El término "contenido de agua" de un grano tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al % de agua p/p en dicho grano.

5 El término "grano germinado" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a granos que han desarrollado un brote visible, de preferencia un brote de por lo menos 1 mm, tal como de por lo menos 2 mm.

10 El término "inicio de la germinación" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al punto en el tiempo en el cual los granos de cebada con un contenido de agua de menos de 15 % se ponen en contacto con suficiente agua para iniciar la germinación.

15 El término " β -glucano" tal como se utiliza en la presente solicitud, a menos que se especifique de otra manera, se refiere al polímero de la pared celular del cereal "(1,3;1,4)- β -glucano".

20 De manera similar, el término "xilano" tal como se utiliza en la presente solilcitud, a menos que se especifique de otra manera, se refiere al polímero de la pared celular del cereal "arabinoxilano".

25 Los términos "malta secada en horno" y "malta horneada" tal como se utiliza en la presente solicitud se refieren a granos de cereal germinados, los cuales se han secado mediante secado en horno. La malta secada en horno típicamente tiene un contenido de agua de aproximadamente 4

a 5 %.

El término "grano retoñado" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un grano que ha desarrollado un brote visible y un tallo visible.

5 El término "remojo" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al proceso de incrementar el contenido de agua de un grano de cereal.

El término " β -glucanasa" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a enzimas con el potencial para despolimerizar el β -glucano del cereal. Por
10 consiguiente, a menos que se especifique de otra manera, el término " β -glucanasa" se refiere a una endo-enzima o exo-enzima o mezclas de las mismas caracterizada por actividad de (1,3;1,4)- β -glucanasa y/o (1,4)- β -glucanasa.

15 El término "xilanasa" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a enzimas con el potencial de degradar las cadenas principales y secundarias de xilano y arabinoxilano. Por consiguiente, a menos que se especifique de otra manera, el término "xilanasa" se refiere a una
20 enzima o una mezcla de enzimas caracterizada por actividades enzimáticas derivadas por una o más de las siguientes clases de enzimas: endo-1,4-xilanasa; exo-1,4-xilanasa; arabinofuranosidasa; ácido ferúlico esterasa.

Actividades de enzima de granos de cereal tal
25 como se utiliza en la presente solicitud se refiere a las

actividades medidas en harina preparada a partir del tipo de grano especificado. Por ejemplo, 10 U/g de actividad de α -amilasa por gramo de grano de cereal se refiere a dicha actividad de α -amilasa (10 U) medida en un extracto acuoso derivada a partir de 1 g de harina (materia seca) de dicho cereal. La actividad de α -amilasa se determina mediante K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad de β -amilasa se determina mediante K-BETA3 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda). La actividad de dextrinasa límite se determina mediante T-LDZ1000 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda).

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

El volumen de O₂ como se indica en la presente solicitud se refiere al volumen de O₂ a 1 atm y 20 °C. En modalidades de la invención en las cuales el O₂ está comprendido en una mezcla de gases, entonces se puede determinar el volumen total de la mezcla de gases, y el volumen de O₂ puede ser calculado como el porcentaje del volumen total constituido por O₂. A manera de ejemplo entonces el aire atmosférico comprende 21 % de O₂. Por lo tanto el volumen de O₂ dentro del aire atmosférico tal como se utiliza en la presente solicitud es 21 % del volumen total del aire atmosférico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONGranos de cereal

Los métodos de la presente invención son métodos para producir un extracto acuoso de un cereal o métodos para producir una bebida a partir de dicho extracto acuoso de un cereal. Los presentes métodos comprenden un paso de germinación, el cual comprende incubar granos de cereal en una solución acuosa. Se debe indicar que la mezcla de solución acuosa y granos de cereal se puede considerar una suspensión.

El grano de cereal puede ser el grano de cualquier cereal, por ejemplo un cereal que se selecciona a partir del grupo que consta de cebada, arroz, sorgo, maíz, mijo, triticale, centeno, avena y trigo. En modalidades preferidas de la invención los granos de cereal son granos de cebada. Dichos granos pueden ser granos de cualquier variedad de cebada, tal como cualquiera de las variedades de cebada descritas más adelante en la presente solicitud 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 cereal pueden tener un contenido de agua de cuando mucho 30 %, de preferencia cuando mucho 20 %, tal como cuando mucho 15 %, por ejemplo en el intervalo de 5 a 15 %.

Antes de la incubación en dicha solución acuosa, el grano de cereal pudo haber sido sometido a uno o más pasos de tratamiento antimicrobiano. Dicho tratamiento antimicrobiano puede ser cualquier tratamiento antimicrobiano útil, el cual 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, que a las concentraciones utilizadas no sea tóxico para los granos de cereal. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede ser un compuesto que contenga cloro, por ejemplo hipoclorito. El agente antimicrobiano también puede ser peróxido, por ejemplo peróxido de hidrógeno y/o ácido peracético. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos comerciales útiles incluyen P3-Hipocloran®, P3-peroxisan® o P3-oxonia activo 150®. Los granos de cereal se pueden tratar con hipocloran a una concentración en el intervalo de 0.1 a 10 %, tal como en el intervalo de 0.5 a 5 %, por ejemplo aproximadamente 1 %, tal como 1 %. Los granos de cereal se pueden tratar con dicho hipocloran durante un intervalo de 15 minutos a 10 horas, tal como en el intervalo de 1 a 5 horas, por ejemplo durante un intervalo de 2 a 4 horas. Después del tratamiento, los granos de cereal se pueden lavar una o más veces.

En algunas modalidades de la invención, el tratamiento antimicrobiano se lleva a cabo incubando granos de cereal en una solución acuosa que comprende el agente antimicrobiano. Inmediatamente después de dicha incubación, se puede iniciar el paso de germinación, por ejemplo iniciando la aireación. Por lo tanto, en dichas modalidades, no se requiere cambiar la solución acuosa, y la misma solución acuosa se puede utilizar para el tratamiento antimicrobiano y por lo menos durante el inicio del paso de germinación subsiguiente. Esto puede ser, en particular, el caso, cuando el agente antimicrobiano es un peróxido, por ejemplo peróxido de hidrógeno.

Se podría preferir que dichos granos de cereal no hayan sido sometidos a germinación antes de la incubación en solución acuosa de conformidad con la invención. Por consiguiente, se podría preferir que los granos de cereal no hayan sido sometidos a un paso de pre-germinación.

Como se describió anteriormente el grano de cereal puede ser cualquier grano de cereal. Algunos granos de cereal comprenden una cascarilla, mientras que otros granos de cereal son sin cascarilla. Los granos de cereal con cascarilla pueden ser tratados para retirar por lo menos parte de la cascarilla antes del paso de germinación. En general, el tratamiento para retirar la cascarilla no es requerido si se utiliza un grano de cereal sin cascarilla.

Los cereales sin cascarilla incluyen por ejemplo variedades de cebada sin cascarilla y trigo.

Los granos de cereal con cascarilla se pueden tratar para retirar la cascarilla sometiendo los granos de cereal a tratamiento físico que retire la cascarilla. Dicho
5 tratamiento físico se puede seleccionar por ejemplo a partir del grupo que consta de pulido, enarenado, descascarillado y alisado. De preferencia, el tratamiento físico da como resultado una pérdida de la cascarilla. La
10 pérdida de la cascarilla se puede determinar como una pérdida de peso general. Por lo tanto, el tratamiento físico de preferencia lleva a una pérdida de por lo menos 2 %, por ejemplo por lo menos 3 % del peso total de los granos de cereal. Por ejemplo, dicho tratamiento físico
15 puede llevar a una pérdida en el intervalo de 2 a 7 %, tal como una pérdida en el intervalo de 3 6 % del peso total de los granos de cereal.

Germinación

Los métodos de la presente invención comprenden
20 un paso de germinación de granos de cereal. El paso de germinación puede comprender un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa típicamente bajo aireación. El paso de germinación comprende un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa, el cual opcionalmente se
25 lleva a cabo bajo aireación. En algunas modalidades, el

paso de germinación comprende un paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa sin aireación. En otras modalidades, el paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa se lleva a cabo bajo aireación.

5 Incubación en una solución acuosa bajo aireación

Los granos de cereal pueden ser cualquiera de los granos de cereal descritos anteriormente en la presente solicitud en la sección "Granos de cereal", y la solución acuosa puede ser cualquiera de las soluciones acuosas descritas más adelante en la presente solicitud en la sección "Solución acuosa".

Se podría preferir que durante dicha incubación en solución acuosa, los granos de cereal sean completamente cubiertos por dicha solución acuosa durante la incubación completa. Por lo tanto, los granos de cereal por ejemplo se pueden incubar en por lo menos 1, de preferencia por lo menos 1.5, de manera más preferida por lo menos 2, por ejemplo en el intervalo de 1 a 10, tal como en el intervalo de 1 a 5, por ejemplo en el intervalo de 1.5 a 3 L de solución acuosa por kg de grano de cereal (peso seco).

Por lo tanto, en algunas modalidades, los granos de cereal se sumergen en la solución acuosa durante la incubación completa en dicha solución acuosa.

En otras modalidades, los granos de cereal absorben la solución acuosa en una manera, de modo que al

final de la incubación en dicha solución acuosa el total de dicha solución acuosa es absorbida por los granos de cereal.

5 En otras modalidades, la solución acuosa que queda después de la incubación bajo aireación puede ser drenada de los granos de cereal.

10 En algunas modalidades, se prefiere que después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, de preferencia por lo menos 80 %, de manera más preferida por lo menos 90 %, de manera incluso más preferida, por lo menos 95 %, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen un brote visible de por lo menos 1 mm.

15 En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, tal como por lo menos 80 %, por ejemplo por lo menos 90 %, tal como por lo menos 95 %, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen una o más raicillas visibles.

20 En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces la mayoría, por ejemplo por lo menos 70 %, tal como por lo menos 80 %, por ejemplo por lo menos 90 %, tal como por lo menos 95%, tal como esencialmente todos los granos de cereal contienen una o más raicillas visibles y un tallo

25

visible.

En algunas modalidades, después de la incubación de los granos de cereal en dicha solución acuosa, entonces los granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo

5 menos 30 %, de preferencia por lo menos 35 %, de manera más preferida de por lo menos 37 %, por ejemplo en el intervalo de 35 a 60 %, tal como en el intervalo de 35 a 50 %, por ejemplo en el intervalo de 37 a 60 %, tal como en el intervalo de 37 a 50 %. En algunas modalidades, los granos

10 de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 30 % después de la incubación de los granos de cereal en la solución acuosa, tal como por lo menos 31 %, tal como por lo menos 32 %, tal como por lo menos 33 %, tal como por lo menos 34 %, tal como por lo menos 35 %, tal como por lo

15 menos 36 %, tal como por lo menos 37 %, tal como por lo menos 38 %, tal como por lo menos 39 %, tal como por lo menos 40 %, tal como por lo menos 45 %, tal como por lo menos 46 %, tal como por lo menos 47 %, tal como por lo menos 48 %, tal como por lo menos 49 %, tal como por lo

20 menos 50 %, tal como por lo menos 51 %, tal como por lo menos 52 %, tal como por lo menos 53 %, tal como por lo menos 54 %, tal como por lo menos 55 %, tal como por lo menos 56 %, tal como por lo menos 57 %, tal como por lo menos 58 %, tal como por lo menos 59 %, tal como 60 %.

25 El contenido de agua de los granos de cereal se

puede determinar determinando el peso de los granos de cereal, seguido por secado de dichos granos de cereal y determinación del peso de los granos de cereal secos. La diferencia en peso de los granos de cereal húmedos y secos se considera que es agua, y el contenido de agua se provee como el peso del agua dividido entre el peso total de los granos de cereal (granos de cereal o menos). El contenido de agua provisto en % es por lo tanto un p/p %.

Los granos de cereal se pueden incubar en dicha solución acuosa durante el tiempo suficiente para permitir la germinación de la mayoría de dichos granos de cereal como se describió anteriormente. Los granos de cereal también se pueden incubar en dicha solución acuosa durante el tiempo suficiente con el fin de obtener el contenido de agua antes mencionado. Típicamente, los granos de cereal se incuban en la solución acuosa durante por lo menos 20 horas, tal como por lo menos 24 horas. Típicamente, los granos se incuban en dicha solución acuosa cuando mucho durante 72 horas, tal como cuando mucho durante 60 horas, por ejemplo cuando mucho durante 48 horas.

En algunas modalidades los granos de cereal se incuban en la solución acuosa bajo aireación durante un intervalo de 20 a 72 horas, de preferencia durante un intervalo de 40 a 55 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 45 a 50 horas. Esto puede ser el caso en

particular en modalidades de la invención, en las cuales la germinación no comprende un paso de descanso de aire.

En algunas modalidades de la invención, el paso de germinación comprende una incubación en la solución acuosa seguido por un descanso de aire. En dichas modalidades la incubación en solución acuosa se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para permitir suficiente actividad de enzima en los granos de cereal germinados después del descanso de aire. La actividad de enzima de preferencia es como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Granos de cereal germinados".

En dichas modalidades, los granos de cereal se pueden incubar por ejemplo en la solución acuosa durante por lo menos 16 horas, tal como por lo menos 20 horas. Típicamente, los granos se incuban en dicha solución acuosa cuando mucho durante 72 horas, tal como cuando mucho durante 40 horas, tal como durante cuando mucho 35 horas, por ejemplo cuando mucho durante 30 horas. Por lo tanto, en algunas modalidades los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa durante un intervalo de 20 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 20 a 60 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 48 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 30 horas, tal como durante un intervalo de 22 a 26 horas.

En algunas modalidades los granos de cereal se

incuban en la solución acuosa bajo aireación durante un intervalo de 16 a 40 horas, de preferencia durante un intervalo de 20 a 35 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 22 a 26 horas. Esto puede ser el caso en particular en modalidades de la invención, en las cuales la germinación también comprende un paso de descanso de aire.

El grano de cereal se puede incubar a cualquier temperatura útil, sin embargo se podría preferir que la incubación se lleve a cabo a una temperatura lo suficientemente alta para permitir un incremento rápido en el contenido de agua. Como se muestra en la presente solicitud más adelante en el Ejemplo 3, entonces un incremento en la temperatura puede avanzar de manera significativa el incremento en contenido de agua. Por lo tanto, se podría preferir que los granos de cereal se incuben en dicha solución acuosa a una temperatura de por lo menos 15 °C, tal como por lo menos 20 °C, tal como por lo menos 25 °C. En particular, los granos de cereal se pueden incubar en el intervalo de 10 a 35 °C, de preferencia en el intervalo de 15 a 30 °C, tal como en el intervalo de 20 a 30 °C, por ejemplo en el intervalo de 25 a 30 °C, tal como aproximadamente a 25 °C.

En particular, en modalidades de la invención en las cuales los granos de cereal se incuban a una

temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C, entonces dichos granos de cereal se pueden incubar durante un intervalo de 20 a 48 horas, tal como en el intervalo de 16 a 30 horas.

Como se describió anteriormente en la presente solicitud, entonces dichos granos de cereal se incuban frecuentemente en dicha solución acuosa, mientras se pasa O₂ a través de la solución acuosa. Esto también es referido como dichos granos de cereal son incubados en la solución acuosa bajo aireación. De preferencia, el O₂ se hace pasar a través de la solución acuosa de manera continua durante la incubación completa. Dicho O₂ se puede hacer pasar a través de la solución acuosa en cualquier modo útil, sin embargo frecuentemente se introduce un gas que contiene O₂ en el fondo y/o en la parte más baja del contenedor que comprende la solución acuosa con los granos de cereal. Típicamente, el gas se difunde a través de la mezcla de solución acuosa/grano de cereal y sale de la mezcla de solución acuosa/grano de cereal desde la parte alta de la solución acuosa. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en un aparato como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Aparato". También es posible que los gases pesados, especialmente CO₂, se extraigan desde el fondo del contenedor, con lo cual se puede proveer aire fresco//O₂ desde la parte superior del contenedor.

Dicho O_2 se puede agregar a dicha solución acuosa como O_2 puro. Con frecuencia, sin embargo, dicho O_2 está comprendido dentro de una mezcla de gases. En una modalidad dicho O_2 está comprendido dentro del aire atmosférico. Por lo tanto, el método de la invención puede comprender pasar aire atmosférico a través de dicha solución acuosa.

En general, por lo menos 2 L, de preferencia por lo menos 3 L, de manera más preferida por lo menos 4 L, de manera incluso más preferida por lo menos 5 L, de manera incluso más preferida por lo menos 6 L de O_2 pasan a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal por hora. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el intervalo de 2 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 2 a 75 L, tal como en el intervalo de 2 a 50 L, por ejemplo en el intervalo de 4 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 4 a 75 L, tal como en el intervalo de 4 a 50 L, por ejemplo en el intervalo de 6 a 100 L, por ejemplo en el intervalo de 6 a 75 L, tal como en el intervalo de 6 a 50 L O_2 pasan a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por kg de granos de cereal (peso seco) por hora.

En una modalidad se prefiere que por lo menos 20 g de O_2 por kg de grano de cereal, de manera más preferida por lo menos 30 g de O_2 por kg de grano de cereal, de manera incluso más preferida por lo menos 40 g de O_2 por kg

de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 40 a 100 g de O_2 por kg de grano de cereal, tal como en el intervalo de 40 a 80 g de O_2 por kg de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 60 g de O_2 por kg de grano de cereal se
5 pasa a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por hora. El peso del grano de cereal se provee como peso seco. Durante la incubación los granos de cereal típicamente absorben por lo menos algo de la solución acuosa y por consiguiente la concentración de O_2 en la
10 solución acuosa típicamente va a variar durante la incubación. Típicamente, la cantidad de O_2 suministrada por L de solución acuosa por hora está en el intervalo de 40 a 200 g, de preferencia en el intervalo de 50 a 150 g.

Como se indicó anteriormente, frecuentemente es
15 aire atmosférico el que se pasa a través de la solución acuosa. Por lo tanto, el método puede comprender pasar por lo menos 10 L, de preferencia por lo menos 15 L, de manera más preferida por lo menos 20 L, de manera incluso más preferida por lo menos 25 L, de manera incluso más
20 preferida por lo menos 30 L de aire atmosférico a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal por hora. El peso de dichos granos de cereal es el peso seco. Por ejemplo, en el intervalo de 10 a 500 L, por ejemplo en el intervalo de 10 a 375 L, tal como en el intervalo de 10 a
25 250 L, por ejemplo en el intervalo de 20 a 500 L, por

ejemplo en el intervalo de 20 a 375 L, tal como en el intervalo de 20 a 250 L, por ejemplo en el intervalo de 30 a 500 L, por ejemplo en el intervalo de 30 a 375 L, tal como en el intervalo de 30 a 250 L de aire atmosférico se
5 pasa a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por hora. En una modalidad en el intervalo de 50 a 110 L, de preferencia 80 a 100 L de aire atmosférico se pasa a través de dicha solución acuosa por kg de granos de cereal (peso seco) por hora.

10 Descanso de aire

Además de dicha incubación en solución acuosa bajo aireación, los granos de cereal también se pueden incubar en aire (por ejemplo en ausencia de solución acuosa). El paso de incubación en aire también puede ser
15 referido como "descanso de aire". Por lo tanto, después de la incubación en solución acuosa bajo aireación, la solución acuosa remanente se puede drenar y los granos de cereal se pueden incubar en aire. De manera alternativa, después de la incubación en solución acuosa bajo aireación,
20 toda la solución acuosa ha sido absorbida por los granos de cereal, los cuales después se pueden incubar en aire. Dicha incubación en aire de preferencia se lleva a cabo bajo aireación, por ejemplo el O_2 se puede pasar a través del contenedor que comprende los granos de cereal. De
25 preferencia, el O_2 se hace pasar a través de dicho

contenedor durante el descanso de aire completo. La cantidad de O₂ que se hace pasar a través del contenedor que comprende los granos de cereal, puede ser la misma cantidad de O₂ que se hace pasar a través de la solución acuosa como se describió anteriormente. El O₂ se puede proveer en forma de una mezcla de gases, tal como por ejemplo aire atmosférico.

El descanso de aire se puede llevar a cabo durante cualquier cantidad de tiempo apropiada, por ejemplo durante un intervalo de 18 a 50 horas. En una modalidad preferida, el descanso de aire se lleva a cabo durante por lo menos 20 horas, de preferencia durante por lo menos 22 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 20 a 38 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas, tal como en el intervalo de 22 a 26 horas.

El descanso de aire se puede llevar a cabo a temperaturas ambientales, tal como a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C, tal como por ejemplo en el intervalo de 23 a 27 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C. En particular, el descanso de aire se puede llevar a cabo durante por lo menos 20 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas a una temperatura en el intervalo de 20 a 30 °C.

En algunas modalidades de la presente invención

el descanso de aire se lleva a cabo a un flujo de aire en el intervalo de 85 a 95 L/h, por ejemplo en el intervalo de 87 a 93 L/h, tal como aproximadamente 90 L/h de aire atmosférico o una mezcla de gases que comprenda alrededor de 20 % de O₂ por kg de grano de cereal seco. En otras modalidades de la presente invención el descanso de aire se lleva a cabo a un flujo de aire en el intervalo de 17 a 21 L/h, tal como en el intervalo de 18 a 20 L/h, por ejemplo aproximadamente 19 L/h de O₂ por kg de grano de cereal seco.

Durante el descanso de aire se puede agregar agua o solución acuosa adicional a los granos de cereal, por ejemplo mediante riego o rociado. Sin embargo, durante el descanso de aire, los granos de cereal no se deben sumergir en solución acuosa.

Métodos de germinación

En una modalidad, los granos de cereal se pueden germinar utilizando métodos estándar como es sabido en la técnica para obtener granos germinados. La duración de dicha germinación de preferencia puede ser de cuando mucho 96 horas, de manera más preferida cuando mucho 72 horas. La germinación también puede comprender incubación en solución acuosa bajo aireación y opcionalmente descanso de aire subsiguiente como se definió anteriormente.

La germinación también puede comprender varios

pasos de incubación en solución acuosa y/o varios pasos de descanso de aire. En general el primer paso es un paso de incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente. Por lo tanto, la germinación puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"
- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

En esta modalidad, la incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación se puede llevar a cabo por ejemplo durante un intervalo de 16 a 30 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 26 horas, mientras que el descanso de aire se puede llevar a cabo durante un intervalo de 20 a 38 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 35 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, por ejemplo en el intervalo de 22 a 26 horas.

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación".

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire".

La germinación también puede comprender o constar de los siguientes pasos:

- incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

- incubación de granos de cereal en una solución

acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación"

- incubación de granos de cereal en aire como se describió anteriormente en la sección "Descanso de aire"

5 • incubación de granos de cereal en una solución acuosa bajo aireación como se describió anteriormente en la sección "Incubación en una solución acuosa bajo aireación".

El tiempo para cada incubación puede variar, sin embargo típicamente el paso completo de germinación, es
10 decir el tiempo total para todas las incubaciones en solución acuosa y todos los descansos de aire no excede 72 horas, de manera más preferida no excede 60 horas, de manera incluso más preferida no excede 54 horas. Por lo tanto, se podría preferir que el paso completo de
15 germinación se lleva a cabo durante un intervalo de 20 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 24 a 60 horas, por ejemplo durante un intervalo de 24 a 48 horas. Por consiguiente, si la germinación comprende varios pasos de incubación en solución acuosa y/o descansos de aire,
20 entonces cada paso de incubación generalmente es más corto.

En una modalidad el paso completo de germinación se lleva a cabo durante por lo menos 44 horas, tal como durante por lo menos 46 horas, por ejemplo durante por lo menos 48 horas. Por lo tanto, el paso completo de
25 germinación se puede llevar a cabo durante un intervalo de

44 a 72 horas, por ejemplo durante un intervalo de 46 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 48 a 72 horas, tal como durante un intervalo de 46 a 60 horas. El tiempo de germinación se puede determinar por ejemplo desde el inicio de la germinación hasta el inicio del tratamiento térmico como se describe más adelante. En modalidades de la invención que carecen del paso del tratamiento térmico, el tiempo de germinación se puede determinar por ejemplo desde el inicio de la germinación hasta el inicio de dividir finamente los granos de cereal.

En algunas modalidades se pueden agregar una o más enzimas exógenas. Por ejemplo, se pueden agregar una o más enzimas durante el paso de germinación por ejemplo como se describe en el documento WO2016/071463.

En una modalidad la germinación se lleva a cabo sin acidulación de los granos durante la germinación. La acidulación es la aplicación de sustancias ácidas a los granos durante la germinación. Dichas sustancias ácidas pueden ser por ejemplo ácidos orgánicos o inorgánicos fuertes a moderadamente fuertes, tales como ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido fosfórico o ácidos monocarboxílicos o sales ácidas de los mismos. En este sentido, los componentes del aire atmosférico y ácido giberélico no se consideran sustancias ácidas.

Tratamiento térmico

En una modalidad de la presente invención los granos de cereal germinados se someten a tratamiento térmico después del paso de germinación o como la parte final del paso de germinación. El tratamiento térmico provee niveles mejorados de enzimas hidrolíticas en el grano de cereal germinado.

Durante los pasos de germinación y tratamiento térmico, la temperatura de preferencia se controla. La temperatura se puede controlar mediante cualesquiera medios convencionales. Durante la germinación en el paso de incubación en una solución acuosa, la temperatura se puede controlar controlando la temperatura de dicha solución acuosa. Durante la germinación en el paso de incubación en aire, la temperatura se puede controlar controlando la temperatura del aire, por ejemplo mediante el uso de un flujo de aire con una temperatura controlada. El paso de germinación por sí mismo puede desarrollar calor, y por lo tanto podría ser necesario controlar la temperatura hasta el nivel deseado mediante enfriamiento.

Durante el paso de tratamiento térmico, la temperatura se puede controlar mediante diversos medios. Por ejemplo, la temperatura se puede controlar mediante un flujo de aire o mediante incubación en una solución acuosa con temperatura controlada. Como se mencionó anteriormente,

la germinación por sí misma puede desarrollar calor, y por lo tanto incluso durante el paso de tratamiento térmico la temperatura se puede controlar mediante enfriamiento. El enfriamiento se puede llevar a cabo con aire o agua.

5 Es un aspecto de la presente invención que el tratamiento de descanso de aire a una temperatura de cuando mucho 30 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C, como se describió anteriormente, se lleva a cabo durante por lo menos 20 horas, tal como por ejemplo por lo menos 22 horas,
10 de preferencia durante por lo menos 24 horas antes del tratamiento térmico.

 En una modalidad, la duración del paso de tratamiento térmico se lleva a cabo durante por lo menos 1 hora, tal como por lo menos 2 horas, por ejemplo durante un
15 intervalo de 1 a 12 horas, de preferencia durante un intervalo de 1 a 5 horas, tal como en el intervalo de 2 a 4 horas. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C, tal como por ejemplo en el intervalo de 40 a 50 °C.

20 Se prefiere que todos los pasos de la germinación y/o tratamiento térmico se lleven a cabo dentro del mismo contenedor. Dicho contenedor puede ser en particular un tanque, tal como cualquiera de los tanques descritos más adelante en la presente solicitud en la sección "Aparato".

25 El paso de tratamiento térmico si está presente

generalmente se lleva a cabo de tal manera que el contenido de agua de los granos de cereal germinados que se someten a dicho tratamiento térmico se reduzca hasta debajo de 20 % en cualquier momento entre el inicio de la germinación y el tratamiento térmico. En otras palabras, el paso de tratamiento térmico no es un paso de secado en horno. En algunas modalidades, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de agua de menos de 25 %, de manera incluso más preferida de menos de 30 %, de manera incluso más preferida de menos de 35 %, en cualquier momento durante el paso de tratamiento térmico.

Los granos de cereal de preferencia se dividen finamente esencialmente inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico. Por consiguiente, los métodos de la invención de preferencia no comprenden un paso de secado entre el paso de germinación y/o tratamiento térmico y dividir finamente los granos de cereal. Por lo tanto es un aspecto de la presente invención que los granos de cereal germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 25 %, de preferencia de por lo menos 30 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 35 % al momento de dividir finamente dichos granos de cereal. También es un aspecto de la presente invención que los granos de cereal germinados no tengan un contenido de agua de menos de 25 %, de preferencia de menos de 30 %, de manera incluso más

preferida de menos de 35 % en cualquier momento entre el momento de finalización del paso de germinación y el paso de dividir finamente dichos granos de cereal.

Los métodos de la invención de preferencia no
5 comprenden un paso de enfriar activamente los granos de cereal tratados con calor antes de dividirlos finamente. Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención que la temperatura de los granos germinados sea mayor de 35 °C en cualquier punto entre el paso de tratamiento térmico y el
10 paso de dividir finamente los granos germinados.

Granos de cereal germinados

La invención se refiere a un método que comprende un paso de producir granos de cereal germinados y opcionalmente un paso de tratamiento térmico de dichos
15 granos germinados.

Los granos de cereal germinados y/o tratados con calor de preferencia comprenden una o más actividades de enzima hidrolítica, por ejemplo provistas por α -amilasas, β -amilasas, enzimas que des-ramifican el almidón (tal como
20 dextrinasas límite), α -glucosidasas y proteasas.

Frecuentemente, el inicio de actividad de enzima hidrolítica puede estar ocurriendo en una manera coordinada oportuna, y por lo tanto la actividad de algunas enzimas hidrolíticas se puede utilizar como un marcador para otras
25 actividades de enzima hidrolítica.

Por consiguiente, se prefiere que los granos de cereal germinados y/o tratados con calor tengan un nivel adecuado de actividad mensurable de α -amilasa. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad mensurable de α -amilasa de por lo menos 40 U/g, tal como por lo menos 50 U/g de grano de cereal (peso seco). En algunas modalidades de la invención, el grano de cereal puede tener una actividad de α -amilasa de por lo menos 50 U/g, tal como por lo menos 60 U/g de granos de cereal (peso seco).

La actividad de α -amilasa de preferencia se determina de conformidad con métodos estándar, por ejemplo utilizando el kit Ceralpha (K-CERA) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de α -amilasa se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

También se puede preferir que los granos de cereal germinados tengan un nivel adecuado de actividad mensurable de β -amilasa. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad mensurable de β -amilasa de por lo menos 5 U/g de grano de cereal (peso seco). Por lo tanto, de preferencia los granos de cereal germinados pueden tener una actividad mensurable de β -amilasa de por lo menos 10 U/g, por ejemplo por lo menos 15 U/g de granos de cereal (peso seco).

De preferencia, la actividad de β -amilasa se

determina de conformidad con métodos estándar, por ejemplo utilizando el kit Betamyl (K-BETA3) de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de β -amilasa se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

5 También se prefiere que los granos de cereal germinados y/o tratados con calor tengan un nivel adecuado de actividad de dextrinasa límite. De preferencia, los granos de cereal germinados tienen una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 5 mU/g de grano de cereal (peso seco). Por lo
10 tanto, de preferencia los granos de cereal germinados pueden tener una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 9 mU/g de granos de cereal (peso seco).

De preferencia la actividad de dextrinasa límite se determina de conformidad con métodos estándar, por
15 ejemplo utilizando el kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme, Irlanda. En particular, la actividad de dextrinasa límite se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

De manera interesante, los granos de cereal
20 germinados y/o tratados con calor de conformidad con la invención tienen raicillas significativamente reducidas en comparación con la malta verde convencional. Por lo tanto, los granos de cereal germinados de conformidad con la invención de preferencia contienen cuando mucho 4 g de
25 raicillas por 100 g de cebada germinada, de preferencia

cuando mucho 3 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, de manera incluso más preferida cuando mucho 2 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, por ejemplo cuando mucho 1.1 g de raicillas por 100 g de cebada germinada, en donde tanto la masa de las raicillas como la masa de la cebada germinada se proveen como peso seco. La masa de las raicillas de preferencia se determina como se describe en el Ejemplo 6 más adelante. Por lo tanto, en una modalidad, el método de la invención no comprende un paso de remoción de raicillas.

Las nitrosaminas (NDMA por sus siglas en inglés) son compuestos químicos de la estructura química $R^1N(-R^2)-N=O$, es decir, un grupo nitroso unido a una amina. La mayoría de las nitrosaminas son carcinógenas. Aunque los niveles de nitrosaminas en las maltas modernas son bajos, los granos de cebada germinados de conformidad con la invención no obstante aún tienen un contenido significativamente reducido de NDMA en comparación con la malta convencional. En una modalidad, los granos de cebada germinados de conformidad con la invención comprenden cuando mucho 0.15 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA, de preferencia cuando mucho 0.12 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA, por ejemplo cuando mucho 0.10 $\mu\text{g/kg}$ de NDMA.

Solución acuosa

La solución acuosa puede ser cualquier solución

acuosa. La solución acuosa se puede considerar una solución aunque la mezcla de solución acuosa y granos de cereal puede ser considerada como una suspensión. Con frecuencia, la solución acuosa es agua, tal como agua de la llave. Se
5 pueden agregar uno o más agentes adicionales a dicha agua, y por lo tanto la solución acuosa puede ser agua, tal como agua de la llave que comprende uno o más agentes adicionales. Dichos agentes adicionales pueden estar comprendidos en la solución acuosa desde el inicio o éstos
10 se pueden agregar durante la incubación.

Dichos agentes adicionales pueden ser, por ejemplo, compuestos capaces de acelerar la germinación de los granos de cereal. Por lo tanto, la solución acuosa puede comprender ácido giberélico (GA), por ejemplo la
15 solución acuosa puede comprender GA a una concentración de por lo menos 100 nM, por ejemplo a una concentración de por lo menos 1000 nM, tal como a una concentración en el intervalo de 100 a 100,000 nM, por ejemplo a una concentración en el intervalo de 500 a 2000 nM. Dicho GA
20 puede estar presente en la solución acuosa desde el inicio de la incubación, o éste se puede agregar durante la incubación. Dicho GA puede ser cualquier GA, por ejemplo GA₃ o GA₇. En una modalidad dicho GA es GA₃.

El agente adicional también puede ser un agente
25 antiespumante. Dicho agente antiespumante puede ser por

ejemplo cualquier agente antiespumante de grado alimenticio, por ejemplo Foamzol FCD511 (AB Vickers, RU).

Aparato

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando uno o más aparatos apropiados para llevar a cabo los métodos.

Por ejemplo, el paso de incubar granos de cereal en una solución acuosa se puede llevar a cabo en un contenedor equipado con una o más bombas de aire. El contenedor puede ser cualquier contenedor en el que se puedan incubar los granos de cereal en una solución acuosa. En algunas modalidades, el contenedor puede ser un tanque, por ejemplo un tanque como se describe más adelante.

Un ejemplo de un aparato útil para incubar granos de cereal se provee en la Figura 2. El aparato comprende un tanque (2), el cual debe tener un volumen suficiente para contener los granos de cereal y la solución acuosa. El tanque mostrado en la Figura 2 es cilíndrico, pero el tanque a ser utilizado con la invención puede tener cualquier forma apropiada, por ejemplo éste puede ser un tanque cilíndrico, por ejemplo un tanque cilíndrico que tenga una parte inferior cónica. El tanque se puede preparar a partir de cualquier material apropiado, por ejemplo plástico (tal como Plexiglas) o metal (por ejemplo acero inoxidable o cobre).

El tanque comprende por lo menos una entrada (1) para los granos de cereal, la cual se puede utilizar para agregar los granos de cereal al tanque. La entrada también se puede utilizar para agregar otros compuestos al tanque, por ejemplo la entrada se puede utilizar para agregar la solución acuosa, por ejemplo agua. La entrada se puede posicionar en cualquier posición útil en el tanque, y en algunas modalidades la entrada está posicionada en la parte superior del tanque, por ejemplo en la parte alta del tanque. La entrada debe ser de un tamaño suficiente para permitir la adición de los granos de cereal. Aunque no se requiera, el tanque puede comprender entradas adicionales además de la entrada para los granos de cereal.

El tanque puede comprender opcionalmente una rejilla o malla (3) posicionada de manera esencialmente horizontal en el tanque. Si está presente, dicha rejilla o malla típicamente está posicionada en el $\frac{1}{3}$ inferior, tal como en el $\frac{1}{5}$ inferior, del tanque. La rejilla o malla de preferencia solamente contiene aberturas, las cuales son más pequeñas que los granos de cereal. La rejilla o malla se puede elaborar a partir de cualquier material apropiado, tal como plástico o metal, y puede ser por ejemplo una malla de metal. Por lo tanto, la rejilla o malla se puede utilizar para separar los granos de cereal desde la parte inferior del tanque. Sin embargo, el tanque con frecuencia

no comprende 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.

5 Asimismo, el tanque comprende una o más entradas para gas (4). Dichas entradas pueden ser cualquier entrada a través de la cual se pueda pasar un gas que comprende O_2 hacia el tanque. Las entradas para gas pueden tener una forma, que permita que el gas ingrese a la solución acuosa
10 a una alta velocidad que asegure la difusión del gas a través de la solución acuosa. Por lo tanto, por ejemplo las entradas para gas pueden ser boquillas, chorros, piedras de difusión o piedras sinterizadas. En una modalidad the entradas para gas son piedras sinterizadas. Las entradas
15 para gas en general están concetadas a una bomba (5), que bombea gas al interior del tanque, a través de dichas entradas. La bomba puede ser cualquier bomba capaz de bombear gas, por ejemplo aire a través de las entradas para gas. Se prefiere que el tanque comprenda múltiples entradas
20 para gas, por ejemplo por lo menos 2, tal como por lo menos 3, por ejemplo en el intervalo de 3 a 20. Las entradas para gas se pueden posicionar en cualquier posición en el tanque, pero por lo general, éstas están posicionadas en el 1/3 inferior, tal como en el 1/5 inferior del tanque. Esto
25 permite que el gas ingrese a la solución acuosa desde el

fondo y se difunda hacia arriba a través de la solución acuosa. El exceso de gas puede dejar el tanque a través de cualquier abertura en el tanque, por ejemplo a través de la entrada para agregar los cereales. En una modalidad se
5 podría preferir que dichas entradas (3) estén posicionadas directamente en las paredes laterales del tanque (2), de preferencia en la parte inferior de las paredes laterales, por ejemplo como se muestra en la Figura 1.

Un ejemplo de un aparato útil para llevar a cabo
10 varios pasos de los métodos de la invención se muestra en la Figura 1. El aparato comprende una entrada para los granos de cereal (1), un tanque (2), entrada(s) para gas (3) y una bomba (4), que pueden ser cualquiera de las entradas para granos de cereal, tanques, entradas para gas
15 y bombas descritas en la presente solicitud con relación a la Figura 2. 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, por ejemplo posicionada en el fondo del tanque. Dicha salida se puede utilizar tanto
20 para retirar los granos de cereal así como para la remoción de otros componentes mantenidos en el tanque, por ejemplo la solución acuosa. Dicha salida puede ser conectada a una bomba para los granos (6), por ejemplo mediante tubería. Dicha bomba para granos (6) puede ser cualquier bomba capaz
25 de bombear los granos desde el tanque (2) hacia el equipo

para dividir finamente los granos de cereal (7) y opcionalmente también 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 los granos de cereal que tienen un contenido de agua por encima de 20 %, por ejemplo por encima de 35 %. El equipo puede ser en particular una trituradora o un molino, por ejemplo un molino húmedo. El equipo (7) se puede conectar al tanque (2) y a la cuba (9) mediante tubería(s). El movimiento de los granos desde el tanque (2) hacia el equipo (7) y también hacia la cuba (9) se puede asegurar mediante una bomba (6).

El aparato también puede comprender una cuba (9). La cuba (9) puede ser cualquier cuba, que pueda contener un extracto acuoso y que pueda soportar las temperaturas utilizadas para la maceración, por ejemplo temperaturas de hasta 90 °C, tal como hasta 85 °C, por ejemplo hasta 80 °C. Por lo tanto, la cuba se puede elaborar a partir de cualquier material que tolere dichas temperaturas, por ejemplo de metal, tal como acero inoxidable o cobre. La cuba puede tener cualquier forma útil, por ejemplo ésta puede ser esencialmente cilíndrica. La cuba puede estar asociada con equipo para control de temperatura. La cuba se puede utilizar para preparar un extracto acuoso de los

granos de cereal finamente divididos a través de un proceso que implica incubación a una o más temperaturas predefinidas como se describe en la presente solicitud en la sección "Preparar un extracto acuoso". Dicho equipo para control de temperatura es capaz de controlar la temperatura de un líquido dentro de la cuba, incluyendo ser capaz de calentar un líquido dentro de la cuba a una temperatura predeterminada, por ejemplo a cualquiera de las temperaturas descritas en la presente solicitud en la sección "Preparar un extracto acuoso". La cuba (9) también puede comprender equipo para agitar o hacer girar cualquier líquido contenido en dicha cuba. En particular, la cuba (9) puede ser una cuba de maceración. Las cubas de maceración son bien conocidas en la técnica, y la cuba (9) puede ser cualquier cuba de maceración convencional.

La cuba (9), en general, contiene una entrada (8), a través de la cual los granos de cereal germinados finamente divididos pueden entrar a la cuba. Dicha entrada (8) típicamente está posicionada en la mitad superior de la cuba, por ejemplo en el 1/3 superior, tal como en el 1/5 superior de la cuba, por ejemplo en la parte alta de la cuba. Los granos de cereal finamente divididos pueden ser conducidos a través de la tubería desde el equipo para dividir finamente los granos de cereal (7) hacia la entrada (8) de la cuba (9).

En términos generales, la cuba (9) también contiene una salida (10), a través de la cual el extracto acuoso puede salir de la cuba después de la preparación del extracto acuoso (ver detalles sobre el extracto acuoso en la presente solicitud más adelante en las secciones "Extracto acuoso" y "Preparar un extracto acuoso". La salida típicamente está posicionada 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.

10 Dividir finamente los granos de cereal germinados

Los métodos de la invención comprenden un paso de dividir finamente los granos de cereal que han sido descascarillados y/o germinados y/o calentados de conformidad con los métodos definidos en la presente solicitud.

Al momento en que dichos granos de cereal son finamente divididos éstos de preferencia siguen teniendo un contenido elevado de agua, de preferencia dichos granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, de manera más preferida de por lo menos 25 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 30 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 35 %. Por ejemplo, los granos de cereal germinados se pueden transferir directamente desde la germinación y/o tratamiento térmico hacia el equipo para dividir finamente los granos de

cereal. Por consiguiente, los granos de cereal germinados pueden tener el mismo contenido de agua al momento de ser finamente divididos que tienen los granos de cereal inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento

5 térmico de los granos de cereal, por ejemplo el contenido de agua descrito anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En particular, los métodos en general no comprenden un paso de secar los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los métodos de preferencia no

10 comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. Como se indicó anteriormente, el secado en horno da como resultado una reducción del contenido de agua hasta un nivel de aproximadamente 4.5-5 %. De preferencia, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de

15 agua menor de 20 %, de preferencia no menor de 25 %, de manera incluso más preferida no menor de 30 %, de manera incluso más preferida no menor de 35 % en cualquier momento después de la germinación y/o tratamiento térmico y antes de dividir finamente dichos granos de cereal.

20 En algunas modalidades de la presente invención, los granos de cereal germinados se someten a tratamiento térmico después del paso de germinación. Los métodos de la invención de preferencia no comprenden un paso de enfriar activamente los granos de cereal tratados con calor antes

25 de dividirlos finamente. Por lo tanto, es un aspecto de la

presente invención que la temperatura de los granos germinados esté por encima de 35 °C en cualquier punto entre el paso de tratamiento térmico y el paso de dividir finamente los granos germinados.

5 Los granos de cereal germinados se pueden dividir finamente utilizando cualquier equipo apropiado para dividir finamente los granos de cereal que tienen un contenido de agua de más de 20 %, tal como más de 25 %, por ejemplo más de 30 %, tal como más de 35 %. Por ejemplo, los
10 granos de cereal germinados se pueden someter a molienda, por ejemplo molienda en húmedo. Los molinos útiles para moler los granos de cereal germinados incluyen los molinos disponibles de Millstar, EE.UU. Los granos de cereal germinados también se pueden someter trituration.

15 Los granos de cereal por lo general se dividen finamente hasta un grado tal que se pueda elaborar un extracto acuoso de los azúcares fermentables de los granos de cereal. Por lo tanto, los granos de cereal están lo suficientemente divididos, de modo tal que 7-L de un
20 extracto acuoso de 1 kg de dichos granos de cereal finamente divididos tengan una gravedad específica de por lo menos 8 °Platón.

 En modalidades de la invención, en las cuales el extracto acuoso se elabora a partir de los granos de cereal
25 germinados y uno o más complementos, dichos complementos

también pueden estar finamente divididos. En particular, este puede ser el caso cuando dichos complementos comprenden granos de cereal no germinados. Dichos complementos pueden ser finamente divididos, por ejemplo
5 molidos en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que los complementos sean finamente divididos junto con los granos de cereal germinados. De manera similar, si el extracto acuoso se elabora a partir de los granos de cereal
10 germinados y malta secada en horno, entonces dicha malta secada en horno puede ser finamente dividida, por ejemplo molida en procedimientos separados. Sin embargo, también está comprendido dentro de la invención que la malta secada en horno se divida finamente junto con los granos de cereal
15 germinados.

Preparar un extracto acuoso

Los métodos de la invención también comprenden un paso de preparar un extracto acuoso de los granos de cereal germinados finamente divididos. Dicho paso puede ser, por
20 ejemplo, un paso de maceración.

El extracto acuoso antes mencionado se puede preparar, en general, incubando en agua o en una solución acuosa los granos de cereal finamente divididos. La solución acuosa para preparar un extracto acuoso es, en
25 general, una solución acuosa diferente en comparación con

la solución acuosa utilizada para incubación de los granos de cereal durante la germinación.

Con el fin de distinguir, la solución acuosa para preparar un extracto acuoso también puede ser referida como "solución de maceración". La solución de maceración puede ser cualquier solución acuosa, pero típicamente ésta consiste de agua, tal como agua de la llave a la cual se pueden agregar uno o más agentes adicionales. Con el fin de distinguir entre los agentes adicionales agregados durante la germinación, estos agentes adicionales pueden ser referidos como "agentes de maceración adicionales". Por lo tanto, la solución de maceración puede constar de agua (por ejemplo agua de la llave) a la cual se agregan uno o más agentes de maceración adicionales. Los agentes de maceración pueden estar presentes en la solución de maceración desde el inicio o éstos pueden ser agregados durante el proceso de preparar un extracto acuoso.

Dichos agentes de maceración adicionales pueden ser enzimas. Por lo tanto, la solución de maceración puede comprender una o más enzimas. Dichas enzimas se pueden agregar a la solución de maceración desde el inicio, o posteriormente, durante el proceso.

Dichas enzimas pueden ser, por ejemplo, una o más enzimas hidrolíticas. Las enzimas apropiadas incluyen lipasas, enzimas degradadoras de almidón (por ejemplo

amilasas), glucanasas [de preferencia (1-4)- y/o (1,3;1,4)-
 β -glucanasas], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas),
 y/o proteasas, o mezclas de enzimas que comprenden una o
 más de las enzimas antes mencionadas, por ejemplo Cereflo,
 5 Ultraflo, u Ondea Pro (Novozymes). Por ejemplo, la solución
 de maceración puede comprender una o más enzimas
 hidrolíticas en las cuales por lo menos una enzima
 hidrolítica se selecciona a partir del grupo que consta de
 α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa límite, pululanasa, β -
 10 glucanasa, xilanasas, glucoamilasa y proteasa.

En una modalidad de la invención la solución de
 maceración comprende una o más de las siguientes enzimas:

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

Que se agregue o no enzimas a la solución de
 maceración, y las decisiones sobre cuáles enzimas agregar,
 puede depender de los granos de cereal utilizados. Por lo
 tanto, en modalidades de la invención, en las cuales el
 25 cereal es una planta de cebada con niveles bajos de β -

glucano (por ejemplo como se describe más adelante en la presente solicitud en la sección "Cebada"), entonces se puede agregar poco o nada de β -glucanasa a la solución de maceración.

5 En una modalidad se prefiere que no se agregue proteasa exógena durante la maceración. La adición de proteasa puede ser menos preferible, debido a que las proteasas pueden afectar la actividad de enzima. En una modalidad se prefiere que no se agregue lipasa exógena
10 durante la maceración.

 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 700 U, de preferencia cuando mucho 350 U de glucoamilasa exógena por gramo de granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del
15 extracto acuoso.

 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 400 AGU, de preferencia cuando mucho 200 AGU de glucoamilasa exógena por kg de granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del
20 extracto acuoso. La determinación de AGU se puede llevar a cabo como se describe en el documento US7060468.

 En otra modalidad se prefiere que la glucoamilasa exógena y α -amilasa combinadas utilizadas durante la preparación del extracto acuoso no excedan 700 U, de
25 preferencia no excedan 350 U por gramo de granos de cereal

germinados (materia seca). La actividad combinada de glucoamilasa y α -amilasa se puede determinar por ejemplo utilizando K-CERA 01/12 (protocolo y kit disponibles de Megazyme, Irlanda).

5 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 20 U de pululanasa exógena o dextrinasa limitada per de kg granos de cereal germinados (materia seca) durante la preparación del extracto acuoso.

10 En una modalidad se prefiere que se utilice cuando mucho 100 PUN de pululanasa por kg de granos de cereal germinados (materia seca) is durante la preparación del extracto acuoso. La determinación de PUN se puede llevar a cabo como se describe en el documento US7060468.

15 Dichos agentes de maceración adicionales también pueden ser complementos, por ejemplo granos de cereal no germinados, jarabes o azúcares. Si se agregan complementos, estos también pueden haber sido finamente divididos por ejemplo mediante molienda o trituración. Si el complemento es un grano de cereal, por ejemplo un grano de cereal que
20 no ha sido sometido a germinación, entonces éste típicamente puede estar finamente dividido o molino. Si el complemento son jarabes, azúcares o similares, éstos por lo general no serán molidos. Complementos tales como azúcares o jarabes se pueden agregar a la solución de maceración en
25 cualquier momento en el proceso; sin embargo, dichos

complementos también se pueden agregar al extracto acuoso o posteriormente durante el proceso para preparar una bebida como se describe más adelante. En general, los complementos se agregan en cantidades más pequeñas que la de los granos de cereal germinados. Por lo tanto, por lo menos 50 %, de preferencia por lo menos 70 %, por ejemplo por lo menos 90 % de los carbohidratos del extracto acuoso se derivan de los granos de cereal germinados, mientras que los complementos de preferencia solamente dan cuenta de una cantidad pequeña de los carbohidratos. Si el complemento es un grano de cereal no germinado, entonces se prefiere que los granos de cereal germinados constituyan por lo menos 50 % (p/p), de preferencia por lo menos 70 % (p/p), de manera más preferida por lo menos 90 % (p/p) de los granos de cereal totales según se determina por el peso seco.

Los agentes de maceración adicionales también pueden ser malta secada en horno. Si se agrega malta secada en horno, ésta también pudo haber sido finamente dividida por ejemplo mediante molienda o trituración. En general, la malta secada en horno se agrega en cantidades más pequeñas que la de los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los granos de cereal germinados constituyen por lo menos 80 % (p/p), de preferencia por lo menos 90 % (p/p), de manera más preferida por lo menos 95 % (p/p) de los granos de cereal totales y malta según se determina por peso seco. En

modalidades preferidas, no se agrega malta secada en horno.

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

5 Dichos agentes de maceración adicionales también puede ser un ácido, de preferencia un ácido grado alimenticio, por ejemplo H_3PO_4 .

El extracto acuoso generalmente se prepara mediante incubación de los granos de cereal germinados
10 finamente divididos en la solución de maceración a una o más temperaturas predeterminadas. Dicha temperatura predeterminada también puede ser referida como "temperatura de maceración" en la presente solicitud. Dichas temperaturas de maceración pueden ser por ejemplo
15 temperaturas convencionales utilizadas para la maceración.

La temperatura de maceración en general se mantiene constante (maceración isotérmica), o se incrementa gradualmente, por ejemplo se incrementa en una manera secuencial. En cualquier caso, las sustancias solubles en
20 los granos de cereal germinados finamente divididos son liberados hacia dicha solución de maceración con lo cual se forma un extracto acuoso.

La(s) temperatura(s) de maceración típicamente son temperaturas en el intervalo de 30 a 90 °C, tal como en
25 el intervalo de 40 a 85 °C, por ejemplo en el intervalo de

50 a 85 °C. Las temperaturas de maceración se pueden elegir de conformidad con el tipo de cereal utilizado. Por consiguiente, en modalidades de la invención, en las cuales los granos de cereal son cebada con niveles bajos de o
5 carente de actividad de lipoxigenasa (LOX) y/o actividad de metil metionina transferasa (MMT) (ver los detalles más adelante en la presente solicitud en la sección "Cebada"), la temperatura de maceración puede ser más baja, por ejemplo en el intervalo de 35 a 69 °C.

10 La incubación en la solución de maceración se puede llevar a cabo durante cualquier cantidad de tiempo apropiada. El tiempo de incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración puede ser, por ejemplo, durante un intervalo de 60 a 300 minutos, tal como en el
15 intervalo de 60 a 240 minutos, por ejemplo en el intervalo de 90 a 300 minutos, tal como en el intervalo de 90 a 240 minutos, por ejemplo en el intervalo de 90 a 270 minutos. Por ejemplo dicho tiempo de incubación en la solución de maceración puede ser cualquier tiempo utilizado en la
20 maceración convencional. Un ejemplo no limitativo de una maceración apropiada es:

(1) Macerar a una temperatura en el intervalo de 50-60 °C, tal como aproximadamente 55 °C, en el intervalo de 10 a 30 minutos, tal como aproximadamente 15 minutos.

25 (2) Calentar a una temperatura en el intervalo de

60 a 70 °C, de preferencia en el intervalo de 60 a 65 °C, tal como aproximadamente 62 °C, en el intervalo de 30 a 90 minutos, tal como aproximadamente 60 minutos.

(3) Calentar a una temperatura en el intervalo de 70 a 75 °C, tal como aproximadamente 72 °C, en el intervalo de 5 a 30 minutos, tal como aproximadamente 15 minutos.

(4) Calentar a una temperatura en el intervalo de 75 a 80 °C, de preferencia en el intervalo de 75 a 78 °C, tal como aproximadamente 78 °C, en el intervalo de 5 a 15 minutos, tal como aproximadamente 10 minutos.

Posterior a la incubación en la solución de maceración en la cuba de maceración, los granos de cereal germinados finamente divididos en la solución de maceración se pueden transferir a otro contenedor, por ejemplo una cuba de filtración e incubar durante tiempo adicional a temperatura elevada, por ejemplo en el intervalo de 70 a 78 °C durante un intervalo de 30 a 120 minutos.

Por lo tanto, la incubación en la solución de maceración puede comprender también, además de los pasos antes mencionados, un paso (5) de:

(5) Calentar a una temperatura en el intervalo de 70 a 78 °C, de preferencia en el intervalo de 75 a 78 °C, tal como aproximadamente 78 °C, en el intervalo de 30 a 120 minutos, tal como aproximadamente 60 minutos.

Un ejemplo no limitativo de temperaturas y tiempo

de maceración útiles se muestra en la presente solicitud en la Figura 10. La incubación para la primera aproximadamente 120 minutos se puede llevar a cabo por ejemplo en una cuba de maceración, mientras que el resto de la incubación por ejemplo se puede llevar a cabo en otro contenedor. Otros ejemplos no limitativos se pueden encontrar en la literatura de elaboración de cerveza, por ejemplo en Briggs et al. (*supra*) y Hough et al. (*supra*).

Después de la incubación en la solución de maceración, el extracto acuoso típicamente puede separarse, por ejemplo mediante filtración en el extracto acuoso y partículas sólidas no disueltas residuales, éstas últimas también denominadas "grano gastado". La filtración se puede llevar a cabo por ejemplo en una cuba de filtración. De manera alternativa, la filtración puede ser filtración a través de un filtro de mosto. El extracto acuoso así obtenido también puede ser denotado "primer mosto".

Se puede agregar líquido adicional, tal como agua a los granos gastados durante un proceso también denotado rociado con agua caliente. Después del rociado con agua caliente y la filtración, se puede obtener un "segundo mosto". Se pueden obtener mostos adicionales repitiendo el procedimiento.

Por lo tanto, el extracto acuoso puede ser mosto, por ejemplo un primer mosto, un segundo mosto, un mosto

adicional o una combinación de los mismos.

Extracto acuoso

El extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención puede tener un número de propiedades
5 útiles, incluyendo - pero sin limitarse a - las propiedades descritas en esta sección.

Como se mencionó anteriormente, el extracto acuoso se puede someter a un paso de filtración. Por consiguiente, se podría preferir que el mosto tenga buena
10 capacidad de filtración. Por ejemplo, sería técnicamente desafiante filtrar líquido altamente viscoso - una razón que se podría preferir que el extracto acuoso tenga una viscosidad baja.

La capacidad de filtración se puede determinar en
15 un número de maneras. En una modalidad la capacidad de filtración se determina como la cantidad de líquido obtenido después de filtración a través de un embudo de filtración equipado con un papel filtro durante 1 hora. De preferencia el extracto acuoso tiene una capacidad de
20 filtración de por lo 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 filtración. La capacidad de filtración también se puede determinar como el porcentaje del volumen de líquido obtenido después de
25 filtración durante 60 minutos como se describió

anteriormente en comparación con el volumen de líquido del extracto acuoso agregado a dicho embudo. Por lo tanto, la capacidad de filtración puede ser por lo menos 50 %, tal como por lo menos 60 % (v/v). En particular, capacidad de filtración se puede determinar como se describe más adelante en la presente solicitud en el Ejemplo 8.

La capacidad de filtración puede depender con frecuencia del nivel de β -glucano. Por consiguiente, se podría preferir que el nivel de β -glucano no sea muy alto. Por ejemplo el extracto acuoso puede comprender cuando mucho 200 mg/L, de preferencia cuando mucho 150 mg de β -glucano/L.

También se prefiere que el extracto acuoso comprenda un nivel adecuado de azúcares fermentables. En particular se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 10 g, tal como por lo menos 15 g de maltosa por L. Por ejemplo, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 1 g/L por °Platón de maltosa. También se podría preferir que dicho extracto acuoso comprenda por lo menos 1 g, tal como por lo menos 2 g de glucosa por L.

Por lo general es deseable que el mosto contenga nitrógeno de amino libre (FAN) a niveles que sean lo suficientemente altos para obtener buena viabilidad de la levadura, mientras que niveles muy altos podrían ser

indeseables. Por consiguiente, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda en el intervalo de 150 a 400 mg/L, tal como en el intervalo de 150 a 300 mg/L, por ejemplo en el intervalo de 150 a 250 mg de FAN/L.

5 Por lo general es deseable que el mosto contenga niveles altos del aminoácido valina, debido a que éste puede reducir la probabilidad de formación indeseada de diacetilo. Por consiguiente, se podría preferir que el extracto acuoso comprenda por lo menos 55 mg/L, por ejemplo
10 por lo menos 60 mg de valina/L. En una modalidad, el extracto acuoso comprende por lo menos 65 mg de valina/L.

Los niveles antes mencionadas de azúcares, FAN y aminoácidos de preferencia son niveles en el extracto acuoso antes de cualquier fermentación.

15 Método para producir un extracto acuoso de granos de cereal con cascarilla

En una modalidad la invención se refiere a métodos para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

20 a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

 b) tratar dichos granos de cereal para retirar la cáscara, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos
25 de cereal, por ejemplo pérdida en el intervalo de 2 a 7 %

del peso total de dichos granos de cereal, tal como una pérdida en el intervalo de 3 a 6 % del peso total de dichos granos de cereal;

5 c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación puede comprender

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas, en el cual por lo menos 2 L de
10 O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se hacen pasar a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

15 iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 20 a 50 horas, tal como en el intervalo de 20 a 30 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C bajo un flujo de por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal por hora;

20 d) dividir finamente dichos granos germinados, mientras que dichos granos germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y d), con
25 lo cual se obtienen granos germinados molidos; y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

5 Se debe entender que la frase "dichos granos de cereal no tienen un contenido de agua por debajo de 20 % en cualquier momento entre los pasos c) y d)" incluye por ejemplo que dichos granos de cereal pueden tener un contenido de agua por encima de 20 % en cualquier momento
10 durante los pasos c) y d), en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta la finalización del paso d) o en cualquier momento desde la finalización del paso c) hasta el inicio del paso d).

 Al momento en que dichos granos de cereal son
15 finamente divididos éstos de preferencia siguen teniendo un contenido elevado de agua, de preferencia dichos granos de cereal tienen un contenido de agua de por lo menos 20 %, de manera más preferida de por lo menos 25 %, de manera incluso más preferida de por lo menos 30 %, de manera
20 incluso más preferida de por lo menos 35 %. Por ejemplo, los granos de cereal germinados se pueden transferir directamente desde la germinación y/o tratamiento térmico hacia el equipo para dividir finamente los granos de cereal. Por consiguiente, los granos de cereal germinados
25 pueden tener el mismo contenido de agua al momento de ser

finamente divididos que el que tienen los granos de cereal inmediatamente después de la germinación y/o tratamiento térmico de los granos de cereal, por ejemplo el contenido de agua descrito anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En particular, los métodos en general no comprenden un paso de secar los granos de cereal germinados. Por lo tanto, los métodos de preferencia no comprenden un paso de secar en horno los granos de cereal germinados. Como se indicó anteriormente, el secado en horno da como resultado una reducción del contenido de agua hasta un nivel de aproximadamente 4.5-5 %. De preferencia, los granos de cereal germinados no tienen un contenido de agua de menos de 20 %, de preferencia no menor de 25 %, de manera incluso más preferida no menor de 30 %, de manera incluso más preferida no menor de 35 % en cualquier momento después de la germinación y/o tratamiento térmico y antes de dividir finamente dichos granos de cereal.

El método puede comprender un paso de tratamiento térmico como se describió anteriormente en la presente solicitud en la sección "tratamiento térmico".

La cantidad de O_2 que se hace pasar a través de los granos de cereal en la solución acuosa o en aire puede ser cualquiera de las cantidades de O_2 descritas anteriormente en la presente solicitud en la sección "Germinación". En una modalidad en el intervalo de 85 a 95

L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal se pasa a través de dicha solución acuosa por hora durante el paso i. En una modalidad la incubación en aire del paso iii se lleva a cabo bajo un flujo en el intervalo de 85 a 95 L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal.

El paso de dividir finamente los granos germinados puede ser como se describió anteriormente en la presente solicitud en la sección "Dividir finamente granos de cereal germinados".

El paso de preparar un extracto acuoso de cereal puede ser como se describe en la sección "extracto acuoso" anteriormente en la presente solicitud.

Preparación de bebidas

En algunas modalidades, los métodos de la invención también comprenden un paso de procesar como una bebida el extracto acuoso preparado mediante los métodos de la invención. Se puede utilizar cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente solicitud para obtener un extracto acuoso de un cereal, el cual después se procesa en una bebida.

El extracto acuoso se puede hervir con o sin lúpulo después de lo cual puede ser referido como mosto hervido.

El primer mosto, segundo mosto, y mostos

adicionales se pueden combinar, y después de esto someter a calentamiento o ebullición. El extracto acuoso se puede calentar o hervir durante cualquier cantidad de tiempo apropiada, por ejemplo en el intervalo de 60 minutos a 120 minutos. Durante el calentamiento o ebullición se puede reducir el volumen del extracto acuoso debido a la evaporación. Se podría preferir que el volumen del extracto acuoso se reduzca en menos de 8 %, de preferencia en menos de 5 %. Esto puede reducir significativamente el consumo de energía.

La bebida se puede preparar mediante fermentación del extracto acuoso, por ejemplo mediante fermentación del mosto. Por lo tanto, la bebida se puede preparar mediante fermentación del extracto acuoso con levadura.

En una modalidad, la bebida puede ser una bebida alcohólica, tal como cerveza. En otras modalidades, la bebida puede ser una bebida no alcohólica basada en granos de cereal germinados. La bebida no alcohólica, puede ser por ejemplo una cerveza no alcohólica u otros tipos de bebidas no alcohólicas, tal como maltina.

En una modalidad preferida la bebida es cerveza, por ejemplo la cerveza puede ser una cerveza lager o una ale. Por lo tanto, la cerveza se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo que consta de Altbier, Amber ale, vino de cebada, Berliner weisse, Bière de Garde,

Bitter, Blonde Ale, Bock, Brown ale, California Common, Cream Ale, Dortmunder Export, Doppelbock, Dunkel, Dunkelweizen, Eisbock, Lambic afrutada, Golden Ale, Gose, Gueuze, Hefeweizen, Helles, India pale ale, Kölsch, Lambic, Light ale, Maibock, licor de Malta, Mild, Märzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, cerveza Steam, Stout, Schwarzbier, lager, Witbier, Weissbier y Weizenbock. El extracto acuoso de conformidad con la invención se prepara a partir de granos de cereal germinados, los cuales no han sido sometidos a secado en horno. Los granos de cereal germinados, que no han sido secados en horno, por lo general tienen un color más claro, y por consiguiente, los métodos de la invención son particularmente útiles para la preparación de cervezas más claras, en particular para la preparación de cerveza lager. También se pueden preparar cervezas más oscuras mediante los métodos de la invención, por ejemplo agregando una o más maltas secadas en horno durante la maceración como se describe en la sección "Preparar un extracto acuoso".

Por lo tanto, la invención también se refiere a métodos para producir una bebida que comprende los pasos de:

- Preparar un extracto acuoso mediante el método de conformidad con la invención.

- Procesar dicho extracto como una bebida.

Las bebidas alcohólicas - tal como cerveza - se pueden fabricar, de conformidad con los métodos de la invención, a partir de granos de cereal germinados. Los
5 granos de cereal germinados, además de los lúpulos y levadura, contribuyen al sabor y color de la cerveza.

Una vez que se ha preparado el extracto acuoso éste se puede procesar como una cerveza mediante cualquier método incluyendo métodos de elaboración de cerveza
10 convencionales. Los ejemplos no limitativos de ejemplos de métodos apropiados para elaborar cerveza se pueden encontrar, por ejemplo, en publicaciones de Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Están disponibles numerosos métodos, regularmente actualizados para análisis de
15 productos de cebada y cerveza, por ejemplo, pero sin limitarse a, la Asociación Americana de Químicos de los Cereales (American Association of Cereal Chemists) (1995), la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros (American Society of Brewing Chemists) (1992), la Convención Europea
20 de Cervecería (European Brewery Convention) (1998), y el Instituto de Cervecería (Institute of Brewing) (1997). Se reconoce que muchos procedimientos específicos se emplean para una cervecería dada, con las variaciones más significativas relacionadas a las preferencias de
25 consumidores locales. Cualquiera de dichos métodos para

producir cerveza se puede utilizar con la presente invención.

El primer paso para producir cerveza a partir del extracto acuoso de preferencia implica calentar dicho extracto acuoso como se describió en la presente solicitud anteriormente, seguido por una fase posterior de enfriamiento y opcionalmente descanso de remolino. Se pueden agregar uno o más compuestos adicionales al extracto acuoso, por ejemplo uno o más de los compuestos adicionales descritos más adelante en la sección "Compuestos adicionales". Después de enfriar, el extracto acuoso se puede transferir a tanques de fermentación que contienen levadura, por ejemplo levadura para elaborar cerveza, tal como *S. pastorianus* o *S. cerevisiae*. El extracto acuoso se puede fermentar durante cualquier periodo de tiempo apropiado, por lo general en el intervalo de 1 a 20, tal como 1 a 10 días. La fermentación se efectúa a cualquier temperatura útil por ejemplo a una temperatura en el intervalo de 10 a 20 °C. Los métodos también pueden comprender la adición de una o más enzimas, por ejemplo se pueden agregar una o más enzimas al mosto antes de o durante la fermentación. En particular, dicha enzima puede ser una endoproteasa específica de prolina. Un ejemplo no limitativo de una endoproteasa específica de prolina es "Brewer's Clarex" disponible de DSM. En otras modalidades,

no se añade ninguna enzima exógena durante los métodos.

Durante el proceso de fermentación de varios días de duración, el azúcar se convierte en alcohol y CO₂ de manera concomitante con el desarrollo de algunas sustancias aromatizantes. La fermentación se puede terminar en ningún momento deseable, por ejemplo una vez que no se observa ninguna caída adicional en el %P.

Posteriormente, la cerveza se puede procesar adicionalmente, por ejemplo enfriar. Ésta también se puede filtrar y/o almacenar en frío - un proceso que desarrolla un aroma agradable y un sabor menos tipo levadura. También se pueden agregar aditivos. Además, se puede agregar CO₂. Por último, la cerveza se puede pasteurizar y/o filtrar, antes que sea envasada (por ejemplo transferida a contenedores o barriles, embotellada o enlatada). La cerveza también se puede pasteurizar utilizando métodos estándar.

Las cervezas producidas mediante los métodos de la invención típicamente tienen un sabor agradable, y carecen de o solamente tienen poca astringencia. El sabor puede ser analizado, por ejemplo, por un panel de especialistas en el catado de cerveza.

Cebada

En modalidades preferidas de la invención los granos de cereal que se van a utilizar con los métodos de

la invención son granos de cebada.

Dichos granos pueden ser granos de cualquier planta de cebada. Sin embargo, en algunas modalidades, la planta de cebada puede comprender una o más características específicas, por ejemplo, una o más de las características como se describe más adelante en la presente solicitud. Aunque las diversas características se discutan individualmente más adelante en la presente solicitud, la planta de cebada de la invención puede tener una combinación de dichas características.

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

Como se mencionó anteriormente, es preferible que el extracto acuoso obtenido durante la maceración tenga una viscosidad lo suficientemente baja para permitir una buena capacidad de filtración de la mezcla de macerado. Como también se describió con detalle anteriormente, los β -glucanos solubles pueden contribuir a la viscosidad elevada de un extracto acuoso. Por consiguiente, en algunas modalidades de la invención, se puede preferir utilizar una

planta de cereal - y en particular una planta de cebada que tiene un nivel bajo de β -glucano, por ejemplo sin β -glucano, tal como un nivel de β -glucano que está por debajo del nivel de detección. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para una β -glucano sintetasa. Dicho gen puede ser un gen que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO:2 indicado en el documento US2012/0030784. Por ejemplo, la planta de cebada puede ser una cebada que comprende un gen deficiente de β -glucano como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:18 del documento US2012/0030784. La planta de cebada también puede ser una que contiene un gen CslF6 silenciado, lo que lleva a granos de cebada con niveles muy bajos de (1,3;1,4)- β -glucano (como es descrito por Taketa et al., 2011).

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tiene un nivel bajo de actividad de LOX. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica, 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 los documentos WO 02/053721, WO 2005/087934 y WO 2004/085652.

La planta de cebada también puede ser una planta

de cebada que porta una mutación en el gen que codifica para lipoxigenasa 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 los genes LOX-1 y LOX-2 descritas en el documento WO 2010/075860.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada que tiene un nivel bajo de actividad de MMT. Dichas plantas de cebada son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, plantas de cebada que portan una mutación en el gen que codifica para MMT. De manera específica, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta cualquiera de las mutaciones en el gen MMT descritas en el documento WO 2010/063288. La planta de cebada también puede ser cualquiera de las plantas de cebada descritas en el documento WO 2011/150933.

La planta de cebada también puede ser una planta de cebada caracterizada por señalización de GA incrementada. En particular, la planta de cebada puede ser una planta de cebada que porta una mutación en el gen *Slender1*, que 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, por ejemplo en la

Tabla 1 del mismo. Por ejemplo, la planta de cebada puede portar una mutación en el gen *Slender1* lo que da como resultado un gen *Slender1* mutante que codifica para una proteína DELLA mutante, en el cual 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 que se selecciona a partir del grupo que consta de G46E, S490F, R268H, G271D, A277T, V231M, R481H, V282F, A277T, G227E, S485F y C237Y. La numeración de aminoácido se provee con relación a la secuencia de la proteína DELLA disponible bajo el no. de accesión de Genbank AK372064 o AF035820 (versión a partir del 4 de febrero de 2013).

Bebida

Las bebidas preparadas procesando un extracto acuoso de conformidad con la invención como una bebida pueden tener un número de propiedades útiles, incluyendo - pero sin limitarse a - las propiedades descritas en esta sección.

En términos generales es deseable que las bebidas de conformidad con la invención contengan la menor cantidad de diacetilo posible. Por consiguiente, se puede preferir que la bebida comprenda diacetilo a un nivel, que esté por debajo del umbral considerado de mal sabor en la cerveza lager. De preferencia, la bebida comprende cuando mucho 30

ppb de diacetilo, de manera más preferida cuando mucho 25 ppb de diacetilo, incluso de manera más preferida cuando mucho 20 ppb de diacetilo. En particular éste es el caso si la bebida es cerveza, por ejemplo cerveza lager.

5 La bebida de conformidad con la presente invención puede ser, por ejemplo, como se describe en la presente solicitud, la cual opcionalmente ha sido fermentada. Por lo tanto, la bebida puede comprender o constar de dicho extracto acuoso o extracto acuoso
10 fermentado y opcionalmente uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser, por ejemplo, cualquiera de los compuestos adicionales descritos a continuación en la presente solicitud en la sección "Compuestos adicionales".

15 Compuestos adicionales

 Los métodos de la invención pueden comprender el paso de agregar uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden ser, por ejemplo, un compuesto saborizante, un conservador, un ingrediente
20 funcional, un colorante, un edulcorante, un agente regulador del pH o una sal. El agente regulador del pH puede ser, por ejemplo, un amortiguador o un ácido, tal como ácido fosfórico.

 Los ingredientes funcionales pueden ser cualquier
25 ingrediente agregado para obtener una función dada. De

preferencia un ingrediente funcional hace a la bebida más saludable. Los ejemplos no limitativos de ingredientes funcionales incluyen vitaminas o minerales.

El conservador puede ser cualquier conservador de grado alimenticio, por ejemplo éste puede ser ácido benzoico, ácido sórbico, sorbatos (por ejemplo sorbato de potasio), sulfitos y/o sales de los mismos.

El compuesto adicional también puede ser CO₂. En particular, se puede agregar CO₂ para obtener una bebida carbonatada.

El compuesto saborizante que se va a utilizar con la presente invención puede ser cualquier compuesto saborizante. El compuesto saborizante, por ejemplo, se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de aromas, extractos vegetales, concentrados vegetales, partes vegetales e infusiones de hierbas. En particular el compuesto saborizante puede ser lúpulo.

Ítems

La invención se puede describir adicionalmente mediante los siguientes ítems:

1. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

- a) proveer granos de un cereal;
- b) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

c) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

d) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos b) y d); y

e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

2. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55 °C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún

momento entre los pasos c) y e); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del
5 cereal.

3. El método de conformidad con el ítem 1, en el cual el paso b) se efectúa durante cuando mucho 72 horas.

4. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación
10 comprende incubar dichos granos en una solución acuosa hasta que dichos granos tengan un contenido de agua de por lo menos 30 %, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora.

15 5. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 4, en el cual el paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos
20 de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante
25 un intervalo de 20 a 50 horas a una temperatura en el

intervalo de 15 a 30°C.

6. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 5, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla y en el cual el método comprende un paso inicial
5 de remover por lo menos parte de dicha cascarilla.

7. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secar en horno los granos germinados.

8. Un método para producir un extracto acuoso de
10 un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

b) tratar dichos granos de cereal para remover la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado
15 la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en el cual dicho paso de germinación comprende

20 i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa
25 durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30°C;

5 d) dividir finamente dichos granos germinados, con lo cual se obtienen granos germinados molidos, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún
10 momento entre los pasos c) y d); y

 e) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

 con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

15 9. El método de conformidad con el ítem 8, en el cual el método comprende un paso adicional después del paso de germinación y antes del paso de dividir finamente, dicho paso adicional comprende someter los granos germinados a un paso de tratamiento térmico a una temperatura en el
20 intervalo de 35 a 55 °C.

 10. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 9, en el cual el paso de incubar los granos húmedos en aire se efectúa con un flujo en el intervalo de 85 a 95 L/h de aire atmosférico por kg de granos de cereal
25 secos.

11. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 9, en el cual el paso de incubar los granos húmedos en aire se efectúa con un flujo en el intervalo de 17 a 21 L/h de O₂ por kg de granos de cereal secos.

5 12. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el tratamiento térmico se efectúa a una temperatura en el intervalo de 40 a 50 °C.

10 13. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la duración del tratamiento térmico está en el intervalo de 1 a 5 horas.

14. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes en el cual la temperatura se controla por ejemplo mediante enfriamiento.

15 15. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso d) es opcional.

16. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 15, en el cual dichos granos se incuban en dicha solución acuosa durante un intervalo de 20 a 72 horas.

20 17. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 16, en el cual el paso i) comprende incubar los granos en dicha solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como por ejemplo 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas.

25 18. El método de conformidad con cualquiera de

los ítems 5 a 17, en el cual los granos del cereal se sumergen en la solución acuosa durante todo el paso i) de la germinación.

19. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4, 6 y 12 a 18, en el cual los granos se sumergen en la solución acuosa durante todo el paso de germinación.

20. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 19, en el cual los granos del cereal se sumergen en solución acuosa, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora durante un intervalo de 20 a 72 horas.

21. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 20, en el cual los granos del cereal se sumergen en solución acuosa, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora durante un intervalo de 16 a 40 horas, tal como por ejemplo 20 a 35 horas, de preferencia en el intervalo de 20 a 30 horas.

22. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 21, en el cual el paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire se efectúa bajo aireación.

23. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 22, en el cual la duración del paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire está en el

intervalo de 20 a 50 horas, de manera más preferida durante un intervalo de 20 a 35 horas, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 30 horas.

24. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 5 a 23, en el cual la temperatura del paso de incubar dichos granos de cereal húmedos en aire está en el intervalo de 20 a 30 °C.

25. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo no excede las 72 horas, de manera más preferida no excede las 60 horas, incluso de manera más preferida no excede las 54 horas.

26. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa durante por lo menos 44 horas, tal como durante por lo menos 46 horas.

27. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa durante un intervalo de 44 a 72 horas.

28. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el paso de germinación completo se efectúa a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C, tal como en el intervalo de 20 a 30 °C.

29. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 28, en el cual dicha solución acuosa es agua.

30. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 29, en el cual el método comprende también agregar ácido giberélico (GA) a la solución acuosa.

5 31. El método de conformidad con el ítem 30, en el cual dicho GA se agrega a la solución acuosa a una concentración de por lo menos 100 nM, por ejemplo por lo menos 1000 nM.

10 32. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 31, en el cual la solución acuosa comprende también un agente antiespumante.

15 33. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 32, en el cual por lo menos 3 L, de manera más preferida por lo menos 4 L, incluso de manera más preferida por lo menos 5 L, incluso de manera más preferida por lo menos 6 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal se pasa a través de dicha solución acuosa por hora.

20 34. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 33, en el cual por lo menos 20 g de O₂ por kg de grano de cereal, de manera más preferida por lo menos 30 g de O₂ por kg de grano de cereal, incluso de manera más preferida por lo menos 40 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el intervalo de 40 a 100 g de O₂ por kg de grano de cereal, tal como en el intervalo de 40 a 80 g de O₂ por kg de grano de cereal, por ejemplo en el
25 intervalo de 60 g de O₂ por kg de grano de cereal (materia

seca) se pasa a través de dicha mezcla de solución acuosa/grano de cereal por hora.

35. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 34, en el cual dicho O₂ está comprendido dentro de una mezcla de gas.

36. El método de conformidad con el ítem 35, en el cual la mezcla de gas es aire atmosférico.

37. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 36, en el cual por lo menos 10 L, de preferencia por lo menos 15 L, de manera más preferida por lo menos 20 L, incluso de manera más preferida por lo menos 25 L, incluso de manera más preferida por lo menos 30 L de aire atmosférico por kg de peso seco de granos de cereal se pasan a través de dicha solución acuosa por hora.

38. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 37, en el cual la incubación en solución acuosa se efectúa a una temperatura en el intervalo de 15 a 30 °C, de preferencia aproximadamente a 25 °C.

39. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 38, en el cual los granos se mantienen en el mismo contenedor durante los pasos de germinación y el paso de tratamiento térmico.

40. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 39, en el cual los granos de cereal se incuban en dicha solución acuosa hasta que éstos tengan un

contenido de agua de por lo menos 35 %, tal como por lo menos 37 %.

41. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos provistos en el paso a., han sido tratados con un agente antimicrobiano.

42. El método de conformidad con el ítem 40, en el cual el agente antimicrobiano es un peróxido, tal como peróxido de hidrógeno.

43. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 4 a 42, en el cual el método no comprende un paso de eliminación de raicillas.

44. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la remoción de dicha cascarilla da como resultado una pérdida en un intervalo de 2.5 a 7.5 %, tal como una pérdida en un intervalo de 3 a 6 % del peso total de los granos de cereal.

45. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos de cereal germinados tienen un contenido de agua de por lo menos 25 %, incluso de manera más preferida de por lo menos 30 %, incluso de manera más preferida de por lo menos 35 % al momento de dividir finamente dichos granos de cereal.

46. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos de cereal germinados no han tenido un contenido de agua menor de 25

%, incluso de manera más preferida menor de 30 %, incluso de manera más preferida menor de 35 % en ningún momento entre la finalización del paso de germinación y el momento de dividir finamente dichos granos de cereal.

5 47. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual la temperatura de los granos germinados está por encima de 35 °C en ningún momento entre la finalización del paso de tratamiento térmico y el momento de dividir finamente dichos granos de
10 cereal.

48. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el cereal es cebada.

49. El método de conformidad con el ítem 48, en el cual la cebada es una cebada sin cascarilla o una
15 variedad de cebada que tiene una cáscara delgada.

50. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es un cereal sin cascarilla, por ejemplo trigo o una cebada sin cascarilla.

51. El método de conformidad con cualquiera de
20 los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla, tal como una cebada con cascarilla.

52. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 48, en el cual el cereal es una cebada caracterizada por una o más de las siguientes:

25 B. portar una mutación en el gen que codifica

para una β -glucano sintetasa

C. portar una mutación en el gen que codifica para LOX-1

5 D. portar una mutación en el gen que codifica para LOX-2

E. portar una mutación en el gen que codifica para MMT; y/o

F. portar una mutación en el gen que codifica para DELLA.

10 53. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados tienen una actividad de α -amilasa de por lo menos 40 U/g, tal como por ejemplo por lo menos 50 U/g de grano de cereal, de preferencia por lo menos 60 U/g de grano de cereal en una base en peso seco.

15 54. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados tienen una actividad de dextrinasa límite de por lo menos 5 mU/g, de preferencia por lo menos 9 U/g de grano en una base en peso seco.

20 55. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 4 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

25 56. El método de conformidad con cualquiera de

los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 2 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

5 57. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados inmediatamente antes del paso de dividirlos finamente tienen un contenido de nitroaminas de cuando mucho 0.15 µg/kg, de preferencia cuando mucho 0.12 µg/kg, por ejemplo cuando mucho 0.10 µg/kg de granos de cereal (materia seca).

10 58. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método comprende también un paso de filtrar dicho extracto acuoso.

15 59. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso tiene una capacidad de filtración de por lo menos 50 %, tal como de por lo menos 60 %.

60. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende cuando mucho 200 mg/L de β-glucano.

20 61. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende por lo menos 10 g, tal como por lo menos 15 g de maltosa por L.

25 62. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso

comprende un intervalo de 150 a 400 mg/L de FAN.

63. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el extracto acuoso comprende por lo menos 60 mg/L, de preferencia por lo menos 65 mg/L de valina.

64. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secado en horno.

65. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de secar en horno los granos germinados.

66. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método no comprende un paso de eliminación de raicillas.

67. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 4 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

68. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual los granos germinados contienen cuando mucho 2 g de raicillas (materia seca) por cada 100 g de granos de cereal germinados (materia seca).

69. Un método para producir una bebida, dicho método comprende los pasos de:

i. preparar un extracto acuoso mediante el método

de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes;

ii. procesar dicho extracto como una bebida.

70. El método de conformidad con el ítem 69, en el cual el paso ii. comprende los pasos de:

5 a) calentar dicho extracto acuoso opcionalmente en presencia de lúpulo o extracto de lúpulo;

 b) enfriar el extracto acuoso;

 c) fermentar dicho extracto acuoso con levadura, con lo cual se produce una bebida fermentada.

10 71. El método de conformidad con el ítem 70, en el cual el método comprende también un paso de sedimentación efectuado después del paso a. o el paso b.

 72. El método de conformidad con cualquiera de los ítems precedentes, en el cual el método completo se
15 efectúa en un sitio.

 73. El método de conformidad con cualquiera de los ítems 69 a 72, en el cual la bebida comprende cuando mucho 25, tal como cuando mucho 20 ppb de diacetilo.

 74. Una bebida producida mediante el método de
20 conformidad con cualquiera de los ítems 69 a 73.

 75. Un extracto de cereal acuoso producido mediante el método de conformidad con cualquiera de los ítems 1 a 68.

 76. Un método para producir un extracto acuoso de
25 un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de germinación con lo cual se obtienen granos germinados;

d) someter los granos germinados a un paso de
5 tratamiento térmico a una temperatura en el intervalo de 35 a 55°C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %, con la condición que dichos
10 granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos b) y d); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del
15 cereal.

77. Un método para producir un extracto acuoso de un cereal, dicho método comprende los pasos de:

a) proveer granos de un cereal, en el cual el cereal es un cereal con cascarilla;

20 b) tratar dichos granos de cereal para remover la cascarilla, en el cual dicho tratamiento da como resultado la pérdida de por lo menos 2 % del peso total de dichos granos de cereal;

c) someter los granos de cereal a un paso de
25 germinación con lo cual se obtienen granos germinados, en

el cual dicho paso de germinación comprende

i. incubar dichos granos en una solución acuosa durante un intervalo de 16 a 40 horas, en el cual se hacen pasar por lo menos 2 L de O₂ por kg de peso seco de granos de cereal a través de dicha solución acuosa por hora, y en el cual dichos granos se sumergen en dicha solución acuosa durante dicha incubación;

ii. retirar el exceso de solución acuosa; y

iii. incubar los granos húmedos en aire durante un intervalo de 18 a 50 horas a una temperatura en el intervalo de 15 a 30°C;

e) dividir finamente dichos granos germinados, mientras dichos granos germinados tengan un contenido de agua de por lo menos 20 %; con la condición que dichos granos de cereal no tengan un contenido de agua por debajo de 20 % en ningún momento entre los pasos c) y d); y

f) preparar un extracto acuoso de dichos granos germinados molidos,

con lo cual se produce un extracto acuoso del cereal.

EJEMPLOS

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. No obstante, éstos no se deben considerar como limitativos para la invención. Las muestras de cebada utilizadas en los ejemplos a continuación en la

presente solicitud se analizan todos de la siguiente manera:

- Prueba de germinación

Todas las muestras de cebada utilizadas en los
5 ejemplos se evalúan respecto a los parámetros índice de germinación, energía de germinación y sensibilidad al agua. Los datos se basan en un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para una prueba de germinación de 4 mL y un tamaño de muestra de 100 granos de cebada para una prueba de
10 germinación de 8 mL de conformidad con el Método 3.6.2 Energía Germinativa de la Cebada (Método BRF) de Analytica-EBC.

- Caracterización de las muestras de cebada

Se determinan los pesos de mil granos mediante
15 conteo automático utilizando un instrumento Data Count JR, mientras que el fraccionamiento de tamaño utiliza un instrumento Pfeuffer Sortimat K3 ajustado a 4 clases de granos 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 de
20 tamaño se calculan tomando como base muestras de grano de 100 g.

Se determinan los contenidos de proteína, agua y almidón de muestras de cebada utilizando un instrumento Foss 1241 NIT, utilizando calibración para cebada (FOSS
25 BY213271; provisto por Foss, DK). Antes de la incubación

(por ejemplo 24 horas) en solución acuosa, el contenido de agua de las muestras de grano de 100 g se vuelve a determinar utilizando un instrumento Foss 1241 NIT utilizando calibración para cebada Foss BY303300 (Foss, 5 Dinamarca).

El contenido de agua del grano se determina midiendo primero el peso de la muestra de cebada correspondiente, seguido por el secado de dicha muestra y determinación del peso de la muestra secada. La diferencia 10 en el peso de la muestra húmeda y seca se considera que es agua, y el contenido de agua es igual al peso del agua dividido entre el peso total de la muestra (muestra húmeda).

- Análisis de granos germinados

15 Las muestras de granos germinados se analizan respecto a los siguientes parámetros (p/p): contenido de agua, contenido de proteína, proteína soluble y extracto de la muestra de malta. Los valores se determina utilizando un instrumento Foss 1241 NIT calibrado de conformidad con los 20 datos provistos por Foss (DK; calibración MA000010).

EJEMPLO 1

Método general para remojo y germinación

Se coloca grano de cebada seco en una solución acuosa en un cilindro de plexiglás y se airea 25 constantemente con aire atmosférico desde debajo de la

columna de grano. Se provee un dibujo esquemático del equipo utilizado en la presente solicitud en las Figuras 1 y 2. El flujo de aire se configura utilizando un medidor y controlador de flujo másico SmartTrak® 50 (Sierra, CA, E.U.A.) y la temperatura se mide utilizando un termómetro de precisión Testo 735 (Testo, Alemania).

Se incorporan detectores para medir el flujo de aire, temperatura, pH, conductividad, potencial redox y contenido de O₂ del agua para remojo en este sistema. Los detectores no solo permiten que el procedimiento sea monitoreado en tiempo real, sino también permiten ajustar las condiciones de remojo y germinación durante los procedimientos; este nivel de control no es posible siguiendo los protocolos de malteado y elaboración de cerveza actuales.

GA es una fitohormona que activa la capa de aleurona en la cebada en germinación. Muchos malteadores agregan GA a baja concentración durante el procedimiento de malteado. En la presente, se suplementan diversas concentraciones de GA al agua para la incubación de los granos al inicio del procedimiento. Se prepara una solución GA₃ a partir de ácido giberélico (G7645, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) en etanol absoluto y se agrega al agua.

En términos generales, la cebada se remoja y se germina de conformidad con regímenes de remojo diferentes:

WA = agua/aire:

Incubación en un tanque en agua de la llave que contiene GA₃ y agente antiespumante a 25 °C, al tiempo que se conduce el aire a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

A = descanso de aire

Incubación de granos de cereal húmedos en el tanque. Durante toda la incubación se conduce aire a través de los granos de cereal húmedos desde el fondo del tanque.

10

EJEMPLO 2

Métodos para determinar la actividad enzimática

Durante la germinación, el grano de cebada comienza a secretar una gama de enzimas hidrolíticas, tales como α -amilasas, dextrinasas límite y (1,3;1,4)- β -glucanasas. Típicamente, dichas actividades enzimáticas se detectan en una manera oportunamente coordinada, con las actividades de α -amilasa, β -amilasa y/o dextrinasa límite útiles como marcadores generales para la actividad de enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, se monitorean las actividades de α -amilasa y dextrinasa límite midiendo las actividades de enzima hidrolítica en el grano y se determinan después de la germinación efectuada de conformidad con el método de la invención.

25

Preparación de la muestra

Antes del análisis de la actividad enzimática las

muestras de grano germinado se muelen utilizando un molino Cyclotech Foss estándar (Foss, Dinamarca), equipado con un anillo triturador de carburo de tungsteno (Foss 10004463), impulsor niquelado (Foss 1000 2666) y un tamiz de salida de 1 mm (Foss 10001989). Todas las mediciones de actividad enzimática en granos de cebada germinados se hacen dentro de 48 horas después de moler la muestra.

Actividad de α -amilasa

La actividad de α -amilasa de granos germinados se basa en harina preparada como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". Las pruebas para la determinación de la actividad de α -amilasa utilizan un kit Ceralpha de Megazyme utilizando equipo de laboratorio estándar. Las pruebas se realizan de conformidad con el protocolo del fabricante (K-CERA 01/12), que incluyen el cálculo de la actividad de α -amilasa.

Actividad de β -amilasa

Cuando se mide la actividad de beta-amilasa de los granos germinados, la harina se elabora como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". Las pruebas de actividad de β -amilasa siguen las recomendaciones provistas con el kit Betamyl de Megazyme (K BETA3).

Actividad de dextrinasa límite

Para la medición de la actividad de dextrinasa

límite en granos germinados, la harina se elabora como se describió anteriormente en la sección "Preparación de la muestra". La actividad de dextrinasa límite se determina utilizando un kit Limit Dextrizyme T-LDZ1000 de Megazyme.

5 Las pruebas, que incluyen mediciones de la actividad, se realizan de conformidad con el protocolo del fabricante (T LDZ1000 07/9).

EJEMPLO 3

Desarrollo del grano durante el procedimiento de remojo y germinación

10

Se incuban una línea de cebada sin cascarilla y líneas de cebada con cascarilla en un cilindro de plexiglás de conformidad con el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1. El procedimiento de incubación se efectúa a 15 °C y 25 °C. Los granos se airean desde abajo con niveles variables de aire atmosférico durante diferentes periodos de tiempo, durante los cuales el contenido de humedad del grano se eleva y se inicia la germinación. El desarrollo de grano se analiza después de 24 horas y 48 horas de incubación y se verifica la absorción de agua en los granos determinando el contenido de agua como % (p/p).

15

20

En detalle, los granos de la línea de cebada sin cascarilla se transfieren al cilindro de plexiglás y se incuban utilizando el régimen WA. Los granos primero se incuban durante 3 horas en P3-hipocloran al 1% (Ecolab,

25

Suiza) después de incubación durante 45 horas en agua ajustada a 1000 nM de ácido giberélico (GA) y Foamazol al 0.01% FCD511 (AB Vickers, Burton on Trent, Reino Unido). La incubación es ya sea a 15 o 25 °C, y los granos se airean ya sea con 30, 60, 90 o 120 L/h de aire atmosférico. Las muestras se recolectan después de 24 horas y 48 horas. Los resultados se resumen en las Figuras 3A-3B. Tal como se muestra, el acceso de aire promueve fuertemente la germinación de la cebada. Cuando se comparan con la muestra no aireada (0 L/hr) todas las muestras sometidas a un flujo de aire se caracterizan por una diferencia notable en el desarrollo de grano. En particular, los granos tienen un brote visible de más de 1 mm incluso después de 24 horas, a 15 °C y 30 L/h de flujo de aire. Incrementar el flujo de aire ocasiona el desarrollo de brotes adicionales después de 24 horas a 15 °C. A 25 °C algunos granos incluso desarrollan raicillas visibles (60, 90 o 120 L/h). Incrementar el tiempo de incubación conduce a avance en el desarrollo, con todos los granos sometidos a flujo de aire caracterizados por la germinación y desarrollo de raicillas visibles después de 48 horas. Con temperatura de incubación incrementada, hay desarrollo mejorado de brotes y raicillas. Un flujo de aire de 90 L/h corresponde a 51 g de O₂ por hora. Si se calcula como O₂ por L de H₂O, la cantidad variará con el tiempo, debido a que los granos de cereal

absorben agua durante la incubación. Típicamente, un flujo de aire de 90 L/h corresponde a 64-121 g de O₂ por L de H₂O por hora.

El mismo experimento se efectúa utilizando granos de una línea de cebada con cascarilla y los resultados se resumen en las Figuras 4A-4B. Los granos de la línea de cebada con cascarilla también tienen un brote visible de más de 1 mm después de incubación a las 24 horas, a 25 °C y 30 L/h de flujo de aire. Incrementar el tiempo de incubación conduce a avance en el desarrollo con todos los granos sometidos a flujo de aire de 60 L/h caracterizados por la germinación y desarrollo de raicillas visibles después de 48 horas.

Los resultados de absorción de agua en los granos se resumen en la Tabla 1 (cebada sin cascarilla) y la Tabla 2 (cebada con cascarilla) a continuación. El contenido de agua parece no ser altamente dependiente del flujo de aire, si el flujo de aire es por lo menos 30 L/h. En contraste, el contenido de agua es mucho más alto después de 24 horas a 25 °C que a 15 °C.

TABLA 1

Absorción de agua (%), granos de cebada sin cascarilla

Flujo de aire *Temperatura. (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 *Temperatura. (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

Por consiguiente, los resultados de la presente invención muestran que una temperatura de 25 °C puede ser más preferible para velocidades de absorción de agua tempranas por parte del grano y por tanto en la velocidad total de la germinación.

EJEMPLO 4**El efecto de las temperaturas del descanso de aire en las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite libre**

5 Se incuba cebada con cáscara en un cilindro de plexiglás (WA) durante 24 horas seguido por tratamiento con descanso de aire (A) durante 24 horas a diferentes intervalos de temperatura. Posteriormente, se analizan las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite
10 libre como se describe en el ejemplo 2.

La incubación en agua con aireación también puede ser referida como "WA" en la presente solicitud, mientras que la incubación en aire con aireación puede ser referida como "A".

15 En un primer experimento, se remoja cebada con cascarilla (Con cascarilla 03) durante 24 horas (WA) en agua de la llave que contiene en H_2O_2 al 0.01 %, 1000 nM de GA_3 y agente antiespumante al 0.01 % Sigma 204. Durante la incubación WA, se burbujea aire a 90 l/h por kg de granos
20 de cebada secos a 25 °C. La imbibición en agua es seguida por descanso de aire (A) a diferentes intervalos de temperatura; a) 18 horas de aireación (90 l/h) a 25 °C seguido por 6 horas de aireación (90 l/h) ya sea a 40 °C, 50 °C o 60 °C, o b) 24 horas de aireación (90 l/h) ya sea a
25 40 °C, 50 °C o 60 °C (Figuras 5A-5C). La aireación durante

el descanso de aire se efectúa conduciendo 90 l de aire a través de los granos de cebada por hora por kg de granos de cebada secos.

Se efectúa un segundo experimento utilizando las mismas condiciones para imbibición en agua (WA) seguido por 24 horas de descanso de aire (A) con aireación (90 l/h) a 25 °C. Posteriormente, el periodo de descanso de aire se prolonga con c) 2 o d) 4 horas adicionales a 40 °C, 50 °C o 60 °C (Figuras 6A-6C).

Los regímenes de descanso de aire con a) 18 horas a 25 °C seguido por 6 horas a 40 °C o b) 24 horas a 40 °C afectan de manera adversa la actividad de α -amilasa en comparación con 24 horas a 25 °C (Figuras 5A-5C y 7A-7C). En contraste, incrementar la temperatura después de 24 horas a 25 °C hasta 40 o 50 °C durante c) 2 o d) 4 horas afecta de manera positiva las actividades α -amilasa y en un grado menor las de dextrinasa límite (Figuras 6A-6C). Por lo tanto, con el fin de obtener actividades elevadas de enzima hidrolítica, se prefiere un descanso de aire inicial durante la germinación a temperatura óptima (25 °C o 30 °C)) durante por lo menos 24 horas seguido por un incremento en la temperatura (incrementándola óptimamente hasta 40 °C durante 4 horas). En la presente se demuestra que este tratamiento incrementa la actividad total de α -amilasa y en un grado menor las actividades de dextrinasa límite.

EJEMPLO 5**Efecto del descascarillado antes de la germinación**

Se analiza el efecto del descascarillado antes de la germinación tomando como base las actividades de α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite libre en un panel de 10 líneas diferentes de cebada con cascarilla. Se compara un tratamiento que comprende a) descascarillado, 24 horas de incubación WA y 24 horas de descanso de aire (A) con b) 48 horas de incubación WA sin descascarillado.

10 Tratamiento 1 (que incluye descascarillado)

Se descascarillan líneas de cebada con cascarilla (1-10) mediante tratamiento mecánico con lija durante 1 minuto con el fin de remover parcialmente la cáscara. El tratamiento da como resultado una pérdida de peso de 3-6 %, dependiendo de la línea de cebada con cascarilla. La cebada descascarillada después se incuba (WA) a 25 °C durante 24 horas en agua aireada con 90 l/h que contiene H₂O₂ al 0.01 %, agente antiespumante al 0.01 % Sigma 204, 1000nM de GA₃, seguido por 24 hora de aireación (A) a 25 °C, 90 l/h.

20 Tratamiento 2 (sin descascarillado)

Se incuba cebada con cascarilla (1-10) (WA) durante 48 horas en agua aireada 90 l/h que contiene H₂O₂ al 0.01 %, 1000 nM de GA₃ y antiespumante al 0.01 % a 25 °C.

Los resultados demuestran que el tratamiento 1, que comprende un descascarillado inicial, incrementa las

actividades de α -amilasa y de dextrinasa límite hasta diez veces e incrementa la actividad de β -amilasa en un grado menor en comparación con el tratamiento 2 (Figuras 7A-7C).

EJEMPLO 6

5 Evaluación de la formación de raicillas

Se prepara cebada germinada de conformidad con los métodos generales descritos en el ejemplo 1. De manera más específica, se sanitizan granos de cebada de las variedades Sin cascarilla 01 y Con cascarilla 02 con lavado
10 con hipocloran al 0.1 % durante 1 hora, después se remojan y se germinan mediante incubación durante 48 horas en agua de la llave que contiene 1000 nM de GA y agente antiespumante al 0.01%. La incubación se efectúa a 25 °C, y se conducen 90 l/h de aire a través del agua desde el fondo
15 del tanque durante toda la incubación. La cebada germinada se seca por congelación y se pesa. Las raicillas formadas se retiran utilizando equipo "old Munich" y la cebada germinada se pesa otra vez. La diferencia en masa antes y después de la remoción de raicillas, se considera la masa
20 de las raicillas. Se determina el peso de 3 muestras diferentes. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa antes de	Masa después de	Masa de las raicillas	Masa antes de	Masa después de	Masa de las raicillas
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(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
Promedio			0.97			0.44
Desv. Est.			0.08			0.05

En un segundo experimento, se remojan y germinan granos de cebada provenientes del mismo lote de Sin cascarilla 01 y Con cascarilla 02 durante 96 horas utilizando métodos estándar. La cebada germinada se seca por congelación y se pesa y las raicillas se retiran utilizando equipo "old Munich". Después de la remoción de las raicillas la cebada se pesa nuevamente y la diferencia en masa antes y después de la remoción de raicillas se considera la masa de las raicillas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

	Sin cascarilla 01			Con cascarilla 02		
	Masa antes de	Masa después de	Masa de las raicillas	Masa antes de	Masa después de	Masa de las raicillas
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(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
Promedio			8.19			6.41
Desv. Est.			0.05			0.13

La Tabla 5 muestra una comparación entre la masa (en g) de raicillas de la cebada germinada mediante los métodos de la invención (WA 48 horas) y en cebada remojada mediante métodos convencionales (Malteado 96 horas). Es evidente que la cebada germinada mediante los métodos de la invención tiene formación de raicilla significativamente reducida. La Figura 8 muestra la pérdida de peso después de remoción de raicilla en %.

TABLA 5

Cebada_método	Masa promedio de las raicillas (g)	Desv. Est.
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 7**Evaluación del contenido de NDMA**

La nitrosamina NDMA se forma particularmente en las raíces durante el horneado de la malta (Wainwright (1986) J Inst Brew 92 73-80). Tal como se describe en el Ejemplo 6, una ventaja de los granos de cereal germinados preparados mediante los métodos de la invención es que éstos comprenden menos raíces en comparación con malta verde ordinaria. El contenido de NDMA en malta contemporánea es bajo, sin embargo puede ser conveniente

reducir los niveles incluso más.

El contenido de NDMA se analiza en cebada (Cebada-1), en granos de cebada germinados preparados de conformidad con los métodos de la invención (denotados
5 "Malta 1a" en este Ejemplo) y en tres maltas producidas industrialmente (Malta-1b, Malta 2 y malta 3). Las maltas producidas industrialmente han sido todas tratadas para remover las raicillas mediante métodos estándar. La cebada-1, Malta-1a y Malta-1b se preparan todas a partir del mismo
10 lote de una variedad de cebada con cascarilla (Con cascarilla 02), mientras que las otras dos muestras de malta Malta-2 y Malta-3 se obtienen ambas a partir de otros lotes de cebada.

La Malta-1a se produce de conformidad con los
15 métodos generales descritos en el ejemplo 1. En detalle, se sanitizan granos de cebada con lavado de hipocloran al 0.1 % durante 1 hora, después se remoja y se germina mediante incubación (WA) durante 48 horas en agua de la llave que contiene 1000 nM de GA y agente antiespumante al 0.01 %. La
20 incubación se efectúa a 25 °C, y se conducen 90 L/h de aire a través del agua desde el fondo del tanque durante toda la incubación.

La cebada germinada se seca por congelación antes de analizar el contenido de NDMA mediante GC-MS. Los
25 resultados se muestran en la figura 9. Los análisis indican

claramente que menos NDMA está presente en la Malta-1a en comparación con maltas producidas mediante malteado estándar que incluyen horneado, aunque el patrón haya sido sometido a desraizado.

5

EJEMPLO 8

Maceración

Se germinan granos de cebada sin cascarilla como se describió en la presente solicitud anteriormente en el Ejemplo 7 con diferente flujo de aire (0, 45 o 90 L/h).
10 Después de 2 días de remojo y germinación continuos, se drena la fase líquida de los granos y el grano se muele en húmedo en un homogeneizador a escala de laboratorio (Omega Juicer 8226, Omega, E.U.A.). La extracción de los granos molidos en agua se realiza utilizando el programa de
15 maceración expuesto en la Figura 10. Este procedimiento también se puede referir como "maceración". Durante la maceración también ocurre una sacarificación en términos generales. Durante la maceración típicamente se agregan CaCl_2 y H_3PO_4 al agua.

20

Durante el procedimiento de maceración industrial, se pueden agregar preparaciones de enzimas exógenas para continuar la conversión de almidón, proteína de almacenamiento y polisacáridos de pared celular parcialmente degradados en azúcares fermentables y
25 aminoácidos que posteriormente apoyarán el crecimiento de

la levadura durante la fermentación. Se comparan las características de la maceración en presencia y ausencia de la mezcla de enzimas para elaboración de cerveza Ultraflo Max (Novozymes, Dinamarca). Ultraflo Max es una mezcla de
5 enzimas que comprende actividades de β -glucanasa y xilanasas. Después de la maceración, los extractos se filtran utilizando un filtro de mosto estándar.

La eficacia de la mezcla de enzimas exógenas se analiza midiendo la capacidad de filtración de la mezcla de
10 macerado que permanece después del procedimiento de maceración. La capacidad de filtración se determina utilizando un embudo de filtración TOP ID de 140-mm (Urbanti Pequannock, N.J. E.U.A.) equipado con MN 614 Ø $\frac{1}{4}$ 320 mm REF 527032 (Macherey Nagel Düren Alemania). El peso
15 de las muestras se registra utilizando una báscula estándar (MPB1502 L, Mettler Toledo, Suiza). La capacidad de filtración se determina como la cantidad total de líquido obtenido después de filtración durante 60 minutos de una
mezcla de macerado que comprende 400 mL de solución de
20 maceración, previamente suplementada con 100 g de cebada germinada, molida.

Los resultados experimentales se resumen en la Figura 11 y demuestran que el flujo de aire incrementado durante la incubación da como resultado una capacidad de
25 filtración del mosto incrementada.

EJEMPLO 9**Mosto**

El mosto se prepara como se detalla en los experimentos del Ejemplo 8, utilizando granos de cebada germinados preparados como se describió en el Ejemplo 7. Los granos de cebada germinados se muelen en húmedo y se maceran como se describió en el Ejemplo 8 - ya sea en presencia o ausencia de la mezcla de enzimas Ultraflo Max (Novozymes, Dinamarca).

Los niveles de azúcares fermentables - fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y maltotriosa - se determinan de la siguiente manera. Después de hervir el mosto, éste se diluye 1:2000 con agua milliQ y posteriormente se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0.2 μm (Titan3 30 mm, Thermo Scientific, CA, E.U.A.). Primero se aplican alícuotas de 10 μL a una columna CarboPac SA10-4 μm , y posteriormente se analiza en un sistema de HPLC libre de reactivos Dionex ICS 5000+ equipado con una columna de guarda CarboPac SA10-4 μm (4 x 50 mm). La elución de moléculas separadas se realiza con una corrida con KOH 25 mM isocrático en el transcurso de 20 minutos. Después de la resta de la línea basal y de emplear carbohidratos puros de grado HPLC como patrones de referencia [D-(+)-glucosa, D-fructosa, D-(+)-maltosa maltotriosa], los carbohidratos se cuantifican mediante integración de área pico.

Los resultados se muestran en la Figura 12 y demuestran que el flujo de aire incrementado durante la incubación da como resultado cantidades incrementadas de azúcares fermentables.

5

EJEMPLO 10

Elaboración de cerveza a escala pequeña

Fermentación

El mosto, preparado como se describió en el Ejemplo 8, se hierve en presencia lúpulo o extracto de lúpulo y el proceso de fermentación se inicia a través de la inoculación convencional del extracto con una cepa de levadura para elaborar cerveza apropiada. La fermentación, filtración de la cerveza y el embotellado se efectúan de conformidad con protocolos tradicionales.

15

Elaboración de cerveza a escala pequeña

El ejemplo compara cerveza preparada a partir de dos variedades de cebada, tratadas de conformidad con los métodos descritos en la presente solicitud, con cerveza preparada a partir de cebada no malteada tratada con una mezcla de enzimas para elaboración de cerveza disponible comercialmente. El mosto y las cervezas finales se analizan y comparan con una cerveza lager comercial de referencia (denotada como "Referencia" en la presente solicitud) cuando sea posible. Los datos acerca de la cerveza lager de

20

referencia se obtienen por separado a partir de otras fuentes.

Material

A menos que se indique lo contrario el material se utiliza tal como es.

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Variedad de cebada	Sin cascarilla 01	Con cascarilla 02	Con cascarilla 02	Sin cascarilla 01	80% de malta 20% de cebada
Tratamiento antes de la molienda	A 90 l/h de aire 24 h WA 24 h A	A 90 l/h de aire 24 h WA 24 h A	---	---	Malta preparada mediante procedimiento estándar

Molienda

Material tratado

Material no tratado

Molido en un extractor doméstico (Omega J822C)	Molido en MULTICRACKER
--	------------------------

Elaboración de cerveza

La elaboración de cerveza se realiza bajo condiciones estándar utilizando una relación de sémola/agua de 1 a 4.

La cebada germinada, el material no tratado y/o la malta se maceran utilizando un programa de maceración estándar con una sacarificación de 2 pasos en presencia de las enzimas indicadas.

5

	Material tratado (prueba 1 y 2)	Material no tratado (prueba 3)	Material no tratado (prueba 4)	Referencia
pH	5.20	5.70	5.70	Tipicamente 5.20
Adición de enzima	UltraFlo® Max, 0.2 g/kg de DM Attenuzyme® Flex, 1.0 g/kg de DM	Ondeapro®, 2.0 g/kg de DM	Ondeapro®, 2.0 g/kg de DM	UltraFlo® Max, 0.08 g/kg de DM Attenuzyme® Core, 0.2 g/kg de DM

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

- Ultraflo® Max comprende β -glucanasa (700 EGU/g) y xilanasa (250 FXU/g)
- Attenuzyme® Flex comprende glucoamilasa (400 AGU/g) y pululanasa (80 PUN/g) de conformidad con la hoja del producto del fabricante
- Attenuzyme® Core comprende glucoamilasa (1600 AGU/g)
- Ondeapro® comprende β -glucanasa, Xilanasa, α -amilasa, Pululanasa (637 PUN/g), Proteasa y Lipasa.

Cuando se determina la actividad de Attenuzyme® Flex como se describió en el Ejemplo 2 se encontró que se utiliza una cantidad de Attenuzyme® Flex que corresponde a 16243 mU de actividad de dextrinasa límite de cebada por g de solución de enzima. Asimismo, se descubrió que la

actividad de glucoamilasa y α -amilasa combinada es de 628,863 U por g de solución de enzima.

El mosto frío se recolecta después de filtración estándar y ebullición del mosto con lúpulo agregado al inicio de la ebullición.

El extracto original se ajusta con agua de la llave para obtener un platón final (en %P) de 11.5 después de ebullición y evaporación y el color del mosto se ajusta para obtener un color similar al color de la cerveza de referencia.

Fermentación

- se agrega Brewers Clarex® (disponible de DSM) al mosto frío a 0.1 g/kg de DM
- el mosto se inocula (pitched) con 8E6 células/ml de levadura lager (*S. pastorianus*),
- el mosto inoculado se airea con aire durante 30 minutos
- la fermentación se lleva a cabo en un tanque de fermentación sin presión a 15 °C hasta el final de la fermentación
- la cerveza fermentada final se mantiene a 4 °C hasta la transferencia a un tanque

Transferencia al tanque

- la cerveza con menos de 5E5 células/ml en suspensión se transfiere a un tanque

- el tanque se enjuaga con CO₂ a 0.5 barías antes y después del llenado
- el CO₂ se agrega a una sobrepresión de 0.5 barías y la cerveza se mantiene a 4 °C hasta la filtración

5 Filtración

- la cerveza se filtra a través de tres capas de láminas de filtro de profundidad
- se aplican 1.2 barías de presión con CO₂ a la cerveza en el tanque después de la filtración
- la cerveza se mantiene a 4 °C hasta el envasado

10

Envasado

La cerveza se envasa en botellas de 33 cl y se mantiene a 4 °C para las pruebas finales y evaluación sensorial.

15 Resultados del análisis

Azúcares en el mosto antes de la fermentación

20

La concentración de azúcares fermentables totales se determina esencialmente como se describió en el Ejemplo 9 y los resultados se muestran en la Tabla 6. Los niveles de glucosa son notablemente más altos en ambas cervezas preparadas de conformidad con los métodos de la invención (prueba 1 y 2) en comparación con la cerveza preparada a partir de cebada no malteada (prueba 3 y 4).

TABLA 6

	Prueba 1		Prueba 2		Prueba 3		Prueba 4		referencia	
	g/100	%	g/100	%	g/100	%	g/100	%	g/100	%
	g/%P		g/%P		g/%P		g/%P		g/%P	
	de		de		de		de		de	
	mosto		mosto		mosto		mosto		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 de amino libre y β -glucano

Las concentraciones de nitrógeno de amino libre (FAN) en el mosto antes de la fermentación así como en la cerveza final se determinan de conformidad con el protocolo estándar Gallary Beermaster de ThermoFisher para FAN, método colorimétrico. Los valores típicos de nitrógeno de amino libre (FAN) en el mosto son de 200 mg/L. FAN es importante para una buena viabilidad de la levadura durante la fermentación. En términos generales, son deseables niveles de FAN que sean lo suficientemente altos para obtener una buena viabilidad de la levadura. Los resultados de FAN en mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 7a y en cerveza en la Tabla 7b.

El β -glucano habitualmente es degradado durante el malteado convencional. Los niveles muy altos de β -

glucano son indeseables, debido a que esto puede ocasionar una filtración problemática. El nivel de β -glucano en mosto antes de la fermentación así como en cerveza se determina utilizando el kit "Beta-Glucan (High MW)" de Thermo Scientific de conformidad con las instrucciones del fabricante y los resultados se muestran en la Tabla 7a (mosto antes de la fermentación) y la Tabla 7b (cerveza).

TABLA 7a**Mosto antes de la fermentación**

10

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

TABLA 7b**Cerveza**

15

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

20

Aminoácidos en mosto antes de la fermentación

Se determina la concentración de todos los aminoácidos estándar en el mosto antes de la fermentación utilizando el kit AccQ•Tag de Waters siguiendo el procedimiento descrito en el mismo. Los resultados acerca

de los aminoácidos en mosto antes de la fermentación se muestran en la Tabla 8.

En particular la concentración de valina antes de la fermentación es importante. Entre más valina esté presente en el mosto, menor será la probabilidad de formación de "diacetilo indeseado" durante la fermentación - y por tanto más largo el tiempo de descanso de DA. La concentración de valina es 5 veces (Prueba 1) y 2 veces (Prueba 2) más alta en mosto preparado de conformidad con la invención en comparación con la Prueba 3.

TABLA 8

mg/L de mosto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 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
Valina	153	71	31	50	132

TABLA 8 (cont.)

mg/L de mosto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Isoleucina	80	43	16	28	79
Leucina	214	109	52	69	181
Fenilalanina	139	75	39	47	144
Triptófano	47	32	25	30	
Aminoácidos totales	1940	1182	664	907	

Números clave de la elaboración de cerveza y fermentación

Se determinan diversos números clave de la elaboración de cerveza y de la fermentación y se comparan con la referencia. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Es notable que las cervezas preparadas mediante los métodos de la invención tienen niveles de diacetilo significativamente más bajos. Por lo general se prefiere que los niveles de diacetilo sean tan bajos como sea posible.

TABLA 9

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 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, % en volumen	5.2	5.2	5.6	5.4	4.54
Color, unidades EBC	5.4	8.0	5.4	7.1	6.4

TABLA 9 (cont.)

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Referencia
Amargor	14	14	16	18	16
Diacetilo, ppb	14	15	27	28	22
SO₂, mg/L	1	1	1	1	3

5

Evaluación del panel sensorial

Todas las cervezas preparadas como se describe en este ejemplo se someten a evaluación por parte de un panel sensorial. La calificación total del sabor para todas es aceptable. Una diferencia entre las diferentes cervezas es que la cerveza de la Prueba 3 tiene la calificación "notablemente" para el sabor "jabonoso, grasoso, a diacetilo, grasiento rancio", mientras que la cerveza de la Prueba 2 (preparada de conformidad con la invención) solamente tiene la calificación "ligeramente" para este sabor.

10

15

Resumen

Los desafíos de la escasez futura de agua y energía se deben resolver en una manera social, económica y ambientalmente responsable. En este sentido, la presente invención contribuye a la sustentabilidad a largo plazo de la producción de cerveza en términos del uso reducido de agua y energía. A través de la eliminación del procedimiento de secado en horno tradicional, combinado con la integración directa del remojo, la germinación y el

20

25

descanso de aire al procedimiento de elaboración de cerveza, la aplicación de los métodos de la presente invención reducen en gran medida los costos de entrada y funcionamiento de la fabricación de cerveza.

5 La presente invención puede contribuir a reducir los costos de entrada y reducir la presión ambiental en las industrias de malteado y elaboración de cerveza de numerosas maneras, incluyendo:

10 - Los procedimientos de remojo y germinación que actualmente toman varios días para completarse se pueden completar mucho más rápido

 - Los procedimientos de remojo y germinación se pueden llevar a cabo en un solo recipiente en una sola ubicación

15 - El segundo paso de remojo tradicional del procedimiento de malteado se puede eliminar

 - Los procedimientos pueden reducir el consumo de agua, por ejemplo hasta en 40%

20 - Los costos elevados de calefacción para secar en horno la malta se pueden eliminar

 - Los costos elevados de transporte para trasladar la malta desde la maltería hasta la cervecería se pueden eliminar

25 - El equipo y planta requeridos para llevar a cabo los métodos de la invención pueden ser compatibles con el

equipo existente en cervecerías y por lo tanto no requerirán gastos grandes de capital nuevo.

Literatura citada

Briggs DE (1998) In: Malts and Malting. Blackie
5 &, Professionals.

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

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

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