

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491370 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.10

(51) Int. Cl. *A23L 2/84* (2006.01)  
*C12C 7/14* (2006.01)  
*C12H 1/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.29

---

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА НАПИТКА

---

(31) 21211367.4

(32) 2021.11.30

(33) EP

(86) PCT/EP2022/083681

(87) WO 2023/099480 2023.06.08

(88) 2023.08.03

(71) Заявитель:  
ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:  
Беверс Лус Элизабет, Вейсман  
Теодориус Адольф (NL)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или уменьшения мутности в напитке путем добавления эндопротеазы.

---

A1

202491370

202491370

A1

## **УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА НАПИТКА**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к областям энзимологии и производства напитка. В частности, настоящее изобретение относится к способам предотвращения или уменьшения мутности в напитке. Более конкретно, настоящее изобретение относится к ферментам и их применению в способах предотвращения или уменьшения мутности в напитке.

### Сведения, предшествующие изобретению

Мутность является широко известным явлением в производстве напитка. Мутность может присутствовать, например, в пиве, вине и фруктовых соках. Формирование мутности может происходить на различных стадиях способа производства напитка. Часто мутность является результатом взаимодействий между белками и полифенольными соединениями. Формирование мутности нежелательно, поскольку помутнение, вызванное формированием мутности, считается нарушением качества и воспринимается негативно, поскольку потребители ожидают получить прозрачный напиток.

Пролин-специфическая эндопротеаза была предложена для предотвращения или уменьшения формирования мутности. Эти протеазы добавляют на стадии ферментации в способах производства напитка, где они избирательно гидролизуют активные в отношении формирования мутности, богатые пролином белки, тем самым предотвращая осаждение белково-полифенольных комплексов и, следовательно, формирование мутности. Однако в способах производства, в которых применяется только стадия ограниченной ферментации или вообще не применяется стадия ферментации, формирование мутности по-прежнему представляет проблему.

Таким образом, в данной области по-прежнему сохраняется потребность в разработке усовершенствованных способов предотвращения или уменьшения формирования мутности в напитке.

### Сущность изобретения

Объектом изобретения является способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке за счет использования ферментов. Оптимизация и усовершенствование заключаются, среди прочего, в применении ферментов, в частности, в добавлении ферментов в сусло и инкубации сусла.

### Раскрытие изобретения

По всему настоящему описанию и в прилагаемой формуле изобретения слова

«содержат» и «включают», а также их варианты, такие как «содержит», «содержащий», «включает» и «включающий», должны толковаться как включающие. То есть эти слова предназначены для того, чтобы передать возможное включение других элементов или целых чисел, которые специально не упоминаются там, где это позволяет контекст. «Элемент» может означать один элемент или более чем один элемент. Как будет очевидно для специалистов в данной области техники после прочтения данной заявки, каждый из индивидуальных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, содержит дискретные компоненты и признаки, которые могут быть легко отделены от признаков любых других вариантов осуществления или объединены с ними без отступления от объема или сущности настоящего изобретения, описанного в настоящем документе. Любой изложенный способ может быть реализован в порядке изложенных действий или в любом другом порядке, который является логически возможным.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или уменьшения мутности в напитке, при этом способ включает следующие стадии: (а) приготовление сусла, (b) добавление пролил-специфической эндопротеазы к суслу и инкубацию сусла, (с) кипячение сусла и (d) приготовление напитка из сусла.

В одном из вариантов осуществления напитков представляет собой напиток, содержащий чувствительные к формированию мутности белки. Напиток может представлять собой пиво, солодовый напиток, несолодовый напиток, вино или фруктовый сок. В предпочтительном варианте осуществления напитков представляет собой пиво или солодовый напиток. В более предпочтительном варианте осуществления напитков представляет собой пиво.

Термин «пиво» при использовании в настоящем документе предназначен для охвата как пива, приготовленного из заторов, полученных из несоложенных зерновых культур, ровно как и из заторов, полученных из соложенных зерновых культур, и всех заторов, полученных из смеси соложенных и несоложенных зерновых культур. Термин «пиво» также охватывает пиво, приготовленное с использованием добавок, и пиво со всеми возможными вариантами содержания алкоголя.

Используемый в настоящем документе термин «солодовый напиток» означает напиток, в котором в качестве сырьевых материалов используется по меньшей мере солод. Солод может быть ферментирован дрожжами или может быть не ферментирован дрожжами.

В предпочтительном варианте осуществления пиво представляет собой пиво с низким содержанием алкоголя или безалкогольное пиво.

Термины «безалкогольное пиво» и «неалкогольное пиво» могут быть использованы взаимозаменяемо. Они определяются как пиво с содержанием алкоголя менее 0,5% по объему (ABV).

Используемый в настоящем документе термин «пиво с низким содержанием алкоголя» определяется как пиво, которое содержит от 0,5% до менее 1,2% алкоголя по объему (ABV).

В настоящем документе слова «мутность», «помутнение» и «муть» используются взаимозаменяемо. Для измерения степени мутности в напитке можно использовать турбидиметр. В турбидиметре измеряется количество света, рассеянного под заданным углом относительно направления падающего светового луча. Измерения мутности очень подходят для измерения мутности, сформированной в результате белково-полифенольных взаимодействий.

В одном варианте осуществления сусло готовят путем обеспечения зерновых культур и подвергания их стадии помола. Зерновые культуры включают, помимо прочего, солод, ячмень, пшеницу, кукурузу, рожь, овес, рис, сорго и маниоку.

После стадии помола зерновые культуры подвергают стадии затириания. Перед затирианием размолотые зерновые культуры могут быть подвергнуты стадии варки. В одном варианте осуществления во время затириания используют ферменты, такие как эндоглюканызы, ксиланызы, протеазы, альфа-амилазы и амилоглюкозидаза. Основной целью затириания является превращение крахмала из сырьевых материалов, *например*, зерновых культур, в ферментируемые сахара. Это происходит в процессе затириания и может быть выполняться в едином сосуде (зоторном чане) или в двойном сосуде, зоторном чане и разварнике зерна. В большинстве случаев второй сосуд, *т.е.* разварник зерна, используется для разжижения зерен, которые содержат крахмал, имеющий высокие значения температуры желатинизации. После процесса варки зерна эту часть затора переносят обратно в заторный чан.

После стадии затириания затор фильтруют с получением сусла. Сусло также может быть получено путем растворения солодового экстракта в горячей воде.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (a) помол зерновых культур с получением размолотых зерновых культур, (b) затириание размолотых зерновых культур с получением затора, (c) фильтрацию затора с получением сусла, (d) добавление к суслу пролил-специфической эндопротеазы и инкубацию сусла, (e) кипячение сусла и (f) приготовление напитка из сусла.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения

мутности в напитке, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (a) обеспечение солодового экстракта, (b) растворение солодового экстракта с получением сусла, (c) добавление пролил-специфической эндопротеазы в сусло и инкубацию сусла, (e) кипячение сусла и (f) приготовление напитка из сусла.

Хмель может быть добавлен до, на и/или после стадии инкубации. Хмель также может быть добавлен до и/или на стадии кипячения.

В одном из вариантов осуществления напиток может быть приготовлен из сусла путем подвергания прокипяченного сусла стадии сепарации. После стадии сепарации сусло может быть подвергнуто стадии ферментации. Необязательно, стадии ферментации предшествует стадия охлаждения. После стадии ферментации ферментированное сусло может быть подвергнуто стадии созревания и/или стадии стабилизации. После этого полученный промежуточный напиток может быть подвергнут стадии фильтрации и/или стадии стабилизации с получением напитка. После этого напиток может быть подвергнут стадии пастеризации.

«Стадия ферментации», используемая в настоящем документе, представляет собой стадию приготовления напитка (*например*, варку пива), предназначенную для ферментации доступных сахаров в спирт с помощью добавленных дрожжей.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (a) приготовление сусла, (b) добавление к суслу пролил-специфической эндопротеазы и инкубацию сусла, (c) кипячение сусла, (d) подвергание прокипяченного сусла стадии сепарации, (e) необязательно охлаждение сусла или его части, (f) ферментацию сусла или его части, (g) созревание и/или стабилизацию ферментированного сусла с получением промежуточного напитка, (h) фильтрацию и/или стабилизацию промежуточного напитка с получением напитка и (i) пастеризацию напитка.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности напитка, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (a) помол зерновых культур с получением размолотых зерновых культур, (b) затирание размолотых зерновых культур с получением затора, (c) фильтрацию затора с получением сусла, (d) добавление пролил-специфической эндопротеазы к суслу и инкубацию сусла, (e) кипячение сусла, (f) фильтрацию прокипяченного сусла, (g) необязательно охлаждение отфильтрованного сусла, (h) ферментацию отфильтрованного сусла, (i) созревание и/или стабилизацию ферментированного сусла с получением промежуточного напитка, и (j) пастеризацию и/или фильтрацию промежуточного напитка с получением напитка.

Существует несколько способов производства безалкогольного пива и пива с

низким содержанием алкоголя. Его можно, например, получить с помощью способов, использующих деалкоголизацию, разбавление, ограниченную ферментацию (*например*, холодную контактную ферментацию), отсутствие ферментации или любую их комбинацию.

При деалкоголизации алкогольное пиво варят традиционным способом. Затем алкоголь удаляют с использованием способа, такого как паровая дистилляция, отгонка в токе водяного пара или газа, или обратный осмос.

При использовании разбавления для производства безалкогольного пива, пивовары производят концентрированное пиво традиционным способом, используя значительное количество хмеля и зерна для создания концентрированного пива с насыщенным вкусом и консистенцией. После ферментации концентрированное пиво разбавляют водой с получением низкого уровня содержания алкоголя, а затем повторно насыщают диоксидом углерода.

Существует три распространенных способа ограничения ферментации, и пивовары могут использовать комбинацию этих способов, чтобы получить пиво с низким или нулевым содержанием алкоголя. Во-первых, можно ограничить количество ферментируемых сахаров в сусле. Пивовары могут сделать это, используя зерно, которое производит менее ферментируемые сахара (например, рис или кукуруза), или используя методы, в которых извлекаются менее ферментируемые сахара из зерна на стадии затирания в процессе варки пива. Во-вторых, пивовары могут использовать специальные штаммы дрожжей, которые производят лишь небольшое количество алкоголя или не способны ферментировать определенные типы сахара, такие как мальтоза и мальтотриоза. В-третьих, процесс ферментации можно замедлить или полностью остановить, например, увеличив или уменьшив температуру во время ферментации. Примером последнего является холодная контактная ферментация, при которой ферментация проводится дрожжами при низкой температуре в течение определенного периода времени (например, 24 часов).

Неферментированные солодовые напитки можно производить способами, не требующими ферментации.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, как описано в настоящем документе, включает стадию ограниченной ферментации. Как описано выше, «стадия ферментации», используемая в настоящем документе, представляет собой стадию приготовления напитка (*например*, варки пива), предназначенную для ферментации доступных сахаров в спирт с помощью добавленных дрожжей. Используемый в настоящем документе термин «стадия ограниченной

ферментации» означает, что стадия ферментации отличается от стадии ферментации для производства алкогольного пива. Например, стадия ограниченной ферментации может быть сокращена по времени по сравнению со стадией ферментации при изготовлении алкогольного пива или может проводиться при очень низкой температуре (*например, холодная контактная ферментация*).

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности напитка, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (а) приготовление сусла, (б) добавление к суслу пролил-специфической эндопротеазы и инкубацию сусла, (с) кипячение сусла и (д) приготовление напитка из сусла, причем напиток готовят из сусла с использованием стадии ограниченной ферментации.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности напитка, как описано в настоящем документе, не включает стадию ферментации.

В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (а) приготовление сусла, (б) добавление к суслу пролил-специфической эндопротеазы и инкубацию сусла, (с) кипячение сусла и (д) приготовление напитка из сусла, причем напиток готовят из сусла в отсутствие стадии ферментации. В одном из вариантов осуществления способ предотвращения или уменьшения мутности в безалкогольном пиве, как описано в настоящем документе, включает следующие стадии: (а) приготовление сусла, (б) добавление в сусло пролил-специфической эндопротеазы и инкубацию сусла, с) кипячение сусла и (д) приготовление безалкогольного пива из сусла, причем безалкогольное пиво готовят из сусла в отсутствие стадии ферментации.

В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 1-240 минут при температуре от 50°C до 80°C.

В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 5-220 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 10-200 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 15-180 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 20-160 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 25-140 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 30-120 минут. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют в течение 5-220 минут.

В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют при температуре от 50°C до 85°C. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют при температуре от 55°C до 80°C. В одном из вариантов осуществления сусло инкубируют при температуре от 60°C

до 75°C. В настоящем документе охвачена любая указанная выше комбинация времени инкубации и температуры инкубации.

В одном из вариантов осуществления сусло кипятят в течение 45-120 минут при температуре от 95°C до 100°C.

В одном из вариантов осуществления пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 1-100 г/гл сусла. В одном из вариантов осуществления пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 2-90 г/гл сусла. В одном из вариантов осуществления пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 3-80 г/гл сусла. В одном из вариантов осуществления пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 4-70 г/гл сусла. В одном из вариантов осуществления пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 5-60 г/гл сусла.

Известны эндопротеазы, обладающие пролил-специфической активностью (ЕС.3.4.21.26). «Пролит-специфическая эндопротеаза» определяется как эндопротеаза, которая разрезает белки или пептиды вблизи или в местах, где белок или пептид содержит пролилный остаток в своей цепи. Предпочтительно пролил-специфическая эндопротеаза представляет собой эндопротеазу, которая разрезает белки или пептиды в местах, где белок или пептид содержит пролилный остаток. В способе в соответствии с изобретением предпочтительно используется пролил-специфическая эндопротеаза, которая разрезает пролилные остатки на их С-конце. В этом тексте термины «пролил-специфическая эндопротеаза», «пролин-специфическая эндопротеаза», «пролин-специфическая эндопептидаза» и «пептид, обладающий пролил-специфической активностью» или подобные выражения используются взаимозаменяемо.

Пролит-специфическая эндопротеаза, используемая в способах, описанных в настоящем документе, может быть использована в выделенной форме. Следует понимать, что пролил-специфическая эндопротеаза может быть смешана с носителями или разбавителями, которые не будут препятствовать предполагаемому назначению пролил-специфической эндопротеазы, и все еще будет считаться выделенной. Пролит-специфическая эндопротеаза также может находиться в более значительно очищенной форме, и в этом случае она, как правило, будет содержать полипептид в препарате, в котором более 70%, *например*, более 80%, 90%, 95%, 98% или 99% белков представляют собой пролил-специфическую эндопротеазу. Пролит-специфическая эндопротеаза может быть предоставлена в такой форме, которая находится вне ее естественного клеточного окружения. Таким образом, она может быть по существу выделенной или очищенной, как обсуждалось выше, или находиться в клетке, в которой она не встречается в природе,

например, в клетке другого вида грибов, животного, растения или бактерии. Предпочтительно в способах, описанных в настоящем документе, используют выделенную или очищенную пролил-специфическую эндопротеазу. Выделенная или очищенная пролил-специфическая эндопротеаза предпочтительно имеет по меньшей мере 5 единиц пролил-специфической эндопротеазной активности на грамм белкового материала. Пролит-специфические эндопротеазы широко встречаются у животных и растений, но их присутствие в микроорганизмах, по-видимому, ограничено. Пролит-специфическая эндопротеаза была идентифицирована у видов *Aspergillus*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Xanthomonas* и *Hacteroides*. Хотя пролит-специфические ферменты из большинства этих организмов являются активными при рН около 8, фермент *Aspergillus* является оптимально активным при рН около 5. Пролит-специфическая эндопротеаза может быть выделена из одного из вышеупомянутых видов микроорганизмов, особенно из вида *Aspergillus*. Предпочтительно пролит-специфическая эндопротеаза выделена из штамма *Aspergillus niger*. Более предпочтительно, пролит-специфическая эндопротеаза выделена из хозяина *Aspergillus niger*, сконструированного для сверхэкспрессии гена, кодирующего пролит-специфическую эндопротеазу, хотя другие хозяева, такие как *E. coli*, также являются подходящими хозяевами для экспрессии.

В одном из вариантов осуществления пролит-специфические эндопротеазы, которые можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, включают те, которые описаны в WO02/45524 (см. SEQ ID NO:2), WO02/46381 (см. SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5) и/или SEQ ID NO:7). Подходящая пролит-специфическая эндопротеаза, которую можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, включает Brewers Clarex® (DSM).

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### *Применение пролит-специфической эндопротеазы во время инкубации сусла*

Сусло 12°Plato получали путем добавления порошка солодового экстракта Spraymalt (Amber 18EBC, Muntons) в водопроводную воду. Это сусло впоследствии инкубировали после добавления 5 г/гЛ, 10 г/гЛ и 50 г/гЛ пролит-специфической эндопротеазы в течение 30 минут, 60 минут или 120 минут при 60°C, 70°C или 75°C.

Использовали коммерческий образец пролит-специфической эндопротеазы из *A. niger*, названной Brewers Clarex®. Активность пролин-специфической эндопротеазы измеряли на синтетическом пептиде Z-Gly-Pro-pNA при 37°C в цитратно-динатрий-фосфатном буфере с рН 4,6. Продукты реакции контролировали спектрофотометрически при 405 нм. Одна единица (1 PPU) определяется как количество фермента, которое

высвобождает 1 мкмоль р-нитроанилида в минуту при заданных условиях испытания.

После инкубаций сусла его кипятили в течение 30 минут в присутствии хмеля (гранулы хмеля Hallertau, Brewferm), внесенного в количестве 1 г/л, и отделение осадка выполняли с помощью бумажного фильтра.

Ферментации прокипяченного сусла начинали путем добавления 2,5 г/л предварительно распустившихся дрожжей (Saflager S-23, Fermentis) в объеме 100 мл при 12°C и проводили в течение 4 дней.

Для сравнения использовали то же самое сусло 12°Plato без инкубации сусла и с добавлением пролил-специфической эндопротеазы в количестве 1 г/гл во время ферментации. Более конкретно, сусло 12°Plato, приготовленное из порошка Spraymalt (Amber 18EBC, Muntons), кипятили непосредственно в присутствии 1 г/л хмеля с последующим отделением горячего осадка на бумажном фильтре. Ферментацию прокипяченного сусла начинали путем добавления 2,5 г/л предварительно распустившихся дрожжей (Saflager S-23, Fermentis) и пролил-специфической эндопротеазы в количестве 1 г/гл в объеме 100 мл при 12°C, и проводили в течение 4 дней.

Эффективность ферментации контролировали путем наблюдения за образованием ферментационного газа. Образование ферментационного газа контролировали с помощью системы беспроводного контроля процесса газообразования ANKOM RF Gas Production System (Ankom Technology), которая регистрировала измерения суммарного давления с течением времени.

После ферментации проводили холодный отдых в течение одного дня при 0°C. Затем ферментационный бульон центрифугировали в течение 10 минут при относительной центробежной силе 14000 г и температуре 20°C для разделения твердой и жидкой фаз. Супернатант анализировали на присутствие белков, активных в отношении формирования мутности, посредством титрования дубильной кислотой (HSP10).

Активные в отношении формирования мутности белки измеряли с помощью таннометра с использованием инструкции по эксплуатации от фирмы Pfeuffer для этого способа. В образцы добавляли дубильную кислоту и мутность, измеренную при 20°C под углом рассеяния 90 градусов, выражали в единицах EBC и регистрировали при добавлении 2,5, 5 и 10 мг/л дубильной кислоты.

Результаты представлены в таблице 1. Они показывают, что количество активных в отношении формирования мутности белков является более низким в случае применения пролил-специфической эндопротеазы во время инкубации сусла перед кипячением сусла по сравнению с применением пролил-специфической эндопротеазы во время ферментации.

## **Пример 2**

### *Применение пролил-специфической эндопротеазы во время инкубации сусла*

Сусло 12°Plato получали путем добавления порошка Spraymalt (Amber 18EBC, Muntons) в водопроводную воду. Это сусло впоследствии инкубировали после добавления 5 г/гл, 10 г/гл, 25 г/гл и 50 г/гл пролил-специфической эндопротеазы в течение 30 минут, 60 минут, 90 минут или 120 минут при 60°C или 70°C.

Использовали коммерческий образец пролил-специфической эндопротеазы из *A. niger*, Brewers Clarex® (5 PPU/г продукта), как описано в примере 1.

После инкубации сусла его кипятили в течение 30 минут в присутствии хмеля (гранулы хмеля Hallertau, Brewferm), внесенного в количестве 1 г/л, и проводили отделение осадка с помощью бумажного фильтра.

Ферментацию прокипяченного сусла начинали путем добавления 2,5 г/л предварительно распустившихся дрожжей (Saflager S-23, Fermentis) в объеме 100 мл при 12°C, и проводили в течение 4 дней.

Для целей сравнения использовали то же самое сусло 12°Plato без инкубации сусла и с добавлением пролил-специфической эндопротеазы в количестве 2 г/гл во время ферментации. Более конкретно, сусло 12°Plato, приготовленное из порошка Spraymalt (Amber 18EBC, Muntons), кипятили непосредственно в присутствии 1 г/л хмеля с последующим отделением горячего осадка на бумажном фильтре. Ферментацию прокипяченного сусла начинали путем добавления 2,5 г/л предварительно распустившихся дрожжей (Saflager S-23, Fermentis) и пролил-специфической эндопротеазы в количестве 2 г/гл в объеме 100 мл при 12°C, и проводили в течение 4 дней.

За ходом ферментации следили путем наблюдения за образованием ферментационного газа, как описано в примере 1.

После ферментации проводили холодный отдых в течение одного дня при 0°C. Затем ферментационный бульон центрифугировали в течение 10 минут при относительной центробежной силе 14000 г и температуре 20°C для разделения твердой и жидкой фаз. Супернатант анализировали на присутствие белков, активных в отношении формирования мутности, посредством титрования дубильной кислотой (HSP10), как описано в примере 1.

Результаты представлены в таблице 2. Они показывают, что количество активных в отношении формирования мутности белков является более низким в случае применения пролил-специфической эндопротеазы во время инкубации сусла перед кипячением сусла по сравнению с применением пролил-специфической эндопротеазы во время ферментации.

Таблица 1: Содержание активного в отношении формирования мутности белка в супернатантах, образовавшихся в результате ферментации сусла, где сусло инкубировали в различных условиях (в условиях различной дозировки пролил-специфической эндопротеазы, времени и температуры) по сравнению с контролем, где пролил-специфическую эндопротеазу добавляли во время ферментации

Образец	Применение пролил-специфической эндопротеазы	Дозировка фермента (в г/гл)	Температура (в °С)	Время инкубации (в минутах)	HSP10 (ЕВС)
1	Ферментация	1	12	5760	3,59
2	Инкубация сусла	5	60	120	3,50
3	Инкубация сусла	10	70	30	3,43
4	Инкубация сусла	50	75	30	3,19
5	Инкубация сусла	50	75	60	3,40

Таблица 2: Содержание активного в отношении формирования мутности белка в супернатантах, образовавшихся в результате ферментации сусла, где сусло инкубировали в различных условиях (в условиях различной дозировки пролил-специфической эндопротеазы, времени и температуры) по сравнению с контролем, где пролил-специфическую эндопротеазу добавляли по время ферментации

Образец	Применение пролил-специфической эндопротеазы	Дозировка фермента (в г/гл)	Температура (в °С)	Время инкубации (в минутах)	HSP10 (ЕВС)
1	Ферментация	2	12	5760	3,19
2	Инкубация сусла	10	60	120	3,16
3	Инкубация сусла	10	70	60	3,11
4	Инкубация сусла	10	70	90	3,06
5	Инкубация сусла	25	60	120	3,16
6	Инкубация сусла	25	60	30	2,88
7	Инкубация сусла	25	70	30	2,54
8	Инкубация сусла	25	70	60	2,51
9	Инкубация сусла	25	70	90	2,47
10	Инкубация сусла	50	70	30	2,13
11	Инкубация сусла	50	70	60	2,46
12	Инкубация сусла	50	70	90	2,34

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, включающий следующие стадии:

- a) приготовление сусла,
- b) добавление пролил-специфической эндопротеазы в сусло и инкубацию сусла,
- c) кипячение сусла, и
- d) приготовление напитка из сусла; где напиток представляет собой безалкогольное пиво, содержащее менее чем 0,5% алкоголя по объему, или пиво с низким содержанием алкоголя, имеющее содержание алкоголя от 0,5% до 1,2% алкоголя по объему.

2. Способ по п. 1, в котором пролил-специфическую эндопротеазу добавляют в количестве 1-100 г/гл сусла.

3. Способ по любому из п.1 или п.2, в котором сусло инкубируют в течение 1-240 минут при температуре от 50°C до 85°C.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором сусло кипятят в течение 45-120 минут при температуре от 95°C до 100°C.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где способ не включает стадию ферментации.

6. Способ по любому из пп. 1-4, где способ включает стадию ограниченной ферментации.

7. Способ по п. 6, в котором стадия ограниченной ферментации предусматривает сокращенное время по сравнению со стадией ферментации для изготовления алкогольного пива или может проводиться при очень низкой температуре.

8. Способ предотвращения или уменьшения мутности в напитке, включающий следующие стадии:

- a) обеспечение солодового экстракта,
- b) растворение солодового экстракта с получением сусла,
- c) добавление пролил-специфической эндопротеазы в сусло,
- d) инкубацию сусла,
- e) кипячение сусла, и
- f) приготовление напитка из сусла.