



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109161450 A

(43)申请公布日 2019.01.08

(21)申请号 201810153802.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.03.07

C12C 12/00(2006.01)

(30)优先权数据

C12C 12/04(2006.01)

13158261.1 2013.03.07 EP

C12R 1/84(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480012824.9 2014.03.07

(83)生物保藏信息

NMI V06/022711 2006.08.24

NMI V06/022712 2006.08.24

(71)申请人 科.汉森有限公司

地址 丹麦霍尔斯霍姆

(72)发明人 S·萨伦 J·H·斯维格斯

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

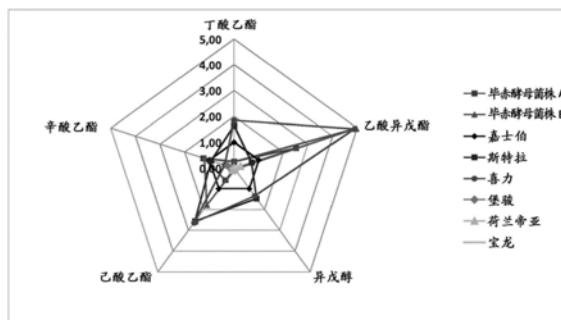
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株的低酒精或无酒精啤酒的生产

(57)摘要

已出乎意料地发现可以使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株生产一种低酒精或无酒精饮料,其与至少4%(体积比)酒精的啤酒有非常接近的风味分布。特别的,克鲁维毕赤酵母的酵母菌株仅利用麦芽汁中的葡萄糖,并具有将这种底物转化为高浓度的特定风味化合物的能力,而后者通常是由用于酿造啤酒的酵母属酵母菌株产生的。以这种方式,依据麦芽汁中的葡萄糖水平,可以使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株生产低酒精或无酒精饮料。克鲁维毕赤酵母在麦芽汁发酵中所产生的主要风味化合物是乙酸异戊酯、异戊醇、丁酸乙酯、己酸乙酯和辛酸乙酯。



1. 一种低酒精啤酒或无酒精啤酒,所述低酒精啤酒或无酒精啤酒的酒精含量不超过1.2%体积比并且乙酸异戊酯含量为至少0.5ppm(mg/L),所述低酒精啤酒或无酒精啤酒包含克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)作为酵母菌株的唯一物种。

2. 根据权利要求1的低酒精啤酒或无酒精啤酒,其中所述克鲁维毕赤酵母菌株选自自由以下组成的组:2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院、邮编1142以保藏号V06/022711保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541-65号的国家计量研究院、邮编:3205的克鲁维毕赤酵母PK-KR1(JT1.28或菌株A)菌株,以及2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院、邮编1142以保藏号V06/022712保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541-65号的国家计量研究院、邮编3205的克鲁维毕赤酵母PK-KR2(JT3.71)。

3. 根据权利要求1或2的加过酒花的低酒精啤酒或无酒精啤酒。

4. 根据权利要求3的加过酒花的低酒精啤酒或无酒精啤酒,其中所述酒花是阿坦姆、亚麻黄、阿波罗、布拉沃、卡利普索、卡斯卡特、世纪、车兰、奇努克、西楚、克雷斯特、哥伦布、考梅脱、水晶、埃尔多拉多、伊瑞卡、格林纳、冰川、格林伯格、地平线、自由、千禧、胡德山、瑞尼尔山、摩西、新港、努格特、芭乐西、圣胡安、桑特姆、萨塔斯、西姆科、索尼特金牌、斯特林、萨米特、超级格林纳、蒂利卡姆、战斧、阿尔萨、先锋、勇士、威廉麦特、宙斯、上将、金酿、布拉姆灵杂交、比伦、挑战者、第一金、富格尔斯、格尔丁斯、海来尔德、诺恩道、北酿、菲尼克斯、朝圣者、派洛特、先驱、普罗格拉斯、塔吉特、惠特布雷德公司的金牌品种(WGV)、哈拉道、赫斯布鲁克、萨兹、泰特纳、司派尔特、埃拉、法国福柯-考尔、佳乐喜、绿色子弹、哈拉道香型、寇哈图、莫图依卡、尼尔森索文、太平洋美玉、太平洋翡翠、帕西菲卡、林伍德之荣、拉库、里瓦卡、南十字星、斯蒂克布莱克、夏季、超级阿尔法、超级荣耀、托帕石、瓦依提、哈拉道海格力斯、哈拉道马格努门、哈拉道陶瑞斯、马格努门、默克、欧宝、佩勒、萨菲尔、精选、祖母绿、传统、波恩、君嘉、卢柏林、玛连卡、普莱米特、斯拉德克、斯狄赛尔斯伯特、斯蒂莱恩阿特拉斯、斯蒂莱恩奥罗拉、斯蒂莱恩波贝克、斯蒂莱恩赛里亚、斯蒂莱恩戈尔丁斯、西比拉、勃垦地拖拉非或空知王牌。

5. 至少一种克鲁维毕赤酵母菌株在不存在酵母属(*Saccharomyces*)和酒香酵母属(*Brettanomyces*)的酵母菌株的情况下用于制备低酒精啤酒或无酒精啤酒的用途,所述低酒精啤酒或无酒精啤酒的酒精含量不超过1.2%体积比并且乙酸异戊酯含量为至少0.5ppm(mg/L)。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述至少一种克鲁维毕赤酵母菌株选自自由以下组成的组:2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院、邮编1142以保藏号V06/022711保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541-65号的国家计量研究院、邮编:3205的克鲁维毕赤酵母PK-KR1(JT1.28或菌株A)菌株,以及2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院、邮编1142以保藏号V06/022712保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541-65号的国家计量研究院、邮编3205的克鲁维毕赤酵母PK-KR2(JT3.71)。

7. 根据权利要求5或6的用途,其中加入了酒花。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述酒花是阿坦姆、亚麻黄、阿波罗、布拉沃、卡利普索、卡斯卡特、世纪、车兰、奇努克、西楚、克雷斯特、哥伦布、考梅脱、水晶、埃尔多拉多、伊瑞卡、

格林纳、冰川、格林伯格、地平线、自由、千禧、胡德山、瑞尼尔山、摩西、新港、努格特、芭乐西、圣胡安、桑特姆、萨塔斯、西姆科、索尼特金牌、斯特林、萨米特、超级格林纳、蒂利卡姆、战斧、阿尔萨、先锋、勇士、威廉麦特、宙斯、上将、金酿、布拉姆灵杂交、比伦、挑战者、第一金、富格尔斯、格尔丁斯、海来尔德、诺恩道、北酿、菲尼克斯、朝圣者、派洛特、先驱、普罗格拉斯、塔吉特、惠特布雷德公司的金牌品种(WGV)、哈拉道、赫斯布鲁克、萨兹、泰特纳、司派尔特、埃拉、法国福柯-考尔、佳乐喜、绿色子弹、哈拉道香型、寇哈图、莫图依卡、尼尔森索文、太平洋美玉、太平洋翡翠、帕西菲卡、林伍德之荣、拉库、里瓦卡、南十字星、斯蒂克布莱克、夏季、超级阿尔法、超级荣耀、托帕石、瓦依提、哈拉道海格力斯、哈拉道马格努门、哈拉道陶瑞斯、马格努门、默克、欧宝、佩勒、萨菲尔、精选、祖母绿、传统、波恩、君嘉、卢柏林、玛连卡、普莱米特、斯拉德克、斯狄赛尔斯伯特、斯蒂莱恩阿特拉斯、斯蒂莱恩奥罗拉、斯蒂莱恩波贝克、斯蒂莱恩赛里亚、斯蒂莱恩戈尔丁斯、西比拉、勃垦地拖拉非或空知王牌。

使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株的低酒精或无酒精啤酒的生产

[0001] 本申请是申请日为2014年3月7日、申请人为科.汉森有限公司、发明名称为“使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株的低酒精或无酒精啤酒的生产”的中国专利申请201480012824.9的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及通过发酵制备低酒精或无酒精饮料的领域。特别地,本发明涉及一种制备具有提高水平的所期望的源于发酵的风味化合物的低酒精或无酒精饮料的方法,所述方法包括使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株发酵麦芽汁以获得低酒精或无酒精饮料的步骤,涉及一种通过该方法可获得的低酒精或无酒精饮料,以及一种包含高浓度的特定风味化合物,比如乙酸异戊酯和辛酸乙酯的低酒精或无酒精饮料。

背景技术

[0003] 由于对更健康食物和饮料需求的不断增加,减少酒精饮料,特别是啤酒和葡萄酒中的乙醇具有相当大的商业利益。

[0004] 低酒精啤酒,无酒精啤酒或酒精减少型啤酒(也被称为轻啤酒,无醇啤酒,非酒精啤酒,淡啤酒,低度麦芽啤酒,薄啤酒)都是不含酒精或者低酒精含量的啤酒,其目的是再现通常含超过4%(体积比)酒精的标准啤酒的全部风味。在大多数欧盟国家中将低酒精含量的啤酒分为含有不超过0.5%(体积比)酒精的无酒精啤酒,以及不超过1.2%(体积比)酒精的低酒精啤酒。在美国,无酒精啤酒意味其中不存在酒精,而上限为0.5%(体积比)酒精的啤酒对应的是所谓的非酒精啤酒或薄啤酒(Montanari et al.2009)。

[0005] 麦芽汁转化成含酒精的啤酒是酵母菌属(*Saccharomyces* ssp.)酵母发酵过程的结果,导致酒精和源于发酵的风味化合物的产生,所述风味化合物例如酯类(如,乙酸异戊酯)和高级醇。乙酸异戊酯是啤酒中关键的风味化合物(Saerens et al.2010)。原料(主要为麦芽和酒花)的风味与发酵过程组合在一起,导致了啤酒独特的风味和口感(Swiegers et al.2007,Saerens et al.2010)。

[0006] 目前低酒精含量的啤酒一般是通过生产高浓度(full-strength)的啤酒(酒精浓度高于4%(体积比)),然后经物理过程除去酒精(煮沸除酒精/蒸馏或反渗透)制成的。就一些非酒精(non-alcoholic)或无酒精(alcohol-free)的啤酒而言,并没有经过发酵,且在某些情况下简单地以水稀释高浓度的啤酒来生产。

[0007] 因为物理过程导致发酵产生的风味化合物蒸发,损失或稀释(或如未经发酵的非酒精或无酒精啤酒的情况,完全缺乏发酵产生的风味化合物),这些类型的啤酒通常的特征是不如高浓度的啤酒有风味或可能具有不期望的麦芽汁样的口感(Zufall and Wackerbauer.2000)。

[0008] 德国专利DD288619A5描述了使用粉状毕赤酵母(*Pichia farinosa*)酵母菌株发酵未加酒花的啤酒麦芽汁以获得一种具有水果香味的无酒精饮料。

[0009] 无论如何,存在对制备低酒精或无酒精的发酵饮料的改进方法的需求,其中所希望的风味化合物,例如酯和高级醇的存在增加。

发明内容

[0010] 本发明是基于发明人出乎意料地发现只能发酵啤酒麦芽汁中的葡萄糖的克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri* yeast strains)的酵母菌株,能产生高浓度的期望的风味化合物,而只有少量乙醇产生。

[0011] 巴斯德酵母(*Saccharomyces pastorianus*),卡尔斯伯酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的酿造酵母利用麦芽汁中的主要糖——葡萄糖和麦芽糖(Boulton and Quain.2010),并导致在发酵过程中形成酒精和风味化合物。麦芽汁中糖浓度越高,产生的酒精和风味化合物就越多。为产生更少的酒精,一种解决方法是使用只发酵葡萄糖而不发酵麦芽糖的酵母,从而仅由葡萄糖产生酒精。麦芽汁中存在的葡萄糖浓度比麦芽糖低很多(表1),因此相比于使用常规的发酵酵母如巴斯德酵母或卡尔斯伯酵母时,相同量的麦芽汁将产生更少的酒精。存在这些类型的酵母,实例包括某些酵母属(*Saccharomyces*)和非酵母属(non-*Saccharomyces*)的酵母菌株,例如类酵母属(*Saccharomycodes* spp) (Liu et al.2011)。

[0012] 然而,这些酵母菌株从有限量的葡萄糖产生仅相对少量的风味,导致啤酒中关键的风味化合物浓度低于酒精超过4%(体积比)的啤酒。

[0013] 表1麦芽汁的典型糖谱(Stewart.2010)

[0014]	百分比组成	
	葡萄糖	10 - 15
	果糖	1 - 2
	蔗糖	1 - 2
	麦芽糖	50 - 60
	麦芽三糖	15 - 20
	糊精	20 - 30

[0015] 解决这个问题的一個方法是要鉴别不能利用麦芽糖的高度芳香的酵母,以从有限量的葡萄糖产生高浓度的相关的源于发酵的风味化合物,获得与进行全发酵时类似浓度或更高浓度的关键风味化合物。

[0016] 本发明的发明人已经发现,通过采用这种方法和克鲁维毕赤酵母的酵母菌株,生产与标准的高浓度啤酒风味相同的无酒精啤酒和低酒精啤酒(根据EU法规)是可能的。而使用常规的酿造酵母如酿酒酵母、巴斯德酵母或卡尔斯伯酵母、稀释、物理去除酒精工艺或从非发酵底物产生的啤酒,这是不可能的。

[0017] 因此,本发明的第一个方面涉及一种制备低酒精饮料或无酒精饮料的方法,包括步骤:

[0018] a) 提供麦芽汁;和

[0019] b) 使用至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株发酵所述麦芽汁以获得低酒精饮料或者无酒精饮料。

[0020] 本发明的另一方面涉及一种通过根据本发明第一方面的方法可获得的低酒精饮

料或无酒精饮料。

[0021] 本发明进一步的方面涉及一种低酒精饮料或无酒精饮料,其中所述低酒精饮料或无酒精饮料的乙酸异戊酯含量为至少0.5ppm(mg/L)。

[0022] 本发明再进一步的方面涉及使用一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株用于制备低酒精饮料或无酒精饮料的用途。

附图说明

[0023] 图1说明了一种克鲁维毕赤酵母啤酒的优化的啤酒酿造工艺。比较了标准的(左)和克鲁维毕赤酵母(右)的酿造过程。将不同于标准酿造工艺的步骤强调显示。

[0024] 图2说明了对5种不同的无酒精啤酒的风味分布比较:堡骏,荷兰帝亚,宝龙(都是0%酒精的),克鲁维毕赤酵母菌株A生产的啤酒(0.1%(体积比)酒精)和克鲁维毕赤酵母菌株B生产的啤酒(0.2%(体积比)酒精)。含4.6%(体积比)酒精的嘉士伯皮尔森啤酒作为参考皮尔森啤酒,也显示了其他两种皮尔森啤酒:斯特拉(5.2%(体积比)酒精)和喜力(5.0%(体积比)酒精)。使用顶空-GC-FID测量5种不同的风味化合物:乙酸异戊酯,异戊醇,丁酸乙酯,己酸乙酯和辛酸乙酯。嘉士伯皮尔森啤酒中的风味化合物浓度作为参考并按比例换算为1。所有啤酒中的风味浓度进行相同比例的换算以能比较数值。

[0025] 图3显示了4种不同啤酒的风味分布比较:采用克鲁维毕赤酵母菌株A的无酒精啤酒(0.1%(体积比)酒精),采用克鲁维毕赤酵母菌株A的低酒精啤酒(0.7%(体积比)酒精),作为参考皮尔森啤酒(对照)的嘉士伯皮尔森啤酒(4.6%(体积比)酒精)和麦芽啤酒(1.8%(体积比)酒精)。使用顶空-GC-FID测定5种不同的风味化合物:乙酸异戊酯,异戊醇,丁酸乙酯,己酸乙酯和辛酸乙酯。嘉士伯皮尔森啤酒中的风味化合物浓度作为参考并按比例换算为1。3种啤酒中的风味浓度进行相同比例的换算以能比较数值。

[0026] 图4说明了采用克鲁维毕赤酵母菌株A和酿酒酵母啤酒酵母的啤酒试验中的丁二酮浓度。

[0027] 图5描绘了在发酵过程中的酵母细胞生长。

[0028] 图6显示了在采用路德类酵母(*Saccharomyces ludwigii*)和克鲁维毕赤酵母的所有发酵产物中以及在基础麦芽汁中(有或无酒花)的乙酸异戊酯、癸酸乙酯和乙酸苯乙酯的浓度。w/o=没有。

[0029] 图7说明了在采用路德类酵母和克鲁维毕赤酵母的所有发酵产物中以及在基础麦芽汁中(有或无酒花)的乙酸异丁酯和乙酸丁酯的浓度。w/o=没有。

[0030] 图8显示了在采用路德类酵母和克鲁维毕赤酵母的所有发酵产物中以及在基础麦芽汁中(有或无酒花)的异丁醇、1-丁醇和异戊醇的浓度。w/o=没有。

[0031] 图9描绘了在采用路德类酵母和克鲁维毕赤酵母的所有发酵产物中以及在基础麦芽汁中(有或无啤酒花)的己酸、辛酸和癸酸的浓度。w/o=没有。

具体实施方式

[0032] 本申请的发明人已出乎意料地发现,克鲁维毕赤酵母的酵母菌株能够提高以克鲁维毕赤酵母的酵母菌株发酵麦芽汁制备的饮料中所希望的风味化合物。特别是,发现啤酒所希望的风味化合物的浓度得到提高,所述风味化合物例如乙酸异戊酯,异戊醇和辛酸乙

酯。

[0033] 令人惊奇的是,在不存在常规的酿造酵母菌株例如酵母属和酒香酵母属(*Brettanomyces*)的酵母菌株的情况下使用克鲁维毕赤酵母种的酵母菌株时,存在啤酒风味化合物的提高。

[0034] 酿造啤酒的工艺是本领域技术人员熟知的并可以被概述成如下方式(参见图1):由干燥的、已发芽的谷粒(主要是大麦或小麦)制备麦芽,将麦芽磨成可包含未发芽的辅料的碎麦芽。将碎麦芽糖化(与水混合并浸泡)以允许麦芽中的酶将淀粉转化为糖。在被称为过滤的过程中谷粒颗粒和辅料被从液体麦芽汁中分离。通过将水添加到麦芽提取物中可省略麦芽制备和糖化步骤。加入酒花和/或例如香草和糖的其他成分后,将麦芽汁煮沸(也可以在煮沸之后添加酒花),冷却并且通气。然后将麦芽汁转移到发酵罐中并加入啤酒酵母发酵。初期发酵通常持续5至10天,随后可使用啤酒酵母进入二次发酵步骤。发酵后,对新鲜的啤酒或“生”啤酒进行调节,可选地进行过滤和加入二氧化碳。将啤酒装瓶以及可选地巴氏杀菌。

[0035] 可以添加酒花到麦芽汁中以用苦味平衡麦芽的甜味并给予啤酒所希望的风味和香气。存在一些品种,包括但不限于阿坦姆、亚麻黄、阿波罗、布拉沃、卡利普索、卡斯卡特、世纪、车兰、奇努克、西楚、克雷斯特、哥伦布、考梅脱、水晶、埃尔多拉多、伊瑞卡、格林纳、冰川、格林伯格、地平线、自由、千禧、胡德山、瑞尼尔山、摩西、新港、努格特、芭乐西、圣胡安、桑特姆、萨塔斯、西姆科、索尼特金牌、斯特林、萨米特、超级格林纳、蒂利卡姆、战斧、阿尔萨、先锋、勇士、威廉麦特、宙斯、上将、金酿、布拉姆灵杂交、比伦、挑战者、第一金、富格尔斯、格尔丁斯、海来尔德、诺恩道、北酿、菲尼克斯、朝圣者、派洛特、先驱、普罗格拉斯、塔吉特、惠特布雷德公司的金牌品种(WGV)、哈拉道、赫斯布鲁克、萨兹、泰特纳、司派尔特、埃拉、法国福柯-考尔、佳乐喜、绿色子弹、哈拉道香型、寇哈图、莫图依卡、尼尔森索文、太平洋美玉、太平洋翡翠、帕西菲卡、林伍德之荣、拉库、里瓦卡、南十字星、斯蒂克布莱克、夏季、超级阿尔法、超级荣耀、托帕石、瓦依提、哈拉道海格力斯、哈拉道马格努门、哈拉道陶瑞斯、马格努门、默克、欧宝、佩勒、萨菲尔、精选、祖母绿、传统、波恩、君嘉、卢柏林、玛连卡、普莱米特、斯拉德克、斯狄赛尔斯伯特、斯蒂莱恩阿特拉斯、斯蒂莱恩奥罗拉、斯蒂莱恩波贝克、斯蒂莱恩赛里亚、斯蒂莱恩戈尔丁斯、西比拉、勃垦地拖拉非和空知王牌。

[0036] 本发明用于制备低酒精饮料或无酒精饮料的方法,包括步骤:

[0037] a) 提供麦芽汁;和

[0038] b) 以至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株发酵麦芽汁,以获得低酒精饮料或无酒精饮料。

[0039] 本文的术语“低酒精饮料”定义为酒精含量超过0.5%(体积比)酒精且不超过1.2%(体积比)酒精的用于饮用的液体。

[0040] 本文的术语“无酒精饮料”定义为酒精含量不超过0.5%(体积比)酒精的用于饮用的液体。

[0041] 本文的术语“麦芽汁”具有本领域中常规的含义并且指从啤酒酿造的糖化过程中提取的含糖液体。

[0042] 麦芽汁中的葡萄糖浓度对于饮料中所产生的酒精百分比是关键,且可通过改变糖化工艺、加入酶或其他本领域技术人员已知的方法进行调节。

[0043] 在一个优选的实施方案中,麦芽汁中的葡萄糖浓度在0.01%–3% (w/vol)、例如0.5%–1.0% (w/vol)的范围。

[0044] 优选的,步骤b)的发酵是在无菌条件下进行(受控的发酵),并以克鲁维毕赤酵母作为所添加的酵母菌株的唯一物种。

[0045] 本领域技术人员将能够容易地确定适于根据本发明方法制备低酒精饮料或无酒精饮料的克鲁维毕赤酵母的酵母菌株合适的接种浓度。

[0046] 在一个优选的实施方案中,克鲁维毕赤酵母的酵母菌株接种的浓度为至少 1×10^4 CFU/ml(克隆形成单位/ml),例如至少 5×10^4 CFU/ml,例如至少 1×10^5 CFU/ml,例如至少 5×10^5 CFU/ml,例如至少 1×10^6 CFU/ml,例如至少 5×10^6 CFU/ml。

[0047] 在另一个优选的实施方案中,所述方法进一步包括步骤a1)在使用至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株发酵麦芽汁之前,添加至少一种酒花品种到麦芽汁中。

[0048] 在另一个优选的实施方案中,使用至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株对麦芽汁的发酵进行至少7天,例如至少14天,例如至少21天,例如至少28天。

[0049] 在另一个优选的实施方案中,使用至少一个克鲁维毕赤酵母的酵母菌株对麦芽汁的发酵在18°C至22°C范围的温度进行。

[0050] 在另一个优选的实施方案中,所述方法进一步包括步骤c)将低酒精饮料和无酒精饮料装瓶和瓶内巴氏杀菌。

[0051] 优选的,所述至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株能够发酵葡萄糖但是不能发酵麦芽糖或麦芽三糖。这可以通过使酵母菌株在只有麦芽糖或麦芽三糖的培养基上生长来进行检测。

[0052] 在一个优选的实施方案中,所述至少一种克鲁维毕赤酵母的酵母菌株选自由以下组成的组:2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院(邮编:1142)以保藏号V06/022711保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541–65号的国家计量研究院(邮编:3205)的克鲁维毕赤酵母PK-KR1(JT1.28;菌株A),以及2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院(邮编:1142)以保藏号V06/022712保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街541–65号的国家计量研究院(邮编:3205)的克鲁维毕赤酵母PK-KR2(JT3.71)。

[0053] 优选的,低酒精饮料或无酒精饮料是低酒精啤酒或无酒精啤酒。

[0054] 本文所用的术语“啤酒”至少指的是由制备于发芽谷物的糖化醪和制备于未发芽谷物的糖化醪以及制备于发芽谷物和未发芽谷物的混合物的糖化醪制备的啤酒。术语“啤酒”还指使用辅料制备的啤酒和具有所有可能的酒精含量的啤酒。

[0055] 本文的术语“低酒精啤酒”指酒精含量超过0.5%(体积比)并且不超过1.2%(体积比)酒精的啤酒。

[0056] 本文的术语“非酒精啤酒”指酒精含量不超过0.5%ABV的啤酒。

[0057] 本发明的另一个方面涉及通过本文所述方法可获得的低酒精饮料或无酒精饮料。

[0058] 在一个优选的实施方案中,所述低酒精饮料或无酒精饮料是低酒精啤酒或无酒精啤酒。

[0059] 本发明的进一步方面涉及低酒精或无酒精的饮料,其中所述饮料中的乙酸异戊酯的浓度为至少为0.5ppm(百万分率;mg/L),例如至少0.6ppm,例如至少0.7ppm,例如至少

0.8ppm,例如至少0.9ppm,例如至少1.0ppm,例如至少1.2ppm,例如至少1.4ppm,例如至少1.6ppm,例如至少1.8ppm,例如至少2.0ppm,例如至少2.5ppm,例如至少3.0ppm,例如至少3.5ppm,例如至少4.0ppm,例如至少4.5ppm,例如至少5.0ppm。

[0060] 优选的,低酒精饮料或无酒精饮料中的辛酸乙酯的浓度为至少10ppb(十亿分率; $\mu\text{g/L}$),例如至少11ppb,例如至少12ppb,例如至少13ppb,例如至少14ppb,例如至少15ppb,例如至少20ppb,例如至少25ppb,例如至少30ppb,例如至少40ppb,例如至少50ppb,例如至少60ppb,例如至少70ppb,例如至少80ppb,例如至少90ppb,例如至少100ppb。

[0061] 在一个优选的实施方案中,所述饮料中的酒精浓度超过0.5%(体积比)酒精且不超过1.2%(体积比)酒精。

[0062] 在另一个优选的实施方案中,所述饮料中的酒精浓度不超过0.5%(体积比)酒精。

[0063] 优选的,所述低酒精饮料或无酒精饮料是低酒精啤酒或无酒精啤酒。

[0064] 本发明在进一步的方面涉及克鲁维毕赤酵母的酵母菌株用于制备低酒精饮料或无酒精饮料的用途。

[0065] 在一个优选的实施方案中,所述低酒精饮料或无酒精饮料是低酒精啤酒或无酒精啤酒。

[0066] 实施例

[0067] 实施例1

[0068] 材料和方法

[0069] 发酵设置

[0070] 以2种不同的克鲁维毕赤酵母菌株(菌株A和菌株B)生产低酒精啤酒和无酒精啤酒。总共进行2个试验:

[0071] 1) 采用克鲁维毕赤酵母菌株A和菌株B的无酒精啤酒相互比较。

[0072] 2) 采用克鲁维毕赤酵母菌株A的低酒精啤酒。

[0073] 除了添加酒花,两个试验的酿造配方最初是相同的。无酒精啤酒以1500升规模生产。采用克鲁维毕赤酵母菌株A和菌株B的低酒精啤酒以1000升规模进行。所有的啤酒都是以4种不同麦芽的混合物为基础的:皮尔森麦芽20%、小麦芽38%、慕尼黑麦芽38%及Cara(焦香)50麦芽4%。以安东帕啤酒分析仪(Anton Paar Beer Alcolyzer)测定最初的糖浓度为8.3°Plato(柏拉图)。

[0074] 所有的酵母菌株都以 $5 \times 10^6 \text{CFU/ml}$ 接种。

[0075] 对于无酒精啤酒,在克鲁维毕赤酵母菌株A和菌株B之间进行比较,仅使用酒花提取物用于苦味。在20℃下进行发酵约3周。

[0076] 对于低酒精啤酒,采用酒花提取物用于苦味并在麦芽汁加热结束时,采用泰特纳和亚麻黄酒花作为香型酒花。在21℃下进行发酵。发酵进行3周,并在发酵中期以酒花钟(hop bells)方式加入泰特纳和亚麻黄酒花用于干加酒花。在干加酒花过程中将发酵温度降低至4℃。

[0077] 发酵后,所有啤酒都冷却至4℃几天,过滤以及巴氏杀菌。然后将啤酒灌装入瓶。

[0078] 在第一次试验时初始葡萄糖浓度为>1%,但在最后2次试验时为约0.5%,并且在发酵过程中葡萄糖浓度非常缓慢地降低。在发酵终止时,几乎所有的葡萄糖都被酵母消耗并转化为酒精。

[0079] 图1给出了酿造工艺的概览,其中其与常规酿造工艺进行了比较。在“新”酿造工艺中的重要步骤为:

[0080] 1) 调节糖化条件以优化麦芽汁中的葡萄糖浓度

[0081] 2) 确保加入的酒花是无菌的,因此使用酒花颗粒或酒花提取物,而非干加酒花,因为这可能导致最终啤酒的污染

[0082] 3) 更长的发酵时间以优化啤酒的风味分布

[0083] 4) 瓶内巴氏杀菌以避免由于最终啤酒中高麦芽糖水平而引起污染风险。

[0084] 因为克鲁维毕赤酵母菌株是非常慢发酵的菌株,所以保持麦芽汁和啤酒无菌很重要。酒花的任何添加都需要以无菌方式进行,这意味着在麦芽汁煮沸结束前至少30分钟添加。干加酒花(在煮沸后添加)不应被用于生产低酒精啤酒或无酒精啤酒,因为存在污染啤酒的风险。由于最终啤酒中留有大量的糖,故需额外谨慎以避免腐败。

[0085] 实验室酿造试验

[0086] 以500ml麦芽汁进行了实验室规模的发酵试验。以小麦麦芽提取物(Brewferm)来制备麦芽汁。将麦芽提取物与水混合达到10°P(柏拉图)的初始糖含量,如由安东帕啤酒分析仪(Anton Paar Beer Alcolyzer)测定。将亚麻黄酒花颗粒在密闭的咖啡过滤器中添加至麦芽汁中,将此煮沸30分钟以提取酒花风味并为啤酒增添苦味。酒花颗粒被添加达到23EBU(欧洲苦味单位)。煮沸之后,从麦芽汁中去除咖啡过滤器并将麦芽汁转移到1L的瓶子中,通过水封将瓶子密封。在20℃进行发酵。发酵5天后取样进行丁二酮的测量。

[0087] 风味分析

[0088] 以顶空气相色谱法与火焰电离检测联用(HSGC-FID)来测量样品中的乙酸酯、乙酯以及高级醇。以具有顶空取样器的经校准的Perkin Elmer GC系统对样品进行分析。该GC配置有HP-FFAP柱(25m×0.20mm×0.33μm;德国的安捷伦科技公司(Agilent Technologies, Germany))。使用分流-非分流进样器并保持在180℃。将样品在注射前(针的温度:110℃)在顶空自动取样器中在70℃加热30分钟。使用氦气作为载气。SOF-程序操作如下:60℃下开始后,2分钟后将烘箱温度以45℃/分钟从60℃升高到230℃并且最终在230℃保持5分钟。在GC程序期间,维持载气(He)的恒定流速(10毫升/分钟)。将FID温度在220℃下保持恒定。使用Turbochrom软件对结果进行分析。

[0089] 采用顶空GC-MS分析丁二酮。原则上,该方法与用于检测风味化合物的方法相同,除了额外的分流来运送额外的氦,引起流速增加以及使得柱子上化合物的浓度更高。进一步的区别在于加压瓶作为载气容器作用0.03分钟,并且GC程序在90℃的温度下开始。

[0090] 乙醇和密度分析

[0091] 以来自安东帕公司(Anton-Paar)的alcolyzer啤酒分析系统进行乙醇和密度分析。

[0092] 结果

[0093] 表2:6种商品化啤酒以及采用克鲁维毕赤酵母菌株A和克鲁维毕赤酵母菌株B制备的啤酒中的丁酸乙酯、乙酸异戊酯、异戊醇、己酸乙酯和辛酸乙酯的浓度(以ppm;mg/L表示)

[0094]

	丁酸乙酯	乙酸异戊酯	异戊醇	己酸乙酯	辛酸乙酯
嘉士伯	1,10	1,00	34,0	0,04	0,10
斯特拉	2,14	0,71	50,0	0,11	0,10
喜力	2,02	4,87	46,0	0,10	0,09
堡骏	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
荷兰帝亚	0,00	0,26	3,2	0,00	0,00
宝龙	0,00	0,18	2,0	0,00	0,00
麦芽啤酒	0,71	0,21	11	0,01	0,01
毕赤酵母菌株 A—无酒精啤酒	0,43	1,96	2,00	0,03	0,12
毕赤酵母菌株 B—无酒精啤酒	0,26	4,94	2,00	0,07	0,13
毕赤酵母菌株 A—低酒精啤酒	0,27	2,50	1,80	0,02	0,13

[0095] 在发酵期间使用克鲁维毕赤酵母生产的无酒精啤酒

[0096] 为生产无酒精啤酒,进行采用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株的酿造工艺(参见材料和方法)。使用克鲁维毕赤酵母的酵母菌株生产酒精百分比低于0.5%的啤酒。在欧洲条款中,这被认为是一种非酒精啤酒。使用克鲁维毕赤酵母菌株A和菌株B,在稍微更低的发酵温度20℃以1000L规模进行了酿造试验(酿造工艺细节参见图1)。发酵终止时所有的葡萄糖都被消耗,并且以菌株A生产的啤酒的酒精百分比为0.1%。以菌株B生产的啤酒的酒精百分比为0.2%,发酵时间为3周。

[0097] 将两种最终的啤酒用于风味分析。为了了解商品化无酒精啤酒的风味分布,对4种商品化无酒精啤酒进行了风味分析。3种啤酒是堡骏、喜力和宝龙。所述啤酒叙及以下成分:

[0098] -堡骏经典无酒精啤酒:水,大麦,麦芽,玉米和酒花。

[0099] -喜力麦芽无酒精啤酒:水、大麦、麦芽、麦芽糖和酒花提取物。

[0100] -宝龙无酒精啤酒:纯矿泉水、大麦麦芽、麦芽糖和酒花。

[0101] 采用嘉士伯皮尔森啤酒(4.6%(体积比)的酒精)的风味分布作为对照。为了对以克鲁维毕赤酵母酿造的试验啤酒和其他商品化的皮尔森啤酒进行比较,测定了其他2种皮尔森啤酒的风味分布:斯特拉优质贮藏啤酒(5.2%(体积比)的酒精)和喜力贮藏啤酒(5.0%(体积比)的酒精)。

[0102] 如上面列表所显示的,无酒精啤酒的主要成分是水、麦芽(有时以不发芽的大麦作为辅料)以及酒花。这些是与在使用克鲁维毕赤酵母的试验中相同的主要成分。

[0103] 图2描绘了风味分析的结果。显示了5种风味化合物的浓度:乙酸异戊酯、异戊醇、丁酸乙酯、己酸乙酯和辛酸乙酯。对每个浓度都按比例换算,从而使得嘉士伯皮尔森啤酒的各风味化合物的浓度为1。

[0104] 图2清楚地显示了当与嘉士伯皮尔森啤酒相比,以及与其他三种皮尔森啤酒相比,

所有的商品化无酒精啤酒中典型的啤酒风味化合物浓度都很低。但是,以克鲁维毕赤酵母产生的啤酒具有与参考皮尔森啤酒相似水平的特定啤酒风味化合物,特别是异戊醇、己酸乙酯和辛酸乙酯。丁酸乙酯以更低浓度存在(浓度的一半),乙酸异戊酯以更高浓度存在(浓度的2倍或更高)。当与其他皮尔森啤酒相比时,似乎克鲁维毕赤酵母啤酒中的乙酸异戊酯和辛酸乙酯浓度仍更高。但是,皮尔森啤酒中丁酸乙酯和己酸乙酯的浓度比克鲁维毕赤酵母啤酒更高。这些化合物在啤酒中以非常低的浓度存在,并且与乙酸异戊酯的浓度相比较不那么重要。异戊醇的浓度在克鲁维毕赤酵母啤酒和皮尔森啤酒之间相差不大,但在无酒精啤酒中实质上缺失。当将克鲁维毕赤酵母啤酒的总体风味分布与无酒精啤酒和皮尔森啤酒相比较时,似乎克鲁维毕赤酵母啤酒的风味分布比所测定的任一商品化无酒精啤酒的风味分布更接近含4.6–5.2% (体积比) 酒精的啤酒。

[0105] 由于这些风味化合物具有类似的水果风味,可产生协同作用。通过由酿造人员和啤酒消费者组成的品尝组对克鲁维毕赤酵母啤酒的品尝显示,该风味非常像啤酒,并且这种啤酒比商业化的无酒精啤酒更受欢迎。

[0106] 由克鲁维毕赤酵母生产的低酒精啤酒

[0107] 以1500L麦芽汁酿造啤酒,且发酵温度为21℃ (酿造工艺细节参见图1)。该试验是以克鲁维毕赤酵母菌株A进行的。发酵终止时所有的葡萄糖都被消耗并且最终的乙醇水平为0.7%。发酵时间为3周。

[0108] 如图3所示,以克鲁维毕赤酵母菌株A制备的无酒精啤酒和低酒精啤酒二者具有相似的风味分布,这意味着无酒精啤酒和低酒精啤酒都非常接近常规的皮尔森啤酒的风味分布。同样,主要的酯类,乙酸异戊酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯和异戊醇决定了风味分布。

[0109] 对克鲁维毕赤酵母产生的丁二酮的测定

[0110] 为确保克鲁维毕赤酵母不产生啤酒中的任何显著的异味物质,在仅以克鲁维毕赤酵母菌株A进行的实验室酿造实验测定了啤酒中最重要的异味丁二酮的产生,与采用酿酒酵母菌株的啤酒相比较(图4)。

[0111] 从图4中可以清楚看出,与酿酒酵母酿造菌株相比,克鲁维毕赤酵母产生少得多的丁二酮。这一点很重要,因为丁二酮常被认为是啤酒中的异味。特别地,在无酒精的无酒精啤酒和低酒精啤酒中,丁二酮的品尝阈值水平很可能比一般浓度的啤酒要低的多。

[0112] 结论

[0113] 以克鲁维毕赤酵母生产的无酒精啤酒和低酒精啤酒的风味分布结果显示这一酵母菌株对于生产较低酒精或无酒精的啤酒非常适合。特别地,从极低的葡萄糖浓度中产生大量酯是在克鲁维毕赤酵母菌株中发现的特殊性能。其他的酯与乙酸异戊酯一起被提高,这赋予低或无酒精啤酒以啤酒样的风味分布。

[0114] 实施例2

[0115] Branyik et al. (2012) 已提到路德类酵母 (*Saccharomycodes ludwigii*) 是除酵母属 (*Saccharomyces*) 以外用于工业生产无酒精啤酒最成功的种类。为比较克鲁维毕赤酵母与路德类酵母在制备低酒精啤酒方面的特性,设置了第二个实验:

[0116] 材料和方法

[0117] 培养酵母

[0118] 以pH调节至5.5的YPD(2%葡萄糖、1%蛋白胨和0.5%酵母提取物)制备了两种酵母培养物(克鲁维毕赤酵母菌株A和路德类酵母菌株)。121℃高压灭菌YPD培养基20分钟。

[0119] 将酵母培养物涂布YGC平板(西格玛奥德里奇Sigma-Aldrich),将单个集落接种到5ml YPD培养基中。培养物在摇床中在30℃下生长过夜再接种到500ml YPD培养基中。2天后,取样进行细胞计数,以能够在麦芽汁培养基中以相同的初始细胞数接种所述酵母培养物。

[0120] 实验室酿造试验

[0121] 实验室规模的发酵试验在500ml麦芽汁中进行。以皮尔森麦芽提取物(Brewferm)制备麦芽汁。将麦芽提取物与水混合达到7°P(柏拉图)的初始糖含量,如由安东帕啤酒分析仪(Anton Paar Beer Alcolyzer)测定。总共以这种方法制备了10L麦芽汁。

[0122] 在第一设置中,将麦芽汁煮沸60分钟而不添加酒花。在第二配置中,将4.5g亚麻黄酒花颗粒、4.5g卡斯卡特酒花颗粒以及2g泰特昂(Tettnanger)酒花颗粒加入到麦芽汁中,并煮沸60分钟以提供苦味。在煮沸终止前10分钟,添加1.5g卡斯卡特酒花颗粒、1.5g亚麻黄酒花颗粒以及1g泰特昂酒花颗粒作为香型酒花。煮沸后,将麦芽汁转移到2L瓶子中(每瓶1600ml麦芽汁),并瓶子以水封密闭。

[0123] 以 1×10^6 CFU/ml接种酵母培养物,20℃下进行发酵。发酵5天后,取样用于风味分析。

[0124] 乙醇分析

[0125] 使用宝灵曼公司(Boehringer Mannheim)的乙醇酶法生物分析试剂盒来测量乙醇。

[0126] 风味分析

[0127] 在Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología(葡萄酒香气和分析实验室,西班牙萨拉戈萨)进行了风味分析。微量的香味化合物以 $\mu\text{g/L}$ (ppb)表示,并通过固相提取和气相色谱结合质谱检测而测定,而主要的香味化合物以 mg/L (ppm)表示,并通过二氯甲烷提取化合物后以气相色谱火焰电离检测而测定。

[0128] 结果

[0129] 以两种类型的皮尔森麦芽汁进行了实验室规模的发酵:不添加酒花的麦芽汁和添加了苦味酒花和香型酒花(卡斯卡特、亚麻黄和泰特昂)(参见材料和方法)的同样的皮尔森麦芽汁。测试了两种酵母菌株:路德类酵母和克鲁维毕赤酵母。将其培养于YPD培养基后,以 1×10^6 CFU/ml的细胞数接种酵母培养物。总共进行了4种不同的发酵:

[0130] 1) 路德类酵母在不含酒花的麦芽汁中(路德类酵母,无酒花)

[0131] 2) 路德类酵母在含酒花的麦芽汁中(路德类酵母,有酒花)

[0132] 3) 克鲁维毕赤酵母在不含酒花的麦芽汁中(克鲁维毕赤酵母,无酒花)

[0133] 4) 克鲁维毕赤酵母在含酒花的麦芽汁中(克鲁维毕赤酵母,有酒花)

[0134] 所有的发酵都在20℃下进行5天。

[0135] 发酵过程中,每天测定细胞数以关注酵母生长(图5)。

[0136] 从图5中可以清楚看到两种酵母菌株在含有和不含酒花的麦芽汁中都能存活。克鲁维毕赤酵母相对于路德类酵母而言有明显的生长,路德类酵母在整个发酵中具有稳定的

细胞数。

[0137] 5天后,对所有发酵产品测定乙醇浓度(表3)。

[0138] 表3:所有四种发酵产品中的乙醇浓度

	发酵产品	乙醇 % /v/v)
	路德类酵母, 无酒花	0.3
[0139]	路德类酵母, 有酒花	0.3
	克鲁维毕赤酵母, 无酒花	0.1
	克鲁维毕赤酵母, 有酒花	0.1

[0140] 表3显示了路德类酵母和克鲁维毕赤酵母都产生非常少量的乙醇。克鲁维毕赤酵母似乎在不产生酒精方面更为优异,因为与路德类酵母相比,这一菌株生长至更高的细胞数,却产生更少的乙醇。

[0141] 还对第5天的发酵产物进行了风味分布分析(图6、7、8和9)。对啤酒而言最重要的风味化合物是酯和高级醇。

[0142] 图6和7显示了所有最终发酵产物中以及基础麦芽汁中(含有或不含酒花)酯的浓度。克鲁维毕赤酵母的发酵产物中所有酯浓度都是最高的,含有或不含酒花二者。在乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、乙酸异丁酯和乙酸丁酯方面,与癸酸乙酯相比,当不加入酒花时克鲁维毕赤酵母产生更高浓度的这些酯。特别是乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯的水平非常高。乙酸异戊酯产生香蕉的香味,而乙酸苯乙酯产生一种更具花香的蜂蜜香味。两种酯化合物都是啤酒中期望的化合物。需要注意的是,此处所描述的结果是发酵5天后的酯浓度,而这些浓度会在最终的啤酒中随着时间推进而减少。以高的酯浓度开始是重要的,获得在更长的时间内的水果味的啤酒,因为这些酯化合物在最终的啤酒中随着时间推进而被水解。

[0143] 图8中描绘的杂醇浓度在路德类酵母和克鲁维毕赤酵母的发酵产物之间特别相似。仅异戊醇的浓度在路德类酵母的发酵产物中更高,这很可能是由于这种化合物并未如同在克鲁维毕赤酵母的发酵产物中一样被转化为乙酸异戊酯。

[0144] 图9中描述了3种酸,其是啤酒中的不良风味化合物。特别是癸酸向啤酒提供一种腐臭的、干酪质的味道,因此是不期望的。显然特别是路德类酵母产生大量的这些酸,从而使得其较不适合啤酒的生产。

[0145] 结论

[0146] 以所述两种不同的非酵母属的酵母菌株进行的实验室酿造试验清楚指示出:与路德类酵母相比,克鲁维毕赤酵母更适合生产无酒精啤酒。与路德类酵母相比,克鲁维毕赤酵母产生更少的酒精和更多所需的酯化合物以及更少的不期望的酸。

[0147] 保藏信息

[0148] 如W02009/110807中描述的,克鲁维毕赤酵母PK-KR1(JT1.28或菌株A)以保藏号V06/022711,以及克鲁维毕赤酵母PK-KR2(JT3.71)以保藏号V06/022712分别于2006年8月24日由新西兰奥克兰的奥克兰大学生物科学学院(邮编:1142)保藏在澳大利亚维多利亚州南墨尔本克拉克街51-65号的国家计量研究院(邮编:3205)。

[0149] 参考文献

[0150] DD 288619

[0151] WO 2009/110807

- [0152] Boulton,C.M.and Quain,D.2010.Brewing yeast and fermentation.Blackwell publishing Ltd.
- [0153] Branyik,T,Silva,D.P.,Baszczyn,M.,Lehnert,R.,Almeida e Silva,J.B., 2012.A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production.Journal of Food Engineering 108,493-506.
- [0154] Liu,Y.,Li,H.,Du,J.-H.2011.Non-alcoholic Beer Production by *Saccharomyces ludwigii*.Food Science,32:186-190.
- [0155] Montanari,L.,Marconi,O.,Mayer,H.,Fantozzi,P.,2009.Production of alcohol-free beer.In:Preedy,V.R.(Ed.),Beer in Health and Disease Prevention.Elsevier Inc.,Burlington,MA,61-75.
- [0156] Saerens S.M.,Delvaux F.R.,Verstrepen K.J.,Thevelein J.M.2010.Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*.Microbial Biotechnology 3:165-77.
- [0157] Stewart,G.Wort glucose,maltose or maltotriose-do brewer's yeast strains care which one?Institute of Brewing and Distilling.Asia Pacific Section.31st Asia Pacific Convention 2010.(<http://www.ibdasiapac.com.au/asia-pacific-activities/convention-proceedings/2010/results.html>)
- [0158] Swiegers,J.H.,S.M.G.Saerens,I.S.Pretorius.2007.The development of yeast strains as tools to adjust the flavor of fermented beverage to market specifications.Havkin D.and Belanger F.Biotechnology in flavor production.Blackwell Publishing Ltd.
- [0159] Zufall C,and Wackerbauer K.2000.Process engineering parameters for the dealcoholisation of beer by means of falling film evaporation and its influence on beer quality.Monatsschrift für Brauwissenschaft 53:124-137.

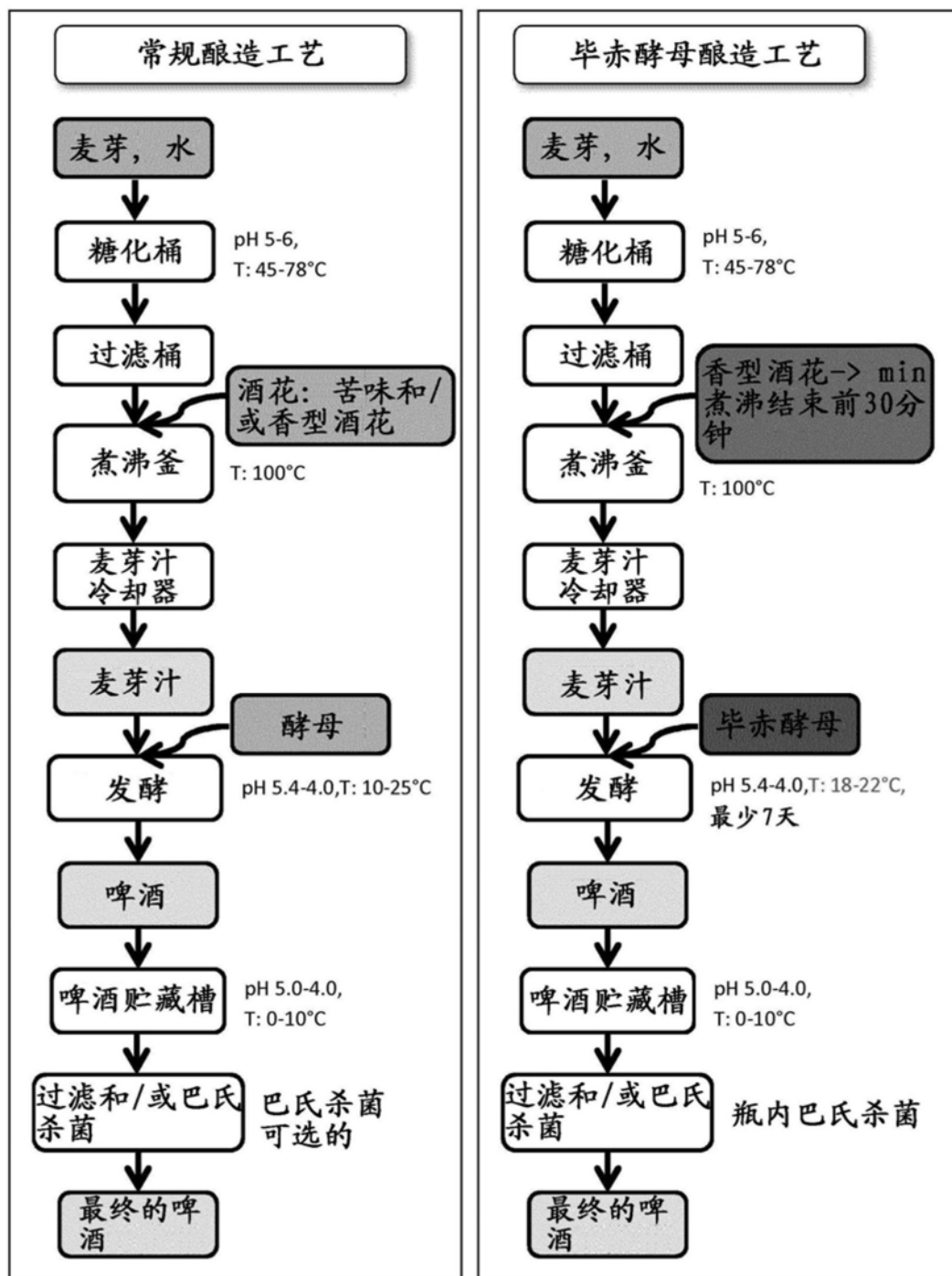


图1

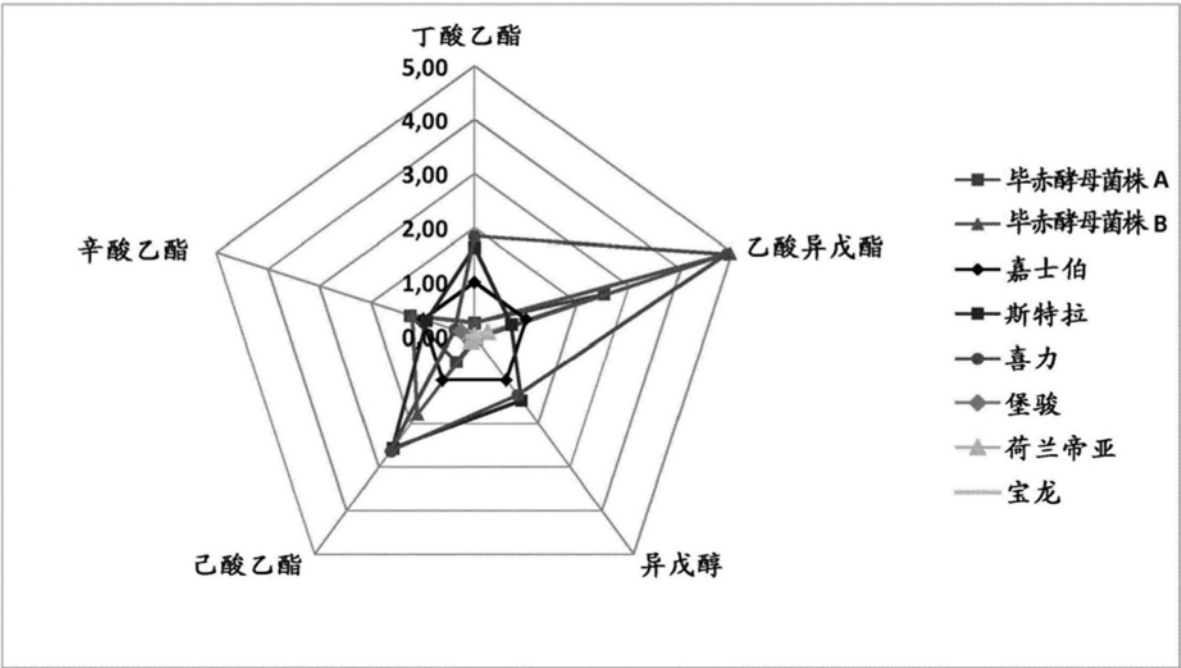


图2

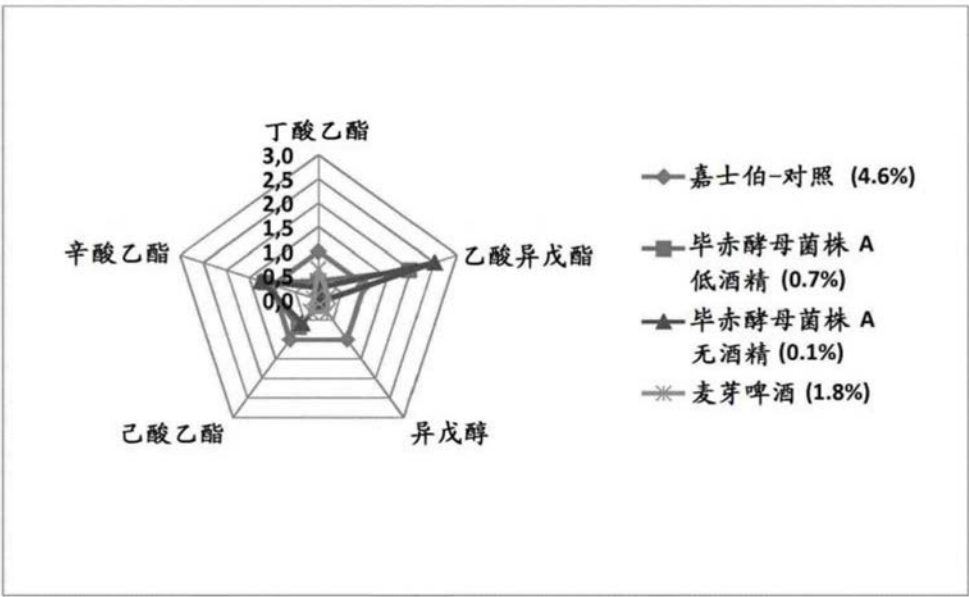


图3

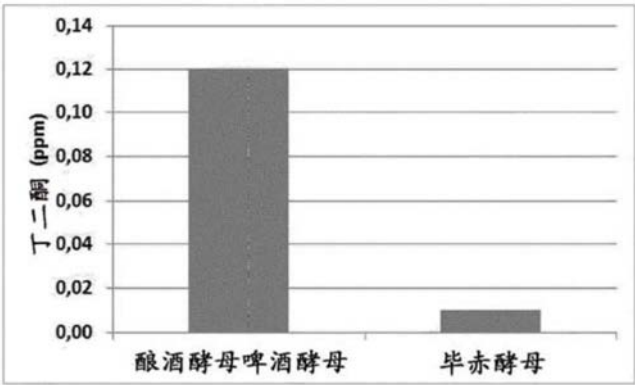


图4

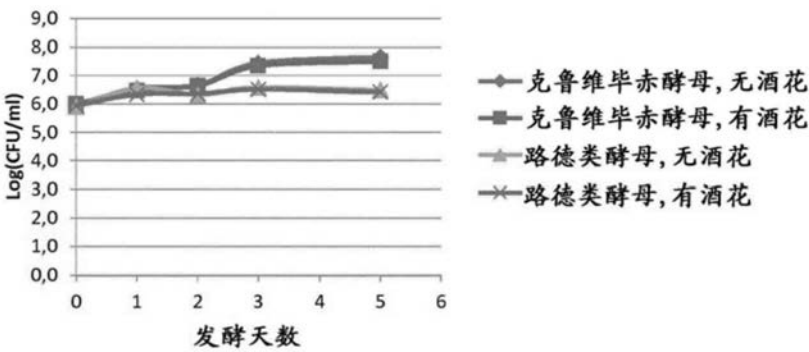


图5

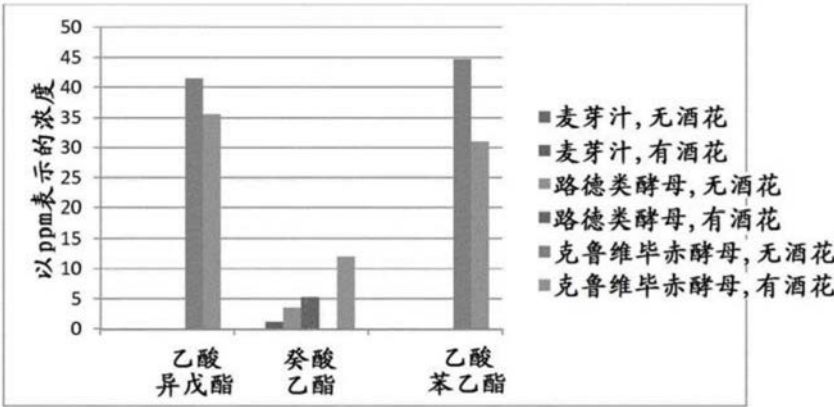


图6

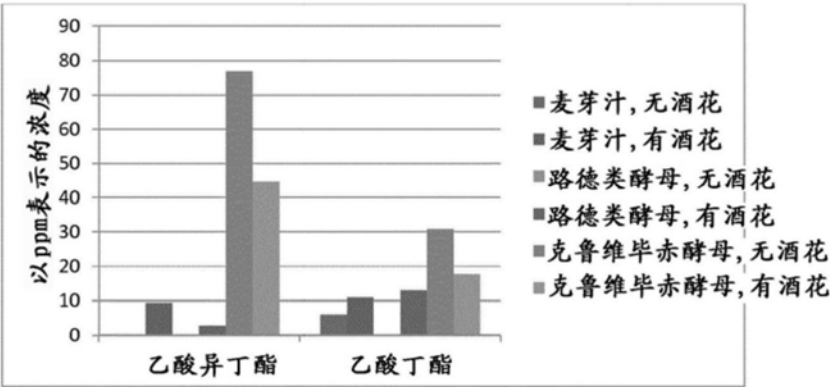


图7

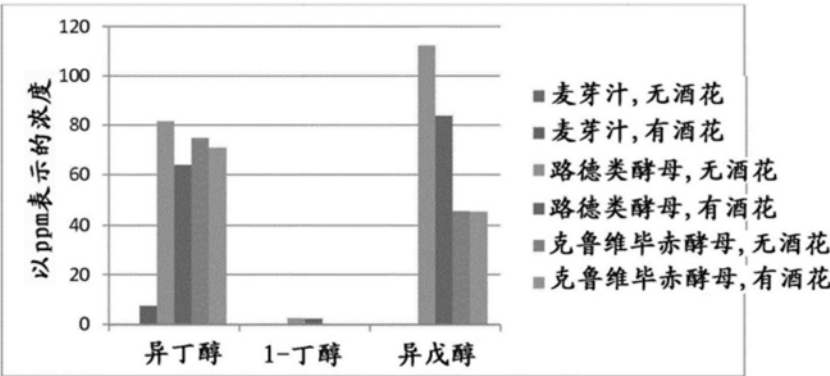


图8

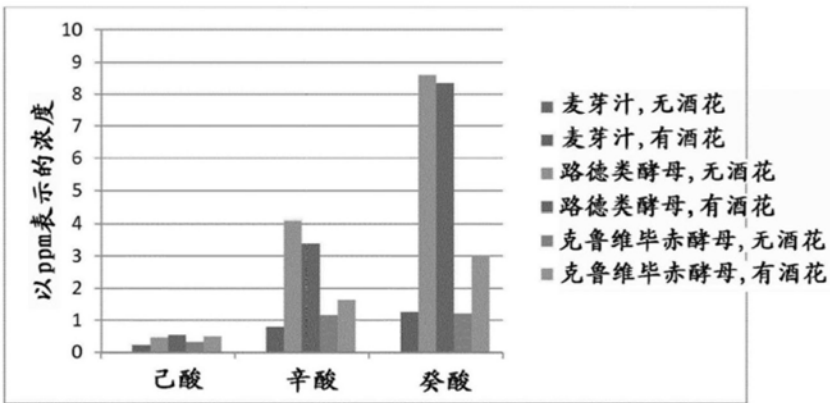


图9