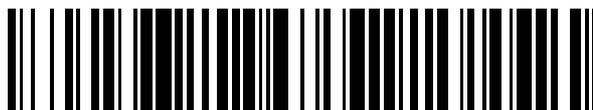


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 348**

51 Int. Cl.:

C12C 11/00 (2006.01)

C12G 3/04 (2006.01)

C12C 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753686 .2**

96 Fecha de presentación: **17.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1943327**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Cerveza estabilizada microbiológicamente**

30 Prioridad:

26.10.2005 DE 102005052210

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

**SUDZUCKER AG MANNHEIM/OCHSENFURT
(100.0%)
MAXIMILIANSTRASSE 10
68165 MANNHEIM, DE**

72 Inventor/es:

**DÖRR, TILLMANN;
GUDERJAHN, LUTZ;
KOWALCZYK, JÖRG;
PAHL, ROLAND y
SCHNEIDER, JAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 392 348 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cerveza estabilizada microbiológicamente

5 La presente invención se refiere a medios y a un procedimiento para la fabricación de cerveza estabilizada microbiológicamente.

10 En los últimos diez años aproximadamente ha surgido otra vez un gran número de pequeñas cervecerías, las denominadas cervecerías caseras o artesanas ("pub breweries") que se distinguen de las grandes cervecerías sobre todo por su reducido volumen de producción, que casi siempre cubre sólo el despacho en el propio establecimiento y la venta directa de pequeños envases tales como botellas, así como por un proceso cervecero y de envasado más sencillo.

15 Mientras que, sobre todo las grandes cervecerías, mantienen instalaciones industriales a gran escala con las que se puede producir y envasar la cerveza en condiciones que inhiben los gérmenes o de baja contaminación microbiológica, muchas pequeñas cervecerías carecen de las correspondientes medidas de prevención. Para las pequeñas cervecerías las medidas constructivas o a nivel de procedimiento que aseguran estas condiciones favorables en las que se evita por completo una contaminación con microorganismos que dañan la cerveza, casi nunca resultan económicamente atractivas.

20 Por otro lado, precisamente la fabricación y el envase con baja contaminación microbiológica tiene un efecto positivo sobre el resultado del proceso cervecero; muchos de los microorganismos introducidos durante la fabricación "dañan la cerveza". Una cerveza fabricada con pocos organismos que la dañan es apta para un almacenamiento prolongado y puede ser envasada fácilmente en botellas o en barriles incluso en un entorno no totalmente libre de gérmenes, sin que se espere un resultado negativo. Resulta preferible poner a disposición procedimientos y medios sencillos y económicos que permitan tanto a las grandes cervecerías industriales como también a las pequeñas cervecerías llevar a cabo la fabricación y el envasado de cerveza que esté estabilizada microbiológicamente.

30 El riesgo de contaminación, es decir de una desestabilización microbiológica de la cerveza, existe sobre todo en relación con el envasado de la cerveza en botellas, barriles o envases similares. Con "baja contaminación microbiológica" no se entiende una total asepsia. El número de gérmenes que dañan la cerveza presentes en la misma, especialmente microorganismos tales como bacterias y hongos, debería ser tan reducido que la cerveza no se deteriore durante los prolongados tiempos de almacenamiento de semanas y meses. Si se mantiene reducido el número de los gérmenes que dañan la cerveza existirá una menor probabilidad de que se desarrollen cultivos que perjudiquen a la cerveza. Preferentemente, el envasado se realiza de forma estéril a efectos de bebida o a efectos de cerveza, respectivamente.

40 Por el estado de la técnica se conocen procedimientos para el envasado de cerveza y otras bebidas con baja contaminación microbiológica. Un envasado de cerveza con baja contaminación microbiológica puede realizarse con un coste de vigilancia biológica. En este caso, se toman medidas de limpieza y esterilización intensivas en las instalaciones de envasado y las correspondientes salas. Estas medidas van acompañadas de un elevado gasto en controles biológicos y también de mucho trabajo y elevados costes. Tanto para la permanente vigilancia de la baja contaminación microbiológica como también para su mantenimiento se han de tomar en parte medidas costosas a nivel de aparatos o procedimientos. Sin embargo, la seguridad resulta insuficiente si se compara con el gasto necesario. Por lo tanto, estas medidas se adoptan rara vez. Para el envasado de bebidas azucaradas con una base de cerveza, tales como bebidas mixtas a base de cerveza o cerveza de malta las cuales presentan un muy alto riesgo de contaminación, el procedimiento no es suficientemente seguro.

50 Otra medida para el envasado de cerveza con baja contaminación microbiológica es la breve pasteurización a temperatura elevada (HTST). A tal efecto la cerveza es calentada mediante un pasteurizador, casi siempre al pasar por un intercambiador de calor de placas, y a continuación es enfriada otra vez. El pasteurizador se instala, de forma idónea, directamente delante del envasador. No obstante existe el peligro de una contaminación secundaria, por ejemplo durante el proceso de envasado o por envasar en envases ya contaminados. La pasteurización HTST es una medida que se adopta a menudo; sin embargo, no es suficientemente segura para el envasado de bebidas azucaradas con una base de cerveza.

60 Otra medida para el envasado de cerveza con baja contaminación microbiológica es la filtración por membrana o la esterilización en frío. El procedimiento corresponde básicamente al procedimiento HTST, pero en lugar de un pasteurizador se utiliza un sistema de filtración por membrana para reducir los gérmenes que, debido al tamaño de los poros del filtro, hace posible la separación de los microorganismos presentes en la cerveza. También en este caso existe el peligro de una contaminación secundaria. Este procedimiento tampoco resulta suficientemente seguro para el envasado de bebidas azucaradas con base de cerveza.

65 Otra medida consiste en la pasteurización total de botellas o latas ya envasadas y cerradas, preferentemente en el pasteurizador de túnel o de cámara. En este procedimiento, los envases en los que se ha envasado la cerveza se han calentado, por ejemplo, mediante agua caliente o vapor y, a continuación, se han enfriado otra vez. Este

procedimiento se utiliza a menudo en cervecerías con largos trayectos de distribución, por ejemplo para la exportación de cerveza a ultramar. En este caso, se puede controlar el peligro de una contaminación secundaria durante el envasado. De esta manera, se pueden estabilizar biológicamente, de forma suficientemente segura, incluso bebidas azucaradas tales como la cerveza de malta o bebidas mixtas a base de cerveza. Debido al elevado
 5 gasto en aparatos, este procedimiento resulta costoso. Además de los elevados costes corrientes, tales como un elevado consumo de agua y de energía, también resultan desventajosos los elevados costes de inversión para las instalaciones así como la necesidad de un mayor espacio. Además, los envases y sus cierres están expuestos regularmente a altas exigencias (especialmente referente a la estabilidad térmica y de presión). Por ejemplo, las botellas de plástico fabricadas del PET habitual en la industria de las bebidas no pueden ser pasteurizadas de
 10 acuerdo con el procedimiento conocido. Además resulta desventajosa la alteración del sabor por el proceso de pasteurización.

Otras posibilidades para el envasado de cerveza con baja contaminación microbiológica o para proporcionar cerveza envasada estabilizada microbiológicamente, son procedimientos que se conocen de la industria de zumos y refrescos. Entre ellas está la esterilización química. En algunas limonadas la ley alimentaria permite utilizar el conservante dimetil dicarbonato (DMDC) justo antes del envasado. Generalmente esto requiere una pasteurización HTST precedente. Si se aplica correctamente, la sustancia añadida actúa todavía en la botella envasada y cerrada y se desintegra después de un cierto tiempo. Un inconveniente constituye la aplicación de la sustancia que es técnicamente muy difícil en la cervecería, ya que resulta perjudicial para la salud y presenta un elevado punto de
 15 congelación. Para cervezas azucaradas, tales como bebidas mixtas a base de cerveza o cerveza de malta, la aplicación de esta sustancia no es adecuada ya que la concentración permitida se puede utilizar sólo en la parte de limonada o base de limonada concentrada. Pero en relación con el envasado de la cerveza, la sustancia debería ser añadida en un momento anterior, de manera que existe el riesgo de que la misma ya no actúe en la botella ya llenada. Por lo tanto, la esterilización química mencionada anteriormente no entra en consideración en términos
 20 generales.

Otro método de envasado conocido del ámbito de la industria de zumos y refrescos es el envasado aséptico, es decir libre de gérmenes. Esto conlleva un considerable gasto en equipos técnicos tales como sala aséptica y técnicas de aislamiento. Este procedimiento implica además una reorientación del concepto de garantía de calidad incluyendo la validación y la calificación de los operarios. Su aplicación en el envasado de cerveza a gran escala, como también en el envasado en cervecerías artesanales no es realista debido al elevado gasto técnico y organizativo.
 25

Por el documento DE 23 44 252 se describe un procedimiento para la fabricación de una bebida clara, con bajo contenido de alcohol, similar a la cerveza, con isomaltulosa.
 30

Por los documentos DE 103 61 313 y WO 2005/061690 se describen asimismo procedimientos para la fabricación de cervezas con bajo contenido de alcohol o refrescos parecidos a la cerveza con isomaltulosa. La GB 1.060.681 se refiere a un procedimiento para la fabricación de bebidas alcohólicas y describe procedimientos de estabilización microbiológica.
 35

El problema técnico que sirvió de punto de partida para la presente invención consiste, por consiguiente, substancialmente en el hecho de proporcionar procedimientos y medios para la fabricación y el envasado de cerveza o bebidas mixtas a base de cerveza que puedan ser llevados a cabo de forma muy sencilla y económica, y de reducir de forma más eficaz o estabilizar el número de microorganismos que dañan la cerveza durante y/o después de su fabricación. Debido a ello se debe obtener una cerveza o una bebida mixta a base de cerveza estabilizada microbiológicamente en el estado envasado. Además, los procedimientos y medios deben ser aptos para su aplicación en procedimientos de fabricación de cerveza conocidos y en instalaciones cerveceras conocidas sin que ello requiera una adaptación esencial de las etapas del proceso.
 40

El problema técnico se resuelve porque se proporciona un procedimiento para la fabricación de cerveza o de una bebida mixta a base de cerveza estabilizada microbiológicamente a partir de agua cervecera, lúpulo y, como mínimo, una fuente de hidratos de carbono, en el que en una primera etapa (a) se mezclan el agua cervecera, el lúpulo y una fuente de hidratos de carbono formando un mosto. En una etapa siguiente (b) se hierva el mosto. En otra etapa siguiente (c) se realiza una fermentación microbiana del mosto. El procedimiento de la invención se caracteriza porque la isomaltulosa es añadida adicional o exclusivamente después de la filtración de la cerveza, o bien adicional o exclusivamente justo antes del envasado o antes del almacenamiento de la cerveza o de la bebida mixta a base de cerveza.
 45

Es decir, que la invención enseña a elaborar cerveza o bebidas mixtas a base de cerveza a partir de agua cervecera, lúpulo y una fuente de hidratos de carbono a la que se añade isomaltulosa o una mezcla que contenga isomaltulosa como agente estabilizador. Sorprendentemente, los inventores encontraron que la isomaltulosa o una mezcla que contenga isomaltulosa reduce en la fuente de hidratos de carbono, el número de microorganismos reconocidos como desventajoso, es decir que dañan la cerveza, o estabiliza la cerveza que se obtiene microbiológicamente. Debido a la isomaltulosa o la mezcla que contiene isomaltulosa el número de estos microorganismos no crece en el siguiente proceso de fabricación ni durante el envasado, de manera que a
 50

continuación se obtiene una cerveza con bajo contenido en gérmenes o esencialmente libre de gérmenes que dañan la cerveza la cual presenta una estabilidad microbiana. La cerveza obtenida y envasada de esta manera es entonces apta para un almacenamiento prolongado.

5 Con “estabilizado microbiológicamente” o “estabilización microbiológica” se entiende a efectos de la presente invención, que un alimento expuesto generalmente a la contaminación y al deterioro presenta determinadas propiedades debido a las cuales se suprime o se impide completamente el crecimiento posterior o indeseado de microorganismos. Estos microorganismos, también denominados gérmenes, son en primer lugar bacterias y hongos
10 tales como mohos o levaduras. A los mismos pertenecen no solamente aquellos organismos que, debido a su actividad metabólica influyen negativamente en la calidad y el sabor del alimento, sino también gérmenes potencialmente patógenos que pueden poner en peligro la salud del hombre. La estabilización microbiológica, según la invención, hace que el número de estos microorganismos no sobrepase un umbral determinado en períodos oportunos de almacenamiento, de manera que el alimento no se deteriore o que implique un riesgo para la salud.

15 Tal como un experto en la materia puede reconocer fácilmente, en el contexto de la presente invención, como “cerveza” no se entiende solamente una cerveza que se obtiene una vez fermentado completamente o casi completamente el mosto, es decir, los componentes de hidratos de carbono contenidos en la misma. Según la presente invención, como cerveza se entiende también una bebida mixta a base de cerveza que se obtiene cuando se añade a la cerveza antes, durante o después de su fabricación, como mínimo, otro componente de hidratos de
20 carbono que no ha sido fermentado o sólo parcialmente. Mediante la presente invención, como cerveza se entiende, por ejemplo, una bebida mixta a base de cerveza, donde a una cerveza elaborada de forma convencional se le ha añadido isomaltulosa, durante o después de su fabricación.

25 El agente estabilizador puede ser añadido también a una fuente de hidratos de carbono que contiene cereales malteados (malta), el fruto crudo de cereales o una mezcla de cereales malteados y el fruto crudo de cereales. En la fuente de hidratos de carbono utilizada, se sustituye preferentemente de forma parcial la malta y/o el fruto crudo por isomaltulosa o por una mezcla que contiene isomaltulosa. La relación entre los demás componentes de la fuente de hidratos de carbono, es decir, especialmente de la malta y/o del fruto crudo de cereales, y la isomaltulosa añadida puede ser desde 6:1 hasta 1:1, preferentemente de 4:1 a 2:1, muy preferentemente, en función del campo de
30 aplicación, precisamente 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 ó 1:1.

A efectos de modificar lo menos posible los procedimientos conocidos y probados para la fabricación de cerveza, la isomaltulosa, o la mezcla que contiene isomaltulosa, es añadida a la fuente de hidratos de carbono, preferentemente antes de mezclar ésta con el agua cervecera y el lúpulo, y preferentemente en forma de sirope, solución y/o como
35 sólido cristalino. A tal efecto, se añade la isomaltulosa o la mezcla que contiene isomaltulosa junto con la restante fuente de hidratos de carbono, el agua cervecera y el lúpulo al mosto.

La isomaltulosa también puede ser añadida a la cerveza en la sala de cocción y pasar a continuación por todo el proceso de fermentación principal y secundario.

40 La isomaltulosa también puede ser añadida exclusiva o adicionalmente después de la fermentación principal. Mediante la adición de la isomaltulosa, después de la fermentación principal, se garantiza que la isomaltulosa no pueda ser metabolizada durante dicha fermentación principal, sin embargo, la levadura todavía suele presentar una actividad residual durante la fermentación secundaria.

45 De acuerdo con la invención, la isomaltulosa es añadida a la cerveza, adicional o exclusivamente, sólo después de la filtración. Al añadir la isomaltulosa a la cerveza después de la filtración, debido a la separación de la levadura, la mezcla no es sometida a ningunas alteraciones por los procesos de fermentación deseados.

50 De acuerdo con la invención, la isomaltulosa es añadida alternativa, adicional o exclusivamente, justo antes del envasado o antes del almacenamiento de la cerveza o de la bebida mixta a base de cerveza.

Según la invención, en las modalidades de la adición de isomaltulosa, ésta actúa de acuerdo con la invención como un agente estabilizador que inhibe el crecimiento de gérmenes o inhibidor microbiano. En todo caso, la adición de
55 isomaltulosa, ya sea en forma de sirope, de solución o como sólido cristalino, puede ser incorporada sin problemas en procedimientos de fabricación de cerveza conocidos, de manera que se evita un gasto adicional en la realización del procedimiento o en aparatos.

60 Sobre todo en bebidas mixtas a base de cerveza que, debido a su contenido en limonada, son generalmente más perecederos, la utilización de isomaltulosa en la parte de cerveza contribuye a mejorar notablemente la estabilidad biológica de la bebida mixta a base de cerveza. Además, se obtienen otras ventajas conocidas tales como la aptitud para diabéticos de la bebida mixta a base de cerveza que se ha fabricado.

65 Sorprendentemente, la utilización preferente, según la invención, de la isomaltulosa en bebidas mixtas a base de cerveza no produce el efecto desventajoso del deterioro del sabor que se conoce de otros sustitutos del azúcar o sustancias edulcorantes. En especial, la adición de isomaltulosa a la cerveza o a bebidas mixtas a base de cerveza

no altera aspectos de sabor como la plenitud de sabor en boca, o sólo de forma insignificante.

Por lo tanto, también es posible fabricar una cerveza o una bebida mixta a base de cerveza que contiene isomaltulosa como agente endulzante. Preferentemente, la isomaltulosa está contenida como el único agente endulzante. Además, la isomaltulosa está contenida preferentemente como el único agente endulzante que confiere cuerpo.

Por lo tanto, también constituye un objeto de la presente invención la utilización de la isomaltulosa como un agente estabilizador o inhibidor microbiano para la fabricación, sobre todo para el envasado, de cerveza o bebidas mixtas a base de cerveza con baja contaminación microbiológica, especialmente de acuerdo con el procedimiento de la invención descrito por la presente y sus variaciones preferentes, según la invención.

La isomaltulosa es un azúcar reductor que sorprendentemente no puede ser asimilado y metabolizado, o solamente con mucha dificultad, por las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*. La isomaltulosa (6-O- α -D-glucopiranosilfructosa), conocida con el nombre de Palatinose™, es una quetosa de disacárido presente en la naturaleza, por ejemplo en la miel. Según el documento DE 44 14 185 C1, la isomaltulosa puede ser fabricada a gran escala a partir de sacarosa mediante transposición enzimática, por ejemplo, utilizando células bacterianas inmovilizadas, especialmente de la especie *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici* y *Serratia plymuthica* o una sacarosa-isomerasa aislada de las mismas.

Una "mezcla que contiene isomaltulosa" es una combinación de isomaltulosa con, como mínimo, otro hidrato de carbono, especialmente fructosa, glucosa, sacarosa, trehalulosa, leucrosa, tagatosa, turanosa, isomaltulosa, isomelzitosa, oligosacáridos con un grado de polimerización de 3 ó 4 o más, o mezclas de las mismas. Según una variante la mezcla contiene isomaltulosa y fructosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y sacarosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y trehalulosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y leucrosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y tagatosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y turanosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa e isomaltulosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa e isomelzitosa, según otra variante la mezcla contiene isomaltulosa y oligosacáridos con un grado de polimerización de 3 ó 4 o más. Según una realización preferente, la mezcla que contiene isomaltulosa es el producto de la isomerización de la sacarosa que se obtiene mediante transglucosilación de la sacarosa, preferentemente utilizando células muertas o vivas de *Protaminobacter rubrum* o de extractos enzimáticos producidos a partir de las mismas. Las mezclas que contienen isomaltulosa incluyen, según una realización muy preferente de la invención, aproximadamente 79-85 % de isomaltulosa, 8-10 % de trehalulosa, 0,5-2 % de sacarosa, 1-1,5 % de isomaltulosa, oligosacáridos, 2,5-3,5 % de fructosa y 2,0-2,5 % de glucosa o están hechos con ello, siendo las indicaciones referidas al contenido porcentual en sólidos.

Como "mosto" se entiende el extracto de una fuente de hidratos de carbono como, por ejemplo malta, que ha sido liberado de componentes insolubles y que se mezcla con agua y, preferentemente lúpulo, y se cuece. Tras la cocción con lúpulo se obtiene el denominado mosto de bombeo (Ausschlagwürze). Una vez enfriado el mosto cocido se presenta como mosto a "levadurizar" (Anstellwürze). El mosto se elabora preferentemente mediante maceración, clarificación, cocción del mosto y tratamiento del mosto. La elaboración del mosto tiene especialmente el fin de transformar los componentes, en un principio no disueltos, de la fuente de hidratos de carbono, especialmente malta, en sustancias solubles y fermentables, separar los componentes sólidos que quedan y, finalmente, añadir la especie, es decir el lúpulo. En la maceración se mezcla preferentemente primero la fuente de hidratos de carbono triturada, en especial malta, con el agua cervecera. A continuación sigue, preferentemente en el denominado proceso de maceración, según un programa específico de temperatura y tiempo, una transformación enzimática dirigida de las sustancias contenidas en la fuente de hidratos de carbono, en el que el proceso más importante es la degradación completa de almidón en azúcares fermentables tales como glucosa, maltosa o maltotriosa y dextrinas no fermentables. La temperatura óptima para la formación de maltosa está en 60° - 65° C, para la formación de dextrina en 70° - 75° C. La temperatura determina el grado de fermentación final del mosto en función del tipo de cerveza. Tras la clarificación y el endulzamiento del orujo con agua caliente (78° C), el mosto es cocido preferentemente durante 60 hasta 100 min, preferentemente con adición de lúpulo, añadiendo en función del tipo de cerveza a fabricar preferentemente aproximadamente 150 hasta 500 g/hl de lúpulo. Mediante la evaporación de preferentemente 6-10 %, aproximadamente, de la cantidad inicial se ajusta el contenido en mosto original. Durante la cocción tiene lugar además una esterilización, se produce la coagulación de sustancias proteicas, la isomerización de las sustancias amargas del lúpulo y la formación y parcialmente también la evaporación de sustancias aromáticas. A continuación, el mosto cocido y lupulizado es liberado de turbios, preferentemente, en un tanque Whirlpool (= de clarificación por remolino) y/o mediante filtración. Tras el enfriamiento del mosto que se realiza habitualmente en intercambiadores de calor de placas, se eliminan parcialmente los turbios fríos y se lleva a cabo un aireado intensivo para suministrar oxígeno a los microorganismos utilizados para la fermentación. Inmediatamente después se añade al mosto preferentemente, como mínimo, un microorganismo adecuado, capaz de provocar la fermentación, como por ejemplo levadura. Dado que el mosto utilizado para la fermentación puede contener diferentes fuentes de hidratos de carbono, aplicando el procedimiento de la invención se pueden elaborar también cervezas claras u oscuras, estabilizadas microbiológicamente.

También se puede sustituir una parte del extracto de mosto por isomaltulosa. Así se reduce la porción de hidratos de

5 carbono metabolizables en el mosto, de manera que preferentemente se reduce además el contenido de alcohol de la bebida fabricada con respecto al de una cerveza normal. El contenido de alcohol de las cervezas fabricadas de forma estabilizada microbiológicamente, según el procedimiento de la invención, puede ser bajado en su caso utilizando un procedimiento de extracción de alcohol. Con "cerveza sin alcohol" se entiende una cerveza con un contenido de alcohol de menos de 0,5 % que presenta preferentemente de un 7 al 8 % aproximadamente de mosto original. (Las indicaciones en % se refieren a % en volumen, si no se indica lo contrario). Con una "cerveza de bajo contenido de alcohol" se entiende, según la invención una cerveza que presenta un contenido de alcohol de menos del 5 %, especialmente de menos del 4 %.

10 Con una "fuente de hidratos de carbono" se entiende materiales que contienen hidratos de carbono tales como cereales en los que los hidratos de carbono pueden ser transformados durante la elaboración del mosto al menos parcialmente en azúcares solubles y fermentables tales como glucosa, maltosa o maltotriosa que son utilizados durante la fermentación por microorganismos, en especial por levaduras, como fuente de hidratos de carbono. Según una realización preferente de la invención la fuente de hidratos de carbono utilizada está formada por cereales malteados, fruto crudo o una mezcla de ambos.

15 Los cereales malteados son preferentemente granos y semillas de cebada, trigo, centeno, avena, mijo, triticale, arroz, sorgo y/o maíz que han sido sometidos a un procedimiento de fabricación de malta. El fruto crudo está formado preferentemente por granos y semillas de cebada, trigo, centeno, avena, mijo, sorgo, triticale, arroz y/o maíz que que han sido triturados pero no malteados.

20 Preferentemente, los materiales de partida son azucarados antes de la fermentación. A tal efecto, se utilizan las enzimas propias de la malta que tienen un efecto hidrolítico tales como las amilasas, las maltasas, etc. que transforman el almidón en dextrinas no fermentables y glucosa, maltosa y maltotriosa fermentable. En el malteado, se deja germinar los cereales ablandados preferentemente de 12° C hasta 18° C, y se interrumpe este proceso de germinación en el momento en el que la formación de enzimas y los procesos de disolución han alcanzado la medida deseada. Esto se realiza preferentemente mediante la aplicación de temperaturas elevadas con un gran caudal de aire. Mediante presecado aproximadamente de 40 hasta 50° C ("Schwelken") se puede reducir el contenido en agua de más del 50% a 10 hasta 12%. A continuación, se puede elevar la temperatura preferentemente de 80 hasta 85° C aproximadamente para reducir el contenido de agua de la malta preferentemente de 4 hasta 5 %, aproximadamente. Este proceso recibe el nombre de "Darren" (= secado).

25 El proceso de fermentación se realiza preferentemente en dos etapas. La fermentación principal se inicia mediante adición de microorganismos, en especial levaduras, levaduras de fermentación baja o levaduras de fermentación alta. Al final de la fermentación principal la levadura se sedimenta en el fondo o en el cono del recipiente de fermentación. Preferentemente, la cerveza joven que se obtiene en la fermentación principal se vuelve a enfriar y a someter a una fermentación secundaria en la que se fermenta el extracto restante y preferentemente se clarifica la cerveza. Durante la fermentación desaparece también el sabor del mosto y, especialmente durante la fermentación secundaria se forma el puro sabor de cerveza. El proceso también se denomina maduración. Se puede influir en la fermentación, por ejemplo, mediante diferentes temperaturas de fermentación, una producción por fermentación alta y baja, fermentación abierta o fermentación cerrada, etc.

30 Preferentemente, para la fermentación se utiliza un único o varios de los microorganismos seleccionados de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de fermentación baja, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de fermentación alta, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus* y *Schizosaccharomyces pombe*.

35 Preferentemente, se elabora una cerveza de fermentación alta o de fermentación baja estabilizada microbiológicamente utilizando el procedimiento de la invención. La cerveza de fermentación baja se obtiene mediante una fermentación baja, en la que después de la fermentación la levadura se deposita en el fondo del recipiente donde puede ser separada. La cerveza de fermentación alta es una cerveza que se obtiene mediante fermentación alta en la que la levadura sube a la superficie al terminar la fermentación y allí es separada en la medida de lo posible.

40 Según otra realización preferente de la invención se prevé que el proceso de fermentación se lleva a cabo utilizando, como mínimo, una levadura y, como mínimo, un acidificador seleccionado del grupo formado por representantes de *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp. y *Gluconobacter* sp. Según una variante preferente de esta realización se prevé, por ejemplo, que la fermentación se lleve a cabo utilizando *S. cerevisiae* y/o *S. diastaticus* y/o *Schizosaccharomyces pombe* y un representante de *Lactobacillus*. Los lactobacilos que también se conocen como bacterias del ácido láctico son capaces de provocar la fermentación ácida de la leche. Las cervezas sin alcohol o de bajo contenido de alcohol o bebidas parecidas a la cerveza elaboradas por una fermentación de este tipo se caracterizan por un suave sabor ácido que se parece más o menos al de una "Berliner Weiße" (cerveza blanca de Berlin).

45 Según otra variante preferente de esta realización se prevé, por ejemplo, que la fermentación se lleve a cabo utilizando *S. cerevisiae* y/o *S. diastaticus* y/o *Schizosaccharomyces pombe* y un representante de *Acetobacter*. El género *Acetobacter* comprende, en el sentido más estricto, las bacterias del ácido acético que pueden formar ácido acético mediante oxidación de etanol. Confiere un sabor un poco ácido a las cervezas sin alcohol o de bajo

contenido de alcohol o a las bebidas parecidas a la cerveza que se han fabricado así, sabor que se diferencia claramente del de las bebidas obtenidas utilizando Lactobacillus.

5 Según otra variante preferente de esta realización se prevé por ejemplo que la fermentación se lleve a cabo utilizando *S. cerevisiae* y/o *S. diastaticus* y/o *Schizosaccharomyces pombe* y un representante de *Gluconobacter*. El *Gluconobacter* puede oxidar por un lado etanol para obtener ácido acético y, por otro lado, glucosa para obtener ácido glucónico. Las cervezas sin alcohol o de bajo contenido de alcohol o bebidas parecidas a la cerveza elaboradas mediante esta fermentación mixta presentan asimismo un agradable sabor ácido.

10 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención una cerveza estabilizada microbiológicamente que puede ser fabricada según el procedimiento descrito anteriormente y que, preferentemente, es fabricada de acuerdo con este procedimiento.

15 También es un objeto una cerveza sin alcohol o de bajo contenido de alcohol, una cerveza dietética, una bebida malteada, una cerveza de malta o un refresco parecido a la cerveza estabilizadas microbiológicamente que han sido fabricadas mediante el procedimiento de la invención. Según una realización preferente se trata de una cerveza sin alcohol o de bajo contenido de alcohol, clara, estabilizada microbiológicamente, o bien una cerveza sin alcohol o de bajo contenido de alcohol, oscura, estabilizada microbiológicamente.

20 Como "bebida malteada" se entiende por la presente, especialmente una bebida oscura, con aroma a malta, dulce de malta, poco lupulizada, que contiene ácido carbónico, y que además es de bajo contenido de alcohol hasta sin alcohol. Preferentemente, la bebida malteada es cocida con aproximadamente 7-8 % de mosto original a partir de la parte de malta. Tras la filtración, se ajusta preferentemente con azúcares para endulzar (glucosa, sacarosa) a 12% de mosto original (aproximadamente un tercio del mosto original).

25 Debido a las ventajas de la isomaltulosa con respecto a azúcares tradicionales, es decir, sacarosa, tales con menor poder edulcorante, mayor estabilidad microbiológica, aptitud para diabéticos, propiedades anticariogénicas, se puede elegir una porción más elevada de isomaltulosa en el mosto original.

30 Otro objeto es también una bebida mixta a base de cerveza estabilizada microbiológicamente que contiene la cerveza estabilizada microbiológicamente, según la invención, y como mínimo otro componente elegido entre: extractos de hierbas, aromas, cafeína, colorantes, aminoácidos, ácidos alimentarios, componentes frutales tales como zumo de fruta, concentrado de fruta, pulpa de fruta o extractos de fruta, azúcar, sustitutos de azúcar, tales como alcoholes de azúcar, edulcorantes intensivos, agua y aguardiente de vino (etanol). Preferentemente, la bebida mixta a base de cerveza comprende la cerveza estabilizada microbiológicamente, según la invención, y como mínimo otro componente.

40 Como "componentes de hierbas" se entienden especialmente: extractos, soluciones, extractos y esencias de partes vegetales, preferentemente de anís, raíz de valeriana, ortiga, hojas de mora, hojas de fresa, hinojo, manto de la virgen, anserina, ginseng, escaramujo, flores de hibisco, hojas de frambuesa, saúco, cebada, jengibre, hierba de San Juan, camomila, coriandro, menta verde, planta de lapacho, lavanda, hierba de limón, mejorana, malva, melisa, muérdago, menta, caléndula, romero, genciana, milenrama, tomillo, hisopo, canela, etc.

45 Como "componentes de fruta" se entiende especialmente: extractos de fruta, preferentemente a partir de manzanas, plátanos, peras, piñas, naranjas, pomelos, cerezas, guindas, limones, granadillas, melocotones, espinos amarillo, frambuesas, fresas, moras, grosellas, grosellas espinosas, kiwis, etc.

50 Preferentemente, se prevé que la bebida mixta a base de cerveza contenga sustancias olorosas y/o sustancias para dar sabores naturales o idénticos al natural como componente aromático tales como aceites etéreos a partir de plantas o frutos tales como el aceite cítrico, aceite de menta o aceite de clavo, esencias frutales, zumos de fruta aromatizantes, anís, mentol, eucalipto, etc.

55 Los componentes colorantes son preferentemente colorantes de origen vegetal tales como carotinoides, flavonoides o antocianos, colorantes de origen animal, pigmentos inorgánicos tales como pigmento de óxido de hierro, productos del bronceado enzimático y no enzimático, productos de calentamiento tales como caramelo, colorante caramelo o colorantes sintéticos tales como compuestos azo, trifenilmetano, indigoid, xanteno o quinolina. Colorantes sintéticos apropiados son por ejemplo eritrosina, carmín de índigo o tartrazina que se utilizan para corregir el color y/o para obtener un aspecto atractivo de la bebida mixta a base de cerveza de la invención.

60 Los componentes de aminoácidos son preferentemente mezclas de aminoácidos esenciales. Los aminoácidos preferentes son His, Ile, Lys, Thr, Trp, Val y taurina.

65 Los componentes de ácidos son preferentemente ácidos alimentarios. Según una realización preferente, las bebidas, según la invención, también existen como bebidas gaseosas, es decir que pueden contener ácido carbónico/dióxido de carbono.

Según una realización muy preferente, las bebidas mixtas a base de cerveza de la invención contienen también componentes de cafeína tales como preparaciones o extractos de granos de café, plantas de té o partes de las mismas, plantas de mate o partes de las mismas, nuez de cola, grano de cacao o guaraná.

5 Ejemplos de realización

La invención se explicará con más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

Las figuras muestran:

- 10 Figura 1: Concentraciones de isomaltulosa antes y después de la incubación con organismos que dañan la cerveza;
- 15 Figura 2: Concentraciones de isomaltulosa en función de diferentes factores de estabilidad;
- Figura 3: Concentraciones de isomaltulosa en muestras incubadas con *S. cerevisiae* MJJ 2;
- Figura 4: Análisis del espectro de azúcar después de siete días de incubación;
- 20 Figura 5: Concentraciones de ácidos en función de los microorganismos elegidos.
- Figura 6: Cata de valoración de las bebidas mixtas a base de cerveza que están compuestas de una cerveza de base y una limonada (nota ideal: 3): cerveza de base = Pilsen (figura 6a), cerveza de base = cerveza dietética (figura 6b), cerveza de base = Pilsen sin alcohol (figura 6c), cerveza de base = Doppelbock (figura 6d),
- 25 Figura 7: Porción de los componentes aromáticos después de la fermentación de mostos reales;
- Figura 8: Degustación que valora las cervezas de mostos reales;
- 30 Figura 9: Contenidos de isomaltulosa después de la fermentación de medios de modelo. Está remarcado el rango de valores del 5 % por encima y por debajo del valor inicial.
- Figura 10: Contenidos de isomaltulosa después de la fermentación de medios de modelo con bacterias. Está remarcado el rango de valores del 5 % por encima y por debajo del valor inicial.
- 35 Figura 11: Curvas de turbiedad en bebidas mixtas a base de cerveza contaminadas con las sustancias edulcorantes sacarosa (Sac), isomaltulosa (Pal) o una mezcla de edulcorantes (Sst) con ángulos de medición de 90° y 25°.
- 40 Figura 12: Aparición de abombamiento en botellas PET con bebidas mixtas a base de cerveza contaminadas con las sustancias edulcorantes sacarosa (Sac), isomaltulosa (Pal) o una mezcla de edulcorantes (Sst).

45 Ejemplo 1: Metabolización de isomaltulosa en el medio de modelo

1.1 Medios de modelo

50 El medio de modelo se ha elaborado de la siguiente manera: 50 g isomaltulosa fueron disueltos en 500 ml de agua bidestilada; 6,7 g de Yeast-Nitrogen-Base (YNB) fueron disueltos en 500 ml de agua bidestilada; 5 ml de la solución de isomaltulosa fueron esterilizados en autoclave en probetas con tubo Durham; la solución YNB fue esterilizada en autoclave por separado y, a continuación, fueron pipeteados 5 ml de forma estéril en cada probeta ya llenada de solución de isomaltulosa y esterilizada en autoclave.

55 En una primera carga se ajustaron los parámetros de valor pH, contenido de alcohol y ausencia de oxígeno, tal como se presentan en la cerveza envasada: 5 % de contenido de alcohol (etanol), valor pH 4,5 e incubación sin oxígeno (jarra de anaerobios). En otras cargas se fue variando los factores inhibidores del crecimiento, respectivamente, véase la tabla 1.

60 Tabla 1:

Factor	Valores de ajuste
Valor pH	3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4
Contenido en sust. amargas (isohumulonas)	10; 20; 30; 40; 50 mg/l
Contenido en alcohol	4,5; 5; 5,5; 6; 6,5 % vol

El medio de modelo no tratado tiene un pH de 5,1. Mediante 100 ml de soluciones de patrón se determinaron las cantidades en ácido sulfúrico 0,1 normal 0,05 mol/l que se necesitaron para ajustar los valores de pH deseados. Se eligió ácido sulfúrico para no aportar ninguna fuente adicional de C al medio.

5 Una solución de isohumulonas fue diluida 1:20, de manera que 10 mg de la solución contenían aproximadamente 0,1 mg de isohumulonas:

10 Solución al 20 % 1 mg de la solución contiene 0,2 mg isohumulonas
10 mg de la solución contienen 2 mg isohumulonas;

Dilución 1:20 10 mg de la solución diluida contienen 0,1 mg isohumulonas; 10 mg de la solución (0,1 mg isohumulonas) añadidos a 10 ml de la solución de patrón corresponden a 10 mg de isohumulonas por litro.

15 El contenido de alcohol fue ajustado a las respectivas concentraciones con un alcohol desnaturalizado al 96 %.

Las probetas incubadas en atmósfera aeróbica fueron cerradas con tapones de algodón, las muestras anaeróbicas fueron cerradas asimismo con tapones de algodón, pero incubadas en una jarra de anaerobios.

20 1.2 Microorganismos

Se eligió un grupo de microorganismos que se conocen por dañar la cerveza o porque en ensayos previos mostraron su capacidad de aprovechar la isomaltulosa. Estos microorganismos se muestran en la tabla 2.

25 Tabla 2:

Microorganismo	Potencial dañino para la bebida
Pediococcus damnosus	Anaeróbico, crece en presencia de alcohol y sustancias amargas del lúpulo
Lactobacillus brevis	Anaeróbico, crece en presencia de alcohol y sustancias amargas del lúpulo, muy a menudo responsables del deterioro de la cerveza
Megasphera cerevisiae	Fuertemente anaeróbico, crece en presencia de alcohol y sustancias amargas del lúpulo
Pectinatus frisenqensis	Fuertemente anaeróbico, crece en presencia de alcohol y sustancias amargas del lúpulo
Schizosaccharomyces pombe	Fermenta la isomaltulosa, además de otros azúcares, rápida y completamente
Saccharomyces diastaticus	Es capaz de fermentar dextrinas (los denominados sobrefermentadores)
Saccharomyces cerevisiae MJJ 2	Fermenta la isomaltulosa, además de otros azúcares, rápida y completamente

30 Los microorganismos fueron atraídos en 100 ml de caldo de cultivo, después lavados con una solución de isomaltulosa y resuspendidos en 5 ml de solución de isomaltulosa. Las probetas fueron incubadas con 0,5 ml de la solución resuspendida. La incubación se realizó a 26° C.

35 1.3 Análisis

Como indicador del crecimiento se valoró la aparición de turbiedad y la formación de gas en las probetas. Para detectar que efectivamente se produce una degradación de isomaltulosa, el extracto fue medido antes y después de la incubación y se determinó mediante medición de extinción durante la reacción con ácido dinitrosalicílico (DNS) el contenido en azúcares reductores antes y después de la incubación.

40 La medición de extracto de la solución se realizó a través de la determinación de la densidad mediante un resonador de flexión (empresa Anton-Paar).

45 El contenido en isomaltulosa se determinó mediante la reducción de ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Debido a ello, resulta en la solución un cambio de color de amarillo a marrón rojizo. La concentración de un azúcar reductor puede determinarse cuantitativamente debido a este cambio de color. Dado que la isomaltulosa es el único azúcar en el medio de prueba (al contrario de los medios reales, tal como el mosto), se puede determinar la concentración de isomaltulosa antes y después de la incubación con el método DNS.

50 En 50 ml de agua destilada fueron disueltos 30 g de tartrato Na-K y se añadió 20 ml NaOH (2 mol/l). A esta solución se añadió con agitación 1 g de ácido dinitrosalicílico (DNS). A continuación, se rellenó con agua destilada a 100 ml.

Se presentaron 0,25 ml de la solución a examinar en una probeta y se mezclaron con 0,25 ml de la solución DNS. Ambas soluciones fueron calentadas conjuntamente durante cinco minutos al baño maría hirviente. Una vez enfriado, se añadió 9 ml de agua (destilada) y tras la mezcla se midió la extinción a 546 nm. Una vez establecida

una recta de calibrado se pudo detectar así la concentración de isomaltulosa en la solución de patrón antes y después de la incubación.

5 Se mostró que una recta de calibrado detectada presentaba la mayor precisión en un rango de concentración de menos del 1,5 % de azúcar en la solución. Correspondientemente, las muestras a medir fueron diluidas 1:5 antes de la medición, a efectos de alcanzar el rango de la máxima precisión con un 5 % teórico de isomaltulosa (antes de la incubación) en la solución.

10 1.4 Resultados

En la tabla 3, se muestra los resultados de la valoración visual del crecimiento por medio de los parámetros aparición de turbiedad y formación de gas (n.b.: no observado, +: aparición de turbiedad y/o formación de gas; -: sin turbiedad ni formación de gas).

15 Tabla 3:

	pH 4,5	Alcohol 5 % v/v	Anaeróbico
Schizosaccharomyces pombe	+	+	+
Saccharomyces cerevisiae MJJ 2	+	+	+
Saccharomyces diastaticus	+	+	+
Lactobacillus brevis	-	-	-
Pediococcus damnosus	-	-	-
Pectinatus frisingensis	n.b.	n.b.	+
Megasphaera cerevisiae	n.b.	n.b.	+

20 Valorado según los criterios de la aparición de turbiedad y la formación de gas, en todas las levaduras hubo crecimiento bajo todas las condiciones. En Saccharomyces diastaticus, sin embargo, sólo se observó la aparición de turbiedad sin formación de gas acompañante. Esto es inusual en una levadura en fermentación. Pectinatus frisingensis y Megasphaera cerevisiae fueron capaces en condiciones anaeróbicas de desarrollar turbiedad y en Lactobacillus brevis y Pediococcus damnosus no se desarrollaron indicios de crecimiento.

25 A lo largo del tiempo de incubación se documentaron visualmente los parámetros de aparición de turbiedad y formación de gas. Los resultados observados se describirán a continuación:

1.4.1 *Pediococcus brevis*, *Lactobacillus brevis*, *Megasphaera cerevisiae*, *Pectinatus frisingensis*

30 En ninguna de las cargas inoculadas se pudo observar ni aparición de turbiedad ni formación de gas.

1.4.2 *Schizosaccharomyces pombe*

35 Ya tras pocos días se observó la formación de gas en algunas cargas. Sin embargo, no se pudo observar ninguna regularidad según las concentraciones de los parámetros variados. Tras una semana de incubación, se había formado en general la cantidad de gas máxima que pueden detectar los tubos Durham y, en algunas cargas, la levadura empezó a sedimentar.

1.4.3 *Saccharomyces diastaticus*

40 Esta levadura producía, en el transcurso de la primera semana, una ligera turbiedad cuya intensidad aumentó en la segunda semana. La aparición de turbiedad fue retrasada visiblemente por concentraciones de alcohol de 6% y 6,5 %. Asimismo, con un pH 3,6 también se constató que al turbiedad empezó a aparecer sólo tres días después de que se observara la aparición de turbiedad con valores de pH más altos. Pareció remarcable que grandes partes de la masa celular que se formaba se encontraban en la superficie del líquido, tanto en cargas sometidas a incubación aeróbica, como en cargas sometidas a incubación anaeróbica. En ninguna carga la levadura dio lugar a la formación de gas en las primeras tres semanas. En el transcurso de las segunda y tercera semanas la levadura sedimentaba por completo, menos la sustancia celular adherente al vidrio en la superficie del líquido.

50 La observación microscópica de las células de levadura sedimentadas tanto en el borde como también en el fondo muestran una gran porción en células inusualmente pequeñas. Tras realizar un frotis de las pequeñas células cosechadas en un agar de mosto se observaron otra vez células de tamaño normal. Debido a ello, se concluye que Saccharomyces diastaticus tiende a crecer escasamente cuando isomaltulosa es la única fuente de hidratos de carbono disponible.

55 1.4.4 *Saccharomyces cerevisiae MJJ 2*

La adición de alcohol en una concentración del 6,5 % retrasa la aparición de turbiedad hasta el inicio de la segunda

semana, la formación de gas se produjo sólo a mediados de la segunda semana. En bajas concentraciones, el alcohol aparentemente no dificultó el crecimiento de la levadura. Bajar el pH tampoco tuvo el efecto de dificultar el crecimiento hasta que no se bajó a un valor de 3,8. Con un pH de 3,6 se formaron turbiedad y gas sólo a mediados de la segunda semana. Mediante la adición de lúpulo también se retrasó la aparición de turbiedad y la formación de gas hasta la segunda semana de incubación. La formación de gas pareció menor que en las demás series. En las cargas sometidas a incubación anaeróbica, la actividad de crecimiento se desarrolló más lentamente que en las muestras sometidas a incubación anaeróbica. Tras haberse sedimentada la levadura durante la tercera semana, el volumen del gas formado se quedó atrás con respecto al de las muestras aeróbicas.

1.4.5 Consideración general

En la figura 1, se muestra las concentraciones de isomaltulosa detectadas mediante ensayo DNS de todas las cargas sin incubación, y después de tres semanas de incubación anaeróbica sin factores conservantes (incubación anaeróbica, sin factores conservantes, tres semanas de incubación a 26° C).

A excepción de las cargas incubadas con *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2, todos los valores se encuentran en un rango de variación de menos del 5 % con respecto a la concentración medida de la solución de patrón sin incubar.

Esto se interpreta de manera que sólo las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 y *Schizosaccharomyces pombe* eran capaces de degradar la isomaltulosa en el período observado en una atmósfera anaeróbica sin factores conservantes añadidos. *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 redujo el contenido de isomaltulosa en la solución de patrón en un 26 %, mientras que *Schizosaccharomyces pombe* pudo metabolizar la isomaltulosa por completo.

Las bacterias examinadas sólo fueron incubadas anaeróticamente, en ninguna carga se detectó una degradación de isomaltulosa. Las levaduras también fueron incubadas aeróticamente. También en condiciones aeróbicas, *Schizosaccharomyces pombe* metabolizó la isomaltulosa por completo, en todos los parámetros de conservación y en todas las concentraciones.

En la figura 2, se muestra las concentraciones de isomaltulosa medidas mediante el método DNS en las muestras incubadas con *Saccharomyces diastaticus* (valores medios de las series tras tres semanas de incubación a 26° C). Los resultados se muestran como valores medios de los diferentes factores de conservación.

Saccharomyces diastaticus mostró también en condiciones aeróbicas la capacidad de metabolizar la isomaltulosa. En esta serie de medición, se produjeron variaciones en las concentraciones medidas que sobrepasaron un margen de error del 5 %. En concentraciones medidas de más del 5% de isomaltulosa, se presupone de que a lo largo del tiempo de incubación se evaporan pequeñas cantidades de agua de la solución. Por esta razón, estos valores medidos sólo han de considerarse como una tendencia.

En la figura 3, se muestran concentraciones de isomaltulosa medidas mediante el método DNS en las muestras incubadas con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 (valores medios de las series de factores selectivos incubadas aeróticamente, en comparación con la incubación anaeróbica a 26° C).

Saccharomyces cerevisiae MJJ 2 mostró un mejor aprovechamiento de la isomaltulosa en una atmósfera aeróbica que en ausencia de oxígeno. En la figura se reconoce claramente que la variación del pH y la adición de alcohol no son capaces, dentro del marco examinado aquí, de inhibir la metabolización de isomaltulosa por parte de esta levadura. Sin embargo, se dificulta el aprovechamiento de isomaltulosa para *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 en presencia de sustancias amargas del lúpulo y en ausencia de oxígeno.

Ejemplo 2: Cerveza dietética comercial es cargada de isomaltulosa

Cerveza dietética comercial (aquí: Pilsen dietética de Henninger) ha sido cargada de isomaltulosa en una cantidad tal que el contenido del extracto residual real era del 4 % g/g. En esta cerveza todos los factores selectivos propios de la cerveza están presentes de forma combinada. Seguidamente, la cerveza dietética que contiene isomaltulosa fue incubada con los microorganismos de prueba (ejemplo 1, tabla 2) durante siete días a 26° C. La serie de ensayos fue acompañada analíticamente, realizando análisis de los mostos y de las cervezas según las prescripciones para métodos analíticos para la industria cervecera de la comisión de análisis centroeuropea e.V. (asociación registrada, MEBAK) y midiendo adicionalmente los espectros de sacáridos. El aprovechamiento de isomaltulosa ha sido detectado mediante el análisis del espectro de sacáridos y ácidos, ya que en la solución real, cerveza, se encuentran además de la isomaltulosa también otros azúcares reductores. Antes de realizar el análisis, se separaron los microorganismos de prueba mediante filtración por membrana (0,45 µm) para establecer un estado estable. La medición del espectro de ácidos y sacáridos se realizó mediante el método HPLC/GC del modo en sí conocido.

En la tabla 4, se muestra en qué cargas se ha observado crecimiento debido a la aparición de turbiedad (- = sin turbiedad, + = turbiedad, ++ = fuerte turbiedad).

Tabla 4:

Cerveza dietética más isomaltulosa inoculada con:	Turbiedad (tras 7 días)
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MJJ 2	++
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+
<i>Pectinatus frisingensis</i>	++
<i>Pediococcus damnosus</i>	-
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	++
<i>Lactobacillus brevis</i>	-

5 Dentro del período observado, *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus brevis* no mostraron crecimiento (turbiedad de la muestra), *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces diastaticus* provocaron solamente una ligera turbiedad. *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2, *Pectinatus frisingensis* y *Megasphaera cerevisiae* eran capaces de desarrollar una fuerte turbiedad.

10 En la figura 4, se muestran los resultados del análisis del espectro de azúcares de las cervezas dietéticas tras siete días de incubación a 26° C.

15 En cerveza cero (= cerveza dietética comercial sin adición de isomaltulosa), no se encontró ninguno de los azúcares analizados. Es decir, que allí no hay azúcares aprovechables de bajo peso molecular. En la cerveza dietética sin incubar, pero cargada de isomaltulosa, se han encontrado además de 22,5 g/l de isomaltulosa sólo trazas de fructosa y glucosa. En las cervezas incubadas, a excepción de la cerveza incubada con *Schizosaccharomyces pombe*, se han encontrado en el marco de las precisiones de medición y pesada las mismas concentraciones de isomaltulosa que en la cerveza sin incubar (desviaciones < 5 %). Asimismo, sólo se han formado concentraciones medibles de glucosa y fructosa en cerveza incubada con *Schizosaccharomyces pombe*.

20 En la tabla 5, se muestran las concentraciones de isomaltulosa de cada una de las cervezas y la correspondiente proporción con respecto a la concentración inicial.

Tabla 5:

Muestra	Concentraciones de isomaltulosa tras la incubación (%)
Cerveza dietética comercial, no modificada	0
Cerveza dietética comercial + isomaltulosa (= H+P)	100
H+P incubada con <i>Saccharomyces diastaticus</i>	100
H+P incubada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MJJ 2	100
H+P incubada con <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	83
H+P incubada con <i>Pectinatus frisingensis</i>	100
H+P incubada con <i>Pediococcus damnosus</i>	100
H+P incubada con <i>Megasphaera cerevisiae</i>	100
H+P incubada con <i>Lactobacillus brevis</i>	100

30 Tras la separación de los microorganismos mediante filtración por membrana, en todas las cervezas inoculadas existía todavía la concentración inicial de isomaltulosa. La única excepción fue la cerveza que había sido incubada con *Schizosaccharomyces pombe*. En este caso hubo una reducción en 17 % y también fue el único caso en el que se encontró una concentración medible de glucosa y fructosa, los productos de disociación de la isomaltulosa. El crecimiento celular detectado por medio de la aparición de turbiedad sólo tuvo lugar, por lo tanto, en el caso de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* basado en la isomaltulosa.

35 Además, se midió los valores pH de las cervezas incubadas. Todos los valores estuvieron en 4,5 o 4,6. Este resultado junto con el análisis del espectro de ácidos de las muestras mostró que ninguno de los microorganismos incubados en las muestras había formado un ácido, y prueba adicional y específicamente para los lactobacilos que no se produjo ningún crecimiento. Un factor importante para el deterioro de las bebidas por lactobacilos es la formación de ácido láctico que puede perjudicar fuertemente el aroma de la bebida en cuestión.

40 En la figura 5, se pueden ver los resultados del análisis del espectro de ácidos. Los contenidos en los ácidos medidos no se mueven en concentraciones elevadas fuera de lo normal. Sólo en la muestra incubada con *Pectinatus frisingensis* se encuentran contenidos ligeramente más elevados de ácido succínico y ácido acético con respecto a las muestras sin incubar. Con 0,3 g/l, los valores son reducidos. En lo que se refiere al contenido en ácido láctico (lactato) cabe señalar que el mismo es más reducido en las muestras incubadas con *Pectinatus frisingensis*, *Pediococcus damnosus* y *Megasphaera cerevisiae* en comparación con la muestra cero. Al faltar un sustrato aprovechable, aparentemente, se ha metabolizado el lactato, un proceso descrito en la literatura en el que se utiliza el lactato como sustrato para la gluconeogénesis. En la muestra incubada con *Lactobacillus brevis* se ha medido el

mismo contenido como en las pruebas sin incubar. Es decir que ni se metabolizó lactato, ni tampoco se formó lactato nuevo por la metabolización de la bacteria. Esto es valorado como otro indicio para la ausencia de actividad metabólica de esta bacteria.

5 Ejemplo 3 (no según la invención): Elaboración de “cerveza dietética”

Como “cerveza dietética” se entiende una cerveza que de forma ideal presenta en el producto acabado sólo isomaltulosa como hidrato de carbono.

10 Dado que para la fabricación de cervezas dietéticas es de vital importancia macerar intensamente, se utilizó a título ejemplar un proceso de maceración en el que se hace mucho hincapié en las temperaturas óptimas de las enzimas de la malta que degradan el almidón:

- Inicio de maceración a 50° C, 15 min de reposo
- 15 - Calentamiento a 55° C (1° C/min), 30 min de reposo
- Calentamiento a 62° C (1° C/min), 45 min de reposo
- Calentamiento a 65° C (1° C/min), 45 min de reposo
- Calentamiento a 68° C (1° C/min), 30 min de reposo
- Calentamiento a 70° C (1° C/min), 30 min de reposo
- 20 - Calentamiento a 72° C (1° C/min), 20 min de reposo
- Calentamiento a 78° C (1° C/min),
- Final de maceración

25 La carga de malta estaba formada de 100 % malta de Pilsen, se agregó lúpulo en una dosis de 90 mg α -ácido/l de mosto de bombeo, formado por extracto de CO₂.

Una parte fue fabricada como ejemplo de comparación sin adición de isomaltulosa, catada y analizada. Esta cerveza representa a la “cerveza cero”. A otra parte de la cerveza se añadió isomaltulosa durante la cocción, debido a lo cual se encontraba isomaltulosa en la cerveza durante la fermentación principal.

30 Dicha fermentación principal se realizó sin presión con la levadura de fermentación baja *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 de 15° hasta 19° C. Hacia el final de la fermentación se elevó la temperatura, a efectos de reducir en la medida de lo posible el contenido en extracto del mosto. Una vez alcanzado el grado de fermentación final determinado previamente la cerveza es bombeada a través de tuberías a los tanques de almacenamiento.

35 La serie de ensayos fue acompañada analíticamente, realizando análisis de los mostos y de las cervezas, según las prescripciones para métodos analíticos para la industria cervecera de la comisión de análisis centroeuropea e.V. (MEBAK) y midiendo adicionalmente los espectros de sacáridos. En cuanto al aroma de las cervezas, se midieron los contenidos en ésteres seleccionados, aromáticamente activos y alcoholes superiores, así como el acetaldehído. 40 Asimismo se detectaron analíticamente los contenidos en ácidos de las cervezas acabadas, y las mismas fueron catadas comparándolas entre sí y evaluándolas.

45 En la cerveza dietética fabricada según la invención, no se aprecia ningún menoscabo de las características sensoriales tales como la calidad del olor, la calidad del sabor, la plenitud de sabor en boca, el burbujeo y la calidad del sabor amargo (amargor). En muchos casos, la cerveza dietética según la invención fue preferida en lugar de la cerveza dietética conocida (aquí: Pilsen dietética de Henninger).

Ejemplo 4 (no según la invención): Elaboración de “cerveza con reducido contenido de alcohol”

50 Se sustituyen partes del mosto original por isomaltulosa, de manera que con una fermentación “normal” se genera menos alcohol que con una cerveza completa tradicional. En el proceso descrito anteriormente en relación con el ejemplo 3, la maceración se llevó a cabo de tal manera que se pudo alcanzar al máximo grado de fermentación posible. Debido a la fermentación completa de los hidratos de carbono alcanzables se genera naturalmente un alto contenido en alcohol. Por este motivo, en este ejemplo se hizo servir un programa de maceración más breve y 55 menos intensivo y, por lo tanto los hidratos de carbono de la malta no fueron transformados completamente en azúcar fermentable:

- Inicio de maceración a 62° C, sin reposo
- Calentamiento a 66° C (1° C/min), 30 min de reposo
- 60 - Calentamiento a 72° C (1° C/min), 20 min de reposo
- Calentamiento a 78° C
- Final de maceración

65 Sustituyendo aproximadamente una cuarta parte del mosto original por isomaltulosa en el momento de la cocción, se pretende reducir el sustrato disponible para la levadura. De esta manera, se puede elaborar una cerveza que, comparada con cervezas completas tradicionales, contiene menos alcohol. La adición de lúpulo se realizó igual que

en las cervezas dietéticas a 90 mg de α -ácido por litro de mosto de bombeo.

La fermentación principal se realizó sin presión con la levadura de fermentación baja *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 a 12° C. El bombeo a los tanques de maduración se realizó con un contenido de extracto que supero en aproximadamente 1,5 % el extracto esperado en la fermentación final.

La analítica acompañante (según MEBAK y específica para el aroma) correspondía a la del ejemplo 3.

Igual que en el ejemplo 3, en la cerveza sin alcohol elaborada según la invención, no se aprecia ningún menoscabo de las características sensoriales. En muchos casos, la cerveza sin alcohol según la invención, fue preferida a la cerveza sin alcohol conocida.

Ejemplo 5 (no según la invención): Elaboración de una "bebida malteada"

Dado que una bebida malteada sólo debería ser elaborada con una fermentación muy incompleta, no era necesario aplicar un programa de maceración para un grado de fermentación lo más alto posible. Se hizo servir el mismo programa de maceración que en el ejemplo 4.

Para conseguir que el color del producto fuera tan oscuro como suele ser habitual en cervezas de malta, se utilizó la siguiente mezcla de malta:

- 40 % de malta Pilsen
- 30 % de malta de Múnich
- 20 % de malta Cara
- 10 % de malta de color

El mosto original se ajustó de tal manera que se obtuvo la mitad del extracto a partir de la malta, mientras que la otra mitad fue añadida en forma de isomaltulosa (azúcar cristalizado) a la cocción. En total, se ajustó al mosto original a 12 %. La adición de lúpulo se realizó a 15 mg de α -ácido/l de mosto de bombeo.

Tras la separación de los turbios calientes la bebida malteada fue vertida en un pequeño barril y tras ser enfriada fue cargada con poca levadura (*Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11). Después de medio día de tiempo de contacto a 0° C, la levadura fue separada en gran parte mediante el trasvase a presión a otro tanque de almacenamiento. Este tipo de fermentación atiende al denominado proceso de contacto en frío. Tras dos semanas de almacenamiento se realizó el filtrado y el envasado.

Las bebidas malteadas obtenidas fueron evaluadas tanto a nivel sensorial como también analítico (según MEBAK y específico para el aroma) igual que en los ejemplos 3 y 4, y fueron comparadas con cervezas malteadas comerciales.

Igual que en los ejemplos 3 y 4, en la bebida malteada elaborada según la invención, tampoco se aprecia ningún menoscabo de las características sensoriales. En muchos casos, la bebida malteada según la invención, fue preferida a cervezas malteadas conocidas.

Ejemplo 6: Elaboración de bebidas mixtas a base de cerveza

6.1 Cargas

Se elaboraron doce bebidas mixtas a base de cerveza diferentes a partir de componentes de cerveza y limonada a escala de 10 litros, variando cada vez la componente de cerveza y la sustancia endulzante en la parte de limonada.

Para los ensayos, se eligieron los siguientes cuatro tipos de cerveza diferentes (también con miras a ensayos posteriores con respecto a la estabilidad biológica de las bebidas):

- Una cerveza Pilsen, para simular las bebidas mixtas a base de cervezas habituales en el comercio.
- Una cerveza dietética, con un contenido muy reducido en hidratos de carbono residuales. Debido a la práctica ausencia de hidratos de carbono propios aprovechables, en este caso la sustancia endulzante utilizada en la parte de limonada resulta decisiva para la plenitud de sabor en boca. Además falta sustrato propio de cerveza en contaminaciones eventuales.
- Una cerveza Pilsen sin alcohol. La bebida mixta a base de cerveza elaborada con esta cerveza no contiene el factor selectivo alcohol, y asimismo falta la influencia del alcohol para que la bebida mixta a base de cerveza tenga plenitud de sabor en boca.
- Una cerveza Doppelbock. Ésta tiene en comparación con cervezas completas, un contenido de alcohol más

elevado y, por otro lado, un contenido en extracto residual más elevado que representa un sustrato adicional además del edulcorante de la limonada para eventuales contaminantes.

5 La parte de limonada ha sido elaborada a partir de una base con aroma de lima-limón de la empresa Wild, nº de prod. 3-110050331 y ácido cítrico. Como sustancia endulzante su utilizó:

- Sacarosa,
- Isomaltulosa,
- 10 • Una mezcla de edulcorantes de la empresa Wild (Sweet Up; compuesta de ciclamato, sacarina, aspartamo y acesulfame K).

15 La mezcla de edulcorantes fue elegida ya que este producto se utiliza a gran escala industrial en la fabricación de bebidas mixtas a base de cerveza y, por lo tanto, resulta práctico. Además, se compensan los inconvenientes que algunos componentes suponen para el sabor mediante la mezcla de edulcorantes. Se utilizó ácido cítrico para la acidificación.

20 Una vez pesados, los ingredientes fueron puestos en solución en agua cervecera.

La variación de las diferentes sustancias edulcorantes y las cervezas dio lugar a las siguientes cargas del ensayo para bebidas mixtas a base de cerveza:

Tabla 6:

25

12 cargas de ensayo para bebida mixta a base de cerveza y limonada			
Pilsen	Isomaltulosa	Pilsen dietética	Isomaltulosa
	Sacarosa		Sacarosa
	Edulcorante		Edulcorante
Pilsen sin alcohol	Isomaltulosa	Doppelbock	Isomaltulosa
	Sacarosa		Sacarosa
	Edulcorante		Edulcorante

30 La sacarosa y la mezcla de edulcorantes fueron dosificadas del modo en sí conocido y según las recomendaciones de la empresa Wild Flavours. La isomaltulosa fue dosificada ajustando, después de catar, el mismo poder edulcorante que en otras limonadas. Se vertieron la cerveza y la limonada juntas en un barril tipo “Keg” de 30 litros, se mezcló y a continuación se carbonató. La carbonatación se realizó mediante introducción de CO₂ por la trayectoria del líquido de la cabeza del grifo. Para la fijación de CO₂, los barriles cargados de una presión de gas de 1,8 bar fueron almacenados a 0° C durante 24 horas. Tras almacenamiento en frío, la presión del barril era todavía de 0,8 – 0,9 bar.

35 6.2 Evaluación

Se realizaron catas triangulares con preferencia (según MEBAK) con 10 catadores. Con la misma cerveza de base se realizaron catas comparando las variantes con diferentes edulcorantes entre sí. Se quiso averiguar que edulcorante era preferido sensorialmente. Se tenía que detectar la muestra divergente y anotar la preferencia respectiva. Sólo si la muestra divergente fue asignada correctamente, se valoraría también la preferencia.

45 Asimismo se realizaron catas de valoración con las bebidas mixtas a base de la cerveza que se habían elaborado. A tal efecto, se aplicó un esquema propio. Mediante la valoración, se intentaría diferenciar las impresiones gustativas en función de las diferentes sustancias edulcorantes utilizadas en la bebida mixta a base de cerveza. Resulto ser de crucial importancia la impresión gustativa del dulzor, que podía ser valorada tanto positiva como negativamente, igual que las otras características también. Además del dulzor existían los siguientes criterios de valoración:

50 Plenitud de sabor en boca, amargor, frutado, acidez, armonía (relación dulzor/acidez) y frescura. Las valoraciones tenían grados de 1 al 5, representando el “3” el valor a alcanzar. Valores por encima representaban impresiones gustativas demasiado intensas tales como, por ejemplo “demasiado dulce”. Valores por debajo del “3” representaban impresiones gustativas demasiado flojas tales como, por ejemplo “no bastante dulce”. De esta manera el catador pudo valorar también la calidad de cada uno de los criterios más precisamente. La valoración del frescor fue graduada sólo del 1 al 3, donde 3 significa “refrescante” y 1 “no refrescante”. Finalmente, se valoró la calidad total: números enteros del 1 (= peor resultado) al 5 (= mejor resultado).

55

6.3 Resultados

6.3.1 Análisis químico-técnicos

A continuación están representados los análisis de los componentes individuales de las limonadas.

5

Tabla 7:

Análisis del agua utilizada para la fabricación de la parte de limonada		
Dureza total	dH	0,5
Dureza del calcio	dH	0
Alcalinidad residual	dH	0,924
Valor pH		6,7
Valor p		0
Valor m		0,33
Conductividad	µS/ cm	47

El agua se caracteriza por su muy poca dureza después del tratamiento, que es lo que se requiere de forma ideal para la elaboración de bebidas mixtas a base de cerveza acidificadas.

10

Tabla 8:

Análisis de las cervezas de base utilizadas					
		Pilsen	Pilsen dietético	Pilsen sin alcohol	Doppelbock
Mosto original	% peso	11,23	9,32	5,27	18,65
Contenido de alcohol	% vol	5,02	4,83	0,41	8,46
Extracto, aparente	% peso	1,76	0,01	4,46	3,47
Valor pH		4,35	4,56	4,35	14,72
Unidades de amargor	BU	31	19	26	25

15

Se reconoce claramente que, a diferencia de la cerveza Pilsen, la cerveza dietética contiene notablemente menos extracto residual aparente (hidratos de carbono), la cerveza sin alcohol contiene menos alcohol presentando un extracto residual parecido y la cerveza Doppelbock contiene claramente más alcohol como también más extracto residual. La cerveza dietética contiene menos unidades de amargor, lo cual podría tener un efecto negativo en el caso de una contaminación con microorganismos que dañan la cerveza.

20

Entre los valores de pH medidos los más bajos se han medido en la cerveza Pilsen y en la Pilsen sin alcohol, y la cerveza Doppelbock presentó el valor más elevado.

En las siguientes tablas se reflejan los análisis de las bebidas mixtas a base de cerveza acabadas.

25

Tabla 9:

Análisis de las bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen como cerveza de base				
		Isomaltulosa	Sacarosa	Edulcorante
Extracto, aparente	% peso	11,20	4,91	0,97
Alcohol	% vol	2,60	2,68	2,53
Valor pH		3,39	3,39	3,41
Unidades de amargor	BU	15	15	15

Tabla 10:

Análisis de las bebidas mixtas a base de cerveza con la cerveza dietética como cerveza de base				
		Isomaltulosa	Sacarosa	Edulcorante
Extracto, aparente	% peso	10,27	4,01	0,14
Alcohol	% vol	2,52	2,54	2,49
Valor pH		3,46	3,47	3,48
Unidades de amargor	BU	12	11	12

30

Tabla 11:

Análisis de las bebidas mixtas a base de cerveza con la cerveza sin alcohol como cerveza de base				
		Isomaltulosa	Sacarosa	Edulcorante
Extracto, aparente	% peso	12,53	6,26	2,40
Alcohol	% vol	0,04	0,06	0,05

		Isomaltulosa	Sacarosa	Edulcorante
Valor pH		3,49	3,52	3,52
Unidades de amargor	BU	13	13	13

Tabla 12:

Análisis de las bebidas mixtas a base de cerveza con Doppelbock como cerveza de base				
		Isomaltulosa	Sacarosa	Edulcorante
Extracto, aparente	% peso	12,55	6,26	2,41
Alcohol	% vol	3,85	3,79	3,91
Valor pH		3,81	3,82	3,81
Unidades de amargor	BU	12	11	12

5 Se reconocen claramente las diferencias en los valores de los análisis debido a las diferentes cervezas de base. Todos los valores de pH de las bebidas mixtas a base de cerveza se sitúan por debajo de los de las cervezas de base, debido al ácido cítrico de la parte de limonada.

10 Debido a la dilución con la limonada sólo hay aproximadamente la mitad de las unidades de amargor comparado con las cervezas de base. Debido a esta “reducción por la mitad” se reduce la influencia del escaso amargor de salida de la cerveza dietética y los valores de amargor de las bebidas mixtas se sitúan todos en un orden de magnitud parecido. Los contenidos de alcohol de las bebidas mixtas a base de cerveza han sido medidos de acuerdo con las cervezas de base; las bebidas elaboradas con la cerveza sin alcohol contienen menos de 0,1 % en vol. de alcohol y han de ser consideradas por lo tanto como sin alcohol igual que la cerveza de base. Las bebidas con la cerveza Pilsen o la cerveza dietética utilizadas presentan alcohol aproximadamente del 2,5 % o escasamente 2,7 % en vol. y el valor de las bebidas mixtas elaboradas con la cerveza Doppelbock es de escasamente 4 % en vol. Este valor es parecido a los de bebidas normales de cerveza pura. Los contenidos de extracto medidos corresponden asimismo a las cervezas de base, sin embargo el contenido de extracto más alto lo presentan las bebidas endulzadas con isomaltulosa, respectivamente, debido a la adición aumentada con respecto a la sacarosa. Las bebidas que contienen sacarosa presentan los segundos extractos más elevados, las mezclas endulzadas con los edulcorantes el más bajo. En total, las bebidas a base de cerveza dietética presentan el menor contenido de extracto, seguido de las bebidas mixtas con la cerveza Pilsen. Curiosamente, las cervezas de base Doppelbock y la cerveza sin alcohol dieron como resultado aproximadamente los mismos contenidos en extracto residual, dado que la cerveza sin alcohol aparentemente contenía todavía extracto residual no fermentado. Debido a la aptitud para diabéticos de la cerveza dietética, resulta que también las bebidas mixtas que contienen la mezcla de edulcorantes (casi sin calorías) y la isomaltulosa (índice glucémico más bajo) son aptos para diabéticos.

6.3.2 Cata

30 En las tablas se muestran los resultados de las catas de tres vasos con asignación de clasificación, en las que se pretendía detectar cual de las sustancias edulcorantes era preferente utilizando la misma cerveza de base.

Las catas fueron realizadas por diez personas respectivamente; dado que tres sustancias edulcorantes son el objeto de examinación, resultaron en total treinta catas a evaluar por cada cerveza de base.

Tabla 13:

Cata de tres vasos con asignación, bebidas mixtas a base de cerveza con diferentes cervezas de base (se requieren 15 asignaciones correctas para adquirir un nivel significativo del 95 % ($\alpha = 0,05$))				
	Pilsen	Pilsen dietética	Pilsen sin alcohol	Doppelbock
Se prefirió isomaltulosa	5	8	8	9
Se prefirió sacarosa	2	5	9	7
Se prefirieron edulcorantes	8	4	2	1
Correctos	15	17	19	17
Alfa (0,05)	15	15	15	15

40 En bebidas mixtas a base de cerveza utilizando Pilsen como cerveza de base se asignaron correctamente 15 catas, por lo tanto las diferentes bebidas mixtas a base de cerveza son significativamente diferentes en función de la sustancia endulzante utilizada. De las 15 asignaciones correctas se prefirió 8 veces la bebida que contenía edulcorante, 5 veces aquella que contenía isomaltulosa. 2 catadores prefirieron la bebida mixta a base de cerveza endulzada con sacarosa y con Pilsen como cerveza de base.

45 De las bebidas mixtas a base de cerveza con cerveza dietética como cerveza de base se prefirió más a menudo la

bebida con isomaltulosa, la bebida mixta a base de cerveza que contenía edulcorantes es la que menos veces ha sido elegida como la mejor.

5 19 catadores de la bebida mixta elaborada con cerveza sin alcohol asignaron correctamente las muestras coincidentes en la cata de tres vasos y, por lo tanto, fueron evaluadas 19 valoraciones. Al utilizar Pilsen sin alcohol como cerveza de base, los endulzamientos mediante ambos azúcares fueron preferidos un número parecido de veces, ambos fueron valorados como claramente mejores que la mezcla de edulcorantes.

10 17 valoraciones de la bebida mixta con la cerveza Bock fueron sometidas a evaluación. La sensación más agradable la produjo el endulzamiento con isomaltulosa, seguida de sacarosa. Un sólo catador percibió como más agradable el endulzamiento con edulcorantes con esta cerveza de base.

15 En total, con las cuatro cervezas de base diferentes se percibió aproximadamente tanto el mismo número de veces los azúcares isomaltulosa y sacarosa como el endulzamiento más agradable (la isomaltulosa fue preferida más veces), la utilización de la mezcla de edulcorantes fue la que menos se prefirió.

6.3.2.1 Perfiles aromáticos

20 En la figura 6 se muestran los resultados de las catas de valoración.

25 Los perfiles aromáticos de las diferentes bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen como cerveza de base (figura 6a) se parecen mucho. Se pueden ver diferencias notables en los parámetros de amargor y acidez. En este aspecto, aquellas bebidas que han sido endulzadas con edulcorantes obtuvieron valores que estaban por encima del óptimo. Por lo visto, el endulzamiento con los azúcares sacarosa e isomaltulosa compensa estas impresiones gustativas de forma más eficaz que la mezcla de edulcorantes.

30 También en las bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen dietética como cerveza de base (figura 6b) los perfiles aromáticos se parecen. También en este caso, las impresiones gustativas amargor y acidez han sido realizadas más fuertemente cuando se endulzó con edulcorantes, y estos parámetros fueron percibidos como los menos intensos en las bebidas endulzadas con isomaltulosa. La cerveza endulzada con sacarosa obtuvo por poco la peor valoración para el parámetro de la plenitud de sabor en boca. En su conjunto la plenitud de sabor en boca fue valorado, tal como se esperaba, claramente peor que en las bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen como cerveza de base.

35 En las bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen sin alcohol como cerveza de base (figura 6c) a penas se han detectado diferencias significativas en el perfil aromático. La cerveza endulzada con isomaltulosa obtuvo notas ligeramente mejores en los parámetros frutado, plenitud y armonía. La impresión de acidez más fuerte se percibió donde se habían aplicado los edulcorantes, sin embargo también la impresión de dulzor era la más fuerte en este caso y en algunos casos aislados, la impresión de dulzor fue percibido como demasiado fuerte.

40 Observando los resultados de la cata de valoración de bebidas mixtas a base de cerveza con Doppelbock como cerveza de base, se reconoce que los perfiles aromáticos de las bebidas elaboradas con esta cerveza se diferencian bastante claramente de las bebidas con las demás cervezas de base. Tanto la plenitud y la armonía, como también la impresión de dulzor sobrepasan en este caso la nota ideal 3, es decir que se valoraron como demasiado sobresaliente o divergente del ideal. Los amargores, sin embargo, se percibieron claramente menos fuertes, a pesar de que, en comparación la cerveza de base poseía unidades de amargor más elevadas que la cerveza dietética. La impresión aromática de la cerveza Bockbier utilizada predomina en este caso aparentemente por encima de la parte de limonada y, provoca peores valoraciones de las bebidas mixtas a base de cerveza que en las demás cervezas de base.

50 6.3.2.2 Efecto refrescante y calidad total

Además se valoró el efecto refrescante como una de las características integrales de una bebida mixta a base de cerveza, así como la calidad total. En la tabla 14 se muestran los resultados de estas valoraciones.

55 Tabla 14:

		Efecto refrescante	Calidad total sensorial
Pilsen	Isomaltulosa	2,5	3,75
	Sacarosa	2,75	3,5
	Edulcorante	2,75	3,75
Dietética	Isomaltulosa	2,75	3,75
	Sacarosa	2,5	3,5
	Edulcorante	2,5	2,75
Pilsen sin alcohol	Isomaltulosa	2,4	3,8
	Sacarosa	2,3	3,5
	Edulcorante	2,2	3,5

Doppelbock	Isomaltulosa	1,7	3,3
	Sacarosa	2,1	3,4
	Edulcorante	1,7	2,8

5 Las bebidas mixtas a base de cerveza con la Pilsen como cerveza de base, fueron valoradas con el máximo valor en este parámetro de valoración. Las bebidas basadas en Doppelbock, sin embargo, fueron valoradas como las menos refrescantes. En lo referido a los diferentes edulcorantes, no se puede hacer ninguna declaración clara. La isomaltulosa, por ejemplo, fue valorada como la menos refrescante entre las bebidas mixtas a base de cerveza con Pilsen, sin embargo fue la mejor en las bebidas mixtas a base de cerveza dietética. Las valoraciones de las demás sustancias edulcorantes son parecidas.

10 De la evaluación de la calidad total sensorial no resultó ninguna tendencia clara. Entre las cuatro bebidas mixtas mejor valoradas a base de cerveza se encuentran tres que han sido endulzadas con isomaltulosa. La bebida que obtuvo la peor calificación fue aquella que tenía una cerveza dietética como cerveza de base y fue endulzada con la mezcla de edulcorantes. Esta bebida presenta sólo cantidades muy pequeñas de hidratos de carbono. Las bebidas mixtas peor valoradas fueron en su conjunto las que contenían Doppelbock como cerveza de base.

15 Los valores medios de frescor y calidad total (tabla 15) dejan entrever que la isomaltulosa y la sacarosa fueron claramente mejor valoradas en ambos casos que la mezcla de edulcorantes. La isomaltulosa obtuvo mejores valoraciones en la calidad total, mientras que las bebidas que han sido endulzadas con sacarosa fueron valoradas como algo más refrescantes.

20 Tabla 15:

	Efecto refrescante	Calidad total sensorial
Isomaltulosa	2,34	3,65
Sacarosa	2,40	3,48
Edulcorante	2,29	3,20

25 El endulzamiento de las bebidas mixtas a base de cerveza con sacarosa e isomaltulosa ha de ser considerado como aproximadamente idéntico debido a las catas realizadas, la utilización de la mezcla de edulcorantes pierde claramente en una comparación.

6.4 Contaminación de las bebidas mixtas a base de cerveza

30 6.4.1 Las cargas

Las bebidas mixtas finalizadas han sido envasadas en botellas de plástico tipo PET de 0,5 l mediante envasador manual. Antes de roscar se han pipeteado 50 µl de la suspensión lavada de cultivo puro en el flujo de CO₂ en las botellas.

35 Para la contaminación se han utilizado las siguientes bacterias:

- Lactobacillus brevis (DSM 20054)
- Pediococcus damnosus (DSM: 20331)
- y Megasphaera cerevisiae (cepa salvaje)

40 Adicionalmente, algunas botellas fueron incubadas con las siguientes levaduras:

- Saccharomyces diastaticus (cepa salvaje)
- Saccharomyces cerevisiae MJJ 2
- y Schizosaccharomyces pombe (cepa salvaje)

La incubación se realizó a 20° C en ausencia de luz en botellas cerradas.

50 6.4.2 Medición del deterioro microbiológico

Se midió la turbiedad en las botellas mediante un fotómetro de proceso (Sigrist KTL 30-21) en los ángulos de medición de 90° y 25°. Se realizó la medición en dos ángulos diferentes para tener en cuenta los diferentes tamaños celulares de las levaduras y las bacterias. La turbiedad máxima detectable se situó en unos 20 EBC.

55 En determinados puntos seleccionados se detectó la aparición de abombamiento por medio de la deformación de las botellas de PET utilizadas:

- Altura absoluta de la botella

- Diámetro a la altura de 11,5 cm
- y comienzo del escalón .

Para la medición se utilizó un calibrador digital.

5

6.4.3 Curvas de turbiedad

Tras la incubación de las diferentes cargas resultaron las curvas de turbiedad que están representadas en los siguientes gráficos.

10

6.4.3.1 *S. diastaticus*

En la figura 11a se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces diastaticus*. La bebida endulzada con sacarosa ya alcanzó el máximo valor de turbiedad el segundo día de incubación. Al endulzar con edulcorantes la turbiedad se incrementa poco a poco, pero también alcanza el valor máximo en el período observado. Aparentemente, *Saccharomyces diastaticus* es capaz de crecer en base al extracto residual de la cerveza de base y enturbiar la bebida. En el extracto de cerveza que contiene isomaltulosa, el aumento de la turbiedad es el más lento; y cabe suponer que el crecimiento tiene lugar esencialmente en base al extracto de cerveza y que la isomaltulosa no acelera el deterioro de la bebida.

15

20

En la figura 11b se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen dietética como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces diastaticus*. Al utilizar la cerveza dietética como cerveza de base sólo aparece una notable turbiedad cuando se endulza con la sacarosa convencional. La cerveza dietética no aporta ningún extracto propio de manera que se puede llegar a la conclusión que *Saccharomyces diastaticus* no puede aprovechar ni la mezcla de edulcorantes ni la isomaltulosa como sustrato.

25

30

En la figura 11c se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen sin alcohol como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces diastaticus*. En las cargas con la cerveza sin alcohol todas alcanzan el máximo de turbiedad en el período observado. La sacarosa provoca el aumento de turbiedad más rápido, en las otras dos cargas, al no ser impedida por el alcohol, la levadura es capaz de crecer debido al extracto residual de la parte de cerveza. El deterioro más lento se produce en las cargas que contienen isomaltulosa.

35

40

En la figura 11d se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Doppelbock como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces diastaticus*. A pesar del contenido de alcohol más elevado que presentó la bebida mixta a base de cerveza debido a la utilización de la cerveza Doppelbock, casi todas las cargas alcanzaron con la misma rapidez el valor máximo de turbiedad aproximadamente el tercer día de incubación. Estas bebidas mixtas a base de cerveza presentan los valores de pH más elevados y un contenido en sustancias amargas bastante bajo. La cerveza de base utilizada contenía además grandes cantidades de extracto residual fermentable sobre cuya base tenía lugar el crecimiento celular.

40

6.4.3.2. *S. cerevisiae* MJJ2

En la figura 11e se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2. La levadura de fermentación alta *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 desarrolla el crecimiento celular más rápido en presencia de sacarosa. Claramente más tarde, pero sin duda, sobre la base de la isomaltulosa tiene lugar el aumento de la turbiedad en la carga con isomaltulosa. Que la turbiedad no aumente al utilizar la mezcla de edulcorantes muestra que ni los edulcorantes ni el extracto residual de la cerveza Pilsen pueden ser aprovechados como base para el crecimiento.

45

50

En la figura 11f se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen dietética como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*. En la bebida mixta elaborada sobre la base de cerveza dietética aparece muy rápidamente una turbiedad cuando la bebida contiene sacarosa. La isomaltulosa es metabolizada mucho más lentamente que la sacarosa, pero con más rapidez que al utilizar cerveza Pilsen como cerveza de base, lo cual puede deberse esencialmente al hecho de que la cerveza dietética contiene menos lúpulo y algo menos alcohol. En esta carga de ensayo, la inhibición del crecimiento de la levadura debido a estas dos sustancias es menos fuerte. En la carga con los edulcorantes no se produce ningún aumento de la turbiedad.

55

60

En la figura 11g se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen sin alcohol como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*. En ausencia de alcohol la levadura es capaz de aprovechar, como mínimo, partes del extracto residual presentes en esta cerveza lo cual queda demostrado por el aumento de la turbiedad utilizando los edulcorantes para endulzar. Al utilizar sacarosa para endulzar la turbiedad máxima ya se alcanza el tercer día. En la carga que contiene isomaltulosa, el aumento de turbiedad es más lento. En todas las cargas se aprovechan partes del extracto residual presente en la cerveza.

65

En la figura 11h se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Doppelbock como cerveza de base que ha sido contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*. También la levadura observada en este caso es capaz de

crecer muy rápidamente en todas las cargas con la cerveza Doppelbock como cerveza de base. Ello es debido a la gran cantidad de extracto residual fermentable y los efectos relativamente menores de los factores selectivos como son el valor de pH y el contenido en sustancia amarga.

5 6.4.3.3. *S. pombe*

En la figura 11i se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Schizosaccharomyces pombe*. Las cargas con Pilsen como cerveza de base y la levadura *Schizosaccharomyces pombe* muestran un desarrollo muy atípico. Dado que las cargas con los edulcorantes, por un lado, y la sacarosa, por otro lado, presentan casi desde el inicio una turbiedad notable, que se mantiene sin embargo casi constante durante el transcurso del tiempo, se concluye que en este caso existe una turbiedad coloidal de la parte de cerveza provocada eventualmente porque durante el envasado haya entrado demasiado aire. Esta teoría es apoyada por el hecho de que sobre todo los valores de la medición de turbiedad a 25° C son elevados. Las mediciones a 25° muestran de forma tendencial más bien pequeñas partículas de turbiedad, sin embargo, las células de levadura también debían reconocerse a 90°.

En la figura 11j se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen dietética como cerveza de base que ha sido contaminada con *Schizosaccharomyces pombe*. Durante la incubación con *Schizosaccharomyces pombe* de las bebidas mixtas con la cerveza dietética como parte de cerveza no se aprecia un marcado aumento de la turbiedad en ninguna de las cargas. Esto se interpreta de manera que, debido a la conjunción de ausencia de oxígeno, presencia de alcohol y de lúpulo, se impidió el crecimiento de la levadura. Dado que esta levadura, sin embargo ya había sido capaz en series de ensayos similares de aprovechar la isomaltulosa en cerveza dietética pura, en este caso probablemente sea el valor de pH reducido por la limonada que tiene un papel decisivo para la falta de crecimiento celular en estas cargas. De la tabla 10 se desprende que los valores de pH de las bebidas mixtas a base de cerveza están en 3,5 o incluso ligeramente por debajo, mientras que el valor pH de una cerveza está ligeramente por encima de 4.

En la figura 11k se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen sin alcohol como cerveza de base que ha sido contaminada con *Schizosaccharomyces pombe*. En ausencia de alcohol, *Schizosaccharomyces pombe* no es capaz aparentemente de desarrollar una ligera actividad a pesar del reducido valor de pH. Esto se puede decir al menos para las conversiones con sacarosa. En los endulzamientos más difíciles de aprovechar de las cargas con isomaltulosa y edulcorantes, solo se aprecian aumentos insignificantes y ambiguos de la turbiedad durante el período observado.

En la figura 11l se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Doppelbock como cerveza de base que ha sido contaminada con *Schizosaccharomyces pombe*. Las bebidas que han sido elaboradas con la cerveza Doppelbock muestran en todas las cargas aumentos de turbiedad bastante rápidos. Esto se atribuye al hecho de que no solamente se introducen las ya mencionadas porciones elevadas de azúcares fermentables de la cerveza, sino que adicionalmente estas bebidas mixtas a base de cerveza presentan también los valores de pH más altos de todas las cargas (véase la tabla 12). En este caso, los mismos se sitúan ligeramente por encima de 3,8.

6.4.3.4 *P. damnosus*

En la figura 11m se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Pediococcus damnosus*. Al utilizar la cerveza Pilsen, todas las cargas permanecían estables durante mucho tiempo después de la contaminación con *Pediococcus damnosus*. Las cargas endulzadas con sacarosa presentaron al final del período observado una marcada turbiedad y, por lo tanto, deterioro.

En la figura 11n se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen dietética como cerveza de base que ha sido contaminada con *Pediococcus damnosus*. Las curvas de turbiedad que se han encontrado utilizando una cerveza dietética como base están en buena correlación con las que se han encontrado con la cerveza de base Pilsen. El aumento más rápido de la turbiedad en las cargas que contienen sacarosa tiene su fundamento en los contenidos algo más reducidos de alcohol y sustancia amarga. El hecho de que incluso con una cerveza dietética, que no aporta una porción de hidratos de carbono propia, sólo se pudo detectar un aumento de turbiedad cuando se endulzó con sacarosa, apoya la hipótesis que se había tomado con Pilsen como cerveza de base, de que el crecimiento celular realmente tuvo lugar sobre la base de la sustancia endulzante sacarosa y que las demás sustancias edulcorantes no ofrecían ninguna base para que *P. damnosus* pudiera vivir. En la figura 11o se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen sin alcohol como cerveza de base que ha sido contaminada con *Pediococcus damnosus*.

También en las cargas con la cerveza sin alcohol, sólo las cargas que contenían sacarosa mostraron un aumento de la turbiedad. *P. damnosus* sólo puede utilizar la sacarosa.

En la figura 11p se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Doppelbock como cerveza de base que ha sido contaminada con *Pediococcus damnosus*. El enturbiamiento que se había observado en las otras cargas se retrasa en este caso debido al contenido en alcohol más elevado. Sin embargo, al final del período observado, se

produjo en todas las cargas un ligero aumento de turbiedad. Por ello se concluye que en este caso tiene lugar un ligero crecimiento sobre la base del azúcar residual de la parte de cerveza.

6.4.3.5 *L. brevis*

En la figura 11q se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Lactobacillus brevis*. Durante la incubación con *Lactobacillus brevis* de las cargas con Pilsen como cerveza de base no se observa ningún aumento de turbiedad. Valores constantes ligeramente aumentados se consideran turbiedad básica que puede ser producida entre otros también por la introducción de la suspensión celular durante la inoculación.

En la figura 11r se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen dietética como cerveza de base que ha sido contaminada con *Lactobacillus brevis*. Todas las cargas observadas permanecieron constantes durante mucho tiempo. Se aprecia un ligero aumento de turbiedad en las cargas con sacarosa. Este efecto puede ser debido a las concentraciones algo más bajas de alcohol y sustancia amarga de la cerveza dietética.

En la figura 11s se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen sin alcohol como cerveza de base que ha sido contaminada con *Lactobacillus brevis*. En las cargas con la cerveza sin alcohol como base, el aumento de turbiedad observado en la carga que contenía sacarosa demuestra que, en ausencia de alcohol, *L. brevis* es capaz de deteriorar las bebidas que contienen sacarosa. Las otras dos cargas permanecieron constantes; no hubo aprovechamiento de la isomaltulosa ni de los edulcorantes.

En la figura 11t se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Doppelbock como cerveza de base que ha sido contaminada con *Lactobacillus brevis*. En las cargas de las bebidas mixtas elaboradas con Doppelbock como cerveza de base no se observa ningún aumento de turbiedad. Probablemente debido al contenido de alcohol más elevado, junto con el pH que es más bajo de lo típico para una cerveza, no se puede detectar ninguna actividad de crecimiento.

6.4.3.6 *M. cerevisiae*

En la figura 11u se muestran las curvas de turbiedad de la bebida mixta con Pilsen como cerveza de base que ha sido contaminada con *Megasphaera cerevisiae*. Se describe la serie de ensayos con las mezclas elaboradas con la cerveza de base Pilsen a título de ejemplo que sirve para todas las cargas con *Megasphaera cerevisiae*. En ninguna carga se ha observado un aumento de turbiedad. Parece muy probable que ello se debe a los valores de pH que están muy por debajo de 4 incluso en el caso de la bebida mixta elaborada con Doppelbock.

6.4.4 Aparición de abombamiento

Igual que la turbiedad, la denominada aparición de abombamiento es un claro indicio para el deterioro de una bebida refrescante. Cuando el contenido de la botella se deteriora por la actividad microbiana, se pueden observar deformaciones (abombamientos) en las botellas debido a la mayor presión interior, así como la turbiedad que se ha formado.

Las desviaciones de las botellas sin incubar (botella cero) que se muestran en las figuras 12a hasta 12l han sido medidas después del llenado de la botella, pero antes de la incubación. Esto significa que ligeras variaciones con respecto a este valor de referencia se deben al aumento de presión normal que se produce por el almacenamiento de la bebida carbonatada a 20° C. En adelante, esta dilatación se denomina dilatación normal que se muestra en el ejemplo de la siguiente figura.

En la figura 12a se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras la incubación con *Saccharomyces diastaticus* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Se puede ver que tras la incubación con *Megasphaera cerevisiae* de las botellas llenadas éstas presentan ligeras variaciones con respecto a la botella cero. Sin embargo, no se había detectado ningún crecimiento por medio de la turbiedad medida. Asimismo hay que señalar que *Megasphaera* sólo da lugar a la formación de cantidades mínimas de CO₂, si cabe, incluso cuando se produce crecimiento y, por lo tanto, difícilmente puede contribuir a un aumento de la presión interior de la botella.

La aparición de abombamiento es generalmente más apropiada para la detección del deterioro de bebidas provocado por levaduras que para el provocado por bacterias, dado que las levaduras producen notablemente más CO₂ durante su actividad metabólica. El riesgo de abombamiento tiene por lo tanto más relevancia para el deterioro provocado por levaduras que no para el provocado por bacterias, las cuales deterioran más las bebidas por provocar turbiedad y malos aromas.

En la figura 12b se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras la incubación con *Saccharomyces diastaticus* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Las deformaciones de la botella que se han producido están esencialmente en correlación con las curvas de turbiedad detectadas. Se pueden

provocar ligeras variaciones en las dimensiones por el aumento de la presión interior que se produce durante el almacenamiento de una bebida carbonatada a 20° C. Sólo en las cargas que contenían sacarosa se podían observar cambios evidentes en la altura absoluta de las botellas inoculadas con *Saccharomyces diastaticus*.

5 En la figura 12c se muestran las variaciones del diámetro de las botellas contaminadas tras incubación con *Saccharomyces diastaticus* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Igual que en las mediciones de altura, sólo se observan variaciones evidentes en las dimensiones de la botella donde *Saccharomyces diastaticus* podía aprovechar sacarosa.

10 En la figura 12d se muestran las variaciones en el comienzo del escalón de las botellas contaminadas tras incubación con *Saccharomyces diastaticus* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Una vez más, tras la incubación con *Saccharomyces diastaticus*, se denotan variaciones evidentes sólo en las bebidas endulzadas con sacarosa. Curiosamente, las desviaciones más fuertes se producen en la carga con la cerveza dietética en la que la parte de hidratos de carbono proviene exclusivamente del endulzamiento de la parte de limonada. En todas
15 las cargas inoculadas con *Saccharomyces diastaticus* sólo se ha aprovechado la sacarosa como base metabólica.

En la figura 12e se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras la incubación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 en comparación con la botella no deformada (botella cero). Para las cargas incubadas con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 se puede decir que las desviaciones más evidentes se han
20 producido en las bebidas endulzadas con sacarosa. Las bebidas que contenían isomaltulosa, en las que también se han producido turbiedades más o menos fuertes debido a la multiplicación de células, muestran ligeros aumentos en altura pero claramente inferiores a las que se producen con sacarosa.

En la figura 12f se muestran las variaciones del diámetro de las botellas contaminadas tras incubación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 en comparación con la botella no deformada (botella cero). En cuanto a las variaciones del diámetro de las botellas tras la incubación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 se puede decir, igual que para el aumento en altura, que las deformaciones más evidentes se han producido en las bebidas endulzadas con sacarosa, las dilataciones en las cargas que contenían isomaltulosa y edulcorantes se situaban
25 dentro del rango de la dilatación normal.

En la figura 12g se muestran las variaciones del comienzo del escalón de las botellas contaminadas tras incubación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 en comparación con la botella no deformada (botella cero). Se puede reconocer claramente que sólo en las cargas de ensayo endulzadas con sacarosa se han producido deformaciones relevantes en la botella con respecto al parámetro del comienzo del escalón de las botellas incubadas con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2.
30

En la figura 12h se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras la incubación con *Schizosaccharomyces pombe* en comparación con la botella no deformada (botella cero). En ninguna de las cargas incubadas con *Schizosaccharomyces* se mostró un crecimiento significativo, correspondientemente no se han detectado dilataciones en las botellas que sobrepasan la dilatación normal lo mismo es válido para las figuras 12i y 12j.
35

En la figura 12i se muestran las variaciones del diámetro de las botellas contaminadas tras incubación con *Schizosaccharomyces pombe* en comparación con la botella no deformada (botella cero). En la figura 12j se muestran las variaciones del comienzo del escalón de las botellas contaminadas tras incubación con *Schizosaccharomyces pombe* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Tal como era de esperar, no se han producido deformaciones evidentes en aquellas cargas de ensayo contaminadas con bacterias en las que tampoco se había medido turbiedad. *Pediococcus damnosus* era capaz (excepción: Doppelbock como cerveza de base) de provocar turbiedad en las bebidas mixtas endulzadas con sacarosa. En las mezclas con cerveza dietética y con cerveza sin alcohol incluso mucho antes del final del período observado. Se reconocen pequeñas desviaciones en la dilatación de altura.
40

En la figura 12k se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras incubación con *Pediococcus damnosus* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Sin embargo, esta dilatación es menor y no ha sido verificada en los demás puntos de medición. Una razón para ello puede ser que *Pediococcus* pertenece a las bacterias del ácido láctico homofermentativas que incluso con una fuerte actividad metabólica sólo son capaces de formar pequeñas cantidades de CO₂.
45

En la figura 12l se muestran las variaciones de altura de las botellas contaminadas tras incubación con *Lactobacillus brevis* en comparación con la botella no deformada (botella cero). Por medio de la turbiedad sólo se detectó un crecimiento de *L. brevis* en la bebida mixta a base de cerveza elaborada con cerveza sin alcohol y la parte de limonada endulzada con sacarosa. Ciertamente *Lactobacillus brevis* es heterofermentativo, pero el crecimiento era muy lento, de manera que sólo se detectó una desviación en el parámetro de la dilatación de altura que estaba sólo muy poco por encima de la dilatación normal.
50

65

6.5 Resumen

Se han elaborado bebidas mixtas a base de cerveza que se diferenciaban debido a las diferentes cervezas de base elegidas en los parámetros de contenido de alcohol, aporte de hidratos de carbono de la parte de cerveza y contenido en sustancias amargas. Variando la sustancia endulzante se añadieron a las bebidas mixtas ya sea sacarosa o isomaltulosa como posible sustrato, o bien no se aportaron hidratos de carbono aprovechables utilizando edulcorantes en la parte de limonada. Debido a la gran relevancia de las levaduras como organismos dañinos en refrescos pobres en alcohol, pero ricos en azúcar, las bebidas han sido contaminadas intencionadamente con tres levaduras distintas e incubadas a 20° C. Se eligió la levadura *Saccharomyces diastaticus* porque tiene una importancia excepcional como organismo que daña la cerveza, ya que además de la capacidad normal de fermentar hidratos de carbono de bajo peso molecular también es capaz de fermentar cadenas de hidratos de carbono más largas, las denominadas dextrinas. También se han utilizado las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2. En ensayos previos habían sido capaces de aprovechar la isomaltulosa; *Schizosaccharomyces pombe* también era capaz de ello en la cerveza envasada.

Además de estas levaduras, se han utilizado también bacterias que tienen una gran importancia como gérmenes de deterioro para la cerveza envasada. Se eligieron *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis* y *Megasphaera cerevisiae*.

Se ha mostrado que las levaduras *Saccharomyces diastaticus* y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 han sido capaces muy rápidamente de deteriorar la mayoría de las bebidas contaminadas. Esto sucedió tanto por la aparición de una fuerte turbiedad, como también por una fuerte deformación de las botellas (abombamiento). Pero mientras *Saccharomyces diastaticus* sólo era capaz de crecer en presencia de sacarosa en la carga de ensayo con cerveza dietética (aporte de hidratos de carbono sólo a través de la parte de limonada), *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 creció también en la carga endulzada con isomaltulosa, aunque de forma sorprendentemente más lenta que cuando se endulzó con sacarosa. Por ello, se concluye que *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 era capaz de aprovechar también la isomaltulosa en estas condiciones, pero de forma sorprendentemente más lenta que la sacarosa. Sorprendentemente, *Saccharomyces diastaticus* no pudo aprovechar la isomaltulosa en ninguna de las bebidas elaboradas.

Esta levadura no es capaz de forma general de aprovechar la isomaltulosa como sustrato. El crecimiento detectado de las levaduras *Saccharomyces* en las cargas que han sido elaboradas con otras cervezas de base que la cerveza dietética tuvo lugar casi de forma idéntica en todas las variantes de endulzamiento y se atribuye a la utilización de grandes cantidades de extracto residual que ha sido aportado a la bebida mixta acabada por las partes componentes de la cerveza.

Schizosaccharomyces pombe, en general, no mostró una actividad perceptible en ninguna de las cargas examinadas. Se supone que ello se debe sobre todo a los valores de pH que, debido a la adición de limonada, se situaban claramente por debajo de los de las cervezas normales.

En la evaluación de las cargas de ensayo inoculadas con bacterias que dañan la cerveza sorprende que *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus brevis* sólo eran capaces de enturbiar aquellas cargas que contenían sacarosa. En ninguna de las cargas endulzadas con isomaltulosa o con la mezcla de edulcorantes estas bacterias fueron capaces de provocar turbiedad. *Megasphaera cerevisiae* que también fue examinada no fue capaz en general de crecer en bebidas mixtas a base de cerveza; la razón para ello ha de buscarse sobre todo en los bajos valores de pH de las bebidas.

Resumiendo, de los organismos examinados sólo *Saccharomyces cerevisiae* MJJ2 es capaz de aprovechar la isomaltulosa utilizada para endulzar, pero de forma sorprendentemente más lenta que la sacarosa existente alternativamente. Los demás organismos, sorprendentemente, no pueden aprovechar la isomaltulosa.

Es decir que, con respecto a la utilización de sacarosa para endulzar la parte de limonada de bebidas mixtas a base de cerveza, la isomaltulosa es capaz de mejorar notablemente la estabilidad biológica. Las cargas que contenían la mezcla de edulcorantes presentaban la misma estabilidad que las bebidas endulzadas con isomaltulosa. Sin embargo, éstas obtuvieron peores resultados en la cata que son inaceptables en su conjunto.

Ejemplo 7 (no según la invención): Influencia de la isomaltulosa sobre el perfil aromático de mostos reales fermentados

7.1 Mostos reales

Se elaboró un mosto de Pilsen. Una parte de este mosto fue tratado de manera que aproximadamente una cuarta parte del extracto estaba formado por isomaltulosa. El mosto original no tratado y el mosto que contenía isomaltulosa fueron fermentados en las mismas condiciones (sin presión, 12° C) por las mismas levaduras que se han utilizado en los mostos de patrón.

Dado que se quería simular la práctica normal de la fabricación de cerveza, estos mostos no fueron llevados en una

sola etapa hasta la fermentación final, sino hasta aproximadamente 1 a 1,5 % por encima del extracto a esperar en la fermentación final, y luego se añadió una fermentación secundaria durante 14 días a 1° C. En las cervezas elaboradas de esta manera, se analizaron de forma específica según MEBAK, así como por cromatografía de gases los mismos, componentes aromáticos seleccionados que en los mostos de patrón. Adicionalmente se realizaron catas de valoración. Se pretendía detectar la variación del perfil aromático detectado analíticamente y de la impresión gustativa en función del contenido en isomaltulosa.

En la cervecería de investigación del Instituto Cervecerero de Investigación y Enseñanza (VLB) se elaboró un mosto de cerveza (tipo Pilsen) que fue ajustado mediante redilución con agua y adición de isomaltulosa de tal manera que aproximadamente el 25 % del contenido en extracto del mosto estaba formado por isomaltulosa. El mosto no modificado y el mosto con isomaltulosa fueron fermentados paralelamente en las mismas condiciones por diferentes levaduras.

En la tabla 16 se muestran los análisis de los mostos.

Tabla 16:

Análisis de mostos con y sin isomaltulosa			
Parámetro	Unidad	Mosto original	Mosto 25 % isomaltulosa
Contenido en extracto	%	11,26	11,33
Extracto, aparente, de fermentación final	%	1,93	4,2
Grado de fermentación final, aparente	%	83,3	62,6
pH		5,36	5,2
Profundidad de color	EBC	8,6	6,4
Unidades de amargor	BE	48,1	31,6
Nitrógeno total	ppm	969	655
Nitrógeno de aminoácidos libres	ppm	175	124
Zinc	ppm	0,17	0,15
DMS	ppb	30	20

Los mostos fueron ajustados a un contenido en extracto muy parecido. La adición de isomaltulosa hace que baje el grado de fermentación, dado que aumenta la parte de hidratos de carbono no fermentables (en la analítica del grado de fermentación final) debido a la sustitución del extracto propio del mosto por isomaltulosa. Los demás valores analíticos varían en función de la redilución, es decir que baja el contenido, tal como sustancias amargas o fracciones proteicas.

Ambos mostos han sido fermentados con las cuatro levaduras siguientes, respectivamente:

- *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11,
- *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25,
- *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2,
- *Schizosaccharomyces pombe*

7.2 Análisis de los componentes aromáticos

En todas las cargas de fermentación se ha determinado el siguiente componente aromático una vez terminada la fermentación (= 4 días sin disminución de extracto): acetaldehído, etilacetato, 1-propanol, isobutanol, iso-anilacetato, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 2-feniletanol, fenilacetato. Además de los componentes aromáticos relevantes también se detectaron las dicetonas vicinales formadas durante la fermentación. Se trata de componentes aromáticos relativamente importantes que se utilizan en muchos casos en la práctica cervecera como sustancias clave para controlar la fermentación principal.

7.3 Resultados

7.3.1 El desarrollo de la fermentación

El desarrollo de la fermentación de los dos mostos reales (con y sin isomaltulosa) con *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 muestra la siguiente imagen: Inicialmente, la disminución de extracto es casi idéntica, después la curva de disminución se vuelve más plana en el mosto que contiene isomaltulosa. Una vez el mosto que no contenía isomaltulosa había alcanzado el valor deseado, se interrumpió también la fermentación del mosto que contenía isomaltulosa. Tal como se esperaba, el extracto residual era más alto en este caso.

También en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25, las curvas de disminución de extracto sólo son paralelas inicialmente. Las curvas difieren relativamente pronto (a partir del 5º día de fermentación) y la diferencia del extracto residual es bastante evidente.

5 El desarrollo de la fermentación de mostos reales (con y sin isomaltulosa) con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 muestra la siguiente imagen: Las curvas de fermentación se parecen a las anteriores, la disminución de extracto comienza de forma similar, después la curva del mosto que contiene isomaltulosa se vuelve más plana.

10 El desarrollo de la fermentación de mostos reales (con y sin isomaltulosa) con *Schizosaccharomyces pombe* muestra la siguiente imagen: Las curvas de desarrollo del extracto son casi idénticas cuando se utiliza *Schizosaccharomyces pombe*. También los valores finales que se alcanzan son muy parecidos, dado que la isomaltulosa también puede ser aprovechada como sustrato por esta levadura.

15 **7.3.2 Análisis de las cervezas acabadas**

En la tabla 17 se muestran los valores analíticos de los mostos (con y sin isomaltulosa) fermentados con *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25.

20 Tabla 17:

	MJJ 11 sin isomaltulosa	MJJ 11 con isomaltulosa	MJJ 25 sin isomaltulosa	MJJ 25 con isomaltulosa
Mosto original, calculado [%]	11,25	11,24	11,32	11,28
Extracto, aparente [%]	2,35	3,68	3,3	4,16
Extracto, real [%]	4,04	5,1	4,82	5,44
Alcohol [% en vol]	4,71	3,98	4,28	3,59
pH	4,4	4,25	4,67	4,4
Unidades de amargor [BU]	30	27	33	29
Estabilidad de la espuma [s]	276	263	343	281

En la tabla 18 se muestran los valores analíticos de los mostos (con o sin isomaltulosa) fermentados con *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2.

25 Tabla 18:

	Schiz. pombe sin isomaltulosa	Schiz. pombe con isomaltulosa	MJJ 2 sin isomaltulosa	MJJ 2 con isomaltulosa
Mosto original, calculado [%]	11,27	11,32	11,28	11,56
Extracto, aparente [%]	2,41	4,21	2,13	4,58
Extracto, real [%]	4,08	5,5	3,87	5,91
Alcohol [% en vol]	4,67	3,64	4,86	3,75
pH	4,38	4,36	4,45	4,36
Unidades de amargor [BU]	33	26	29	25
Estabilidad de la espuma [s]	276	197	228	256

30 Se puede ver claramente que el extracto residual de las cervezas cargadas con isomaltulosa es más alto tras la fermentación, ya que la isomaltulosa no ha sido fermentada. De ello resulta en todos los casos también un menor contenido de alcohol. Esto también es válido para *Schizosaccharomyces pombe* que pudo aprovechar en los mostos de patrón las soluciones que contenían isomaltulosa de forma similar a la solución de referencia. En soluciones complejas de mezclas de hidratos de carbono aparentemente esta levadura también aprovecha primero otros azúcares. En esta serie de ensayos la fermentación se terminó antes de poder degradar la isomaltulosa. El valor de pH de las cervezas que contienen isomaltulosa es, en general, ligeramente más bajo que el de las cervezas de comparación, pudiéndose decir lo mismo también para las unidades de amargor, pero en este caso el valor más bajo se debe a la redilución.

35 **7.3.3 Componentes aromáticos**

40 En la figura 7a se muestra el contenido en componentes aromáticos tras fermentación de los mostos reales mediante *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25.

45 No se evidencia una clara influencia de la adición de isomaltulosa sobre la formación de componentes aromáticos. MJJ 11 genera ciertamente en casi todos los componentes en la carga sin isomaltulosa, elevadas cantidades de la sustancia respectiva, pero las diferencias son insignificantes y, además, se deben probablemente a la cantidad absoluta algo inferior del sustrato utilizado. Asimismo se comprueba que *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25 genera en algunos casos en la solución que contiene isomaltulosa concentraciones más elevadas de la sustancia en

cuestión. Por medio de los datos mostrados en la presente, no se puede decir inequívocamente que la presencia de isomaltulosa influye sobre el perfil aromático que se ha formado.

En la figura 7b se muestra el contenido en componentes aromáticos tras fermentación de los mostos reales mediante *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2.

Asimismo no se evidencia una clara influencia de la adición de isomaltulosa sobre la formación de componentes aromáticos. En la mayoría de los casos se forman, ciertamente, menos de las sustancias observadas en los mostos con adición de isomaltulosa, pero esto se debe también a que se ha utilizado en conjunto menos cantidad de sustrato. Extraordinariamente, *Schizosaccharomyces pombe* generó otra vez más acetaldehído en presencia de isomaltulosa.

En los mostos sin isomaltulosa se forman menos diacetilo y pentandiona. La diferencia en las concentraciones no se explica solamente con la menor conversión de sustrato: En los mostos que contienen isomaltulosa se ha sustituido aproximadamente una cuarta parte del extracto por isomaltulosa. Sin embargo, los contenidos medidos corresponden solamente al 50 % o incluso menos en los mostos con isomaltulosa comparado con mostos sin tratar. La presencia de isomaltulosa en los mostos dificulta aquellas vías metabólicas que están relacionadas con la formación de las sustancias diacetilo y pentandiona constituyen una excepción en este caso los mostos que han sido fermentados con *Schizosaccharomyces pombe*.

La presencia de isomaltulosa no influye de forma significativa sobre el desarrollo de sustancias del grupo de los ésteres y alcoholes alifáticos elevados (y acetaldehído). Una excepción constituye en este caso la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que aparentemente genera más acetaldehído cuando en lugar de maltosa también está presente isomaltulosa como sustrato. Esta levadura también constituye la excepción en la formación de dicetonas vicinales. En las típicas levaduras cerveceras la formación de estas sustancias es aparentemente ralentizada por la presencia de isomaltulosa.

7.3.4 Cata

Adicionalmente a la analítica química se realizó una cata con valoración de las cervezas una vez terminada la fermentación principal y la fermentación secundaria. En una escala de 1 a 5 se evaluaron los siguientes parámetros: impresión de dulzor, impresión de amargor, aroma de lúpulo, malta, frutado, burbujeo, plenitud de sabor en boca e impresión general.

A continuación, se muestran los resultados de las catas.

En la figura 8a se muestran los resultados de la cata de valoración de las cervezas elaboradas de los mostos reales; fermentadas con *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11(10 catadores): Los perfiles aromáticos resultantes del esquema de cata tras fermentación por *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 se superponen entre sí de forma casi idéntica, independientemente de si el mosto contenía isomaltulosa o no. Sólo en la impresión general, la cerveza con isomaltulosa ha sido valorada algo mejor. Un motivo indicado a menudo ha sido una impresión general "redonda" a pesar de que los parámetros individuales han sido valorados igual.

En la figura 8b se muestran los resultados de la cata de valoración de las cervezas elaboradas de los mostos reales; fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25 (10 catadores): También tras fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25 los perfiles aromáticos se superponen entre sí de forma casi idéntica. Una vez más la cerveza que contenía isomaltulosa fue valorada ligeramente mejor en la impresión general, a pesar de que los parámetros individuales habían sido valorados igual. Sin embargo, tras fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 25 se percibieron como más fuertes tanto la impresión de amargor, como el frutado de las cervezas.

En la figura 8c se muestran los resultados de la cata de valoración de las cervezas elaboradas de los mostos reales; fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 (10 catadores): Tras fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 las cervezas han sido valoradas otra vez de forma muy parecida. La cerveza sin isomaltulosa ha sido percibida como menos dulce, en cambio predominó más la impresión de amargor que aparentemente fue compensada, por otro lado, por la presencia de la isomaltulosa. En cuanto a calidad general, las dos cervezas han sido valoradas igual.

En la figura 8d se muestran los resultados de la cata de valoración de las cervezas elaboradas de los mostos reales; fermentadas con *Schizosaccharomyces pombe* (10 catadores): Tras fermentación con *Schizosaccharomyces pombe* las cervezas se diferenciaban aparentemente de forma clara. La cerveza que contenía isomaltulosa fue percibida como más dulce, pero aparentemente este dulzor fue percibido como maltoso. Aunque la intensidad del amargor fue percibida igual de fuerte, en la cerveza sin isomaltulosa este amargor fue percibido como algo más aromático de lúpulo, una impresión que aparentemente fue compensada por la isomaltulosa contenida en la misma. Sin embargo, en la valoración de la calidad general, la cerveza que contenía isomaltulosa obtuvo otra vez una valoración ligeramente mejor.

Las cervezas que contenían isomaltulosa, mayoritariamente, no han sido percibidos como claramente diferentes con respecto a las cervezas de referencia. En cuanto a calidad general, la adición de la misma puede hacer que la impresión de la cerveza aparezca algo más “redonda” debido a la compensación de influencias desagradables para el sabor tal como, por ejemplo, fuerte amargor.

5 Ejemplo 8: El aprovechamiento de isomaltulosa por bacterias y la influencia de los factores selectivos propios de la cerveza sobre al aprovechamiento de la isomaltulosa por las levaduras

8.1 Fabricación del medio

10 Se elaboraron de forma estéril una isomaltulosa al 5 % y una solución de patrón que contenía 6,7 g/l YNB (Yeast Nitrogen Base). La incubación se realizó a 26° C a escala de 10 litros en probetas con tubos Durham.

Los respectivos factores selectivos fueron ajustados de la siguiente manera:

- 15
- Manipulación del valor del pH mediante adición de ácido fosfórico,
 - Contenido en sustancias amargas mediante adición de isohumulonas,
 - 20 • Contenido de alcohol mediante adición de etanol desnaturalizado al 96 %, y
 - Privación de oxígeno mediante incubación en jarra de anaerobios.

25 El aprovechamiento de isomaltulosa fue medido mediante el control de la formación de gas (visual), la medición mediante método DNS (fotométricamente) y el análisis del espectro de azúcar (HPLC).

8.2 Microorganismos examinados y análisis

Se ha examinado el aprovechamiento de las siguientes levaduras:

- 30
- *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 (levadura cervecera);
 - *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 (Levadura cervecera, aprovecha bien la isomaltulosa);
 - 35 • *Schizosaccharomyces pombe* (aprovecha bien la isomaltulosa) y
 - *Saccharomyces diastaticus* (daña la cerveza, capaz de sobrefermentar)

40 Además, se examinó el aprovechamiento de la isomaltulosa por bacterias conocidas, que dañan la cerveza. A tal efecto se eligieron “condiciones ideales”, anaeróbicas, 28° C, incubación de 21 días:

- *Pediococcus damnosus* (DSM: 20331),
- 45 • *Megasphera cerevisiae* (cepa salvaje),
- *Pectinatus frisingensis* (DSM: 20465) y
- *Lactobacillus brevis* (DSM: 20054).

50 La denominación “cepa salvaje” significa que se trata de una cepa que ha sido aislada de cerveza contaminada y no tiene número DSM (DSM: Colección alemana de microorganismos).

Adicionalmente se han examinado otros lactobacilos debido a la importancia que tienen éstos como organismos que dañan la cerveza y como cultivos probióticos en la industria alimentaria:

- 55
- *L. fructivorans* (DSM: 20203),
 - *L. fructivorans* (cepa salvaje),
 - 60 • *L. corniformis* (DSM: 20001),
 - *L. lindneri* (DSM: 20690),
 - *L. lindneri* (DSM: 20961),
- 65

- L. casei (DSM: 2001),
- L. curvatus (cepa salvaje),
- 5 • L. brevis (DSM: 6235),
- L. brevis (cepa salvaje),
- 10 • L. acidophilus (DSM: 20242),
- L. amylovorus (DSM: 20552),
- L. delbrückli (DSM: 20047),
- 15 • L. fermentum (DSM: 20049),
- L. gasserii (DSM: 20077),
- 20 • L. johnsonii (DSM: 20553),
- L. plantarum (DSM: 12028),
- L. reuteri (DSM: 20015),
- 25 • L. rhamnosus (DSM: 20023) y
- L. salivarius (DSM: 20492).

30 Dado que por la literatura se conoce de los lactobacilos que este tipo de bacterias no puede sintetizar todos los aminoácidos, se han realizado experimentos paralelamente al medio no tratado, en los que el medio contenía adicionalmente 2% de peptona. Debido a la clasificación de los lactobacilos, asimismo conocida por la literatura, en los tolerantes al lúpulo y los intolerantes al mismo, se ha establecido una tercera serie de ensayos en los que el medio contenía 20 mg/l de isohumulonas.

35 Las concentraciones de isomaltulosa han sido detectadas mediante HPLC en 42, 3 g/l. Este valor está contrapuesto a los contenidos residuales descritos abajo tras incubación como valor de salida. El medio de modelo ha sido incubado con adición de factores selectivos específicos de la cerveza.

40 8.3 Resultados

8.3.1 Levaduras

45 Tras un tiempo de incubación de 14 días se obtuvieron para *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 los resultados mostrados en la figura 9.

En la figura 9a se muestran contenidos en isomaltulosa en la solución de patrón sin incubar y tras 14 días de incubación (anaeróbico, 26° C) con *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 (medido mediante HPLC).

50 Se puede ver que los valores medidos corresponden al valor inicial con una precisión de 5 %. Esto significa que no ha tenido lugar una metabolización de la isomaltulosa. El valor más bajo se ha medido en la solución sin factores selectivos, pero también en este caso no se puede hablar de una disminución de la metabolización. Por medio de esta serie de ensayos se puede decir que *Saccharomyces carlsbergensis* MJJ 11 no ha podido fermentar la isomaltulosa en el período observado independientemente de las influencias selectivas existentes.

55 En la siguiente figura se muestra la correspondiente serie de ensayos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2. Esta levadura es conocida de series de ensayos anteriores como capaz de aprovechar la isomaltulosa.

En la figura 9b se muestran los contenidos en isomaltulosa en la solución de patrón sin incubar y tras 14 días de incubación (anaeróbico, 26° C) con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 (medido mediante HPLC).

60 Tras catorce días de incubación se ha medido una disminución en la carga sin factores selectivos. Sin embargo, también en este caso esta disminución es sólo insignificante y en ninguna carga de las que han sido modificadas se ha medido una disminución parecida.

65 En la figura 9c se muestran los contenidos en isomaltulosa en la solución de patrón sin incubar y tras 14 días de

incubación (aeróbico, 26° C) con *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 (medido mediante HPLC).

5 Tal como se ha esperado, *Saccharomyces cerevisiae* MJJ 2 mostró en condiciones aeróbicas una capacidad claramente mayor de aprovechar isomaltulosa. En la carga no modificada se habían metabolizado tras 14 días aproximadamente el 75 % de la isomaltulosa. En una atmósfera aeróbica, además, se ha detectado una ligera degradación de la isomaltulosa incluso con un pH de 4, pero ya no se produce ningún aprovechamiento de isomaltulosa cuando se baja más el valor pH.

10 La mera ausencia de oxígeno dificulta a esta levadura el aprovechamiento de isomaltulosa como sustrato. La presencia de sustancias amargas del lúpulo y alcohol, así como una reducción del valor de pH por debajo de 4 hace que la metabolización de isomaltulosa se pare por completo.

15 El mismo ensayo se ha realizado con *Schizosaccharomyces pombe*. En la figura 9d se muestran los contenidos de azúcar en la solución de patrón sin incubar y tras 14 días de incubación (anaeróbica, 26° C) con *Saccharomyces pombe* (medido mediante HPLC).

20 Se puede ver claramente que esta levadura es capaz en todas las condiciones de ensayo de aprovechar la isomaltulosa ofrecida como sustrato. Sólo en la carga con el pH más bajo existe aún una concentración residual de isomaltulosa que se puede medir, de manera que al bajar más todavía el valor de pH, el aprovechamiento de isomaltulosa podría quedar eventualmente impedido, pero valores de pH por debajo de 3 se encuentran sólo en muy pocas bebidas y tampoco muy por debajo de este valor. Los factores selectivos típicos de la cerveza no son capaces, ni combinados como la carga con 5 % de alcohol y la presencia de sustancias amargas del lúpulo, de impedir el aprovechamiento de isomaltulosa.

25 Se ha detectado que *Schizosaccharomyces pombe* puede aprovechar la isomaltulosa de forma eficaz. Los valores medidos para los azúcares individuales glucosa y fructosa sugieren que esta levadura disgrega la isomaltulosa de forma extracelular antes de que los azúcares simples sean asimilados después.

30 Otra imagen/situación se presenta tras la realización de la serie de ensayos con la levadura *Saccharomyces diastaticus* conocida como organismo que daña las bebidas. En la figura 9e se muestran contenidos en isomaltulosa en la solución de patrón sin incubar y tras 14 días de incubación (anaeróbico, 26° C) con *Saccharomyces diastaticus* (medido mediante HPLC).

35 En ninguna de las cargas examinadas se ha detectado una disminución de la concentración de isomaltulosa. Los valores se mantienen otra vez constantes en un rango de oscilación de 5 %, de manera que se puede concluir que *Saccharomyces diastaticus* no es capaz de fermentar isomaltulosa.

8.3.2 Bacterias

40 En la figura 10 están representados los resultados de los ensayos de incubación con cuatro bacterias conocidas como que dañan la cerveza.

45 En la figura 10a se muestran los contenidos de isomaltulosa en la solución de patrón sin incubar y tras 21 días de incubación (anaeróbica, 28° C) con las bacterias seleccionadas que dañan la cerveza (medido mediante HPLC).

En ninguna de las cargas se ha detectado un aprovechamiento de isomaltulosa en el marco de la precisión de medición. Ninguna de las bacterias examinadas es capaz de crecer sobre la base de isomaltulosa.

50 Vista la importancia del grupo de los lactobacilos, no solamente como organismos que dañan la cerveza, sino también como organismos en la flora intestinal y dental de mamíferos y su aplicabilidad como cultivos probióticos en la industria alimentaria se ha examinado adicionalmente un grupo de diferentes lactobacilos en cuanto a su capacidad de aprovechar isomaltulosa.

55 En la figura 10b se muestran los contenidos de isomaltulosa tras 21 días de incubación (anaeróbico, 28° C) con diferentes lactobacilos (medido mediante ensayo DNS).

60 Tras el largo período de incubación de tres semanas, las variaciones en las concentraciones de isomaltulosa están dentro del 5 %. Los valores más bajos se han medido para las bacterias *L. lindnerii* 20961, *L. brevis* 6235 y *L. rhamnosus* 20023. Los valores están dentro del rango de variación del 5 % y, además, visualmente no se ha observado ningún crecimiento celular masivo. Por lo tanto, no se puede decir por medio de esta medición que los organismos examinados sean capaces de aprovechar isomaltulosa.

65 Dado que se conoce por la literatura que los lactobacilos no pueden sintetizar todos los aminoácidos, se ha realizado otra serie de ensayos en los que se ha añadido un 2 % de peptona a la solución de patrón. De esta manera se quiere descartar que un sólo eventual crecimiento no haya sido detectado porque no había fuentes de nitrógeno.

En la figura 10c se muestran los contenidos de isomaltulosa tras 21 días de incubación (anaeróbico, 28° C) con diferentes lactobacilos con adición de peptona adicional (medido mediante ensayo DNS).

5 Una vez más, en ningún valor medido se ha detectado una disminución de más del 5 % con respecto al valor inicial. Sin embargo, sorprende que en este caso varios valores se acercan bastante a este valor límite. Asimismo, cabe señalar que en los organismos que tenían los valores más bajos en la serie de mediciones sin peptona, se han vuelto a medir valores bastante bajos.

10 Para organismos tal como *Lactobacillus lindnerii* 20961 no se puede descartar con total seguridad que pueda aprovechar la isomaltulosa tras una adaptación adecuada. Sin embargo, hay que tomar en consideración que en este caso se llevó a cabo una incubación durante tres semanas en condiciones casi ideales, y aún así las concentraciones de isomaltulosa disminuyeron sólo de forma insignificante. Por lo tanto, y teniendo en cuenta eventuales imprecisiones de medición (algunos valores son superiores a la concentración inicial), no se puede considerar que el aprovechamiento sea demostrado por medio de las mediciones descritas en la presente.

15 Correspondientemente resultó de la serie de ensayos en la que a la solución se le añadieron sustancias amargas del lúpulo como sustancia inhibidora, que tampoco en este caso los valores medidos tras la incubación no eran inferiores al 95 % del valor inicial. Es decir que una vez más no se ha podido detectar un aprovechamiento de la isomaltulosa en el período observado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la fabricación de cerveza o una bebida mixta a base de cerveza, estabilizada microbiológicamente, que comprende las siguientes etapas:
- a) mezclar agua de fabricación de cerveza, lúpulo y una fuente de hidratos de carbono para obtener un mosto,
 - b) cocción del mosto y
 - c) fermentación microbiana del mosto,
- 10 **caracterizado porque** se añade isomaltulosa de forma adicional o exclusivamente después de la filtración de la cerveza o bien, adicional o exclusivamente, justo antes del envasado o antes del almacenamiento de la cerveza o de la bebida mixta a base de cerveza.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fuente de hidratos de carbono contiene cereales malteados y/o fruto crudo de cereales.
3. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade la mezcla que contiene isomaltulosa o la isomaltulosa en forma de sirope, en solución o como sólido cristalino.
- 20 4. Utilización de isomaltulosa como agente estabilizador para estabilizar microbiológicamente cerveza o bebidas mixtas a base de cerveza.

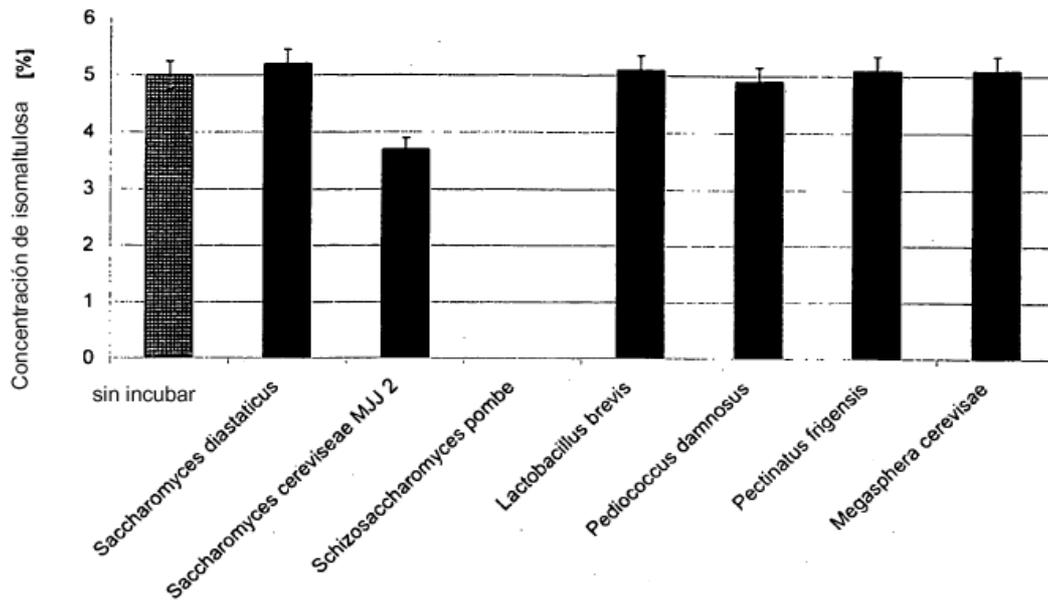


FIG. 1

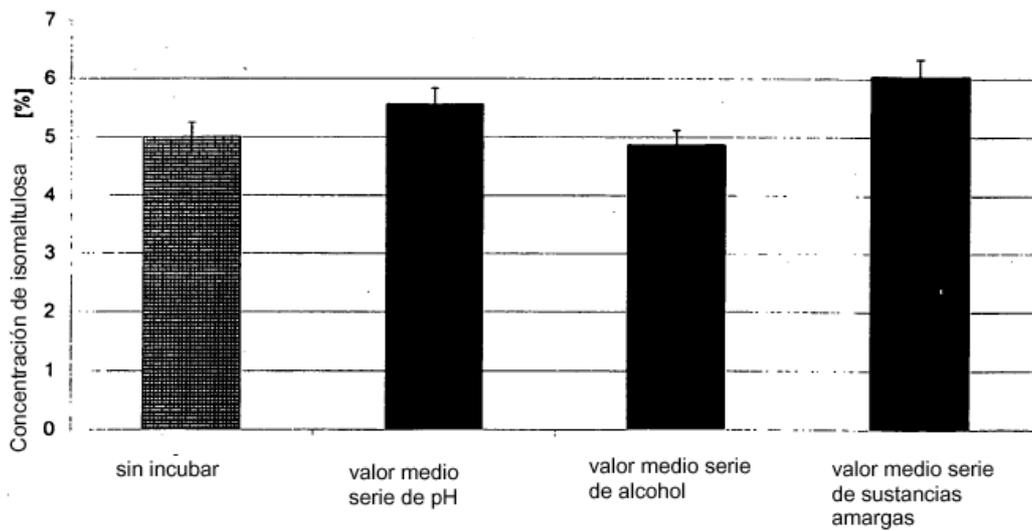


FIG. 2

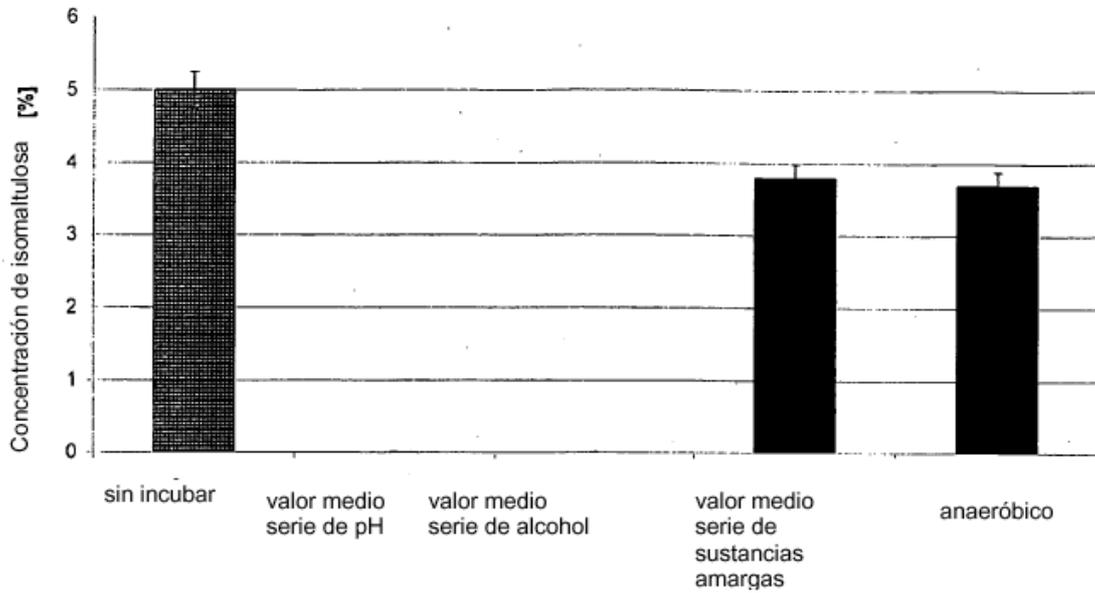


FIG. 3

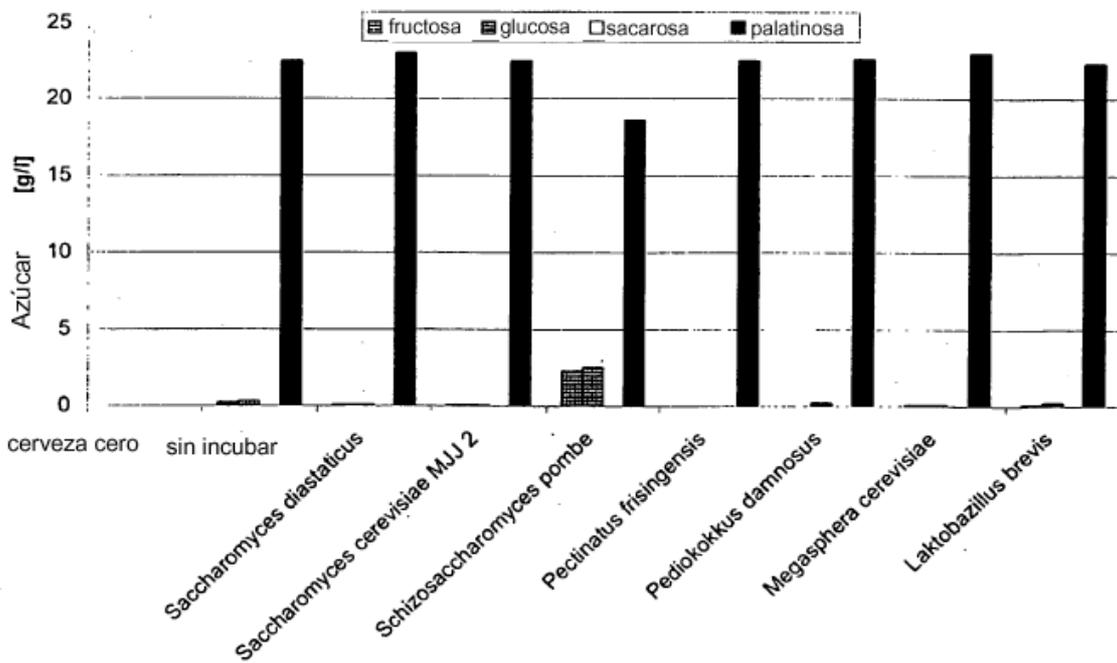


FIG. 4

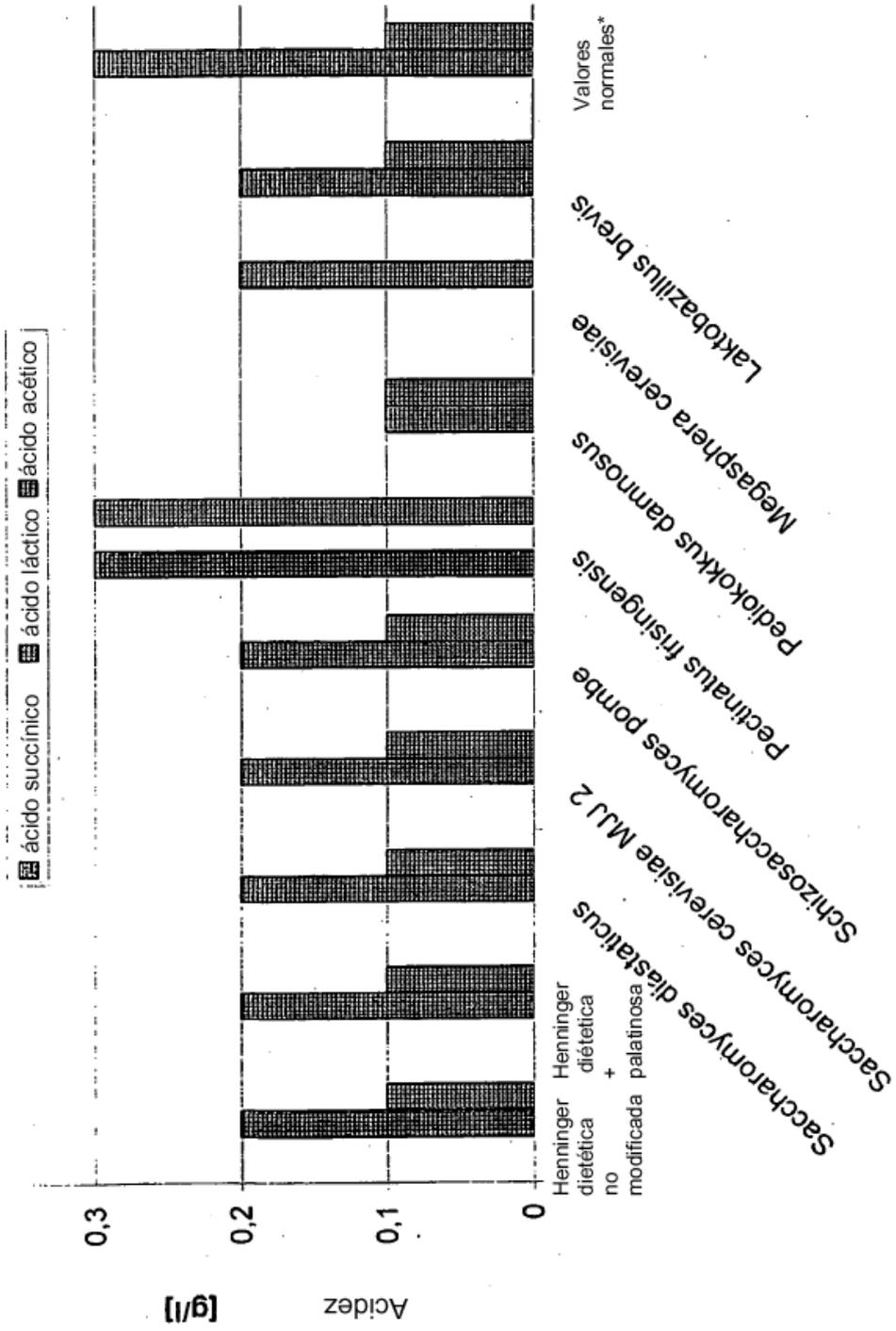


FIG. 5

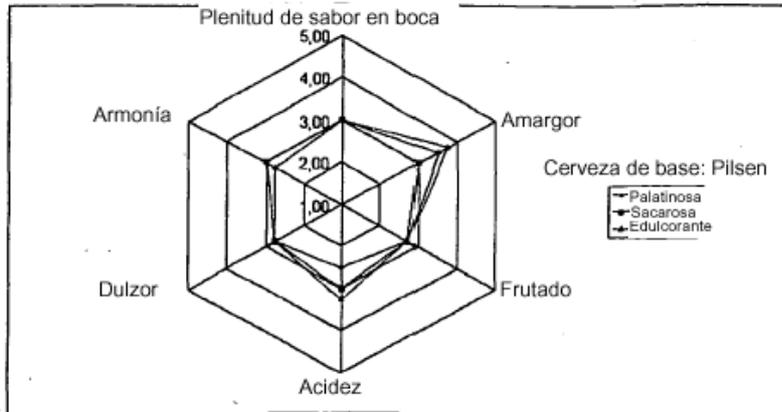


FIG. 6A

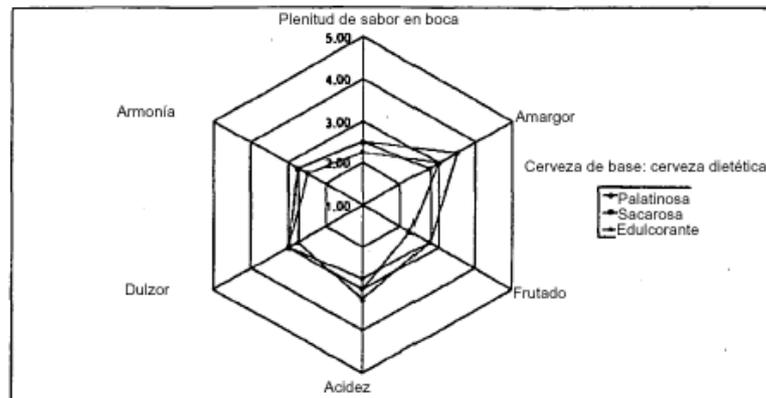


FIG. 6B

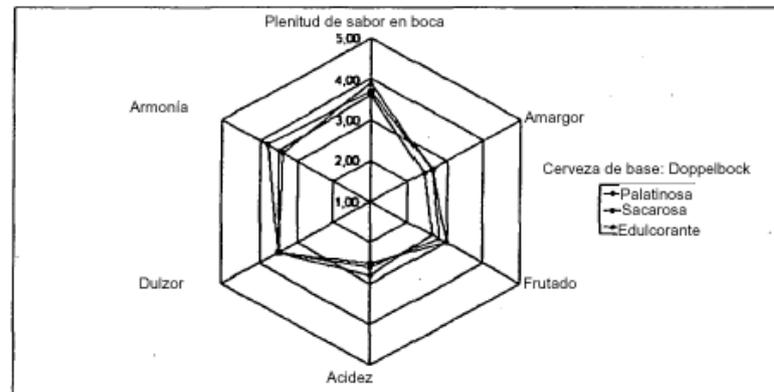


FIG. 6C

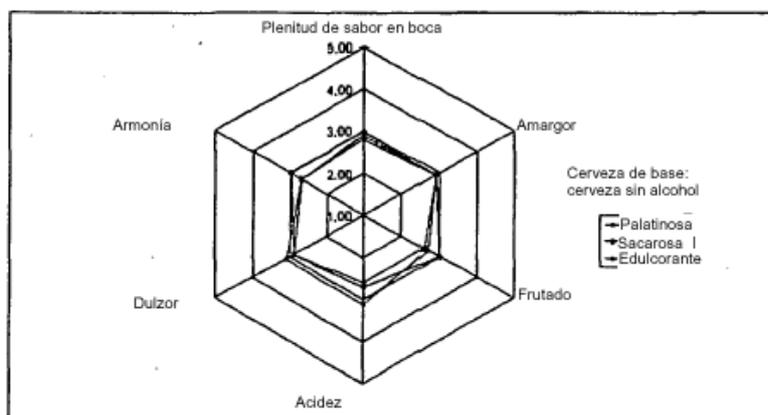


FIG. 6D

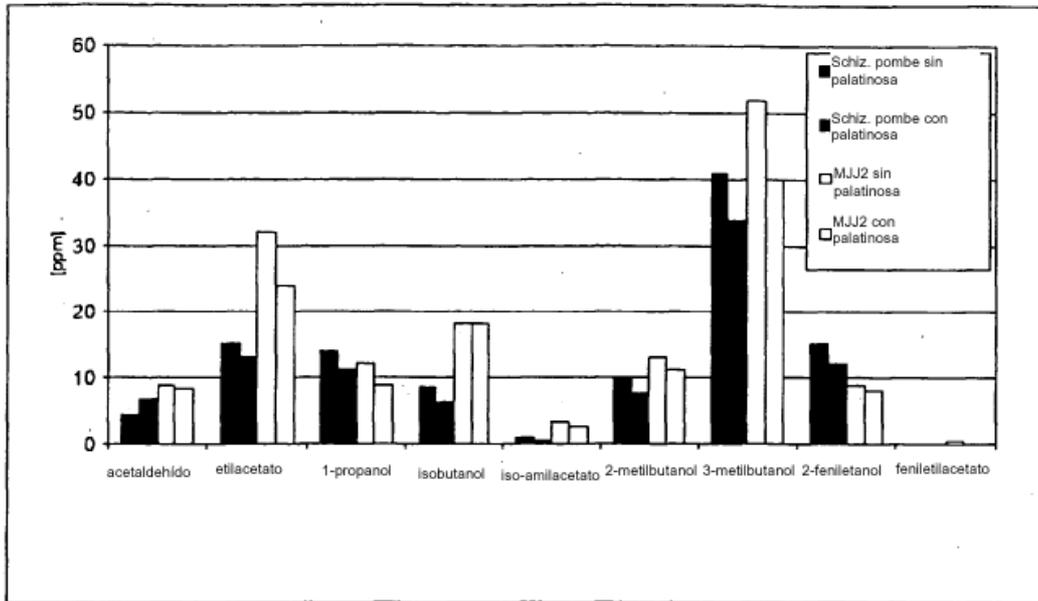


FIG. 7A

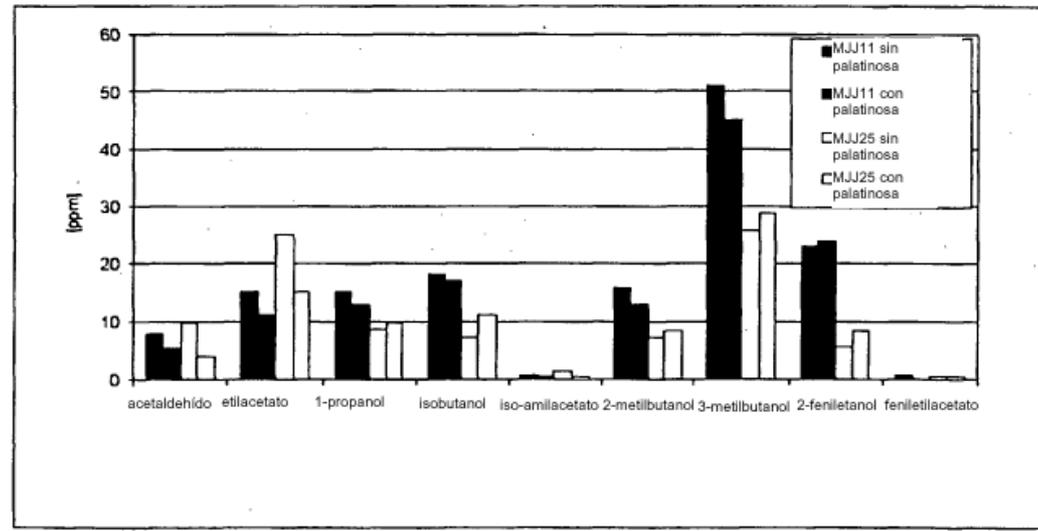


FIG. 7B

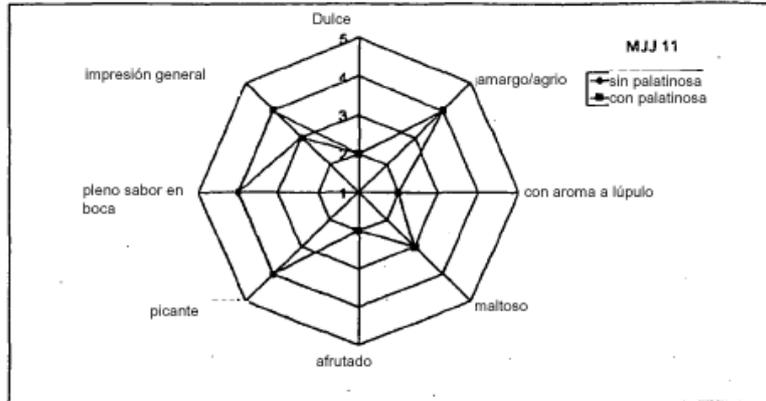


FIG. 8A

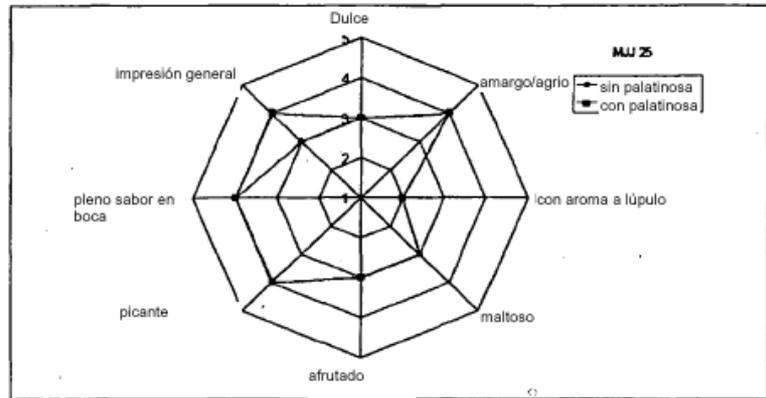


FIG. 8B

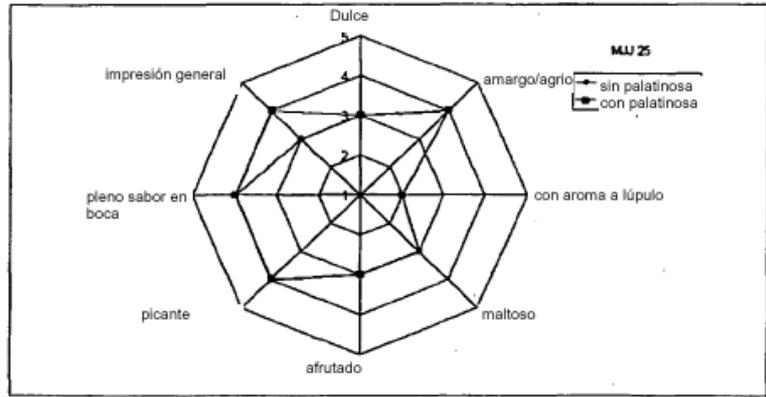


FIG. 8C

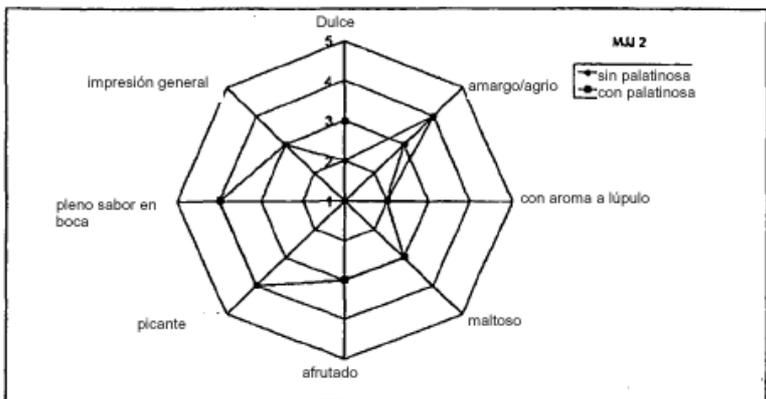


FIG. 8D

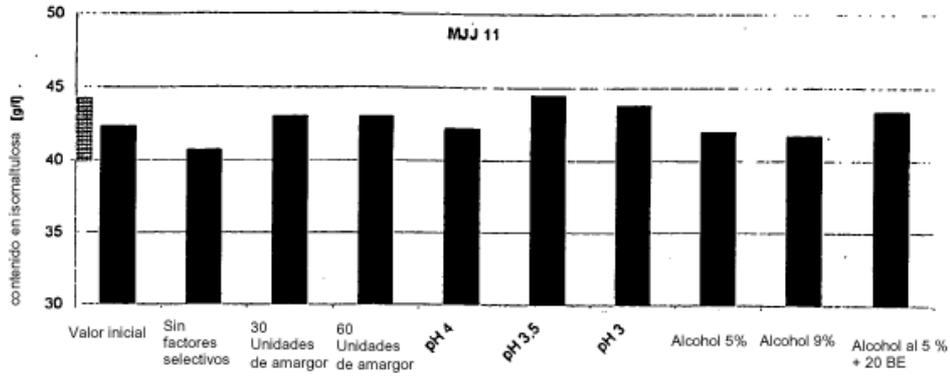


FIG. 9A

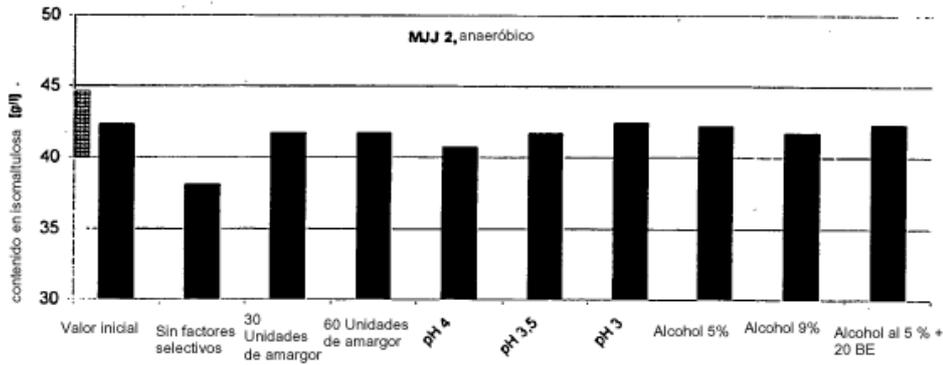


FIG. 9B

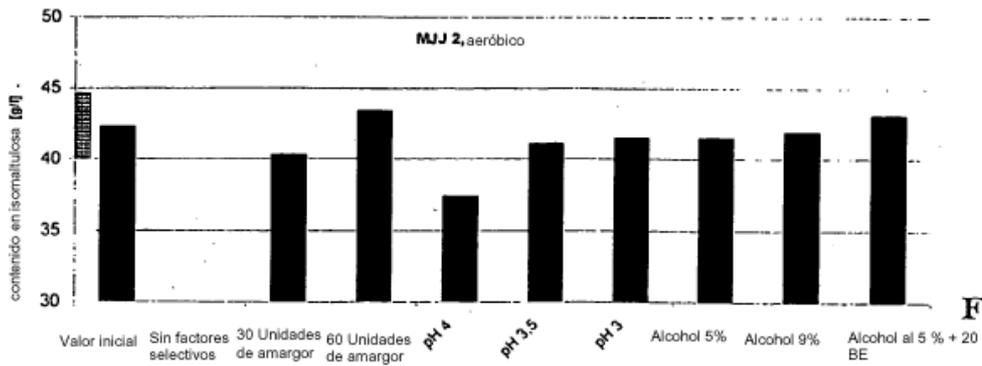


FIG. 9C

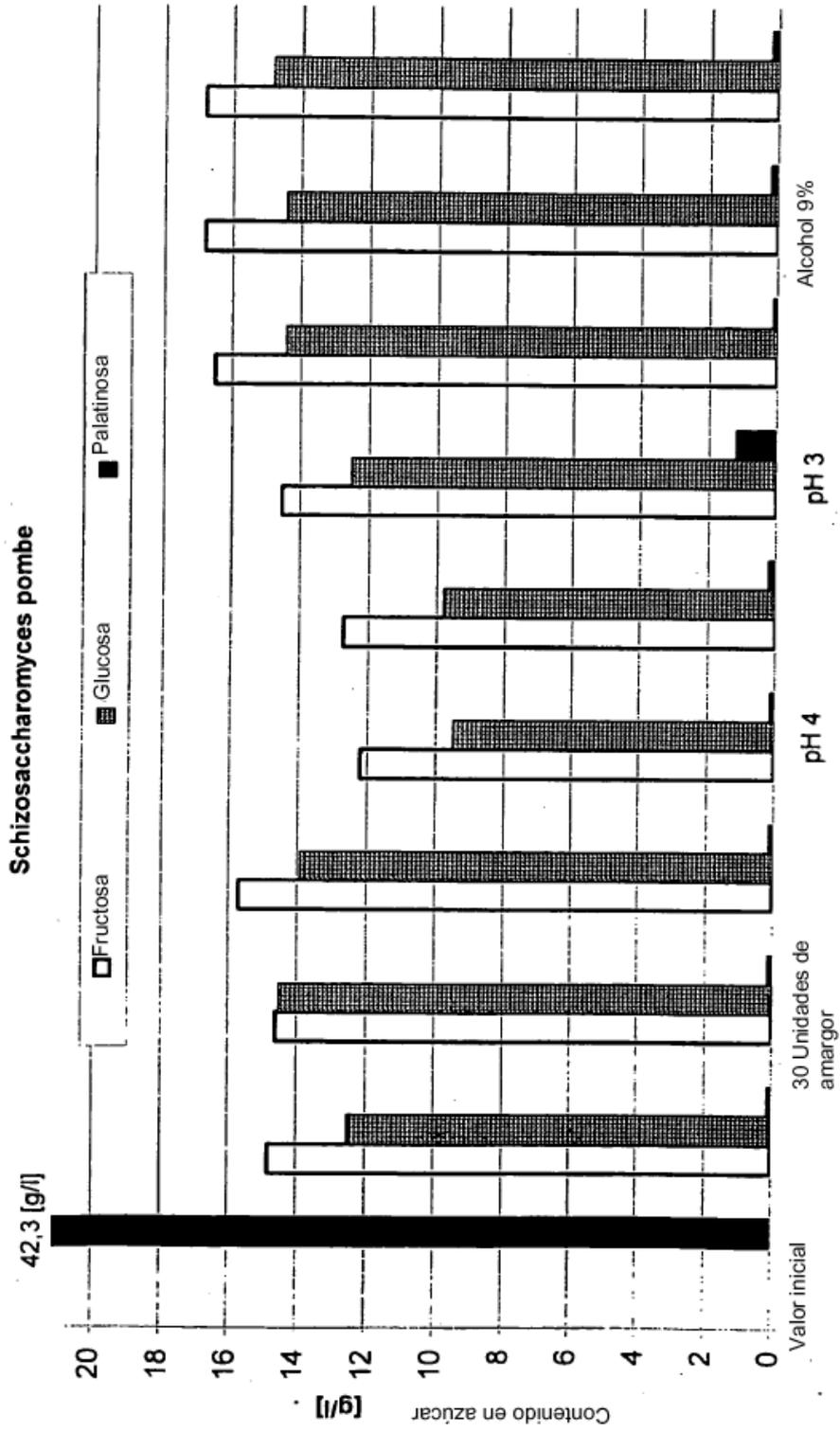


FIG. 9D

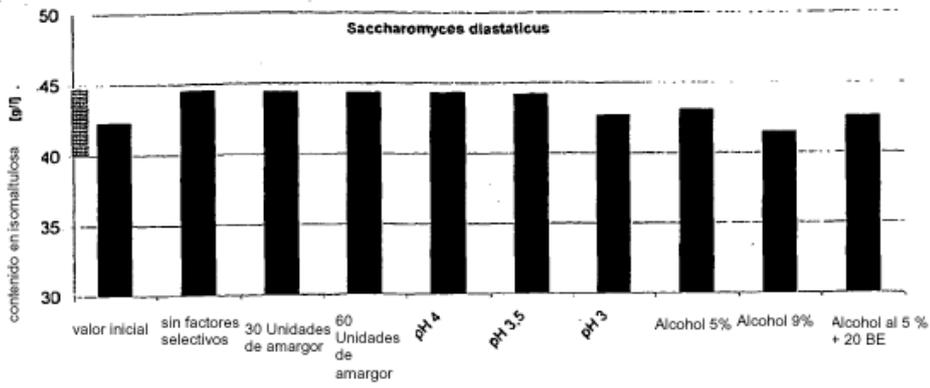


FIG. 9E

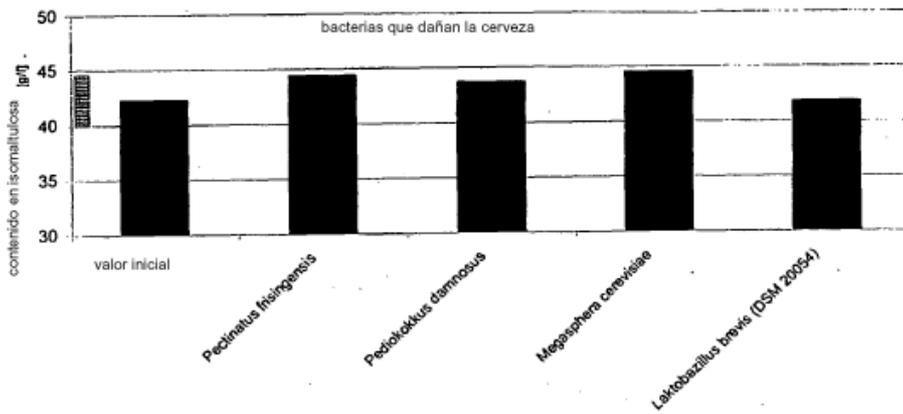


FIG. 10A

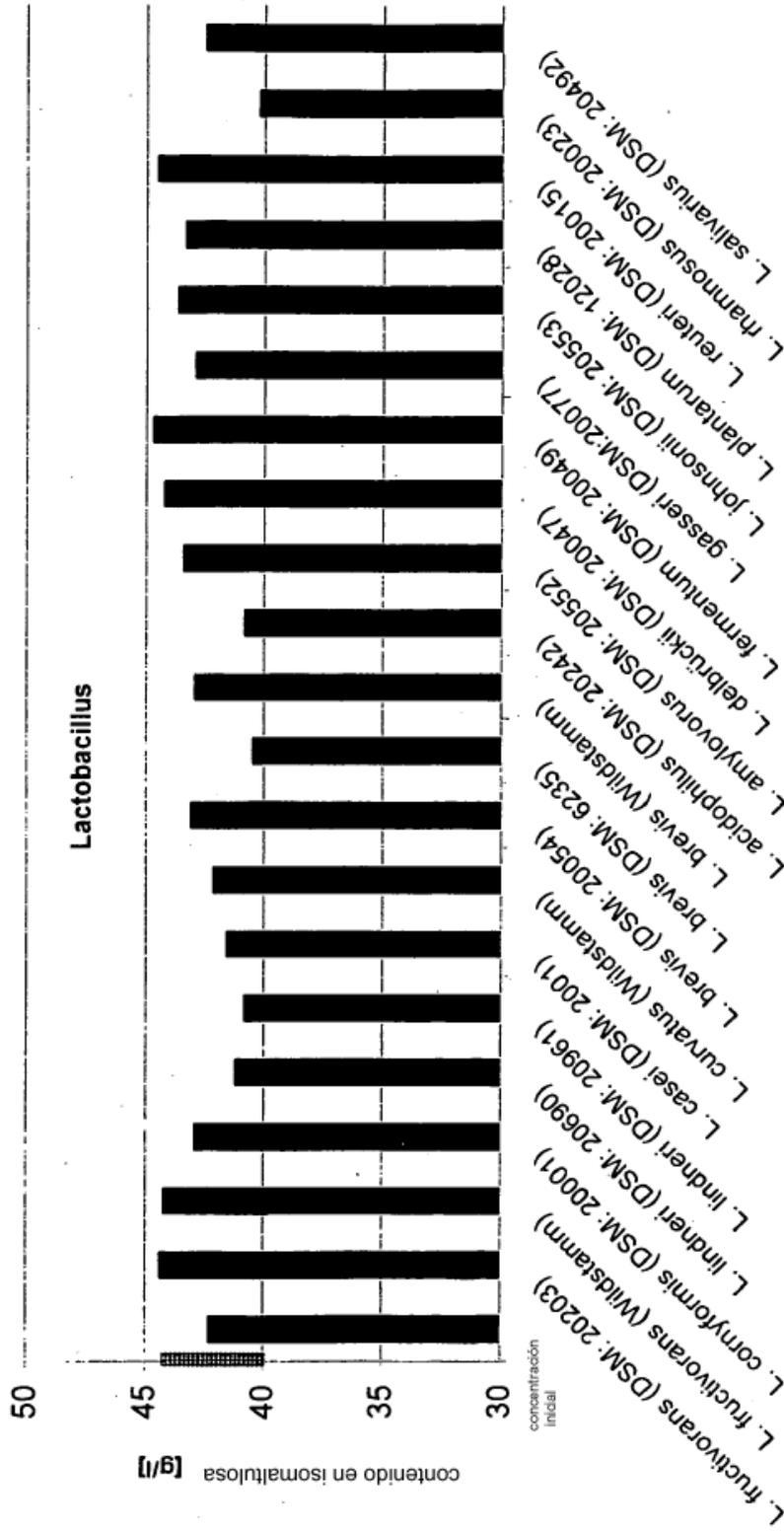


FIG. 10B

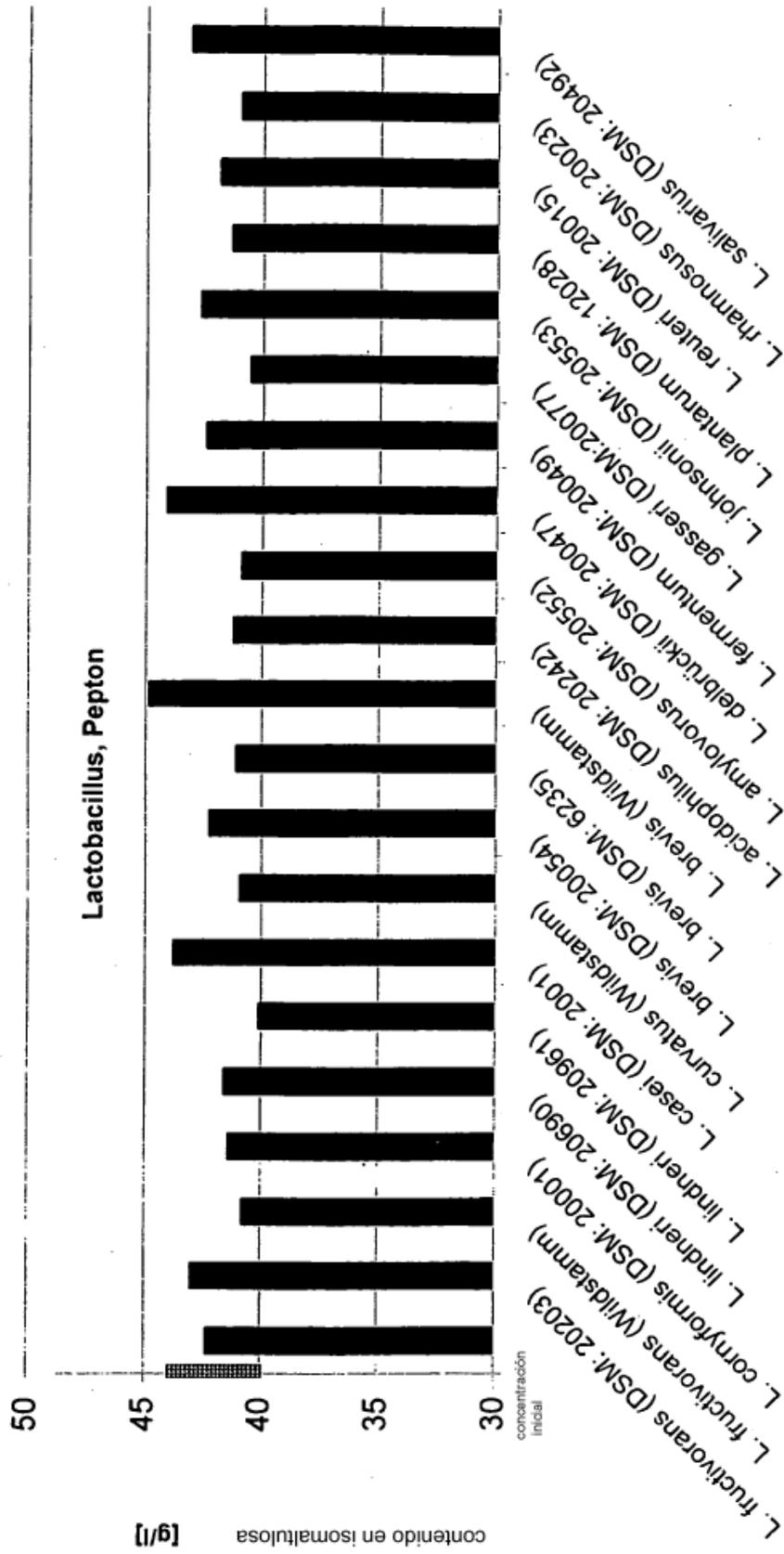


FIG. 10C

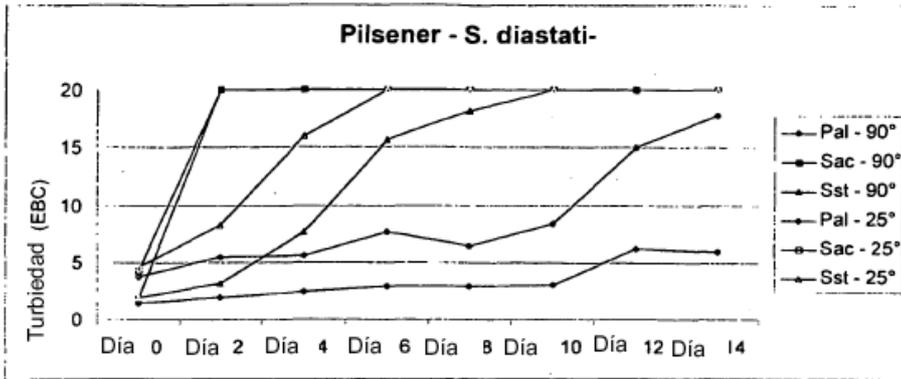


FIG. 11A

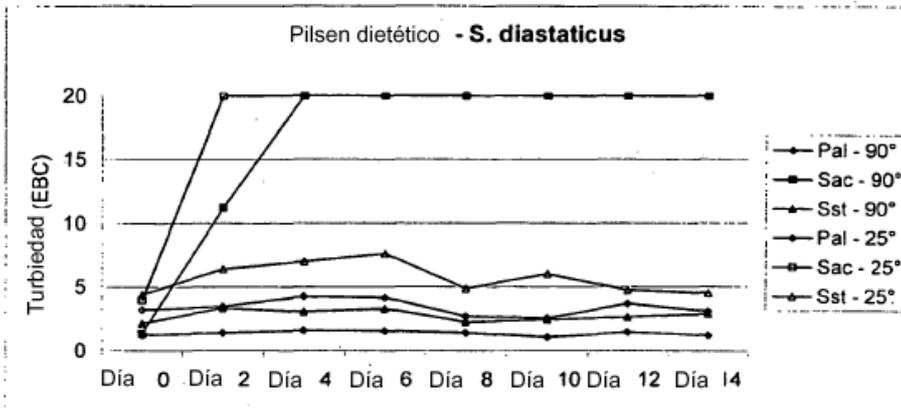


FIG. 11B

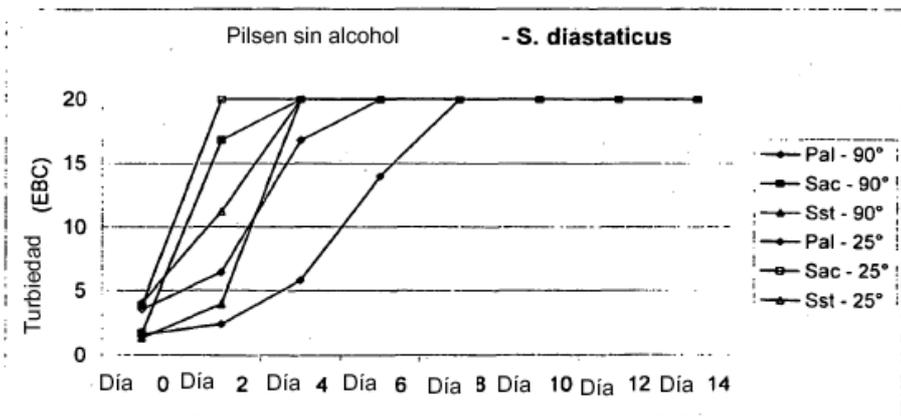


FIG. 11C

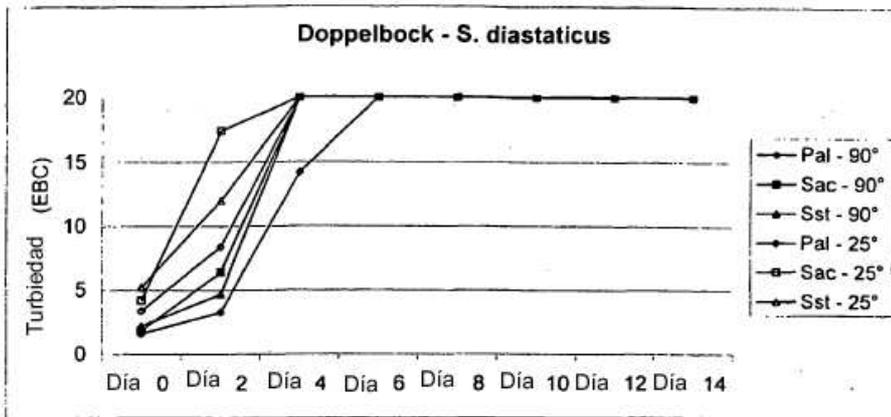


FIG. 11D

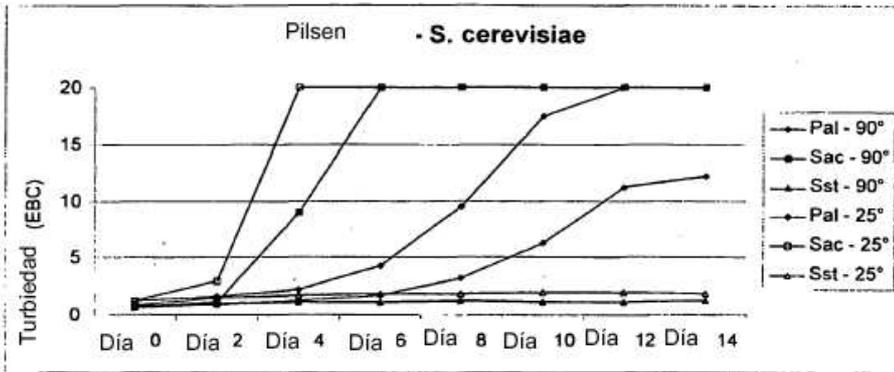


FIG. 11E

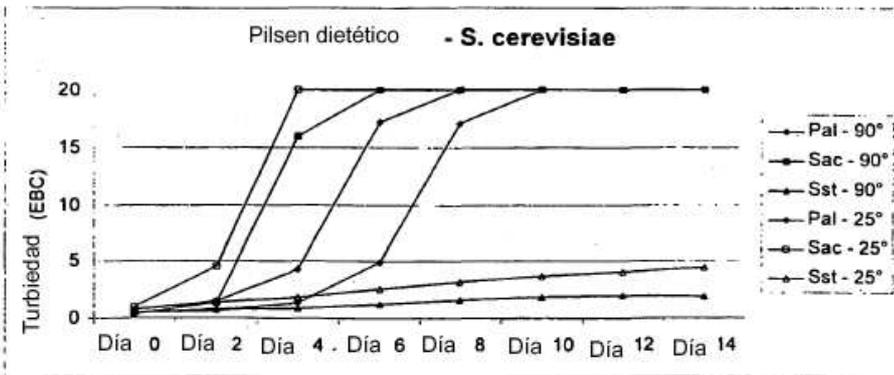


FIG. 11F

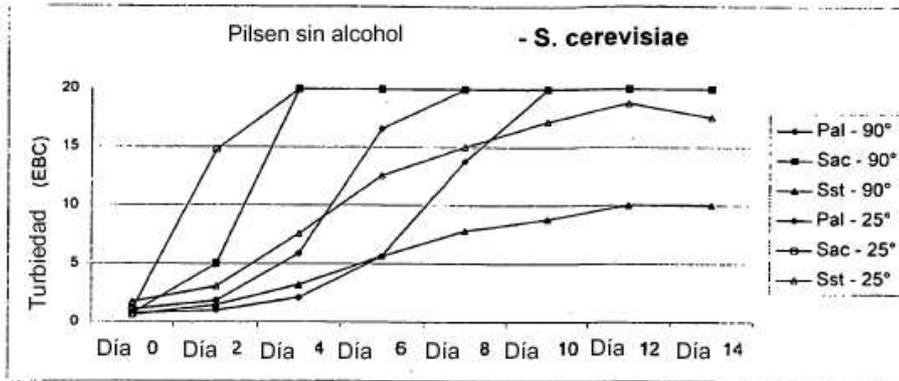


FIG. 11G

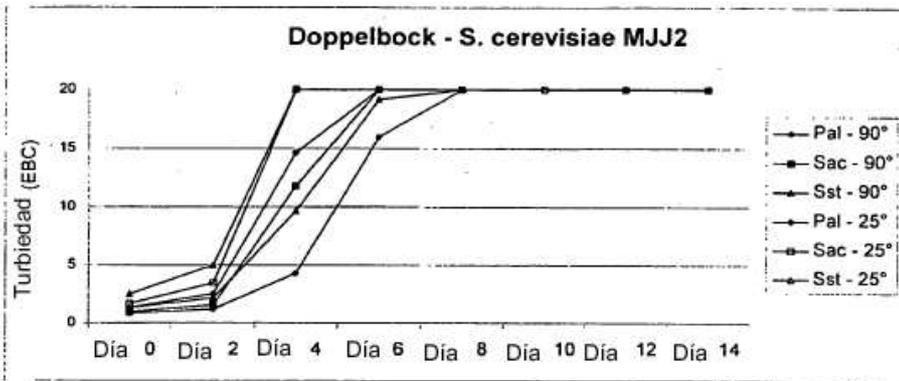


FIG. 11H

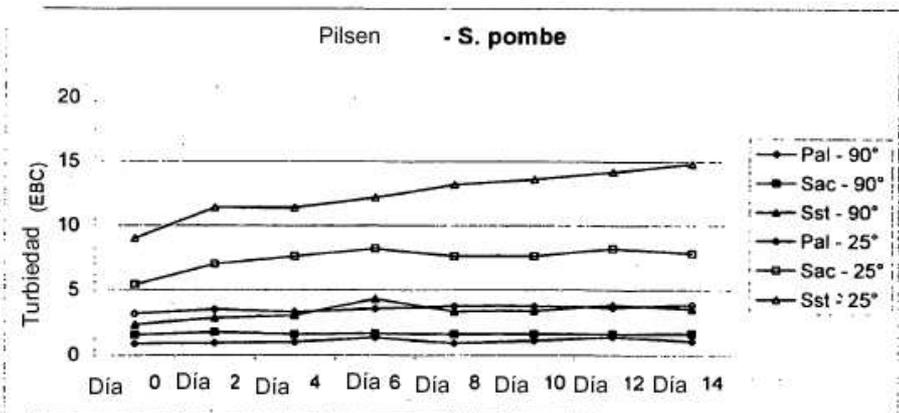


FIG. 11I

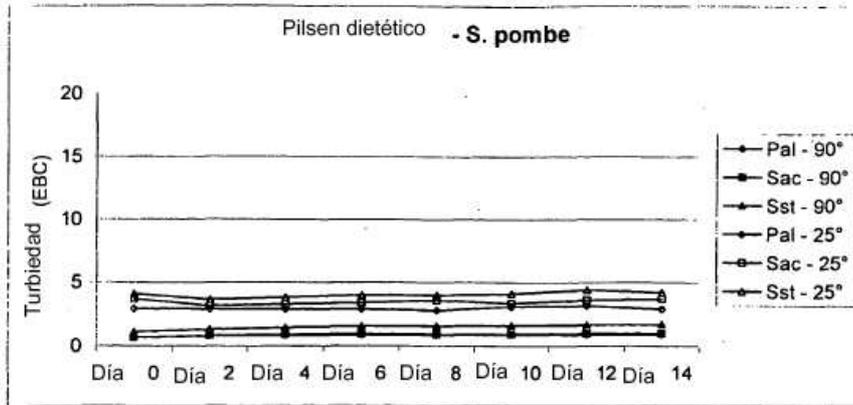


FIG. 11J

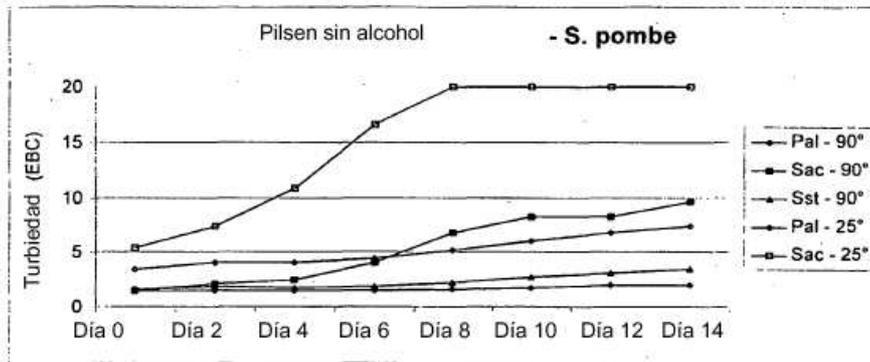


FIG. 11K

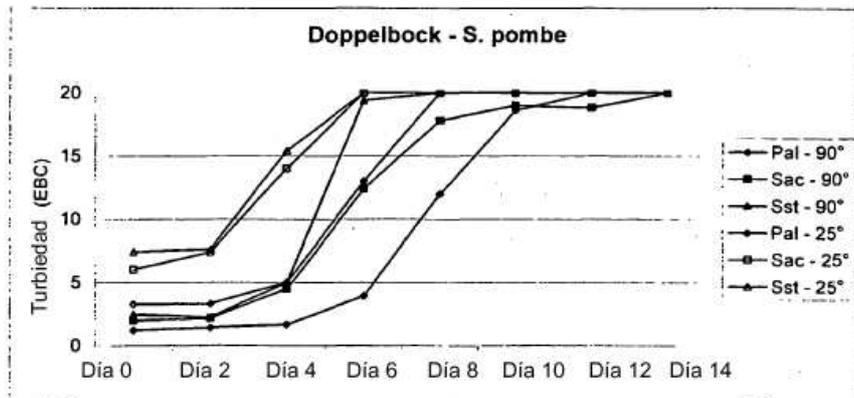


FIG. 11L

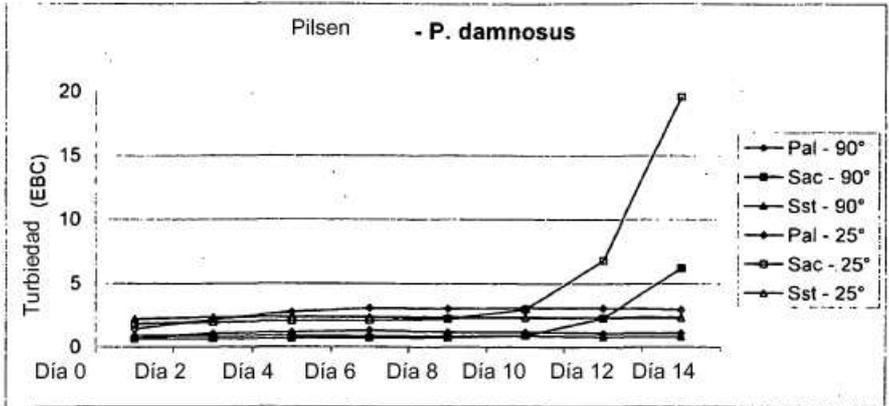


FIG. 11M

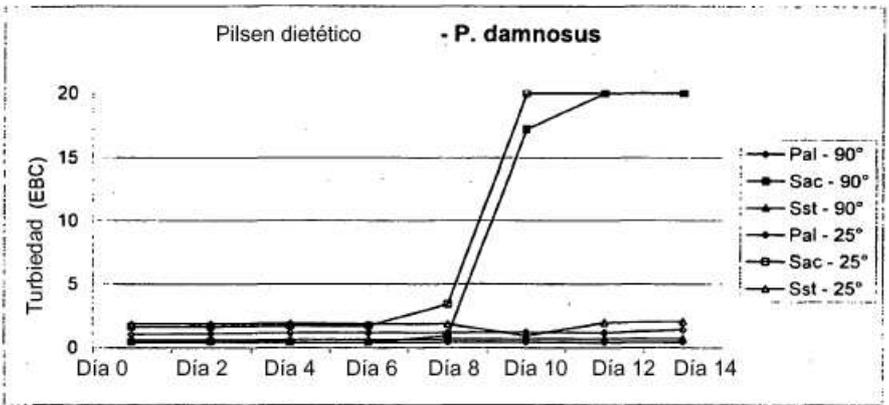


FIG. 11N

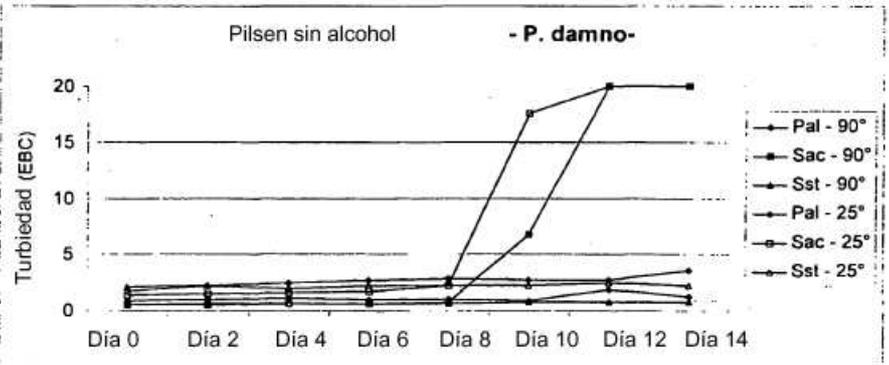


FIG. 11O

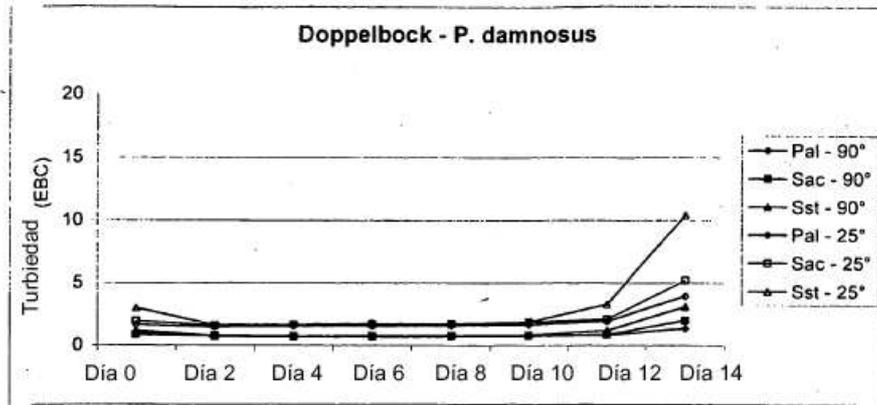


FIG. 11P

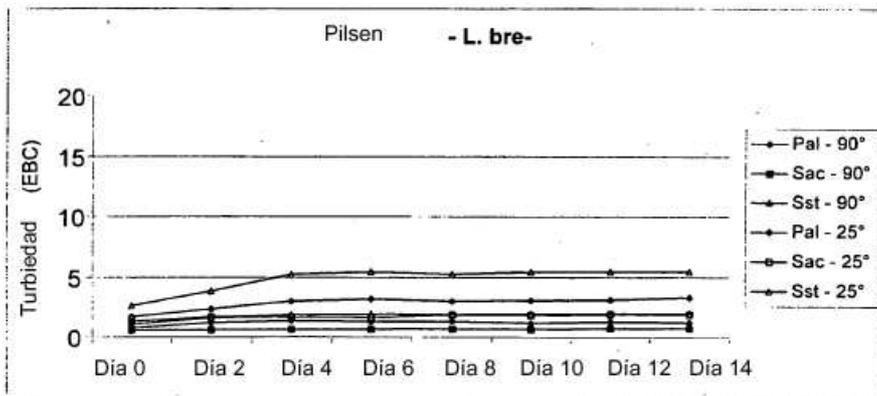


FIG. 11Q

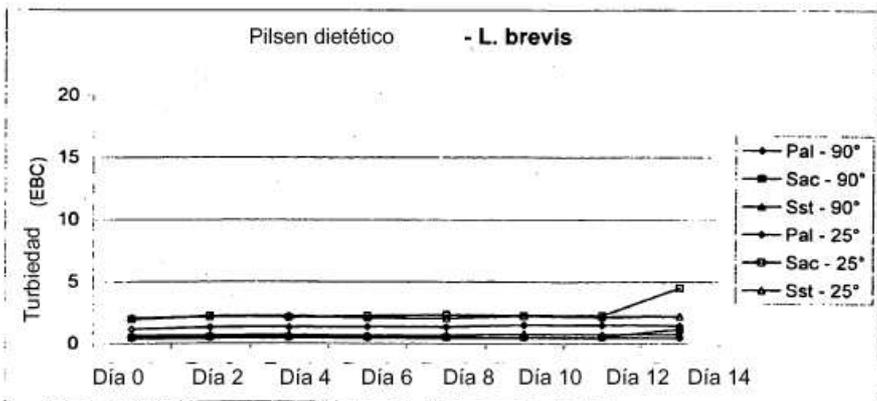


FIG. 11R

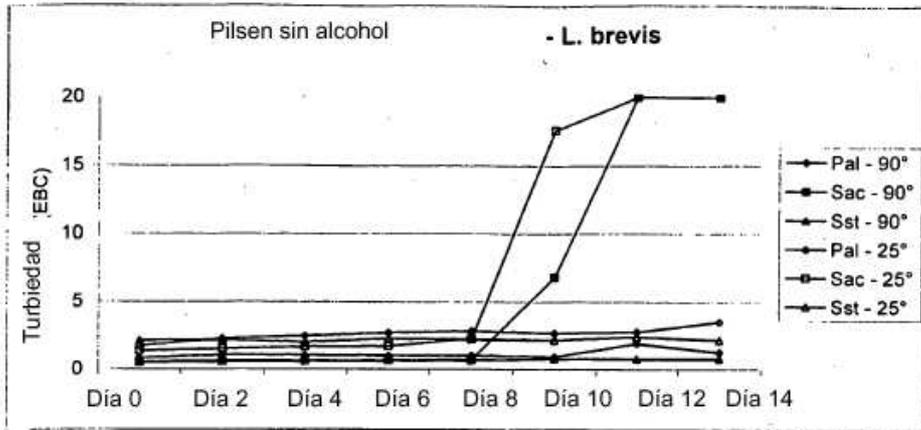


FIG. 11S

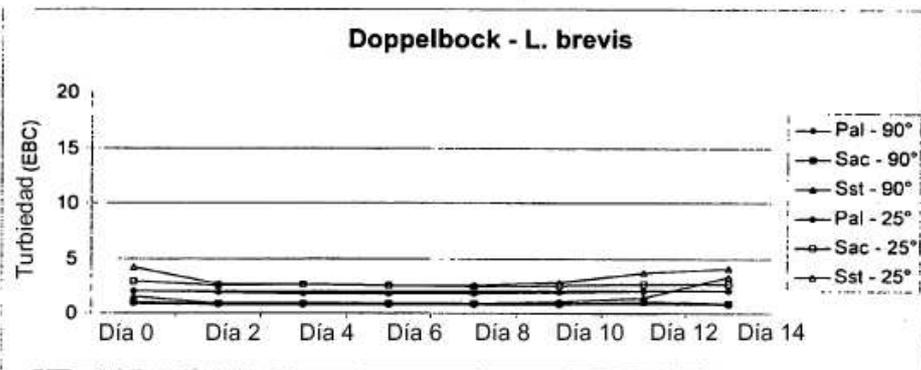


FIG. 11T

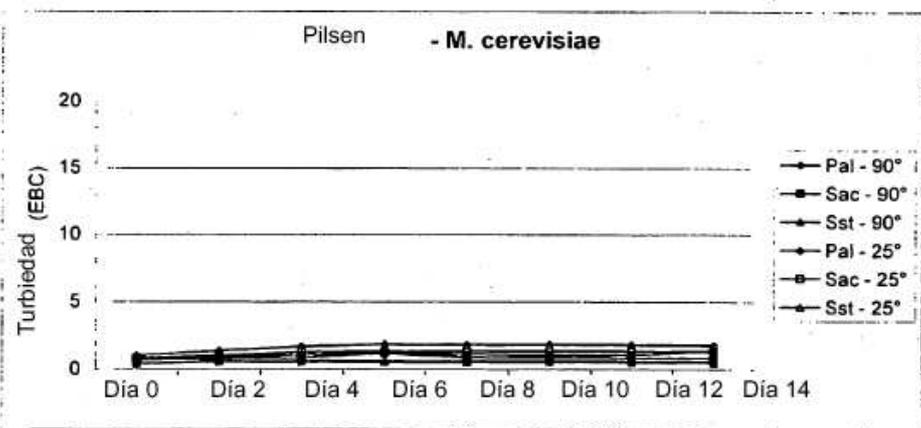


FIG. 11U

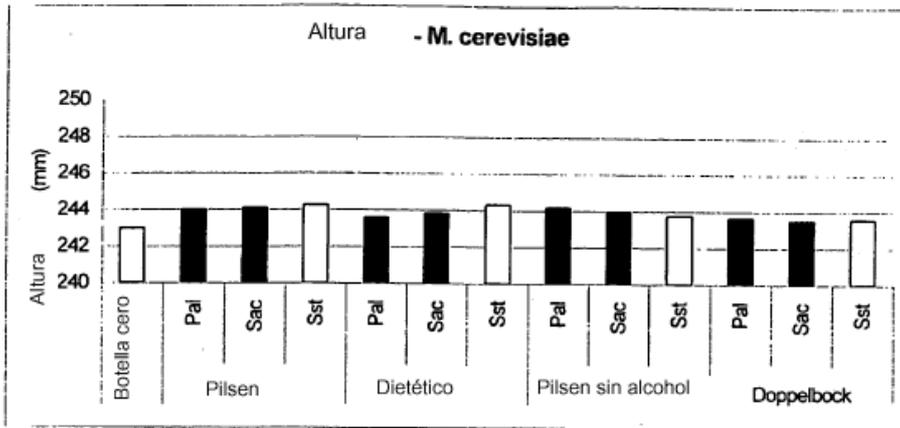


FIG. 12A

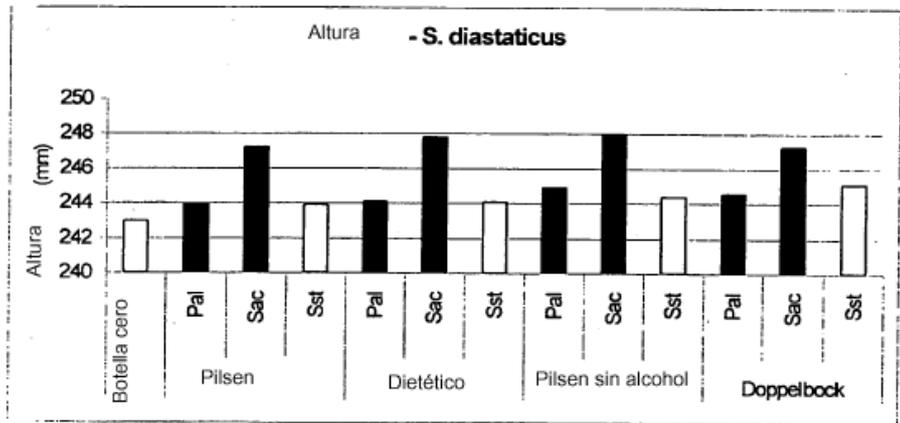


FIG. 12B

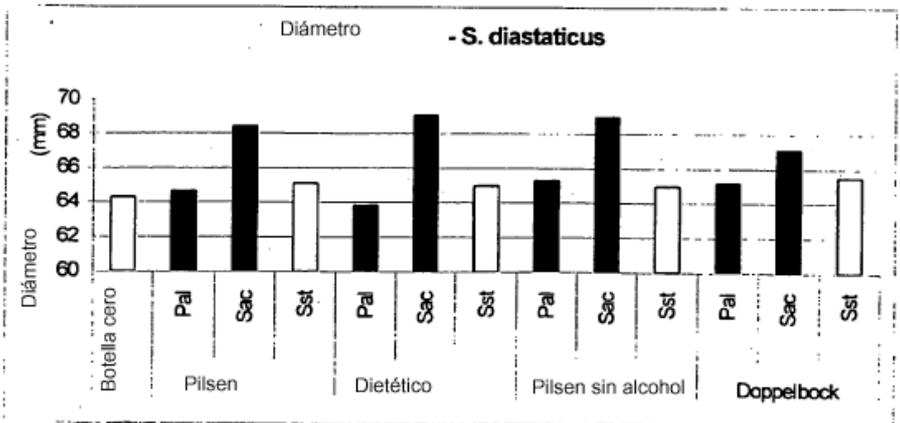


FIG. 12C

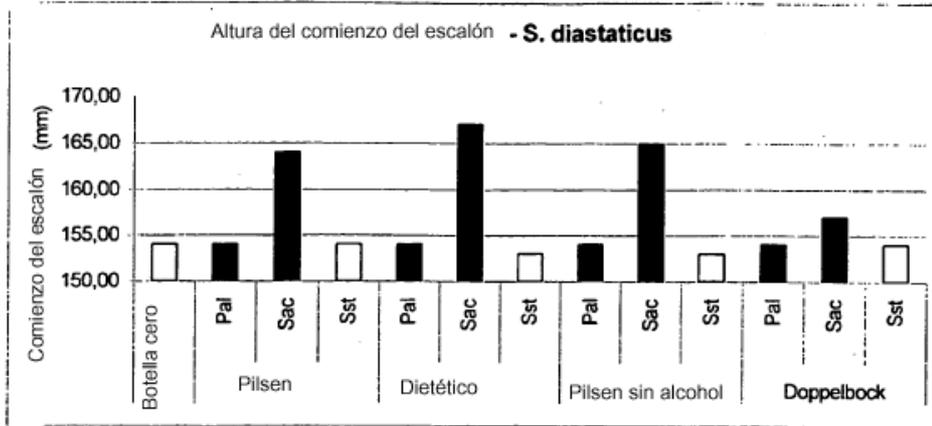


FIG. 12D

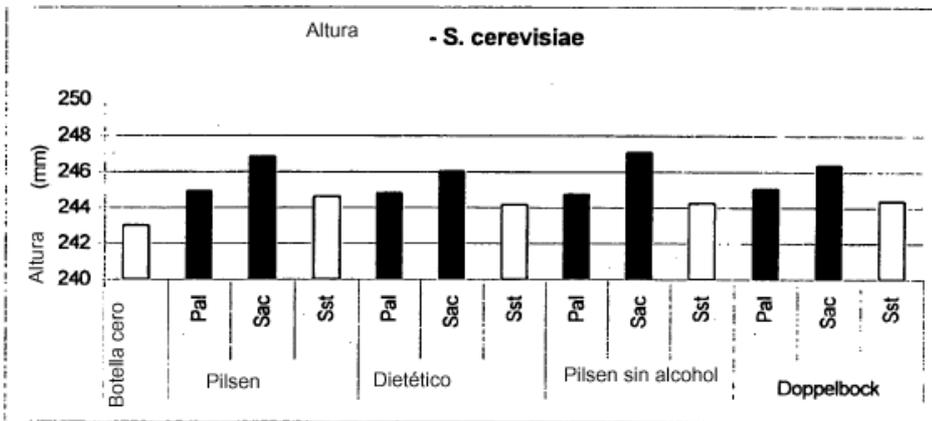


FIG. 12E

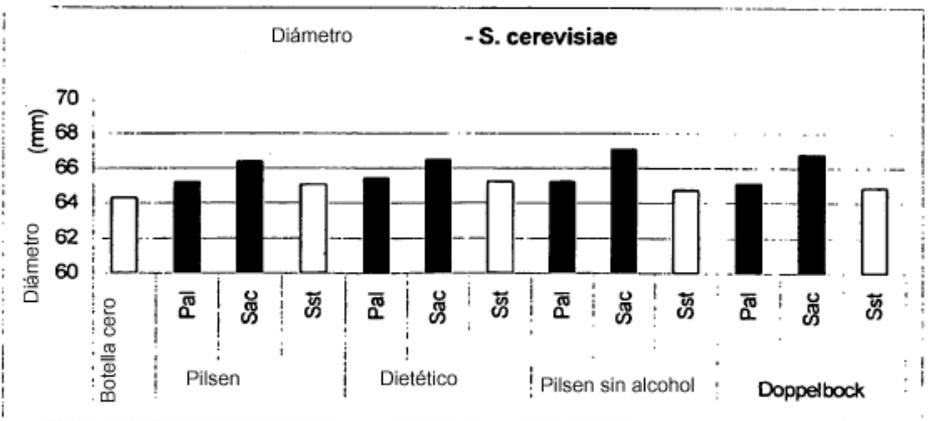


FIG. 12F

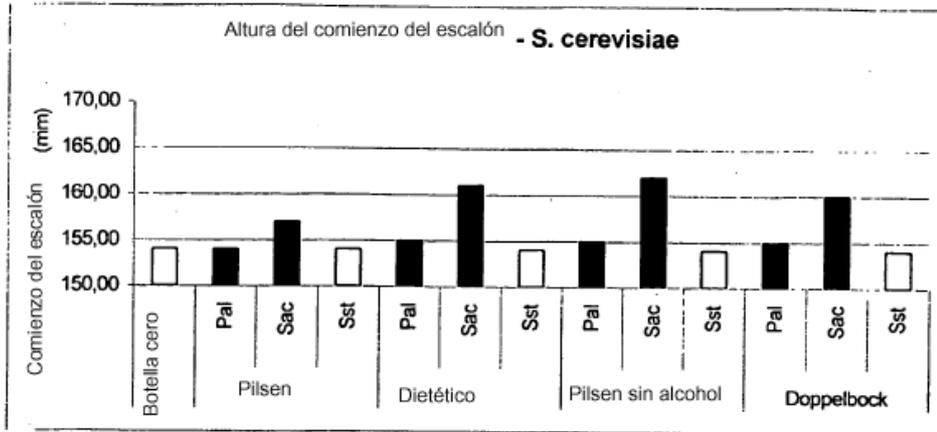


FIG. 12G

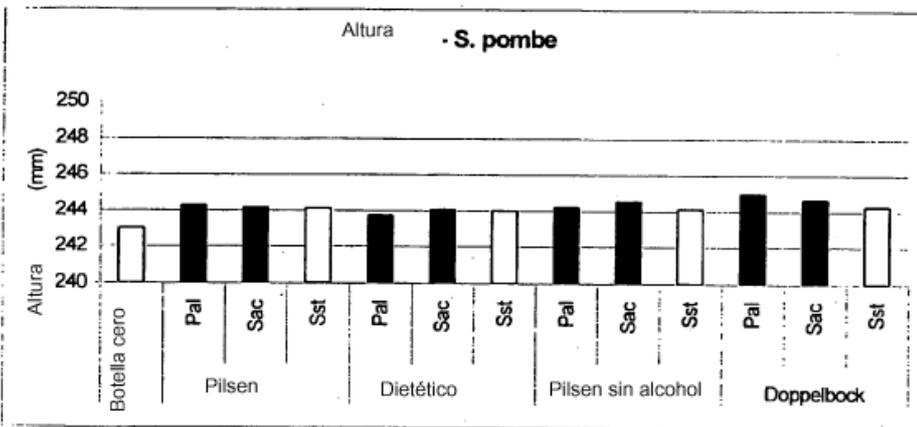


FIG. 11H

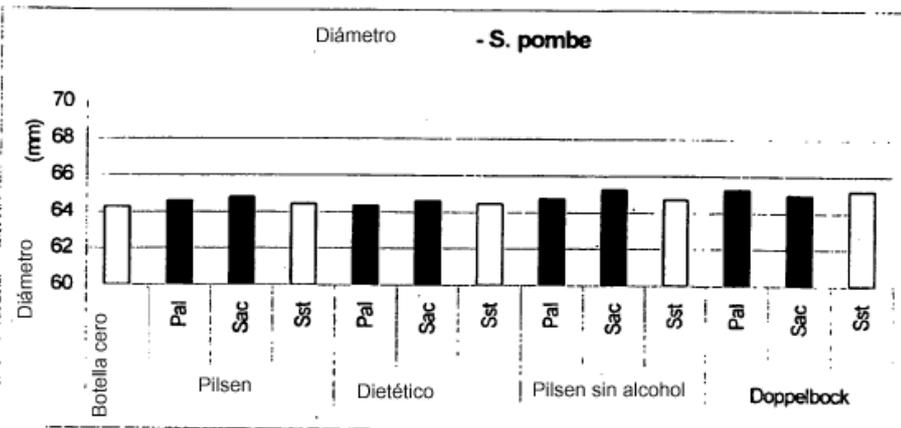


FIG. 12I

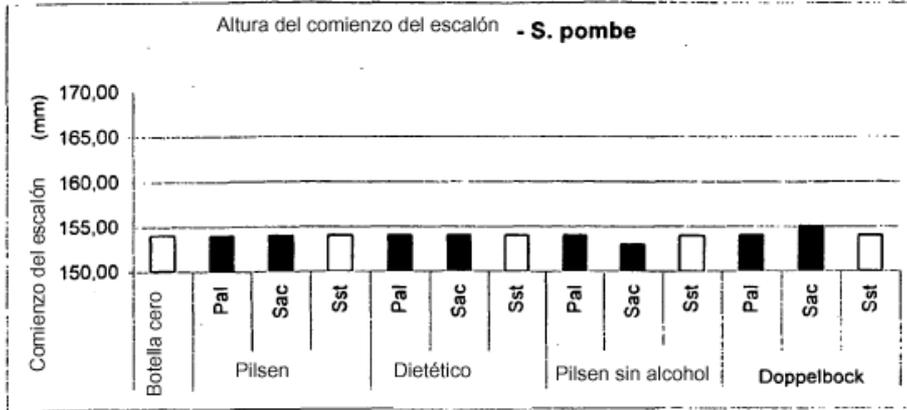


FIG. 12J

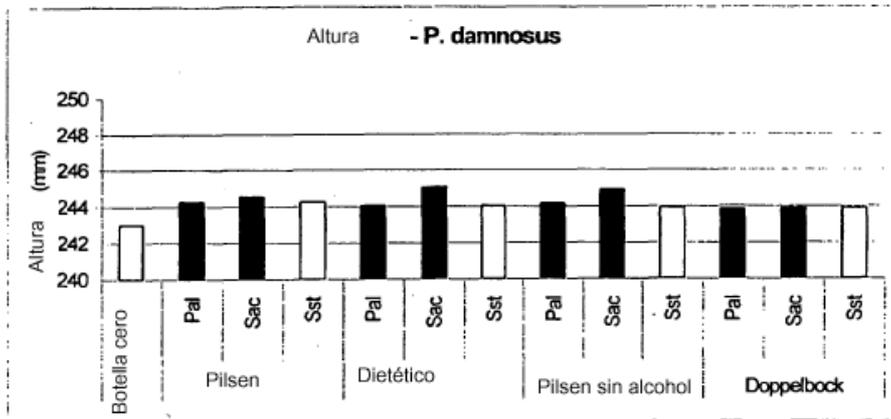


FIG. 12K

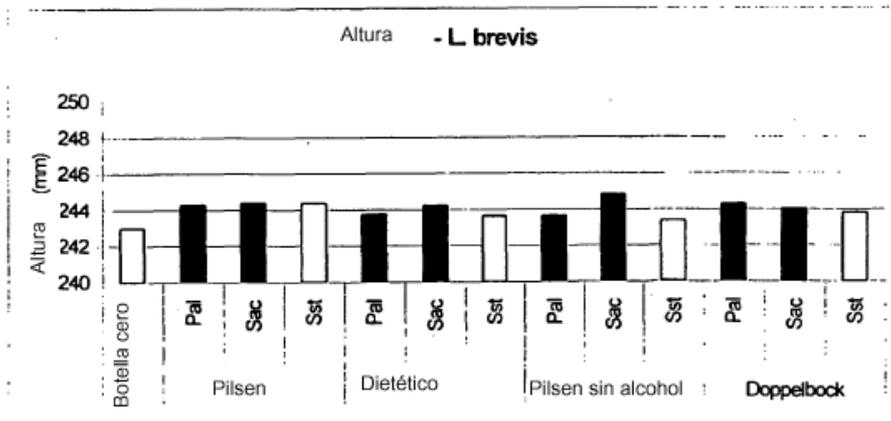


FIG. 12L