

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 840**

51 Int. Cl.:

**C12H 1/056** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2005 E 05784633 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1807500**

54 Título: **Métodos y composiciones para clarificación de bebidas**

30 Prioridad:

**20.09.2004 AU 2004905416**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.10.2014**

73 Titular/es:

**CARLTON AND UNITED BEVERAGES LIMITED  
(100.0%)  
77 SOUTHBANK BOULEVARD  
SOUTHBANK, VIC 3006, AU**

72 Inventor/es:

**DUAN, WEIDONG;  
GIANDINOTO, CAROLINE;  
GOLDSMITH, MARK;  
HOSKING, PETER;  
LENTINI, ALDO;  
OLIVER, TONY;  
ROGERS, PETER;  
SMITH, PETER;  
BACIC, ANTONY;  
LIAO, MING-LONG y  
PETTOLINO, F.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 507 840 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

Métodos y composiciones para clarificación de bebidas.

5 La presente invención se refiere a métodos y formulaciones para clarificación de bebidas. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones útiles como agentes clarificadores, el uso de agentes clarificadores en la producción de productos de bebida, y productos de bebida producidos por el uso de tales agentes clarificadores. Los agentes clarificadores encuentran utilidad particular en la clarificación de bebidas producidas por fermentación.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las bebidas fermentadas o basadas en frutos en particular son a menudo turbias u opalinas. La opalinidad en las bebidas fermentadas es debida a la presencia de moléculas de proteína y tanino, junto con células de levadura.

15 Debido a la preferencia del consumidor, a menudo es deseable clarificar la opalinidad de tales bebidas. Adicionalmente, la clarificación elimina moléculas que podrían agregarse y bloquear el equipo de proceso. En el vino y algunas cervezas, pueden lograrse niveles de clarificación aceptables por reposo de la bebida durante un periodo prolongado a fin de permitir que los agentes causantes de la opalinidad se decanten. Sin embargo, en el caso de muchas bebidas, particularmente cervezas de los tipos ale y lager y zumos de frutas, en los que la vida útil no es  
20 particularmente larga, es necesario efectuar una clarificación rápida a fin de acelerar la entrega de producto al consumidor.

Los cerveceros desean tiempos de producción cortos y existencias limitadas. Diversos aditivos o agentes clarificadores se utilizan generalmente para mejorar la separación de sólidos en las corrientes de cerveza.

25 Los agentes clarificadores se utilizan para asociarse con el material proteínico de la bebida y formar un precipitado que cae rápidamente al fondo de la vasija de almacenamiento como un flóculo denso que puede separarse después.

30 Isinglass es una preparación de colágeno de vejiga de pescado, que se añade a la cerveza en almacenamiento a fin de promover la transparencia de la cerveza y mejorar así la eficiencia de filtración. Junto con Isinglass pueden utilizarse agentes clarificadores auxiliares tales como silicatos o polisacáridos.

35 Frescamente se ha hecho preceptivo el etiquetado de la cerveza respecto a la presencia de ingredientes derivados de pescado debido a problemas de alergia. Los colágenos de sustitución procedentes de bovino no precisan llevar la misma advertencia. Sin embargo, los productos de bovino reciben una opinión negativa en el mercado debido a la enfermedad Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) y, en el mejor de los casos, pueden considerarse como agentes clarificadores sustitutivos a corto plazo. No existen alternativas conocidas distintas de colágeno que sean tan eficaces en costes como Isinglass. Los cerveceros están deseosos de encontrar un sustituto aceptable de  
40 Isinglass.

Otro problema con la utilización de Isinglass como agente clarificador para vino es que Isinglass extrae los polifenoles del vino y por tanto puede alterar algunas de las características del vino.

45 Agentes de clarificación competitivos tales como Silicasol™ y carragenanos proporcionan resultados variables conforme a la industria y pueden presentar inconvenientes - colas harinosas y contaminación de residuos de levadura.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una alternativa fiable de Isinglass para uso en la clarificación de bebidas, particularmente bebidas fermentadas, tales como cerveza y vino.

50 Se comprenderá claramente que, aunque se citan en esta memoria cierto número de publicaciones de la técnica anterior, esta referencia no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento común general en la técnica, en Australia, o en ningún otro país.

### 55 SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de esta invención han encontrado que tipos particulares de pectina, un polisacárido no alergénico derivado de plantas, proporcionan actividad de clarificación eficaz a un nivel igual o superior que el alcanzado con Isinglass. Han determinado también que la incorporación de ciertos aditivos a la Pectina proporciona un efecto de clarificación mejorado.  
60

De acuerdo con ello, en un primer aspecto la presente invención proporciona una formulación de clarificadores que comprende una Pectina y un donante de dióxido de azufre.

Dado que la actividad, estabilidad y solubilidad de la Pectina dependen del pH, se prefiere que la formulación de clarificadores comprenda también un agente tampón capaz de tamponar el pH de la formulación cuando está en solución al pH que es óptimo para la actividad, solubilidad y estabilidad de la Pectina.

- 5 Dado que la actividad de la Pectina puede verse influenciada por la presencia de iones divalentes, la formulación de clarificadores comprende también preferiblemente un agente secuestrante.

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de una Pectina como agente clarificador. La Pectina para uso en el segundo aspecto de la invención se proporciona preferiblemente como la formulación de clarificadores conforme a el primer aspecto de la invención.

15 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de clarificación de una bebida, comprendiendo el método añadir a la bebida una cantidad eficaz de una Pectina. La Pectina para uso en el método conforme a el tercer aspecto de la invención se proporciona preferiblemente por la formulación de clarificadores conforme al primer aspecto de la invención.

El método del tercer aspecto de la invención comprende también preferiblemente los pasos de permitir que se forme un flóculo entre el material proteináceo y la Pectina; y separar de la bebida el flóculo y la pectina asociada.

- 20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una bebida que ha sufrido un proceso de clarificación utilizando una Pectina. La Pectina se proporciona preferiblemente por la formulación de clarificadores conforme a el primer aspecto de la invención.

#### 25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Las pectinas son materiales polisacáridos que tienen propiedades gelificantes, que se encuentran en cantidades variables en las paredes primarias de las células y los tejidos intercelulares de muchas plantas. Son muy abundantes en frutos y hortalizas, especialmente en las cortezas de los frutos cítricos.

- 30 Las pectinas con un grado de esterificación (DE) de 50% o más son conocidas como pectinas ricas de ésteres metílicos, y son capaces de formar geles en sistemas acuosos con contenidos elevados de sólidos solubles y valores de pH bajos. Cuanto mayor es el DE, tanto menor es la cantidad de sólidos solubles requerida y mayor el valor de pH al cual pueden formarse geles.

- 35 Las pectinas ricas en ésteres metílicos (HM) se utilizan para lograr la formación de gel en sistemas basados en frutos con contenidos elevados de sólidos y valores de pH bajos. Los geles producidos con pectinas ricas en ésteres metílicos tienen una estructura firme y corta y son claros y transparentes, con aporte de sabor excelente. Dichos geles son no reversibles por cizalladura o reversibles por calentamiento. Las pectinas ricas en ésteres metílicos se utilizan también ampliamente en productos lácteos acidificados debido a su efecto estabilizador de las proteínas a  
40 pH bajo.

- 45 Las pectinas pobres en ésteres metílicos o pobres en metoxi (LM) se definen como aquéllas con un grado de esterificación (DE) de 50% o menos. Este grupo de pectinas se divide en dos sub-grupos, a saber Pectina convencional pobre en ésteres metílicos (LMC) y Pectina amidada (LMA) pobre en ésteres metílicos. Ambos sub-grupos se caracterizan por su capacidad de formar geles en sistemas con bajos contenidos de sólidos y un intervalo amplio de pH. Ambos tipos forman geles en presencia de calcio. Es sabido que tanto DE (grado de esterificación) como DA (grado de amidación) de las pectinas tienen ambos influencia en la capacidad de las pectinas para formar geles, dado que DE y DA determinan la reactividad de las pectinas con el calcio.

- 50 Las pectinas LMA se utilizan generalmente para ayudar a la gelificación en preparaciones de frutos pobres en azúcar, particularmente en mermeladas y jaleas pobres en azúcar. Las mismas son sensibles al calcio y por consiguiente son capaces de gelificarse como resultado del contenido de calcio en el fruto. Las pectinas LMC son menos reactivas con el calcio que las preparaciones LMA, y actuarán únicamente como agentes espesantes en las preparaciones de frutas. No obstante, si se añade calcio adicional, se producirá la gelificación. Las pectinas LMC se  
55 utilizan en yogur de frutas, helados rizados y productos similares.

- Además de su uso como agentes gelificantes en productos basados en fruta y lácteos, es conocido el uso de pectinas en productos de bebida. La Solicitud de Patente U.S. No. 20030064143 asignada a CP Kelco y la Patente US número 6.143.346 asignada a Hercules Incorporated describen ambas un proceso para fabricación de una  
60 bebida clara que utiliza una Pectina que tiene un DE alto (mayor que 70%) y no es sensible al calcio y que aumenta la viscosidad de la bebida. En US 6.143.346, las pectinas se utilizan para espesar materiales, con inclusión de alimentos y cosméticos. En ambos documentos de la técnica anterior la Pectina se utiliza como un aditivo, en una cantidad de al menos 0,025%, que permanece en el producto final. No se propone como agente clarificador. En la presente invención, la Pectina se utiliza como agente de procesamiento únicamente para aumento de la  
65 transparencia; la misma no queda retenida, excepto en una proporción insignificante, en el producto de bebida final.

La Solicitud de Patente Internacional PCT/GB97/01546, con solicitante Laporte BSD Limited, describe el uso de pectinas como agentes clarificadores, teniendo la Pectina un intervalo de peso molecular indicado por un número de viscosidad limitante menor que 0,5, y preferiblemente de 0,005 a 0,2 y un grado de esterificación de 10-50%,  
 5 preferiblemente menor que 30%. La Pectina descrita para uso por Laporte se deriva de la naturaleza, pero tiene que convertirse en la forma deseada por despolimerización con pectinasa. Esto no es necesariamente el caso en la presente invención. La cantidad de pectina descrita para uso como agente clarificador en Laporte está comprendida en el intervalo de 0,5 a 2,0%. Este valor es muy superior al contemplado por la presente invención.

10 Los agentes clarificadores, tales como Isinglass y clarificadores animales se utilizan en la fabricación de cerveza para acelerar la clarificación de la cerveza una vez que se ha completado el proceso de fermentación y cuando la cerveza se encuentra en almacenamiento. Muchas cervezas, especialmente las de tipo Lager, se filtran al cabo de cierto tiempo de almacenamiento por filtración con membrana, o por filtración asistida con tierra de diatomeas. El proceso de clarificación produce idealmente flóculos sólidos que no se alteran fácilmente en los tanques de  
 15 almacenamiento después de la extracción de la cerveza antes del paso a la filtración con membrana o DE, pero son sin embargo tan sólidos que su eliminación es difícil con los regímenes de limpieza usuales aplicados en esta técnica. Los clarificadores favorecen una filtración más eficiente y campañas de filtración más largas.

20 Los agentes clarificadores se dosifican en la cerveza al pasar a los tanques de decantación, usualmente después del paso de la cerveza a través de las centrífugas de levadura que reducen la carga de células de levadura como valor típico hasta aproximadamente  $10^6$ /ml. El alto número de Reynolds asociado con la dosificación asegura usualmente que el agente clarificador se dispersa agresivamente en la cerveza. El componente principal de la Pectina es el ácido galacturónico, que está unido a una cadena de galacturonato con enlaces glicosídicos. Las unidades de ácido galacturónico están esterificadas parcialmente con metanol y esto determina a su vez el valor DE, el grado de  
 25 esterificación, que tiene a su vez una influencia decisiva sobre las propiedades funcionales de la Pectina.

La Pectina pobre en ésteres metílicos (a la que se hace referencia también en esta memoria como Pectina baja en metoxi) es el ésteres metílicos parcial del ácido poli-alfa-D-galacturónico enlazado en 1,4. La estructura se complica, sin embargo, por interrupción con residuos simples 1,2-alfa-L-ramnosa. Las pectinas pobres en metoxi formarán  
 30 geles de calcio firmes y el método de reticulación puede considerarse en términos del modelo de 'caja de huevos', que requiere una unión cooperativa de los iones calcio entre cintas de poligalacturonato alineadas. La afinidad hacia el calcio puede modificarse por amidación de los grupos ácidos y por esterificación - por cambio de la carga y distribución de la carga. La afinidad de la Pectina en solución se verá afectada también por el pH, la temperatura y la concentración de azúcares y macromoléculas en solución.

35 Para minimizar la dilución de la cerveza y por comodidad de manipulación, los agentes clarificadores se dosifican a partir de soluciones stock concentradas. Los inventores han determinado que existen límites superiores para el intervalo de concentración utilizable de los agentes clarificadores basados en Pectina en las fábricas de cerveza, basándose en consideraciones de proceso: viscosidad de los clarificadores, estabilidad de los clarificadores,  
 40 actividad de los clarificadores, finalmente, eficacia de la dispersión de los clarificadores en la corriente de cerveza.

Se propone que la formación de flóculos de pectina-proteína implica una secuencia de eventos que puede incluir formación de gel, decorado, precipitación de partículas y formación de flóculo. La cerveza contiene cantidades importantes de iones calcio y magnesio así como otros cationes. El calcio puede encontrarse típicamente dentro del  
 45 orden de 50 ppm, y el magnesio, asimismo, aproximadamente 100 ppm. Estos valores pueden variar considerablemente dependiendo de la malta y la planta de cerveza, de si el mosto es de densidad alta o de densidad muy alta (v.g. 14-18° P), si se utilizan adyuvantes azucarados, y de cualesquiera adiciones realizadas en la cerveza, que pueden incluir yeso, y clarificadores de caldera. Esto no debe entenderse como una lista exclusiva, dado que existen muchas variaciones practicadas conforme a la técnica de fabricación de la cerveza.

50 La dispersión de los agentes clarificadores implica la inyección de una corriente líquida en una corriente de cerveza. La inyección de los agentes clarificadores crea una o más interfases entre el concentrado de clarificación y la cerveza. Idealmente, esta falta de homogeneidad es un fenómeno momentáneo, y desaparece a medida que la Pectina se equilibra en el seno de la cerveza. No obstante, si la dispersión es inadecuada (número de Reynolds bajo), o si el agente clarificador en la interfase es muy reactivo (v.g. frente a los iones calcio), la interfase puede estabilizarse y puede resultar una suspensión coloidal estable. Esto impedirá que los agentes clarificadores interaccionen con las proteínas, las células de levadura, los polifenoles y otras sustancias contenidas en la cerveza, mejorará la opalinidad y limitará la clarificación y la formación de un flóculo sólido. Por tanto, la composición del agente clarificador es importante.  
 55

60 La dispersión del agente clarificador debería verse ayudada por una buena agitación. La formación de coloides de pectina estables en la cerveza puede evitarse por la elección apropiada de la pectina, y por el uso de agentes en la solución de dosificación que limitan la reactividad durante la dispersión, tal como por ejemplo, la inclusión de agentes quelantes o sequestrantes.  
 65

La formación de flóculos puede promoverse también por direccionamiento del estado rédox de las proteínas de la cerveza (v.g., por sulfitólisis).

Sin desear quedar ligados por la teoría, los inventores proponen que el progreso de la acción de clarificación puede resumirse como sigue (haciendo referencia a la Figura 1):

i. El mecanismo se explica por (a) la interacción de pectina con cationes tales como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  que se encuentran a niveles de 100 y 50 ppm respectivamente en la cerveza; (b) la unión de proteínas básicas, polifenoles y complejos proteína-polifenol con pectinas cargadas negativamente; (c) el equilibrio entre los geles de pectina y los precipitados de pectina insolubles.

ii. La Pectina se une a los iones  $Ca^{2+}$  y otros cationes divalentes; esta asociación es lo bastante lenta para permitir la dispersión de la Pectina en la matriz de cerveza. La unión con  $M^{2+}$  (cationes divalentes) favorece la formación de gel por la unión de, por ejemplo, los iones  $Ca^{2+}$  por cintas alineadas de ácido poligalacturónico que conduce a reticulación y formación de gel. Otros grupos cargados tales como proteínas cargadas positivamente (proteínas básicas) computen por los sitios negativos en la Pectina. Las proteínas de la cerveza se unen a cationes tales como  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y que pueden estar estabilizados por grupos tiol. Los polifenoles se unen también a algunas proteínas en la cerveza. Los polifenoles pueden quedar también en la cerveza en formas polimerizadas o monómeras. Los agregados existentes de dos o más de estos componentes pueden estar implicados en el direccionamiento y la unión de los sitios cargados y sitios estructurales específicos en/sobre las pectinas.

iii. La Pectina se decora con proteína, polifenoles y  $Ca^{2+}$ ,  $M^{2+}$ . La decoración favorece la precipitación de los complejos. Los coloides siguen siendo decorados y las partículas se agregan unas con otras para formar flóculos. La sinéresis se acelera y se forma un sedimento sólido.

iv. Las pectinas con reactividad apropiada frente al  $Ca^{2+}$  darán como resultado la clarificación de la cerveza y compactación del sedimento. Al menos para las pectinas pobres en metoxi, la eficiencia de los clarificadores dependerá del ajuste del nivel de pectina y los cationes divalentes en la cerveza.

Las pectinas utilizadas en las formulaciones y métodos de la presente invención pueden estar disponibles comercialmente y obtenerse en el mercado o prepararse por procesos convencionales de des-esterificación o amidación de pectinas existentes naturalmente, v.g. pectinas de frutos tales como pectinas de manzana o cítricas, o pectinas de raíz o tubérculo tales como pectinas de remolacha, zanahoria o patata, o pectinas de girasol.

Las pectinas disponibles comercialmente se denominan "pectinas estandarizadas". Éstas contienen a menudo aproximadamente 20-50% de azúcares. Las pectinas sin azúcar alguno añadido se conocen como "pectinas activas". Cuando se cita en esta memoria, la concentración de pectina en un agente clarificador, a no ser que se indique otra cosa, se refiere a la concentración de pectinas estandarizadas, es decir que incluyen azúcares cualesquiera.

El término "agente clarificador" se refiere a cualquier material que se utiliza para clarificación de un fermento (clarificación) por promoción de la agregación y decantación compacta (decantación compacta/coherente).

El término "proceso de clarificación" se refiere a cualquier proceso que utiliza un agente clarificador para clarificación de un fermento (clarificación) por proporción de la agregación y decantación compacta (decantación compacta/coherente).

La clarificación (o aclarado) como se hace referencia a la misma en esta memoria se refiere al aclaramiento de un fermento. Una bebida que está clarificada se juzga, por observación o medida, por uno o varios o la totalidad de los criterios: un aumento en la transparencia visual, un aumento en la transmitancia de la luz, una disminución en la turbidez o dispersión de la luz, una reducción en el número de partículas, una mejora en la filtrabilidad de la bebida clarificada a través de una membrana de porosidad restringida.

La actividad de clarificación eficaz se define en esta memoria como actividad de clarificación comparable a la eficiencia clarificadora de Isinglass en la cerveza. En tests de decantación, como se describe en los ejemplos, la adición de Isinglass a cerveza pre-clarificada reducía la absorbancia a 500 nm de longitud de onda desde 1,322 a 0,31, v.g. en un factor superior a 4.

En los ejemplos 7 a 19, la referencia es una dispersión de colágeno bovino. Se ha encontrado que el colágeno bovino tiene actividad de clarificación comparable y en general mejor que Isinglass en cervezas de densidad alta y ultra-alta.

Cuando la cantidad de un componente se expresa como porcentaje, debe apreciarse que todas las cantidades de los componentes suman 100%.

Cualquier referencia en esta memoria a peso/vol o p/v se refiere a una relación de peso a volumen, es decir x % peso/vol se refiere a x g de formulación sólida en 100 ml de líquido.

- 5 Cualquier referencia en esta memoria a peso/peso o p/p se refiere a una relación de peso a peso, es decir x % peso/peso se refiere a x g de formulación de sólidos en 100 g de la formulación de sólidos.

10 Generalmente, cuando se expresa en esta memoria el % de solución se refiere a la cantidad de pectina en la solución y no a los otros componentes. Por ejemplo, una solución con 5% Pectina tendrá 5 g de pectina en 100 ml. Pueden estar presentes otros componentes.

15 Aunque los tres tipos de pectina tienen cierta capacidad para clarificación de la cerveza, algunos o más efectivos que otros. Si bien no se desea quedar ligados por la teoría, los inventores proponen que la densidad de carga global es un factor importante.

20 En la formulación conforme a el primer aspecto de la invención o los métodos o utilizaciones de los aspectos segundo y tercero de la invención, los agentes clarificadores son pectinas ricas en ésteres metílicos con un DE de 50-65% y muy preferiblemente comprendido entre 50-60%, pectinas pobres en ésteres metílicos con un DE mayor que o igual a 20%, preferiblemente 30-50%, más preferiblemente 35-45%, muy preferiblemente 40% y pectinas amidadas pobres en ésteres metílicos con un DE de 20-40%, preferiblemente 30-37% y un grado de amidación (DA) de 10-25%, preferiblemente 14-18%.

25 Ejemplos de pectinas que pueden utilizarse como agentes clarificadores conforme a la presente invención, que pueden obtenerse en el mercado son Pectina CP Kelco LMA, tipo 101 y Pectina tipo AF702 de Herbstreith y Fox Gmb LMC. Otros ejemplos se proporciona en la Tabla 1. La formulación de clarificadores puede comprender una combinación de una o más pectinas.

30 En la formulación conforme a el primer aspecto de la invención, la Pectina se proporciona con un donante de dióxido de azufre, en donde la ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 3,5:1 a 7,5:1.

El donante de dióxido de azufre es preferiblemente metabisulfito de potasio o metabisulfito de sodio. Este agente mejora el efecto de clarificación al mismo tiempo que evita la contaminación.

35 La formulación de clarificadores comprende preferiblemente además un agente tampón. Este agente tampón tiene que ser capaz de mantener el pH de la formulación de clarificadores, cuando está en solución, a un pH óptimo para la actividad, estabilidad y solubilidad de la Pectina. Para una formulación de clarificadores para uso en cervezas, el pH óptimo para la actividad, solubilidad y estabilidad de la Pectina está comprendido entre pH 4 y 5, preferiblemente entre pH 4,5 y 5, y de modo muy preferible es aproximadamente pH 4,7 ó 4,8. Para uso en otras bebidas, el pH óptimo de la formulación de clarificadores puede ser diferente. Una persona experta en la técnica podría determinar el pH óptimo para la formulación para uso en una bebida particular sin experimentación excesiva.

40 Para la cerveza, el pH preferido de la formulación de clarificadores está comprendido entre pH 4 y pH 5. Un agente adecuado para tamponamiento a este pH es el tampón citrato, que debería tamponar cualquier solución a pH aproximado de 4,8. Pueden utilizarse otros tampones en lugar de citrato, y tampones adecuados pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica. La ventaja de utilizar citrato como tampón es que el mismo es capaz de unirse a los iones calcio. La solubilidad de las pectinas aumenta a medida que aumenta el pH.

Otros tampones adecuados incluyen tampones acetato, lactato, fosfato, malato, succinato y propionato.

50 La formulación del primer aspecto de la invención puede comprender adicionalmente un agente secuestrante (o quelante). El propósito de este agente es combinarse con cualesquiera iones divalentes que pueden influir en la actividad de clarificación de la Pectina. El agente secuestrante forma preferiblemente quelatos con los iones calcio, magnesio, hierro y/o cobre.

55 Agentes secuestrantes preferidos son citrato trisódico, ácido cítrico o una combinación de ambos. Otros agentes secuestrantes adecuados incluyen fosfato, polifosfatos, productos basados en funcionalidad amino/carboxilato, productos basados en funcionalidad carboxi o química de ácidos carboxílicos, compuestos basados en actividad de polifenol tales como ácido tánico, catequinas y análogos.

60 Si el agente tampón es citrato, el mismo tendrá también actividad en la secuestración de iones.

65 Basándose en la concentración inicial de proteínas, polifenoles, iones metálicos y carbohidratos en la bebida, algunos aditivos que son capaces de aumentar el efecto de los clarificadores (tasas de clarificación, y reducción de los componentes clarificadores residuales en el producto final), pueden añadirse a la formulación de clarificadores o durante el proceso de clarificación:

a. Ácidos tánicos a la concentración final de 10-50 ppm, preferiblemente 30-50 ppm;

5 b. Extractos de lúpulo con 30-50% de etanol o agua ácida [(pH 1,8-2,0) a 0,1-0,5% v/v) de volumen total], o extractos de lúpulo comerciales, tales como el extracto de lúpulo de Carlton United Breweries Ltd. HP6, o extractos de lúpulo similares isomerizados o reducidos;

10 c. Algunas proteínas básicas, tales como el citocromo C o proteínas básicas similares de cerveza/cereales (v.g. 5-20 ppm) pero sin excluir otras proteínas de otras fuentes.

La estructura y el peso molecular de las pectinas (normalmente 50.000-150.000) afecta a la actividad de clarificación de la Pectina; las pectinas de peso molecular bajo son generalmente menos favorables que las pectinas de PM alto.

15 Para uso en un proceso de clarificación, la formulación de clarificadores conforme a el primer aspecto de la invención se fabrica preferiblemente en una solución stock en agua. La cantidad preferida de pectina en la solución stock está comprendida en el intervalo de 1-10%. Por encima de 10% la Pectina no es soluble generalmente.

20 La solubilidad óptima se consigue a una concentración de solución stock hacia el extremo bajo del intervalo, es decir hacia 1%, dado que a esta concentración la Pectina es capaz de dispersarse y mezclarse bien con la bebida sobre la que debe actuar. Una Pectina concentrada es más conveniente para transporte y almacenamiento y para los usuarios finales. Sin embargo, a concentraciones más altas la Pectina puede separarse de la solución a lo largo del tiempo y parece existir una reducción en la actividad de los clarificadores. Adicionalmente, para concentraciones de pectina mayores, existe una mayor tendencia de la Pectina a agregarse o gelificarse en lugar de dispersarse uniformemente en la bebida. De acuerdo con ello, se prefiere una solución stock de 4-8,5%, siendo muy preferida una solución stock de 5, 5,5 ó 6% de pectina.

Si bien una temperatura superior aumenta la solubilidad de la Pectina y reduce la viscosidad, esto lleva consigo una mayor probabilidad de desactivación de la Pectina.

30 Una formulación de clarificadores preferida conforme a el primer aspecto de la invención comprende 25-91% (p/p) de pectina, 5,5-50% (p/p) de citrato y aproximadamente 3,5-25% de un donante de dióxido de azufre (p/p). Las cantidades se refieren a la composición de una formulación sólida, es decir a peso seco. La ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 3,5-7,5:1, más preferiblemente 5:1.

35 La formulación de clarificadores se proporciona preferiblemente como una solución acuosa. Una formulación de clarificadores preferida en solución acuosa con agua comprende 5,5% (p/v) pectina, 1,5% (p/v) citrato de sodio, 0,5% (p/v) ácido cítrico, y 1,0% (p/v) de metabisulfito de potasio.

40 De acuerdo con la presente invención en los aspectos segundo y tercero, preferiblemente la concentración de pectina utilizada como agente clarificador es al menos 10 ppm (partes por millón) de concentración final del volumen fluido de la bebida. Una actividad eficaz de clarificación puede conseguirse con una concentración de pectina comprendida entre 10 y 300 ppm del volumen fluido total de la bebida.

45 La cantidad de agente clarificador utilizada para proporcionar una actividad de clarificación eficaz depende del tipo de pectina utilizado, Pectina rica en ésteres metílicos, baja en ésteres metílicos o Pectina amidada baja en ésteres metílicos. La concentración preferida de pectina en el volumen fluido total del producto de bebida para proporcionar una actividad de clarificación eficaz es 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 ó 300 ppm. Esto equivale a una cantidad de pectina en la bebida final a clarificar de 0,001 a 0,03% (p/v). Preferiblemente, la concentración de pectina utilizada en la bebida está comprendida en el intervalo de 40 a 80 ppm, es decir una cantidad de 0,005 a 0,008 (p/v).

El uso y método conforme a los aspectos segundo y tercero de la invención se refieren a procesos de clarificación estándar, tales como serían llevados a cabo con agentes clarificadores conocidos.

55 Preferiblemente, el método de clarificación comprende la producción de una solución acuosa al 1-10% de pectinas, adición de una cantidad de la solución a una cerveza después de la separación a fin de obtener una concentración de pectinas de aproximadamente 10 a 300 ppm, preferiblemente 40-80 ppm, procesamiento de los clarificadores de la cerveza durante 12-168 horas, y finalmente filtración. Un agente clarificador satisfactorio tendrá una tasa de filtrabilidad comparable a Isinglass o colágeno bovino.

60 La presente invención encuentra su utilidad principal en la clarificación de bebidas alcohólicas, particularmente aquéllas que son bebidas fermentadas tales como cervezas, "lagers", "ales", sidra de manzana, sidra de pera, y vino. La misma puede encontrar también utilidad en "alcopops" y mezclas alcohólicas de frutas.

La utilización de pectina como agente clarificador se propone de modo que tenga poco o ningún efecto adverso sobre la bebida a la que se añade. El objetivo buscado es que la bebida produzca la misma sensación bucal, sabor, etc que la misma bebida cuando se clarifica con Isinglass o colágeno bovino.

#### 5 Descripción del proceso de clarificación preferido

En un proceso de clarificación preferido, se prepara un agente clarificador seco (mixtura) que comprende una mixtura que contiene 25-91% (p/p) en pectinas, aproximadamente 5,5-50% (p/p) de citrato y aproximadamente 3,5-25% (p/p) de un donante de dióxido de azufre, preferiblemente metabisulfito de potasio o metabisulfito de sodio, por  
10  
mezcladura en seco. La mixtura se añade luego lentamente a agua a la temperatura ambiente con mezcladura preferiblemente continua hasta que los sólidos se solubilizan completamente. Este proceso puede mejorarse utilizando una bomba de recirculación, un homogeneizador, o un eductor, y sin duda otras variaciones y dispositivos mecánicos. La concentración de pectina de la solución de clarificadores puede ser tan alta como 5-10% (p/v) dependiendo del tipo y naturaleza de la Pectina y la temperatura. La mezcla de clarificadores secos puede  
15 guardarse durante varios meses a 4°C en un recipiente hermético. La preparación de clarificadores líquidos es estable microbiológicamente y en actividad de clarificación durante varias semanas.

El agente clarificador se mezcla con la cerveza usualmente después de centrifugación a fin de reducir los contenidos de levadura, para obtener una concentración de aproximadamente 20-200 ppm de pectina estandarizada,  
20 preferiblemente 40-80 ppm para la mayoría de las cervezas ensayadas. Los niveles de levadura son generalmente del orden de  $10^6$ - $10^7$  células/ml. Las concentraciones finales preferidas para citrato y dióxido de azufre en la cerveza son 5-20 ppm y 5-8 ppm respectivamente. Algunos aditivos tales como ácido tánico, proteínas básicas o extractos de lúpulo pueden añadirse en este momento para aumentar el efecto de los clarificadores. El efecto de estos aditivos dependerá en cierto grado de la naturaleza de la cerveza.

25 La cerveza debería almacenarse, con preferencia a aproximadamente 4°C durante al menos 12, si no 24 horas a 168 horas antes de la filtración final.

30 Para los propósitos de esta memoria descriptiva, se comprenderá claramente que el término "que comprende" significa "que incluye pero sin carácter limitante", y que el término "comprende" tiene un significado correspondiente.

35 Será evidente para la persona experta en la técnica que si bien la invención se ha descrito en algún detalle para los propósitos de transparencia y comprensión, pueden hacerse diversas modificaciones y alteraciones a las realizaciones y métodos descritos en esta memoria sin apartarse del alcance del concepto de inventiva descrito en esta memoria descriptiva.

La invención se describirá a continuación en detalle únicamente a modo de referencia para los ejemplos y dibujos no limitantes siguientes.

#### 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una representación diagramática del mecanismo propuesto de acción de los clarificadores por las pectinas.

45 La Figura 2 es un diagrama esquemático de un sistema de filtración.

La Figura 3 muestra perfiles de HPLC en fase inversa de proteínas solubles a 280 nm. La Figura 3<sup>a</sup> muestra proteínas en cabezas de cerveza a partir de una fracción soluble en frío, la Figura 3b muestra proteínas en cerveza clarificada después de la clarificación de una fracción soluble en caliente y la Figura 3c muestra  
50 proteínas en flóculos de cerveza procedentes de una fracción soluble en caliente.

La Figura 4 muestra SDS-PAGE de fracciones de cerveza con tratamientos diferentes.

55 La Figura 5 muestra un gel de enfoque isoelectrico.

La Figura 6 muestra SDS-PAGE de fracciones de cerveza tratadas con Isinglass, Pectina LMA A (CP Kelco, tipo 101) y Pectina LMA B (CP Kelco, tipo 104).

60 La Figura 7 muestra la separación de las proteínas en un flóculo y en cabezas de Isinglass por electroforesis 2-D.

La Figura 8 es un gráfico que muestra tiempo/volumen frente a volumen para indicar la eficiencia de filtración.

65 La Figura 9 es un gráfico que muestra la relación entre la transparencia DE (%) de pectina no amidada después de decantación (48 h) y el volumen de flóculo.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de citrato y dióxido de azufre sobre la eficiencia de los clarificadores utilizando solución de pectina (1%).

5 La Figura 11 es un gráfico que muestra la clarificación con pectina de cerveza UHB (18° P, con lúpulo de caldera) y cervezas HG (14° P, sin lúpulo de caldera).

La Figura 12 es un gráfico que muestra el efecto de la adición de HP6 sobre la eficiencia de los clarificadores de la cerveza sin lúpulo de caldera utilizando una solución de pectina.

10 La Figura 13 es un gráfico que muestra la filtrabilidad de la cerveza HG clarificada con Pectina.

La Figura 14 es un gráfico que muestra la filtrabilidad de la cerveza UHG clarificada con Pectina.

15 La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto del aumento de la concentración de la solución de clarificadores de pectina no amidada (con DE variable) más la adición de citrato y dióxido de azufre sobre la mejora de la transparencia de la cerveza y el volumen de flóculo.

20 La Figura 16 muestra un gráfico que representa datos de filtración - turbidez, tasa de flujo de polvo, y opalinidad de la cerveza de salida (cerveza de descarga) para cerveza VB clarificada con pectina LM101 (prueba) y cerveza VB de almacenamiento clarificada con colágeno bovino (control). Los datos de la cerveza almacenada de control aparecen en primer lugar seguidos por los datos de la cerveza de prueba (cambio a las 12,30 pm).

25 La Figura 17 muestra un gráfico que representa datos de filtración - volumen de lodo en el filtro de bujía, tasa de flujo de polvo, presión de descarga del filtro, presión de entrada del filtro, tasa de flujo del filtro - para cerveza VB clarificada con pectina LM101 (prueba) y cerveza VB almacenada clarificada con colágeno bovino (control). Los datos de cerveza almacenada de control aparecen en primer lugar seguidos por los datos de la cerveza de prueba (cambio a las 12,00 pm).

30 La Figura 18 es un gráfico que muestra la distribución de tamaños de las partículas en cerveza almacenada para la cerveza VB clarificada con colágeno (control) y cerveza VB clarificada con pectina LM101. Se analizaron 3 muestras de cada una a lo largo de un periodo de tiempo de 3-4 horas.

35 La Figura 19 representa el perfil de opalinidad en unidades EBC para cerveza VB clarificada con colágeno (control) y cerveza clarificada con pectina LM101 (prueba) en las etapas siguientes del proceso de la cerveza - antes del separador, tanque de almacenamiento inicialmente y después de llenado, tanque de almacenamiento después de 24 horas, tanque de almacenamiento después de 48 horas, antes del filtro y después del filtro.

40 La Figura 20 representa gráficamente el dióxido de azufre en cerveza VB clarificada con colágeno (control) y cerveza VB clarificada con pectina LM101 (prueba) en las etapas siguientes del proceso de la cerveza - antes del separador, tanque de almacenamiento inicialmente y después de llenado, tanque de almacenamiento después de 24 horas, tanque de almacenamiento después de 48 horas, antes del filtro y después del filtro.

45 La Figura 21 muestra un gráfico de telaraña que indica los cambios de carácter de la rueda de sabores después de envejecimiento durante dos semanas a 30°C para cerveza VB clarificada con colágeno y cerveza VB clarificada con pectina LM101.

50 La Figura 22 muestra las variables de filtración de la cerveza VB dosificada con pectina LM101.

La Figura 23 muestra las variables de filtración de la cerveza VB dosificada con colágeno bovino.

55 La Figura 24 muestra la opalinidad del producto (EBC) en diversas etapas del proceso para la cerveza de prueba VB clarificada con pectina LM101.

La Figura 25 muestra el dióxido de azufre en diversas etapas del proceso para la cerveza de prueba VB clarificada con pectina LM101.

60 La Figura 26 muestra la filtrabilidad de muestras de cerveza CCLP clarificada con pectina LM101 y clarificada con colágeno (control) extraídas de los tanques de almacenamiento durante la prueba de planta.

La Figura 27 muestra las variables de filtración principales para la cerveza CCLP clarificada con pectina LM101.

65

La Figura 28 muestra las variables de filtración principales para la cerveza CCLP clarificada con colágeno bovino (control).

5 La Figura 29 representa gráficamente la eficiencia de opalinidad de la planta: cerveza UHG CCLP; cerveza clarificada con colágeno (control) frente a cerveza clarificada con pectina LM101 (prueba).

La Figura 30 muestra el dióxido de azufre en el proceso: cerveza UHG CCLP; cerveza clarificada con colágeno (control) frente a cerveza clarificada con pectina LM101 (prueba).

10 La Figura 31 muestra resultados de filtración en laboratorio utilizando cerveza de planta.

La Figura 32 expone muestras de sedimentos de flóculo etiquetados MPB analizadas sobre una base de proteínas iguales. (A) SDS-PAGE/proteínas teñidas con azul Coomassie; (B) SDS-PAGE con etiqueta Western Blot MPB de tiales de proteína.

15 La Figura 33 muestra un análisis en gel 2D de un flóculo de pectina LM121 de cerveza VB.

La Figura 34 muestra un análisis 2D en gel de un flóculo de Isinglass de cerveza VB.

20 La Figura 35 muestra la electroforesis en gel 2D teñido con Azul Coomassie de muestras de sedimentos de flóculo (a) Pectina LM101, (b) Pectina LM121, (c) AFC 702, (d) LMC710 y (e) Isinglass.

## EJEMPLOS

### 25 Método para digestión de la Pectina

Una solución de pectina [1% HM121 (100 ml)] se digirió por adición de pectinasa (de Rhizopus sp. Sigma, EC 3.2.1.15) (2U, 5U, 10U, 20U y 50U). La solución se incubó primeramente a 25°C durante 1 hora y subsiguientemente durante 10 min a 80°C para desactivar la enzima. Después de enfriar a 20°C, se testó la actividad de clarificación de la solución de pectina tratada.

### 30 Método para lavado de la Pectina

La finalidad del lavado fue eliminar cualesquiera azúcares e iones metálicos mezclados de las muestras de pectina estandarizada.

35 La pectina, por ejemplo HM121 (50 g) se lavó con etanol al 60% con agitación continua (agitador o mezclador magnético, 400 ml x 0,5-1 h; 300 ml x 0,5-1 h; 300 ml x 0,5-1 h). La Pectina tratada se recuperó por centrifugación (1000-4000 g durante 5-20 minutos). La Pectina se deshidrató por resuspensión en etanol absoluto (200 ml durante 10 min). La Pectina se recuperó por filtración (filtro Whatman No. 541). La Pectina se secó al aire, seguido por secado en un horno convencional (con ventilación) a 50-55°C.

### Clarificación de la cerveza

45 Todos los tests de clarificación se condujeron a 4°C utilizando cerveza post-separación (no clarificada). Se añadió el agente clarificador a 1 L de cerveza en una botella Schott de 2 L para proporcionar mezcladura, y se transfirió subsiguientemente a un cilindro de vidrio y se dejó sedimentar durante hasta 168 horas. En diversos momentos posteriores, se recogieron partes alícuotas de 30 ml de cerveza por muestreo a 10 cm de las cabezas del cilindro. La turbidez de la cerveza, medida en unidades EBC (European Brewery Convention) se obtuvo utilizando un

50 Turbidímetro de Laboratorio (Hach, 2100AN). Se llevaron a cabo un control negativo (sin agente clarificador) y un control positivo (0,02% p/v colágeno bovino). El colágeno bovino se utiliza como referencia así como Isinglass. El colágeno bovino se proporciona como una solución de proteína al 2% p/v. Este material proporcionó una eficiencia de los clarificadores al menos comparable y por regla general mejor a juzgar por la clarificación y compacidad de los flóculos que las preparaciones de Isinglass comerciales con las mismas corrientes de cerveza, en la experiencia de

55 los inventores, como herramienta de referencia de laboratorio y el uso comercial regular.

### Sistema para el test de filtrabilidad

60 El aparato de filtración es un Millipore Model YT 30 140HW de 'extremo cerrado' con volumen interno y área de filtración fijos (Figura 2). El filtro se prepara poniendo dos antes del filtro s de fibra de vidrio sobre el filtro de soporte del filtro y se humedece. Las placas extremas se sujetan con pinzas, después de lo cual se añade una papilla de prerrecubrimiento (Freshwater Speedflow) a una tasa de 0,115 g/cm<sup>2</sup>, utilizando agua destilada para llenado del aparato. El pre-recubrimiento se asentó por paso de agua desaireada a 100 kPa a través del aparato hasta que se formó una capa clara de líquido por encima del prerrecubrimiento. El aparato se conecta subsiguientemente a la

65 cerveza, que se hace pasar a su través a una presión de 100 kPa. El filtrado se recoge en otro barrilete de 9 L

colocado encima de una balanza de carga superior. Se obtienen medidas de peso cada 10 segundos durante 10 ó 15 minutos por conexión de la balanza a un PC donde se interpreta por una hoja de cálculo Excel.

Estadística:

5 Mejora de la transparencia ( $C_i$ ): la definición de la mejora de la transparencia de la cerveza es la diferencia de turbidez entre la muestra ensayada y el control en el momento frente a la turbidez actual del control.

$$10 \quad C_i = \frac{[\text{Turbidez del control (EBC)} - \text{muestra testada (EBC)}]}{\text{Turbidez del control (EBC)}} \times 100\%$$

15 Información general de materiales

La gama de pectinas incluidas en este estudio se resume en la Tabla 1. La concentración de azúcar en las pectinas se realizó por HPLC con un detector RI. El azúcar total puede ascender a 1-40% (p/p). El nivel de esterificación (DE) de las pectinas convencionales es aproximadamente 20-70%, dividido entre pectinas pobres en ésteres metílicos con un DE mayor que o igual a 20%, preferiblemente 30-50%, más preferiblemente 35-45% y pectinas ricas en ésteres metílicos, con un DE de 50-70%, preferiblemente 50-50%. Para las pectinas amidadas, el DE es aproximadamente 20-40%, preferiblemente 30-37%, y el DA está comprendido en el intervalo de 10-25%, preferiblemente 14-18%.

25 Los tipos de cerveza utilizados en las pruebas de clarificación se resumen en la Tabla 2. La densidad inicial de la cerveza de densidad alta (HG) es alrededor de 13,5-14,2° P (Plato) y para la cerveza de densidad ultra-alta (UHG) es aproximadamente 18° P. Se proporcionan valores de turbidez o bien un intervalo de turbidez dependiendo de si se ha analizado un solo lote o múltiples lotes de cerveza.

30 En la Tabla 2:

Carga de malta: = % de extracto en mosto que procede de la malta (basado en malta da 73% en peso de extracto de azúcares);

35 Lúpulo de caldera = se añade lúpulo a la caldera cuando el mosto está hirviendo;

Clarificadores de caldera = adición de clarificadores de caldera (usualmente carragenanos) al mosto durante la ebullición en la caldera;

40 Levadura = cepa de levadura – levadura industrial;

Turbidez inicial = turbidez de la cerveza después del paso a través de las centrífugas con posterioridad al reenfriamiento de la fermentación; y

45  $Ca^{2+}$  =  $Ca^{2+}$  en la cerveza después de la centrifuga.

Otros términos utilizados en la fábrica de cerveza se describen como sigue:

50 Tonel de malta remojada - extracción de azúcares → separación del extracto en el clarificador de malta → vórtice, separación de la turbidez durante la fabricación → eliminación de proteína, lípidos y polifenoles por ebullición en la caldera, ayudada en algunos casos por la adición de clarificadores de caldera y adición a veces de lúpulo → fermentación → retorno frío de la cerveza en los fermentadores → separadores – retirada de la mayor parte de la levadura → adición de CLARIFICADORES después del filtro → almacenamiento de la cerveza → filtración → dilución a cerveza de la concentración de venta, adición de extracto de lúpulo a veces  
55 - envasado.

Ejemplo 1 - Caracterización de las Partículas

60 Aunque Isinglass se utiliza como adyuvante de filtración en la industria de la fabricación de cerveza, se sabe muy poco acerca del modo en que actúa. El conocimiento de la composición química y la naturaleza física del material que se sedimenta por acción de Isinglass contribuirá a una mejor comprensión de su mecanismo de acción. Esto, a su vez, ayudará al diseño de alternativas adecuadas para la industria. La composición química del material de la

cerveza, con y sin tratamiento por Isinglass, se determinó con respecto a contenido de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos y fenoles.

#### Preparación de las Muestras

5 Se tomaron muestras de las cabezas y el flóculo de cerveza tratada y sin tratar (véase Isinglass Alternative Screen, Materiales y Métodos para Detalles),

10 A no ser que se indique otra cosa, cerveza sin tratar, cerveza tratada con Isinglass y muestras de Isinglass se dializaron (punto de corte por PM 10.000) contra agua Milli-Q y se liofilizaron antes del análisis. El flóculo de Isinglass liofilizado no era completamente soluble en agua.

#### Análisis de Carbohidratos

##### 15 Ensayos Colorimétricos

El carbohidrato total se determinó por el ensayo colorimétrico de Dubois (1956) con glucosa como el estándar.0

20 El contenido de ácido urónico se estimó por el método de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) con ácido galacturónico como el estándar.

#### Análisis de Monosacáridos

25 La composición de monosacáridos y los enlaces de monosacáridos se determinaron por análisis de metilación como ha sido descrito por Ciucanu y Kerek (1984) y modificado por McConville *et al* (1990). Los azúcares derivatizados se inyectaron en una columna CPSIL 5 a 250°C, con helio como gas portador a 0,8 ml/min, y se eluyeron con un perfil de temperatura del horno de 110°C a 320°C a 3°C/min. Los espectros se recogieron a lo largo del intervalo de masas de 100 a 400 m/z.

##### 30 Análisis de Proteínas

##### Ensayo Colorimétrico

35 La proteína soluble se estimó con el reactivo de ensayo de proteínas BioRad conforme a las instrucciones de los fabricantes. Se utilizó BSA como EL estándar.

#### Análisis de Proteína Total

40 La proteína total se estimó a partir del análisis de nitrógeno. El nitrógeno y el carbono se analizaron utilizando un analizador Carlos Erba NA1500, Series 2 NCS y el Automuestreador AS-200 (Fisons Instruments, Milán, Italia).

#### Análisis de Aminoácidos

45 Las muestras se hidrolizaron en HCl 6 M a 103°C durante 16 horas para análisis de aminoácidos. Los aminoácidos se derivatizaron conforme a Persson y Nasholm (2001) y se analizaron en GC-MS por inyección a 270°C en una columna CPSIL 5 con un perfil de temperatura del horno de 130°C a 290°C a 10°C/min. Los espectros se recogieron para el intervalo de masas de 50 a 550 m/z.

#### SDS-PAGE

50 Se centrifugaron partes alícuotas (no dializadas) de 1 ml de cerveza tratada o sin tratar y 0,1 ml de material floculado (13000 x g, 15 min, temperatura ambiente) para aislar la fracción de sedimentos insolubles. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se concentró a vacío. Todas las muestras se suspendieron en tampón de carga de SDS y se pasaron por geles de poliacrilamida pre-colada al 4-20% (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron con Reactivo GelCode conforme a las instrucciones del fabricante.

#### Gel de Enfoque Isoeléctrico

60 El enfoque isoelectrico se realizó en un Phastgel Pharmacia IEF (3-9). Un kit de calibración de gama ancha pI (pI 3-10) proporcionó los estándar. Las muestras no dializadas se concentraron a vacío y se cargaron en tampón de muestra de urea (urea 9 M, Tris-Base 35 mM, CHAPS 4%, DTT 1% p/v, anfolitos 1%, pH 3-9). Los geles se fijaron y se tiñeron después con Azul Coomassie y se destiñeron en metanol al 40% y ácido acético al 10%.

#### RP-HPLC

65

5 Se centrifugaron partes alícuotas (no dializadas) de 1 ml de cerveza tratada o sin tratar y 0,1 ml de material floculado (13000 x g, 15 min, temperatura ambiente) para separar la fracción insoluble (sedimento) de la soluble (sobrenadante). Los sedimentos se resuspendieron en agua MQ. Las muestras se incubaron a 50°C durante 1 hora y se centrifugaron, como anteriormente, para separar el material insoluble y el soluble por calentamiento. La HPLC en fase inversa de las proteínas solubles se realizó en una columna C8 (RP300) y se eluyó con un gradiente lineal de TFA al 0,1% hasta 80% acetonitrilo, 0,0895% TFA. La elución de las proteínas se monitorizó por absorbancia a 280 nm con un detector UV.

10 Análisis de Fenoles

Ensayo Colorimétrico

Los fenoles solubles se estimaron con el reactivo Folin-Ciocalteu utilizando ácido ferúlico como estándar (Fry, 1988).

15 GC-MS de los Fenoles con Enlace Éster

20 Los ácidos fenólicos con enlace éster se liberaron por tratamiento de las muestras con NaOH 2 M. Las muestras se acidificaron y los ácidos fenólicos se extrajeron en acetato de etilo. Los extractos se sialilaron con TriSil y se analizaron por GCMS en una columna CPSIL 5. La muestra se inyectó a 240°C y se eluyó con un gradiente de temperatura de 110 a 320°C a 6°C/min.

Análisis de Ácidos Grasos

25 Los lípidos y los ácidos grasos se extrajeron en cloroformo:metanol (2:1) y se trataron con HCl metanólico (0,5 M) a 80°C durante 16 horas. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se sialilaron con MSTFA conforme a las instrucciones de los fabricantes y se analizaron por GC-MS en una columna CPSIL 5. Las muestras se inyectaron a 240°C y se eluyeron con un gradiente de temperatura del horno de 80°C a 245°C a 5°C/min. Los espectros se recogieron en modo de escaneo desde 40 a 800 m/z.

30 Composición Elemental

35 El contenido de cenizas de las muestras no dializadas se determinó a partir del peso de residuo de la muestra después de calentamiento a 600°C. La composición elemental se determinó por ICP-OES.

Medidas de Movilidad Electroforética

40 Muestras de Isinglass, cerveza sin tratar, y flóculo de Isinglass se testaron respecto a potencial zeta en un Analizador de Potencial Zeta, Zeta PALS (Brookhaven Instruments Corp.).

Resultados y Discusión

Análisis de Polisacáridos

45 Los contenidos de carbohidratos de las muestras de cerveza dializadas estaban comprendidos entre 56% y 100% (Tabla 3.1 - Contenido de carbohidratos (% (p/p)), cerveza desecada). La cerveza sin tratar contiene 94% de carbohidrato mientras que en las cabezas de cerveza decantada, tratadas con Isinglass y sin tratar, el ensayo colorimétrico estima que 100% del material recuperado después de la diálisis (> 10.000 Da) es carbohidrato. La cantidad mínima de carbohidrato se encuentra en el flóculo de Isinglass (56%). Los niveles de ácidos urónicos, como se estima por el ensayo colorimétrico, son insignificantes.

**Tabla 3.1.**

Muestra	% CHO Total	% Urónicos
Cerveza sin tratar	94	< 0.01
Cabezas de cerveza decantadas	101	< 0.01
Flóculo de cerveza decantado*	96	< 0.01
Cabezas de Isinglass	102	< 0.01
Flóculo de Isinglass	56	< 0.01

\*El flóculo de cerveza decantado contiene también cerveza sin decantar debido a la disponibilidad limitada de

ES 2 507 840 T3

Muestra	% CHO Total	% Urónicos
material		

5 La composición de enlaces de monosacáridos da una indicación de los tipos de polisacárido presentes en una muestra. La composición de monosacáridos de todas las muestras de cerveza testadas es similar (Tabla 3.2 - Composición de enlaces de monosacáridos (mol %)), con glucosa como el constituyente azúcar predominante, junto con cantidades menores de xilosa y arabinosa. Aunque no se muestra en la Tabla 3.2, estaban presentes también cantidades traza de manosa y galactosa.

10 La glucosa existe como residuos enlazados en 4, terminales y residuos enlazados en 4,6, todos los cuales son típicos de los enlaces encontrados en almidones o maltodextrinas. La presencia de xilosa como 4-Xyl y 2,3,4-Xyl, junto con t-Ara, es indicativa de un componente de arabinoxilano.

**Tabla 3.2.**

Residuo glicosilo	Enlace deducido	Cerveza sin tratar	Cabezas de cerveza decantada	Flóculo de cerveza decantado	Cabezas de Isin-glass	Flóculo de Isin-glass
Ara (f)	t-	6	5	5	5	6
	3-	Tr	-	-	-	tr
	5-	Tr	tr	tr	tr	tr
		6	5	5	5	6
Xyl (p)	t-	Tr	tr	tr	tr	tr
	2-	Tr	tr	tr	tr	tr
	4-	4	3	4	4	4
	2,4-	Tr	tr	1	1	1
	3,4-	Tr	tr	tr	tr	tr
	2,3,4	2	2	2	2	2
		7	6	8	7	7
Glc (p)	t-	19	18	18	18	19
	3 -	Tr	tr	tr	tr	tr
	4 -	62	63	60	60	61
	2,4 -	-	-	tr	tr	-
	3,4 -	-	tr	tr	tr	tr
	4,6 -	6	6	7	8	5
	Glucitol	Tr	tr	tr	1	tr
		87	88	86	87	86

\*El flóculo de cerveza decantado contiene también cerveza sin decantar debido a la disponibilidad limitada de

Residuo glicosilo	Enlace deducido	Cerveza sin tratar	Cabezas de cerveza decantada	Flóculo de cerveza decantado	Cabezas de Isinglass	Flóculo de Isinglass
material.						
tr, trazas <1%; -, no detectado.						

**Análisis de Proteínas**

- 5 El ensayo colorimétrico para proteína (Tabla 4.1 - Contenido de proteína (% (p/p)) estimado por el Ensayo de Proteínas BioRad) sugiere que la cerveza sin tratar y las cabezas de cerveza decantada (tratadas y sin tratar) contienen aproximadamente 3% (p/p) de proteínas después de la diálisis. El flóculo tratado con Isinglass contiene considerablemente más proteína (10%). Estos niveles están probablemente subestimados, dado que el ensayo depende de la proteína soluble. Las muestras de cerveza contienen todas ellas un componente insoluble.
- 10 Es posible estimar el contenido total de proteínas (solubles e insolubles) a partir de los niveles de nitrógeno en una muestra. Basándose en análisis de nitrógeno, las cabezas de Isinglass contienen 12,6% de proteína y el flóculo 38,2% de proteína (Tabla 4.2 - Contenido de proteínas basado en el análisis de nitrógeno (%) (p/p)).

15 **Tabla 4.1.**

Muestra	% Proteína Soluble
Cerveza sin tratar	2,9
Cabezas de cerveza decantadas	3,3
Flóculo de cerveza decantado*	3,1
Cabezas de Isinglass	2,9
Flóculo clarificado con Isinglass	10,0

\*El flóculo de cerveza decantado contiene también cerveza sin decantar debido a la disponibilidad limitada de material

**Tabla 4.2.**

Muestra	% Nitrógeno	% Carbono	% Proteína (N x 6,25)
Cabezas clarificadas con Isinglass	2,02	42,76	12,6
Flóculo clarificado con Isinglass	6,11	45,21	38,2

20

**Tabla 4.3.**

Aminoácido	Aminoácido (mol%)		
	Isinglass	Cerveza sin tratar	Flóculo de Isinglass
Ala	9	10	8

Aminoácido	Aminoácido (mol%)		
	Isinglass	Cerveza sin tratar	Flóculo de Isinglass
Gly	17	6	7
Val	3	5	5
Leu	5	4	5
Ile	2	2	3
Pro	7	23	13
GABA	Tr	tr	tr
Cle	Tr	tr	tr
Met	1	1	1
Ser	3	4	4
Thr	3	2	2
Phe	2	2	3
Asx	5	7	7
Hyp	30	1	4
Cys	Nd	2	8
Glx	7	27	22
Lys	1	2	0
Arg	4	2	2
His	1	0	1
Tyr	1	1	2
Cys2	Nd	nd	2

5 El análisis de aminoácidos de la cerveza sin tratar, el flóculo de Isinglass e Isinglass solo se presenta en la Tabla 4.3 (Análisis de Aminoácidos (tr, trazas < 1%; nd, no detectado). Isinglass es rico en glicina e hidroxiprolina, lo que se refleja en el análisis de aminoácidos. Se espera también encontrar hidroxisilina en Isinglass, pero no se detectó en este análisis. La composición de aminoácidos de la cerveza sin tratar y el flóculo de Isinglass es similar, excepto que el flóculo de Isinglass contiene menos prolina y más cisteína e hidroxiprolina.

10 La HPLC de fase inversa puede utilizarse para buscar las diferencias globales en el perfil (absorbancia a 280 nm) de proteínas solubles en diferentes muestras. Los perfiles de las muestras de cerveza de diferentes fracciones se muestran en Fig. 3. Éstos incluyen proteínas de cabezas de cerveza que son solubles a la temperatura ambiente (Fig. 3<sup>a</sup>), proteínas insolubles a la temperatura ambiente procedentes de las cabezas que se solubilizan por calentamiento a 50°C durante 1 hora (Fig. 3b), y proteínas del flóculo que son solubles después de calentamiento (Fig. 3c).

15 Los perfiles de proteínas solubles en frío procedentes de las cabezas de cerveza decantadas (Fig. 3<sup>a</sup>) son muy similares para la cerveza sin tratar (NT-ss) y la cerveza tratada con Isinglass (IT-ss). En el caso de las proteínas de cerveza de cabezas solubilizadas por calentamiento (Fig. 3b), la muestra sin tratar (NT-ps) parece tener más componentes proteínicos que la muestra tratada con Isinglass (IT-ps). Los componentes proteínicos en los flóculos de cerveza solubilizada por calentamiento (Fig. 3c) son similares para las muestras sin tratar (NF-ps) y tratada (IF-ps). La variación en las alturas de los picos de algunos componentes puede ser resultado de la preparación de la muestra, dado que es difícil obtener el material del flóculo sin tratar sin incluir material de cerveza no decantado.

25 Puede utilizarse SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes para examinar las diferencias en proteínas solubles e insolubles de tamaños diferentes. Fig. 4 muestra una SDS-PAGE de proteínas en diferentes fracciones de cerveza tratada y sin tratar. En las cabezas decantadas, el tratamiento elimina las proteínas insolubles (sedimentos de las cabezas) mientras que quedan la mayoría de las proteínas solubles (sobrenadante de cabezas). La comparación de las proteínas en el flóculo (sobrenadante y sedimento) sugiere que existe poca diferencia en las proteínas presentes con y sin tratamiento de Isinglass. La banda situada inmediatamente por debajo del etiquetador de 181,8 kDa procede del Isinglass, no de la cerveza.

30

Cuando las proteínas de la cerveza se hacen pasar por un gel IEF, no todas las proteínas entran en el gel debido a su naturaleza insoluble. La mayoría de las proteínas que entran de hecho en el gel pasan a puntos isoeléctricos comprendidos entre 4,55 y 5,2 (Fig. 5).

5

Análisis de ácidos grasos

Las muestras de cerveza ensayadas (cerveza sin tratar, flóculo de Isinglass y flóculo sin tratar) contienen cierta proporción de ácidos grasos. Éstos incluyen ácidos mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico (heptadecanoico) y esteárico en la cerveza sin tratar y el flóculo de Isinglass; y ácidos palmítico, linoleico, 10-octadecanoico y esteárico en el flóculo sin tratar. El análisis cuantitativo de estos ácidos grasos se encuentra actualmente en curso.

10

Compuestos fenólicos

El nivel de compuestos fenólicos solubles totales en la cerveza tratada con Isinglass y sin tratar se estimó por un ensayo colorimétrico. Basándose en este ensayo, cerveza sin tratar, cabezas de cerveza decantadas y flóculos de cerveza decantados contienen todos ellos aproximadamente 4% de compuestos fenólicos (Tabla 5.1 - Contenido de fenólicos de muestras de cerveza (% (p/p) y Tabla 5.2 - Composición de ésteres fenólicos). El flóculo de Isinglass tenía un nivel mayor de compuestos fenólicos de 9,6%, aunque algo de esto podría ser debido al contenido elevado de proteínas.

15

20

El análisis de carbohidratos sugería la presencia de arabinoxilano en las muestras de cerveza. Es sabido que los ácidos fenólicos están asociados con este polisacárido en la cebada, y para ensayar si existe o no una diferencia en el contenido de ácidos fenólicos para las muestras tratadas con Isinglass comparadas con la cerveza sin tratar, se midieron los compuestos fenólicos con enlaces éster. Los niveles globales de compuestos fenólicos con enlaces éster en las muestras dializadas son bajos, teniendo la cerveza sin tratar el contenido máximo de 1,4 ppm, seguida por el flóculo de Isinglass y el flóculo de cerveza decantada. El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en todas las muestras, mientras que el ácido o-cumárico aparece sólo en la cerveza sin tratar. El ácido cinámico aparece en ambos flóculos, pero los ácidos p-cumárico y siríngico se encuentran únicamente en el flóculo de Isinglass.

25

30

**Tabla 5.1**

Muestra	Fenólicos
Cerveza sin tratar	3.9
Cabezas de cerveza decantadas	4.1
Flóculo de cerveza decantado*	4.2
Cabezas clarificadas con Isinglass	3.8
Flóculo clarificado con Isinglass	9.6
*El flóculo de cerveza decantado contiene también cerveza sin decantar debido a la disponibilidad limitada de material	

35

**Tabla 5.2**

Ácido fenólico	Cerveza sin tratar (mol%)	Flóculo de Isinglass (mol%)	Flóculo de cerveza decantado (mol%)
Cinámico	nd	6	15
o-cumárico	28	nd	nd
Siríngico	nd	7	nd
p-cumárico	nd	4	nd
Ferúlico	72	83	85
Total (ppm)	1.4	1.0	0.7

Ácido fenólico	Cerveza sin tratar (mol%)	Flóculo de Isinglass (mol%)	Flóculo de cerveza decantado (mol%)
nd, no detectado.			

Composición Elemental

- 5 Se recogieron cerveza sin tratar y flóculo de Isinglass y se secaron para análisis elemental. Los resultados (Tabla 5.3) sugieren que existe un aumento en calcio, hierro, cobre y aluminio en el flóculo. El flóculo contiene también más ceniza que la cerveza sin tratar.

**Tabla 5.3**

Elemento	Cerveza sin tratar (ppm)	Flóculo de Isinglass (ppm)
Calcio	942	2160
Magnesio	1260	955
Potasio	3490	3760
Sodio	4800	2290
Hierro	2	15
Fósforo	2650	2250
Cobre	1	16
Cinc	<0,1	1
Manganeso	1	0,3
Aluminio	6	16
% Cenizas minerales (p/p)	0,03	2,09

10

Análisis de las Propiedades Coloidales

- 15 Las medidas de movilidad electroforética y potencial zeta (Tabla 6) muestran que Isinglass está cargado positivamente y las partículas en la cerveza están cargadas negativamente. En general, las partículas con potenciales zeta mayores que 30 mV (positivos o negativos) son electroforéticamente estables. Los valores de potencial zeta bajo de la cerveza y las partículas de flóculo son indicativos de sistemas inestables, que tienen mayor probabilidad de agregarse.

20

**Tabla 6**

	Movilidad	Potencial Zeta (mV)
Cerveza sin tratar	-0,26	-3,36
Isinglass solo	1,69	21,61
Flóculo de Isinglass	-0,39	-5,05

Conclusión

- 25 El flóculo de la cerveza tratada con Isinglass contiene más proteínas, compuestos fenólicos y cationes que la cerveza sin tratar, pero tiene características de carga similares. El flóculo de Isinglass dializado está compuesto de polisacárido (56%), proteína (38%) y compuestos fenólicos (9,6%). Se identificaron también algunos ácidos grasos. Los polisacáridos presentes están basados en su mayoría en almidón (maltodextrinas) pero incluyen también arabinosilano. Las proteínas son ricas en glutamina/glutamato y prolina y contienen más cisteína que las de la  
 30 cerveza sin tratar. Las mismas tienen generalmente pls ácidos (~ pI5) y una distribución amplia de pesos moleculares, aunque existen grupos de proteínas que pasan a -40 y por debajo de 20 kDa en los geles de SDS-

PAGE. Parece ser que todas las proteínas que se sedimentan con tratamiento de Isinglass están presentes en la cerveza sin tratar, y están presentes todavía en las cabezas decantadas como proteínas solubles. Los niveles de ácidos fenólicos con enlaces éster son bajos. La influencia de los compuestos fenólicos sobre la acción de Isinglass sigue sin aclarar.

5

#### Ejemplo 2 – Filtro Alternativo de Isinglass

Una alternativa ideal de Isinglass mostrará actividad similar a Isinglass pero no se derivará de animales y será competitiva en costes y susceptible de tratamiento por procesos de fabricación actuales. Cierta número de materiales esencialmente derivados de plantas han sido utilizados en una versión a escala reducida del test para decantación en un intento de encontrar una alternativa adecuada a Isinglass.

10

#### Materiales

15 Cerveza de alta densidad no clarificada fue producida por Calton y United Breweries (CUB) aunque podría utilizarse cualquier fuente de cerveza sin clarificación. Isinglass, kappa-carragenano semiclarificado, polivinil-pirrolidona (PVP), y PVP polimerizada (PVPP) están disponibles universalmente, por ejemplo PVPP está disponible de BASF, Alemania, bajo el nombre Divergen. suministradores comerciales para otros productos son: Plantis M y Plantis WT (Australian Winemakers, North Melbourne); Klebosol (Clariant, Francia); Baykisol (Victus International, Albert Park; fabricado por Bayer Chemicals, Alemania); kappa-carragenano, alginato de sodio y goma de xantano (Sigma, EE.UU.); carboximetil-quitosano (Tipos N-, O-, N, O-, sol, y gel; de V-LABS, Inc., EE.UU.); Goma de gelano (Gelrire; de PhytoTechnology Laboratories, EE.UU.); pectinas HM (tipos RS-109, USP y SS-121; de Citrus Colloids, actualmente parte de Hercules – contacto Copenhagen Pectina A/S Lille Skensved, Dinamarca); pectinas HM (tipos RS-400, RS-450, MRS-351, y SS-200; de Danisco – contacto Danisco Ingredients, Brabrand, Dinamarca); Pectina LMC (tipo 710, también de Danisco); Pectina LMC (tipo 18CG de CP Kelco-contact CP Kelco Lille Skevensved, Dinamarca); pectinas LMA (tipos 1000, 2000 y 3000; de Citrus Colloids); pectinas LMA (tipos 101 y 104; de CP Kelco); Pectina LMA a (tipos 210; de Danisco); Pectina LMA a (tipo 290 NH; de UniPectinae).

20

25

En los experimentos que siguen, PB-A (biopolímero A de plantas) es CP Kelco tipo 101, PB-B (biopolímero B de plantas), es Pectina LMA, Danisco tipo 210, PB-C (biopolímero C de plantas) es CP Kelco tipo 104 y PB-D (biopolímero de plantas D) es UniPectina tipo 290 NH.

30

#### Test de Decantación

35 Todos los tests de decantación se conducen a 4°C utilizando cerveza pre-clarificada no decantada. El agente clarificador se añade a la cerveza no decantada hasta un volumen final de 250 ml. La solución se mezcla utilizando una varilla agitadora magnética (5 min, velocidad media), se transfiere a un cilindro de vidrio y se deja decantar durante hasta 113 horas. Para evaluar la turbidez de la cerveza, se mide la absorbancia (longitud de onda - 500 nm; referencia - agua) de ~ 1 ml de cerveza, tomada de la línea de graduación del cilindro de 210 ml, se mide en diversos momentos después de la adición de los agentes clarificadores. Se incluyen en cada test a la vez un negativo (ausencia de agente clarificador) y un control positivo (0,002% de Isinglass). A la conclusión de cada test, se retienen para análisis 20 ml de cerveza de entre las etiquetas de graduación 210 y 190 ml (cabeza) y material del fondo del cilindro (Flóculo).

40

#### Resultados y Discusión

45

#### Tests de Decantación

En los tests de decantación (Tabla 7 -  $A_{500\text{ nm}}$  de cerveza no decantada - 1350), Baykisol imparte cierta transparencia a la cerveza como lo hace Plantis M. Baykisol no es tan efectivo como Isinglass, y Plantis M, una preparación comercial de proteínas vendida para la clarificación de vinos en combinación con bentonita, es eficaz únicamente después de tratamiento durante un periodo de tiempo prolongado. A partir de las pruebas iniciales, únicamente el biopolímero de plantas B (BP-B) exhibía cierto potencial. Se testaron una serie de otros biopolímeros de plantas de una composición similar a PB-B (Tabla 8). PB-A era eficaz también como una alternativa a Isinglass, mientras que PB-C y PB-D no lo eran.

50

55

#### Tabla 7

Agente clarificador		Concentración	Absorbancia (500 nm)					
			21 h	24 h	48 h	72 h	92h	96 h
Ninguno		-	-	1.198	0.976	0.873	-	0.704
Isinglass		0.00025%	-	1.048	-	-	-	-
		0.0005%	-	0.644	-	-	-	-
		0.001%	-	0.47	-	-	-	-
		0.002%	-	0.307	0.261	0.226	-	0.225
Sol de sílice	Klebosol	100 µL/L	-	1.013	-	-	-	-
	Klebosol	200 µL/L	-	0.924	-	-	-	-
	Klebosol	400 µL/L	-	0.788	-	-	-	-
	Klebosol	800 µL/L	-	0.666	-	-	-	-
	Baykisol	800 µL/L	-	0.54	-	-	-	-
	Baykisol	800 µL/L	-	0.48	-	-	-	-
κ-Carragenano	Purificado	0.003%	-	0.922	-	-	-	-
	Purificado	0.004%	-	1.005	-	-	-	0.822
	Purificado	0.006%	-	0.996	-	-	-	-
	Purificado	0.006%	-	0.911	-	-	-	-
κ-Carragenano	(Semi-Refinado (hidratado))	0.008%	-	1.002	-	-	-	0.772
	(Semi-Refinado (50-50°C))	0.008%	-	1.053	-	-	-	0.886
	(Semi-Refinado (50-50°C))	0.008%	-	0.988	-	-	-	0.783
Carboxi-metil-quitosano	N,O -	0.004%	-	1.239	-	-	1.066	-
	N,O -	0.004%	-	1.426	1.271	-	-	-
	N,O -	0.008%	-	1.441	1.353	-	-	-
	N -	0.004%	-	1.215	-	-	1.021	-
	N -	0.004%	-	1.336	1.173	-	-	-
	N -	0.008%	-	1.385	1.283	-	-	-
Agente clarificador		Concentración	Absorbancia (500 nm)					
			21 h	24 h	48 h	72 h	92h	96 h
Carboxi-metil-quitosano	O -	0.004%	-	1.508	1.318	-	-	-
	O -	0.008%	-	1.6	1.55	-	-	-
	CMC Gel	0.004%	1.435	-	-	-	-	-
	CMC Gel	0.008%	1.466	-	-	-	-	-
	N-CMC (sol)	0.004%	1.428	-	-	-	-	-
	N-CMC (sol)	0.008%	1.376	-	-	-	-	-
Plantis	M	0.001%	-	1.334	1.027	0.901	-	0.90

ES 2 507 840 T3

	M	0.001%	-	1.391	0.797	0.701	-	2 0.67 4
	M	0.002%	-	0.895	0.528	0.463	-	0.41 4
	WT	0.001%	-	1.037	1.019	0.778	-	0.75 1
	WT	0.001%	-	1.113	0.982	0.715	-	0.72 8
	WT	0.002%	-	1.1	0.992	0.763	-	0.76 6
PVP		0.015%	-	0.949	-	-	0.771	-
PVPP		0.015%	-	1.063	-	-	0.836	-
Gelrite	Goma de gelano	0.004%	-	1.1	-	-	0.852	-
		0.008%	-	0.869	-	-	0.75	-
Ácido alginico		0.004%	-	1.123	-	-	0.824	-
		0.008%	-	1.167	-	-	1.012	-
Goma de xantano		0.004%	-	1.138	-	-	1.071	-
		0.008%	-	1.025	-	-	0.698	-
Pectina LMA	Danisco	0.004%	-	0.601	0.505	0.492	-	0.46 0.52
	tipo 210	0.006%	-	0.687	0.589	0.54	-	1 0.47
		0.008%	-	0.597	0.522	0.499	-	1



Agente clarificador	Concentración	Absorbancia (500 nm)										
		21 h	24 h	43 h	48 h	66 h	72 h	92h	96 h	113 h		
PB-C												
Pectina LMA	0,008%	0,836		0,672	-	-	-	-	-	-	-	-
PB-D	0,004%	-	0,895	-	-	-	-	-	-	-	-	0,745
Pectina LMA	0,006%	-	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-	0,754
	0,008%	-	0,735	-	-	-	-	-	-	-	-	0,604

La comparación de los perfiles de proteínas por SDS-PAGE (Fig. 6), sugiere que Isinglass y PB-A interactúan con las proteínas de modo diferente. Análogamente a Isinglass, PB-A reduce la fracción de sedimento de las cabezas de proteína, mientras que PB-C, que no es un agente clarificador eficaz, no lo hace. Sin embargo, PB-A parece recoger más de una proteína en particular (~ 40 kDa) en el flóculo tratado. Isinglass y PB-C hacen disminuir también la misma banda, pero en menor grado.

De los diferentes materiales ensayados, las preparaciones de biopolímeros de plantas PB-A y PB-B parecen exhibir cierto potencial como alternativa a Isinglass.

### 10 Ejemplo 3 - Caracterización ulterior de las partículas de cerveza

La preparación de la muestra, el análisis de ésteres fenólicos y los ensayos de decantación se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Para la electroforesis 2-D, se suspendieron muestras (0,5 a 1,0 mg) en tampón de muestra de tiourea y se concentraron en tiras de IPG de 18 cm que cubrían un intervalo de pH de 3 a 10. Las tiras de IPG se equilibraron y dispusieron a través de un gel de poliacrilamida al 12,5% para la segunda dimensión. Se realizaron digestiones con tripsina en gel en la banda de 40 kDa de SDS-PAGE (véanse los Ejemplos 1 y 2). Los fragmentos peptídicos se analizaron por espectrometría de masas y las secuencias coincidían con proteínas conocidas por investigaciones en bases de datos.

### 20 Análisis de compuestos fenólicos

El análisis de ésteres fenólicos se repitió debido a los niveles extremadamente bajos encontrados en las muestras que contribuían a posibles errores en el análisis. Los niveles de compuestos fenólicos con enlaces éster en cerveza entera, flóculo Isinglass y cabezas son muy bajos, con menos de 50 ng en 5 mg de material dializado liofilizado (Tabla 9 - análisis de ácidos fenólicos con enlaces éster). El ácido fenólico principal es ácido ferúlico en todas las muestras, con cantidades traza de ácidos siríngico, cinámico y p-cumárico. Sobre una base de peso, parece ser que la cantidad máxima de compuestos fenólicos se encuentra en el flóculo de Isinglass, que está constituido por más ácido siríngico y ácido cumárico como porcentaje que la cerveza sin tratar y las cabezas de Isinglass.

30 **Tabla 9**

Ácido fenólico	Cerveza entera	FLÓCULO de Isinglass	CABEZAS de Isinglass
Cinámico	tr	0,2%	0,3%
o-cumárico	nd	Nd	nd
Siríngico	0,3%	1,5%	0,6%
p-cumárico	0,5%	1,7%	0,3%
Ferúlico	99,1%	96,5%	98,8%
Total en 5 mg (ng)	38,9	46,4	29,5
% en la muestra	0,0008%	0,0009%	0,0006%

### Electroforesis 2-D

35 Las proteínas en el flóculo de Isinglass y las cabezas se separaron por 2-DE (Fig. 7). El patrón de proteínas de ambas muestras es muy similar, estando constituido por proteínas principales de pl ácido pero diferente a aproximadamente 40 kDa. Las digestiones con tripsina en gel de la banda de 40 kDa en la SDS-PAGE permitían la secuenciación de esta banda. Los péptidos secuenciados coincidían con la proteína serpina tipo Z de la cebada (véase más abajo SEQ ID NO: 1).

40 Coincidencia de péptidos de la secuenciación MS/MS

Coincidencia con: gi|1.310.677. Registro: 216

45 (X97636) proteína serpina tipo z (*Hordeum vulgare*, subespecie vulgaris]

Peso nominal (Mr): 43307: Valor pl calculado: 5,61 (Taxonomía: *Hordeum vulgare*, subespecie vulgaris)

50 Escisión por semi-Tripsina: corta el lado del término C de KR hasta que el residuo próximo es P

ES 2 507 840 T3

Cobertura de secuencia: 16%

Los péptidos coincidentes se muestran en negrita y se subrayan en SEQ ID NO: 1.

**1** MATTLATDVR LSIHQTRFA LRLASAISSN **PERAAGNVAF SPLSLHVALS**  
**51** LITAGAGGAT **RDQLVAILGD GGAGDAKELN** ALAEQVVQFV LANESSTGGP  
**101** RIAFANGIFV DASLSLKPSF EELAVCQYKA KTQSVDFQHK TLEAVGQVNS  
**151** WVEQVTTGLI KQILPPGSVD NTKK**LVLGNA LYFK**GAWDQK FDESNTKCDS  
**201** FHLLDGSSIQ TQFMSSTKKQ YISSSDNLKV LKLPYAKGHD KRQFSMY**IILL**  
**251** **PGAQDGLWSLAKRL**STEPEF IENHIPKQTV EVGRFQLPKF **KISYQFEASS**  
  
**301** **LLRALGLQLP** FSEEADLSEM VDSSQGLEIS HVFHKSFVEV NEEGTEAGAA  
**351** TVAMGVAMSM PLKVDLVDFV ANHPFLFLIR EDIAGVVVVFV GHVTNPLISA  
 SEQ ID NO. 1

5

Tabla 10

Agente clarificador		Pectina					
Nombre	Compañía*	%COOMe	%CONH <sub>2</sub>	%COOH	% Producto	% Activo Supuesto	Absorbancia λ
Sin decantar					-	-	1,473
Sin clarificadores					-	-	1,322
Isinglass							0,31
Pectina HM							
RS-109	Coloides CC	70	-	30	0,008	0,004	0,954
					0,016	0,008	1,039
RS-400	Danisco	70		30	0,008	0,004	0,923
					0,016	0,008	1,025
RS-450	Danisco	69	-	31	0,008	0,004	0,967
					0,016	0,008	1,028
MRS-351	Danisco	68	-	32	0,008	0,004	1,807
					0,016	0,008	1,668
SS-200	Danisco	64	-	36	0,008	0,004	1,74
					0,016	0,008	0,759
					0,024	0,012	1,696
					0,032	0,016	0,299
USP	Coloides CC	61	-	39	0,008	0,004	1,796
					0,016	0,008	1,91

ES 2 507 840 T3

Agente clarificador		Pectina					
SS-121	Coloides CC	58	-	42	0,002	0,002	0,988
					0,004	0,004	0,692
					0,008	0,008	0,359
					0,012	0,012	0,272
					0,016	0,016	0,249
					0,020	0,020	0,176
					0,024	0,024	0,180
Pectina LMC							
Tipo710	Danisco	48	-	52	0,002	0,002	0,57
					0,004	0,004	0,362
					0,008	0,008	0,304
					0,012	0,012	0,201
					0,016	0,016	0,22
					0,020	0,020	0,165
					0,024	0,024	0,175
Tipo18CG	CP Kelco	39	-	61	0,008	0,004	0,729
					0,016	0,0008	0,631
Pectina LMA							
Tipo3000	Coloides CC	36	14	50	0,002	0,002	0,634
					0,004	0,004	0,44
					0,008	0,008	0,393
					0,012	0,012	0,33
					0,016	0,016	0,325
					0,02	0,02	0,294
					0,024	0,024	0,242
Tipo101	CP Kelco	36		50	0,002	0,001	1,22
					0,004	0,002	0,937
					0,008	0,004	0,375
					0,016	0,008	0,278
					0,024	0,012	0,221
Tipo210 (menos azúcar)	Danisco	33	16	51	0,006	0,006	0,49
					0,008	0,008	0,489
					0,010	0,010	0,606
Tipo2000	Coloides CC	32	18	50	0,008	0,004	0,427
					0,016	0,008	0,343
Tipo104 D)	CP Kelco	30	18	52	0,016	0,008	0,836
Tipo1000	Coloides CC	28	20	52	0,008	0,004	0,654

Agente clarificador	Pectina					
				0,016	0,008	0,558
* CC: Coloides cítricos.						

Ensayos de decantación

5 Pruebas precoces sugerían que existía potencial para que la Pectina (PB A y PB B) actuase como alternativa a Isinglass. Los biopolímeros utilizados en la prueba previa (PB A y PB B) eran ejemplos de pectina amidada. La prueba actual se realizó para determinar la relevancia del grupo amida en la Pectina. En esta prueba, pectinas ricas en ésteres metílicos, pectinas pobres en ésteres metílicos y pectinas amidadas bajas en ésteres metílicos se evaluaron en cuanto a actividad en tests de decantación (Tabla 10). Es importante observar que estas preparaciones  
 10 están típicamente muy mezcladas en la producción, y que la química enumerada en la Tabla 10 está basada en su especificación de producto, no en análisis químico real de cada lote. Asimismo, estos valores son indicativos de valores medios de población y no consideran diferencias en el patrón de distribución de polímeros individuales.

Los resultados sugieren que la totalidad de los tres tipos de pectina tienen cierta capacidad para clarificación de la  
 15 cerveza pero no todas las pectinas son eficaces. Se propone que la diferencia entre pectinas que son activas y aquellas que no lo son está relacionada con la densidad de carga global. Las pectinas LM son generalmente más eficaces que las HM con indiferencia de si la Pectina LM está amidada o no. La Pectina HM es eficaz, pero generalmente sólo cuando la proporción de COOH libre es mayor que 35%. Los límites superior e inferior para grado de esterificación (DE) y grado de amidación (DA) que dan actividad de clarificación eficaz se encuentran  
 20 actualmente en estudio ulterior.

Ejemplo 4 - Ensayos de eficiencia de filtración

Se condujeron ensayos de filtración a 2°C utilizando cerveza de alta densidad pre-clarificada sin sedimentar. Se  
 25 añadieron los agentes clarificadores a cerveza de alta densidad pre-clarificada hasta un volumen final de 8,5 litros. La solución se mezcló por volteo de la vasija (tanque pre-mezcla de acero inoxidable) durante 3 minutos y se dejó decantar luego durante 48 horas. El sobrenadante (7,5 l) se transfirió a otra vasija por la vía de una lanza corta que dejaba atrás el sedimento.

30 Se llevó a cabo una filtración con tierra de diatomeas (DE) sobre el sobrenadante. Se añadieron 7,5 g de DE (Filchem-577) a la cerveza y la solución se mezcló continuamente utilizando una varilla de agitación magnética. La eliminación subsiguiente de DE se realizó con un aparato de filtración horizontal Millipore, utilizando una columna de área de sección transversal de 120 cm<sup>2</sup> con 100 kDa de presión aguas arriba. El filtro se recubrió previamente con dos prefiltros Millipore Tipo AP, seguido por 0,115 g/cm<sup>2</sup> de polvo pre-recubierto DE (Filchem -DU40). Para calcular  
 35 la eficiencia de filtración, el volumen de cerveza filtrada se monitorizó con el tiempo y se calculó el índice de filtrabilidad utilizando un método confirmado por Lim et al. 1992.

Por representación gráfica de p/v frente a V se obtiene una línea recta con la pendiente igual al índice de filtrabilidad. Un valor bajo indica buena filtrabilidad, y un valor alto la inversa.  
 40

Los resultados de *índice de filtrabilidad* para cerveza tratada con diferentes adyuvantes de clarificación, como se  
 45 expone en la Tabla 11, muestran que la cerveza tratada con pectina 121 es comparable a la cerveza tratada con colágeno. La cerveza tratada con pectina 710 exhibía una mejora importante comparada con un control sin clarificadores, pero no tan buena como la Pectina 121.

**Tabla 11**

Agente clarificador	Tasa (mg/L)	Índice de Filtrabilidad (s/L <sup>2</sup> )
Ninguno		43,4
Colágeno	5	7,1
Pectina 121	100	7,5
Pectina 710	100	19,8

El gráfico representado en la Figura 8 muestra la eficiencia de filtración DE en laboratorio de cerveza sin clarificadores (control) comparada con la cerveza tratada con colágeno bovino y las dos muestras de pectina, HM-SS-121 y LMC-710.

5 Líneas planas con pendientes suaves ( $s/L^2$ ) indican una filtración más rápida. De este resultado se deduce que la muestra 121, Pectina rica en ésteres metílicos, es comparable al colágeno de bovino. La muestra 710 ayuda de hecho a la clarificación, pero no se comporta prácticamente tan bien como la muestra 121. Las pectinas se dosificaron a una dosis mayor comparada con el colágeno de buey (10 ppm frente a 80 ppm).

10 Ejemplo 5 - Optimización de los tratamientos de clarificación

Parece probable por el trabajo en progreso que los agentes clarificadores son capaces de capturar proteínas específicas para formar agregados estables y, al hacerlo así, estabilizan y facilitan la extensión de los flóculos a lo largo del tiempo. El trabajo de los autores de la invención ha demostrado que existe un grupo específico de proteínas redox de peso molecular bajo en la cerveza que tienen tioles reactivos. Estas proteínas pueden identificarse por rastreo de dichos tioles proteínicos (véase más adelante el Ejemplo 19).

Ejemplo 6 - Detección de pectinas residuales en la cerveza

20 Anticuerpos que reconocen huellas estructurales específicas, asociadas con el o los agentes clarificadores de pectina se encuentran en fase de desarrollo. Estos datos pueden utilizarse para optimización de las tasas de dosificación, y para controlar el uso no autorizado de esta tecnología. Las pectinas de clarificación definidas en esta solicitud de patente exhibían una reactividad singular que puede utilizarse por tanto para autenticación, contra una diversidad de otras pectinas.

25 Ejemplo 7 - pectinas no amidadas - efectos del DE de la pectina, la concentración de pectina y el tipo de cerveza sobre la eficiencia de los clarificadores de la cerveza

30 Se realizaron una serie de ensayos con pectinas no amidadas de esterificación variable, en las cuales se compararon la transparencia de la cerveza y el volumen de sedimento en condiciones de decantación estándar. La Figura 9 muestra la relación entre el grado de esterificación de la Pectina (DE, %), la transparencia de la cerveza (al cabo de 48 horas) y el volumen aparente del sedimento o flóculo. La Pectina (solución stock al 1%) se dosificó en cerveza UHG (CPL, Tabla 2; mosto original de 18° P) para dar 50 ppm. (La solución de pectina se preparó en agua y no contenía ningún otro aditivo).

35 Mejora de transparencia = (turbidez) del control - (turbidez) de la Pectina / (turbidez) del control x 100. La decantación se refiere a volumen de sedimentos; decantación = volumen aparente de sedimentos/volumen total de cerveza x 100. La clarificación muestra una dependencia acusada sobre el DE de la Pectina (Figura 9). El intervalo óptimo para el DE de la Pectina está comprendido entre 45 y 50% basado en la consecución de transparencia y la compacidad de los sedimentos. El volumen de sedimentos dentro de este intervalo es menor que 1% del volumen de suspensión. A DE reducida (v.g. menor que 40%) el sedimento se vuelve 'más esponjoso', y el volumen aparente del sedimento aumenta muy rápidamente, dado que los niveles de DE se reducen por debajo de 40%. Para valores de DE mayores (v.g. > 50%) el volumen de sedimento disminuye como consecuencia sin duda de la clarificación reducida alcanzada.

45 El efecto de clarificación de dos pectinas diferentes - HM121 (lavada con etanol) y LMC710 (referida a la Tabla 1), se testó utilizando una cerveza VB con alta turbidez (v.g. 88 EBC, Tabla 12, que muestra el efecto de dosificación de la cerveza de alta densidad con clarificadores basados en Pectina: ensayos de decantación y medidas de turbidez). La Pectina se dosificó a una concentración final de 50 ppm o 100 ppm. Se utilizó como control positivo colágeno bovino (4-10 ppm proteína/hL). Los resultados (Tabla 3) demostraron que los clarificadores de colágeno clarificaban la cerveza progresivamente a lo largo del tiempo. Al cabo de 48 horas, la cerveza tratada parecía ópticamente clara, teniendo en cuenta que esto describe el aspecto de la muestra de cerveza en un cilindro estándar de 1 L. La turbidez se estabilizaba a aproximadamente 8 EBC después de 72 horas. HM121 y LM101 (100 ppm) producían clarificación equivalente después de 72 h (7,9 frente a 10,7 EBC). LMC710 exhibía actividad a la tasa de dosis inferior de 50 ppm. HM121 no lo hacía cuando se comparaba con el control de adición sin clarificadores. La eficiencia de los clarificadores de las pectinas depende por tanto de la funcionalidad así como de la concentración. A este respecto, no hay diferencia alguna para los clarificadores de colágeno que exhiben dependencia de la dosis y dependencia de la fuente y los protocolos de preparación (funcionalidad).

60 **Tabla 12**

Pectina	Conc. (ppm)	Turbidez (EBC)				
		0h	8h	24h	48h	72h

ES 2 507 840 T3

Pectina	Conc. (ppm)	Turbidez (EBC)				
		0h	8h	24h	48h	72h
Control	-	88,4	88,0	86,7	85,7	84,4
HM121	100	87,6	46,1	25,7	11,3	7,9
HM121	50	84,4	86,7	85,7	84,7	82,4
LMC710	100	83,2	17,0	14,6	13,3	10,7
LMC710	50	83,3	42,8	38,2	36,1	34,7
Colágeno	0,02%	82,8	56,7	28,9	12,7	8,9

El efecto de la turbidez inicial de la cerveza sobre la eficiencia de los clarificadores de la Pectina no amidada en los ensayos de decantación se ilustra en la Tabla 13. Se utilizó en el estudio una cerveza se dosificó como se indica y se monitorizó durante 72 horas. La cerveza LAGER con fluidez inicial baja y alta (45 frente a 75 EBC). La solución de dosificación de pectina contenía 1% de pectina (p/p). La concentración final de pectina en la cerveza estaba comprendida entre 50 y 100 ppm. En la cerveza de turbidez baja (45 EBC LAGER, Tabla 13), la turbidez de la cerveza de control que no recibía agente clarificador alguno después de 72 h de decantación se redujo a 33 EBC. La cerveza tratada con colágeno (0,02%) al mismo tiempo tenía una turbidez de 5,7 EBC. La cerveza tratada con HM121 a 70-100 ppm era 5,4 EBC o menos. A 60 ppm, la turbidez se había incrementado ligeramente hasta 11,8 EBC. Con 50 ppm de pectina, ésta había aumentado sensiblemente hasta 31,7 EBC. Apenas se apreciaba alguna diferencia con respecto a la cerveza de control sin tratar. A modo de contraste, en la cerveza fuertemente turbia (75 EBC LAGER, Tabla 13), puede verse que la clarificación no tenía lugar hasta que el nivel de pectina en la cerveza era 70 ppm. La cerveza tratada con colágeno alcanzaba 13,8 EBC al cabo de 72 h. Para obtener la misma transparencia se requerían 100 ppm de HM121, aunque se obtuvieron tasas de clarificación satisfactorias con 80 ppm de HM121. Por consiguiente, la turbidez inicial de la cerveza para tratamiento (causada principalmente por las células de levadura residuales) puede influir acusadamente en la capacidad de los clarificadores de pectina.

**Tabla 13**

Pectina	Conc. (ppm)	Turbidez (EBC)					
		0h	4h	18h	24h	48h	72h
<b>Lager (turbidez inicial: ~45 EBC)</b>							
Control	-	45,0	45,5	45,2	43,1	36,4	33,3
HM121	50	44,3	43,2	40,3	37,1	34,6	31,7
HM121	60	45,1	40,2	26,1	20,5	14,0	11,8
HM121	70	46,7	41,7	14,4	12,0	8,9	7,4
HM121	80	45,8	40,7	7,9	6,8	5,9	5,4
HM121	90	45,6	40,3	7,9	6,8	5,4	5,1
HM121	100	44,3	38,9	10,3	7,8	5,0	4,8
Colágeno	0,02%	45,7	42,2	16,7	11,4	8,1	5,7
<b>Lager (Turbidez inicial: ~75 EBC)</b>							
Control	-	77,6	76,7	75,8	74,7	74,9	72,8
HM121	50	77,2	77,2	76,0	72,8	72,1	70,0
HM121	60	73,4	76,6	76,5	72,8	72,3	70,1
HM121	70	74,8	73,7	75,1	71,8	68,8	59,8
HM121	80	74,8	75,2	74,4	72,6	51,3	36,0
HM121	90	73,3	76,8	67,7	51,9	25,6	20,0
HM121	100	74,3	70,3	30,8	24,5	13,5	11,3
Colágeno	0,02%	77,2	68,7	32,3	25,7	16,7	13,8

Ejemplo 8 - Pectina amidada - estructura y funcionalidad

- 5 Se ha investigado el efecto de los clarificadores de pectina amidada. Se utilizaron en el estudio pectinas amidadas con valores variables de DE y DA (véase la Tabla 1). Se dosificó solución de pectina al 1% en cerveza VB a una concentración final de 75 ppm. La cerveza se guardó a 4°C durante 72 horas. Durante este tiempo se retiraron partes alícuotas para determinar la turbidez. Los resultados de decantación demostraron (Tabla 14) que aunque la adición de todas las pectinas amidadas conducía a una mejora en la transparencia de la cerveza (72 h), LM101 y LA110 parecían ser mucho más eficaces que otras.

**Tabla 14**

Pectina	DE (%)	DA (%)	Reactividad con Ca <sup>++</sup>	Turbidez (EBC)					
				0h	4h	18h	24h	48h	72h
Control	-	-	-	35,7	-	33,3	32,1	27,6	23,4
LM101	35	15	Baja	35,7	14,3	10,9	8,74	7,43	5,95
LM102	30	19	Media	39,2	-	13,1	12,2	11,7	9,98
CF005	32-40	11-17	Baja	35,7	22,7	17,5	16,3	14,8	14,2
CF010	30-36	14-20	Media	35,7	19,6	16,5	14,7	13,2	13,0
CF020	27-32	18-23	Alta	35,7	37,5	36,8	35,6	32,8	30,3
LA110	33	17	Baja	41,2	-	-	10,4	8,42	7,61
Colágeno	N/A	N/A	N/A	45,7	42,2	16,7	11,4	8,1	5,7

- 15 Para LM101 y LA110, DE y DA suman 50%. Sin embargo, dado que las otras pectinas de este grupo tienen valores similares (DE + DA) (Tabla 14), la eficiencia superior de estas dos pectinas es probablemente una consecuencia de otros factores. Las propiedades coloidales de la Pectina son especialmente sensibles a la presencia de Ca<sup>2+</sup>, así como otros cationes. Por ejemplo, los niveles de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> en las cervezas son del orden de 50 y > 100 ppm, como ya se ha mencionado, aunque se registrará una variación considerable en la técnica. Tanto LM101 como LA110 se clasifican por sus suministradores comerciales como poseedores de sensibilidad baja de Ca<sup>2+</sup> para formación de gel, mientras que las pectinas menos eficaces en el grupo, aunque son todavía agentes clarificadores eficaces en las condiciones seleccionadas, son CF010 y CF005. La serie de sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> para formación de gel es CF020 > CF010 > CF005 o, conforme a la descripción de los fabricantes, CF020 tiene una sensibilidad alta, CF010 tiene sensibilidad media y CF005 sensibilidad baja a Ca<sup>2+</sup> a juzgar por la formación de gel en condiciones estándar. La especificación de CF005 tiene un intervalo amplio de DE (32-40%) y DA (11-17%) que pueden hacerla menos comparable a las otras pectinas en este grupo. Pero considerados juntos, los datos indican que la capacidad de clarificación de la cerveza está prescrita de modo significativo por los niveles de esterificación y amidación, y por tanto por la carga residual, así como por la sensibilidad de la gelificación a Ca<sup>2+</sup>. Como se conoce también en la bibliografía, lo último está ligado a la distribución de carga a lo largo de la cadena principal de poligalacturato de las pectinas. Por tanto, no es sorprendente que diferentes pectinas, v.g. pectinas de cítricos, de piña, o de lúpulo que pueden diferir en la distribución de los grupos carboxilo de la pectina, puedan tener actividad de clarificación diferente para DE y DA equivalentes. La aglomeración de grupos carboxilo afecta también a los valores pKa de los carboxilos, que puede ser un factor a valores de pH bajos de la cerveza. Se observó que pectinas con alta sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> cuando se añaden a las cervezas tienden a formar partículas coloidales pequeñas, que pueden mantenerse en suspensión en la cerveza durante tiempos prolongados. Si la secuencia de clarificación implica un estado transitorio de cuasi-gel, y decorado subsiguiente con proteína y otros componentes de la cerveza, antes de la floculación, entonces la formación de residuos recubiertos con Ca<sup>2+</sup> es claramente indeseable. La secuencia del proceso, y la sincronización de la decoloración de la proteína de los coloides tienen que jugar claramente un papel fundamental en la compactación de estos flóculos de cerveza. El efecto de Ca<sup>2+</sup> puede minimizarse por el uso de agentes quelantes. La reactividad de las proteínas puede modificarse por alteración de su estado redox. Esto puede conseguirse por sulfitolisis, que rompe los enlaces disulfuro y crea un tiol reactivo y añade un grupo sulfonato. La sulfonación aumentará la carga negativa de la proteína, y por tanto puede afectar a las interacciones con la Pectina basadas en atracción electrostática. El sulfito localizado puede actuar también como tampón contra el peróxido.

Los peróxidos se acumulan de hecho en la cerveza. La oxidación de los tioles de la proteína produce peróxido de hidrógeno, y forma un puente disulfuro. La oxidación de tioles vecinales tenderá a favorecer la formación de puentes intramoleculares, mientras que la formación de flóculos está más relacionada con la producción de redes macromoleculares extendidas. La solución de clarificadores se satura con aire. Durante la dispersión, el oxígeno acompañante de los clarificadores puede causar oxidación de las proteínas. La reticulación del disulfuro entre las proteínas ocurrirá más lentamente que la oxidación de los tioles vecinales. No obstante, los eventos intracelulares tendrán menos probabilidad de tener lugar si el oxígeno es limitante.

La sulfitolisis puede invertir la oxidación de los tioles, aunque cierta pérdida ocurrirá a lo largo del tiempo, y esto debería promover eventos de reticulación de las proteínas y formación de flóculos. Ciertamente, las concentraciones elevadas de sulfito en la cerveza en condiciones de compactación normales promoverán formación de partículas incluso después de tiempos de almacenamiento cortos. El sulfito actúa también como agente de barrido del oxígeno reactivo o agente de barrido de radicales libres y puede ser beneficioso para la estabilidad de la cerveza así como para la formación de flóculos.

Ejemplo 9 - Efectos de SO<sub>2</sub> y citrato sobre la eficiencia de los clarificadores de pectina

El SO<sub>2</sub> se acumula a la cerveza durante la fermentación y puede alcanzar típicamente 10 ppm más o menos al final de la fermentación. SO<sub>2</sub> es un agente reductor, y puede actuar también como agente de extinción de radicales libres. SO<sub>2</sub> puede dar también como resultado sulfitolisis de las proteínas, por la cual los puentes disulfuro en las proteínas se escinden para producir un grupo tiol libre y un grupo sulfonato (Ejemplo 7 anterior). Las proteínas pueden hacerse como consecuencia más reactivas o 'adherentes', y esto ha sido consignado como la causa de la formación de material particulado en algunas cervezas. Frecuentemente se añade SO<sub>2</sub> en forma de sulfito a la cerveza con anterioridad al envasado, y los niveles totales de SO<sub>2</sub> en la cerveza acabada pueden ascender hasta 25 ppm o más.

Se añadió sulfito de sodio a clarificadores de pectina (1% p/p LMC710, 1% LA110 o 1% LM101; sulfito de sodio 1,86 ó 3,72 g/l) preparados a partir de una Pectina amidada o no amidada. La concentración final de pectina en la cerveza era 50 ppm. La concentración final de SO<sub>2</sub> era 8 ó 16 ppm. El efecto del sulfito sobre el efecto de los clarificadores de pectina amida o no amidada (50 ppm) en LAGER (cerveza de alta densidad) se muestra en la Tabla 15. El sulfito (8 ó 16 ppm) mejoraba la tasa de clarificación comparada con las muestras que no contenían sulfito en la solución de dosificación, para las dos pectinas amidadas (LA110 y LM101) y para la LMC710 no amidada. La clarificación con LMC710 (50 ppm) más 16 ppm de SO<sub>2</sub> era casi equivalente a la clarificación con colágeno después de 48 h.

**Tabla 15**

Pectina	SO <sub>2</sub> (ppm)	Turbidez (EBC)				
		0h	18h	24h	48h	72h
Control	-	54,3	59,7	59,5	57,2	54,1
LMC710	-	54,4	23,1	-	19,2	-
LMC710	8	53,7	22,6	-	16,5	-
LMC710	16	54,3	16,1	-	13,0	-
LM101	-	45,1	-	17,8		
LM101	6	45,5	-	16,6		
LA110	-	44,7	-	23,7		
LA110	6	45,1	-	19,6		
Colágeno	-	50,6	17,6	-	8,7	6,9

Estas pruebas se extendieron para incluir el efecto de citrato así como el de sulfito sobre la clarificación de la cerveza (Tabla 16). Dos pectinas amidadas (LM101 y LA110) se seleccionaron para estudio ulterior. La solución de clarificadores Pectina-sulfito se reforzó con citrato de sodio de tal modo que el nivel final de citrato en la cerveza LAGER dosificada era 13 ppm. El citrato produce una mejora en la clarificación de la cerveza (50 ppm de pectina LM101, LA110) además del efecto del sulfito con ambos tipos de pectina. El resultado parece ser aditivo en oposición a sinérgico, lo cual está conforme a la acción propuesta del citrato en oposición al sulfito. El citrato direcciona los cationes y por tanto modera la progresión desde forma 'monómera' a gel para el flóculo de partículas. El sulfito puede dar como resultado sulfitolisis así como la formación de aductos de carbonilo. El mismo puede

promover reticulación macromolecular. LM101 (50 ppm), citrato (13 ppm) y sulfito (8 ppm) en cerveza LAGER dosificada era equivalente a 20 ppm de clarificadores de colágeno en términos de la tasa de clarificación así como del punto final alcanzado. Sin embargo, niveles inferiores de la LM101 en combinación con citrato y sulfito puede ser equivalente también de hecho a la clarificación del colágeno de referencia.

5

**Tabla 16**

Pectina (ppm)	Citrato (ppm)	SO <sub>2</sub> (ppm)	Turbidez (EBC)			
			0h	24h	48h	72h
Control	-	-	45,1	45,8	43,3	40,1
LM101	-	-	45,1	17,8	15,2	14,8
LM101	-	8	45,2	16,6	13,7	11,9
LM101	13	8	45,5	12,1	10,5	8,7
LM101	13	-	45,2	12,4	10,7	8,9
LA110	-	-	45,3	23,7	21,7	21,5
LA110	-	8	45,0	19,6	17,4	15,1
LA110	13	8	45,2	16,7	14,9	13,8
Colágeno	0,02%	-	45,1	11,6	9,0	7,9

10 Se determinó también el efecto de citrato y SO<sub>2</sub> sobre la eficiencia de los clarificadores para una gama de pectinas no amidadas (Figura 10; DE, 25-58%). Se añadió Pectina a cerveza CPL hasta una concentración final de 50 ppm con y sin citrato (13 ppm finales) y SO<sub>2</sub> (8 ppm finales) acompañantes. El citrato mejoraba el efecto de los clarificadores a juzgar por la mejora en transparencia (unidades EBC, Figura 10). Los resultados con cerveza CPL, después de la decantación se muestran en la Tabla 16. El efecto positivo del citrato se aplicaba a todas las muestras de pectina en los tests. El citrato es un buen quelador de Ca<sup>2+</sup> y puede competir con las pectinas en cuanto a Ca<sup>2+</sup> en la cerveza. El contenido de Ca<sup>2+</sup> de la cerveza es aproximadamente 40 ppm; los niveles de Mg<sup>2+</sup> son generalmente ~ 100 ppm. El Mg<sup>2+</sup> puede interactuar también con las pectinas.

20 Ejemplo 10 - Efecto de la adición de proteínas exógenas (citocromo C (proteína básica pl ~ 9, corazón de caballo; seroalbúmina bovina, Fracción V, pl ~ 4) y ácido tánico sobre la eficiencia de los clarificadores de pectina

25 Se añadió citocromo C (20 ppm) o BSA (20 ppm) junto con HM121 (60 ppm) a cerveza LAGER (14° P mosto original) para determinar el efecto sobre la clarificación. La Tabla 17 muestra el efecto de la suplementación con citocromo C y seroalbúmina bovina (BSA) sobre la actividad de los clarificadores de pectina HM121 en cerveza de alta densidad representado por los resultados de la decantación. Los resultados en la Tabla 17 muestran que el citocromo C (20 ppm) mejoraba la tasa de clarificación y reducía la turbidez en el punto final comparado con el control de HM121. BSA (proteína de pl bajo) tenía el efecto opuesto. La tasa de clarificación era más lenta y la transparencia del punto final no tan buena como el control de pectina solo. El citocromo C está cargado positivamente al pH de la cerveza (4.1); BSA lleva poca carga neta, dado que el pH de la cerveza es casi el mismo que el punto isoelectrónico. El citocromo C puede actuar como agente de formación de puentes para el decorado de los grupos Pectina ácidos y adicionalmente, la fijación de las proteínas más ácidas en la cerveza.

30

**Tabla 17**

Pectina (ppm)	Aditivo (ppm)	Turbidez (EBC)			
		0h	24h	48h	72h
Control	-	59,8	59,4	54,7	52,2
HM121	-	59,8	59,4	31,9	22,0
HM121	Citocromo C (20)	60,2	19,2	13,2	10,8
HM121	BSA (20)	59,2	60,6	47,7	36,6

Se investigó el efecto de la suplementación de ácido tánico sobre la acción de los clarificadores de pectina HM121 en la cerveza de alta densidad como se muestra por ensayos de decantación (Tabla 18). La cerveza de control (cerveza LAGER de 14° P de densidad original) exhibía una ligera reducción en las unidades de turbidez EBC después de 1020 horas de decantación. La adición de HM121 (80 ppm) reducía la turbidez a valores inferiores a 10 después de 58 h. Pero, como se ha demostrado previamente en la Tabla 13, la actividad de clarificación de HM121 disminuía rápidamente a niveles menores que 80 ppm. La presencia de ácido tánico contrarrestaba esta disminución (Tabla 18). Por ejemplo, con 50 ppm de ácido tánico presentes y 50 ppm de HM121 la turbidez después de 48 h de decantación era 8 unidades EBC, comparada con 9,8 para cerveza que contenía solamente 80 ppm de HM121. Existe cierta acción de clarificación del ácido tánico por sí solo; por ejemplo, 50 ppm reducían la turbidez después de 48 h a 32 EBC. Sin embargo, globalmente parece existir un resultado mejorado cuando están presentes juntos el ácido tánico y el polifenol. Se observó también que los polifenoles, al igual que la proteína y la pectina se acumulan en los flóculos. Este dato, junto con los datos analíticos, indica que los sedimentos se forman, al menos en parte, como resultado de la interacción entre proteínas, el tanino (polifenoles) y la Pectina.

15 **Tabla 18**

HM121 (ppm)	Ácidos tánicos (ppm)	Turbidez (EBC)						
		0h	18h	24h	48h	72h	96h	120h
Control	-	59,8	-	59,1	54,4	-	-	44,4
80	-	58,8	48,7	11,9	9,8	8,9	8,3	-
17	17	60,2	-	78,1	74,2	-	-	72,3
32	32	59,7	-	95,0	55,2	-	-	33,9
49	49	59,8	-	11,9	7,8	-	-	5,3
65	65	62,2	-	9,9	6,6	-	-	5,1
40	40	66,9	25,0	19,7	14,5	11,7	10,0	-
50	50	65,8	13,5	11,4	8,0	7,0	5,7	-
60	60	66,4	12,5	9,5	7,7	5,9	4,7	-
-	50	67,9	32,3	31,7	32,2	30,4	30,2	-
Colágeno	0,02%	58,9	22,1	13,6	9,4	7,7	5,9	-

Ejemplo 11 - Eficiencia de los clarificadores de pectina sobre cervezas aditivadas y no aditivadas con lúpulo de caldera

20 Tres cervezas aditivadas con lúpulo de caldera (FLEX, CPL y CNM, 18° P, Tabla 2) y tres cervezas no aditivadas con lúpulo de caldera (LAGER, VB y CD, 14° P, Tabla 2) se clarificaron utilizando LM101 a 40-100 ppm. La mejora de la transparencia de la cerveza (Ci, (%)) después de 48 horas es dependiente de la concentración de pectina (Figura 11). La mejora de transparencia para las variedades clarificadas con lúpulo de caldera era mayor que 88% incluso a niveles bajos de pectina (40 ppm), y podía ser tan alta como 95% para CPL para concentraciones de pectina > 60 ppm. Para cervezas que no recibieron adición de lúpulo de caldera, se producía una disminución en la transparencia una vez que la concentración de pectina se reducía por debajo de 80 ppm. Sin embargo, incluso a una tasa de dosificación de 60 ppm de pectina, el índice de clarificación excedía de > 70%.

30 La dependencia de la adición de lúpulo de caldera se veía respaldada por examen del efecto de extractos de lúpulo preparados por extracción etanólica de sedimentos de lúpulo Pride of Ringwood [(50 ml de etanol (30%) más 5 g de sedimentos, 20°C)], sobre la actividad de clarificación de HM121 (60 ppm) (Tabla 19: resultados de los ensayos de decantación con cerveza de alta densidad). El extracto de lúpulo aumentaba la tasa de clarificación y reducía la turbidez final después de 72 h de decantación comparado con el control de HM121.

35 **Tabla 19**

Pectina (ppm)	Aditivo (ppm)	Turbidez (EBC)			
		0h	24h	48h	72h
Control	-	59,8	59,4	54,7	52,2

Pectina (ppm)	Aditivo (ppm)	Turbidez (EBC)			
		0h	24h	48h	72h
HM121	-	59,8	59,4	31,9	22,0
HM121	Extracto de lúpulo (2% p/p)	60,2	46,7	24,5	16,4

- Adicionalmente, dado que los extractos etanólicos de lúpulo contienen también algunas proteínas así como isohumulonas, se ensayó también el efecto de la co-adición de un extracto de lúpulo en CO<sub>2</sub> líquido sobre la actividad de la Pectina. HP6 es un extracto comercial de lúpulo Pride of Ringwood. HP6 (25 Unidades Internacionales de Amargor (IBU), final) y Pectina LM101 (75 ppm, final) más citrato (13 ppm, final) y SO<sub>2</sub> (8 ppm, final) se dosificaron juntos en cerveza LAGER post-centrifugada. Se llevaron a cabo tests de decantación. La filtrabilidad con HP6 presente mejoraba sensiblemente comparada con la misma sin HP6 (Figura 12). Los valores de filtrabilidad se aproximaban a 12 sL<sup>-1</sup>, que se encuentra prácticamente en el extremo superior de la filtrabilidad 'óptima' (~ 10 sL<sup>-1</sup>). Una mejora similar en la filtrabilidad puede conseguirse con adiciones reducidas de HP6 (equivalentes a 10 IBU, final). Por tanto, los efectos de la adición de lúpulo de caldera sobre la clarificación subsiguiente por agentes basados en Pectina pueden ser debidos a disponibilidad de isohumulonas. A su vez, esto puede afectar a la disponibilidad de los cationes reactivos con Pectina.
- Se observó también que, a medida que la solución de clarificadores de pectina se envejece (Pectina-citrato-SO<sub>2</sub>, 1-5% p/v), parece producirse un aumento en el efecto de los clarificadores (clarificación y filtrabilidad, Tabla 20) y una disminución en el efecto positivo sobre ambas por el extracto de lúpulo (HP6).

Tabla 20

Adiciones de clarificadores (1% p/v pectina, citrato, SO <sub>2</sub> )		Turbidez (EBC)		Filtrabilidad (sL <sup>-1</sup> )
		Inicial	48h	
<u>Inicial</u>				
LAGER	- sin adiciones	32	28	27
	- 0,02% Colágeno	32	9	12,4
	- LM101, 75ppm final	32	7,5	17,3
<u>Después de 20 días</u>				
LAGER	- sin adiciones	36	29	27
	- 0,02% Colágeno	36	11	15
	- LM101, 75ppm	36	13	18
	- LM101, 75ppm + HP6 (25 IBU)	36	8	12
<u>Después de 30 días</u>				
LAGER	- sin adiciones	42	40	32
	- 0,02% Colágeno	42	14	20
	- LM101, 75ppm	42	13	10
	- LM101, 75ppm + HP6 (10 IBU)	42	7	10,4
	- LM101, 75ppm + HP6 (20 IBU)	42	5	10
	- LM101, 75ppm + HP6 (30 IBU)	42	13	10,6

20

Esto está ligado probablemente a la estructura y por tanto a los cambios de funcionalidad en la pectina, e implica cambio en la actividad catiónica.

Considerados en su conjunto, los agentes de amargor del lúpulo mejoran la eficiencia de los clarificadores basados en Pectina cuando se introducen en la caldera hirviente o incluso más tarde en el proceso, y especialmente en el momento de la adición de los clarificadores de pectina, antes del almacenamiento.

5 Ejemplo 12 - Clarificación de las cervezas de densidad alta y densidad ultra-alta.

Se dosificó cerveza HG (VB; 14° P) con LM101 (75 ppm) con citrato y SO<sub>2</sub> (13 ppm y 8 ppm de concentración final, respectivamente) y se testó la filtrabilidad (Figura 13).

10 Se utilizó cerveza sin tratar para control negativo y se utilizó colágeno (20 ml/hL) como control positivo. Tanto las cervezas tratadas con colágeno como las tratadas con pectina pasaban con rapidez 2 ó 3 veces mayor a través del filtro comparadas con la cerveza sin tratar (control). La cerveza tratada con pectina era menos turbia después de la clarificación, comparada con la cerveza tratada con colágeno (datos no presentados), pero la filtrabilidad de la  
15 cerveza trata con pectina no era del todo equivalente a la cerveza tratada con colágeno. La Pectina residual puede reducir la filtrabilidad.

La filtrabilidad de las cervezas modelo (4% etanol, citrato 50 mM y 20 IBU) dosificadas con pectina, indica que la Pectina residual > 2 ppm reducirá apreciablemente la filtración a través de un filtro estándar de nailon 66 de 0,65 micrómetros. Estimaciones basadas en tales medidas, y basadas en filtrabilidad de estas cervezas modelo indican  
20 que en el caso arriba indicado la Pectina residual era < 2 ppm.

Se llevó a cabo una serie similar de tests con cerveza UHG (CPL) (Figura 14). Se dosificó LM101 a 50 ppm y citrato y SO<sub>2</sub> hasta 9 y 6 mm, respectivamente. Los resultados de filtración demuestran que la eficiencia de filtración era mayor en la cerveza tratada con pectina comparada con la cerveza tratada con colágeno y con el control sin adición  
25 alguna, lo cual es coherente con los tests de decantación que demostraban que la tasa de clarificación y el volumen de decantación eran más rápidos y más sólidos que en el caso de la cerveza tratada con colágeno.

CPL es una cerveza de densidad ultra-alta a la que se ha añadido lúpulo de caldera. Una corriente de cerveza equivalente que no recibió lúpulo de caldera se filtraba menos fácilmente después del mismo tratamiento de clarificación. Una vez más, esto indica que los agentes de amargor pueden ser contribuyentes a la diferencia. La Pectina residual estimada que quedaba en la cerveza se reduce en las cervezas tratadas con lúpulo de caldera, comparadas con CPL. Las isohumulonas reaccionan con Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> para formar sales insolubles. Una explicación del fenómeno del lúpulo de caldera es que el mismo causa una reducción en los niveles de cationes que conduce a una condición menos favorable para la gelificación y una reducción en la Pectina residual.  
30

35 Ejemplo 13 - La importancia del peso molecular de la Pectina sobre su efecto clarificador

La pectinasa tiene como diana la cadena principal del ácido galacturónico, y puede producir una población de moléculas de pectina de peso molecular reducido comparadas con el sustrato original. Se añadió Pectina tratada o  
40 sin tratar (1% p/p) a cerveza LAGER fresca (de alta densidad) (14° P del mosto original) hasta 100 ppm. Las unidades de pectinasa añadidas a 1 ml de la solución de dosificación de pectina se muestran entre paréntesis en la Tabla 21. Los resultados de los tests de decantación representados en la Tabla 21 son típicos de varias pruebas. Ninguna de las pectinas tratadas con pectinasa demostraba efecto de clarificación alguno comparada con la Pectina HM121 original. La actividad de pectinasa en la cerveza afectará a la eficiencia de los agentes clarificadores  
45 basados en Pectina.

**Tabla 21**

Pectina	Turbidez (EBC)			
	0h	24h	48h	72h
Control	59,8	59,4	54,7	52,2
HM121	59,8	18,6	8,9	6,9
HM121 (2U)	59,6	61,1	60,8	56,7
HM121 (5U)	59,5	60,2	57,3	54,8
HM121 (10U)	59,8	59,7	57,9	54,6
HM121 (20U)	59,2	59,1	58,9	56,4
HM121 (50U)	59,5	62,5	60,9	58,4

Ejemplo 14 - Efecto sobre la eficiencia de los clarificadores de la utilización de una solución de dosificación de pectina al 5% que contiene citrato y sulfito

5 Una concentración elevada de pectina en la solución de dosificación de los clarificadores minimiza el volumen de clarificadores añadidos a la cerveza de paso, que se puede adaptar más fácilmente a los requisitos modernos de procesamiento. De aquí se deduce la deseabilidad de una concentración alta de pectina en el material dosificador.

10 Se añadió Pectina (LM101) a LAGER hasta alcanzar una concentración final de 75 ppm, y una concentración de citrato de 13 ppm final y un nivel de SO<sub>2</sub> de 8 ppm. La concentración de pectina en la solución de dosificación era 5%. Los resultados se muestran en la Figura 15. La mejora de la clarificación era prácticamente la misma que la conseguida con una solución de dosificación de pectina de 1% (compárense las Figuras 4 y 15). El volumen de sedimento era < 1% para las pectinas dentro del intervalo de DE 40-50%, que es similar al resultado alcanzado con la solución stock de pectina al 1% (Figura 8). De hecho, las pectinas dentro del intervalo de DE 35-50% tienen volúmenes de decantación menores que 1,5 del volumen total de cerveza tratada.

15 Tomado en su conjunto, el suministro de clarificadores de pectina LM101 a partir de una solución stock al 5% en oposición a una solución stock al 1%, conducía a la ausencia de efectos desfavorables en la eficiencia de los clarificadores cuando se testó con cerveza de alta densidad. La Pectina concentrada es más conveniente para el producto a transportar, así como para los usuarios finales. Una concentración mayor de pectina, en exceso de 7% tiende a separarse a lo largo del tiempo, y parece producirse una reducción en la actividad de los clarificadores. Existe una mayor probabilidad de que este concentrado se separe en lugar de dispersarse uniformemente en la cerveza. Una temperatura más elevada aumenta la solubilidad de la Pectina y reduce la viscosidad, aunque con probabilidad incrementada de desactivación de la pectina.

Ejemplo 15 - Prueba en planta: Prueba de clarificadores basados en Pectina-LM101 con una cerveza de alta densidad

30 Se llevó a cabo una prueba en fábrica de cerveza con un clarificador basado en Pectina (pectina de CP Kelco, LM101) en una cerveza de alta densidad (densidad original 14° P). El clarificador de pectina se comparó con un clarificador basado en colágeno bovino.

Protocolo

35 Se preparó un Pallekon de la solución de clarificadores (nominalmente 5%) y se transportó al sitio de fabricación de la cerveza. El Pallekon estaba localizado en el stand de dosificación de los clarificadores, y la salida estaba conectada directamente a la entrada de la bomba de dosificación.

40 La prueba se realizó en condiciones normales de la planta. La toma de muestras y las evaluaciones de calidad se adicional llevaron a cabo para cumplir los objetivos de la prueba.

El fermentador identificado se hizo pasar a través de las centrífugas y los clarificadores se dosificaron después del tanque de tampón post-separador y después del cambiador de calor post-separador.

45 La cerveza se transfirió a vasijas de almacenamiento (SV). Después de un tiempo de almacenamiento apropiado (típicamente 2 días) y después que se hubieron completado satisfactoriamente las evaluaciones de calidad pertinentes, se ajustó la cerveza para cumplir los parámetros del producto acabado, se filtró, se ajustó a la densidad de venta y se desplazó a un Tanque de Cerveza Brillante (BBT).

50 Se completaron las evaluaciones finales de calidad y se envió la cerveza al envasado.

Composición de la Solución de pectina

Se recibió un lote de 75 kg (3 bolsas) de pectina LM101 de CP Kelco (número de lote S42251).

55 La Pectina LM101 utilizada para las pruebas en planta contenía 62% p/p de pectina (a la que se hace referencia como Pectina activa en lo sucesivo) y el resto era azúcar. El nivel del azúcar añadido se detectó utilizando HPLC. Adicionalmente, el nivel de pectina se determinó por un método gravimétrico después de la separación de los azúcares por extracción con solución acuoso-etanólica.

Preparación de la Solución de Clarificadores

La central de clarificadores era como sigue:

Pectina estandarizada LM101 (BN: S42251)	5,5%
Citrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ -anhidro)	1,5%
Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ -anhidro)	0,5%
Metabisulfito de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	1,0%

Para un depósito de 1000 L, se requirieron las cantidades siguientes:

Pectina LM101 estandarizada	55 kg
Citrato de sodio	15 kg
Ácido cítrico	5 kg
Metabisulfito de potasio	10 kg
Agua desionizada	950 L

5

La Pectina se suspendió en 950 L de agua desionizada a la temperatura ambiente (22°C). Un homogeneizador estándar de grado alimentario proporcionaba agitación. La Pectina se añadió lentamente (a lo largo de 60 min) con agitación continua. El pH se ajustó en caso requerido con citrato o ácido cítrico. Se añadió finalmente el sulfito y el pH se comprobó de nuevo y se ajustó en caso requerido a 4,5-4,9. La solución se transfirió a un recipiente Pallekon de 1000 L para el transporte al sitio de fabricación de la cerveza. El nivel de pectina activa en esta solución era 3,3%, p/p. El pH y la viscosidad de la solución de dosificación de pectina preparada eran 4,8 y aproximadamente 500-740 mPa.s.

10

#### 15 Proceso de Prueba en Planta

La prueba se llevó a cabo con cerveza de alta densidad de Densidad Original (OG) 14° P procedente de un fermentador de 4000 hL (1 hL = 100 l) dividido en dos partes iguales para prueba y control. La prueba era una cerveza dosificada con clarificadores basados en LM101 a una tasa de dosificación de 4,94 mg/hL de pectina activa. El control estaba constituido por los clarificadores basados en colágeno (lote DFS007/05) dosificados a 200 mg/l de suspensión que contenía nominalmente 2% p/p. El material colágeno se suministró como una suspensión en Pallekons que se almacenaron a la temperatura ambiente normal, 10-18°C. Esta es la variación de temperatura diaria usual de invierno para un invierno en Melbourne.

20

Después de la fermentación,0 y vuelta a enfriar a 4°C, la cerveza se transfirió a dos separadores que operaban a una tasa combinada de 600 hL/h. la solución de clarificadores de pectina se añadió después de los separadores utilizando un punto de ajuste de 150 g/hL. Esto equivale a 4,94 g Pectina activa/hL de cerveza). Se trató primeramente la cerveza de prueba (clarificadores de pectina) seguida por la cerveza de control tratada con colágeno. Las vasijas de almacenamiento utilizadas para retención de la cerveza tratada eran tanques horizontales de 250 hL. La levadura no se dosificó de nuevo en las centrifugas, y no se hizo adición alguna de cerveza de recuperación. La cerveza de prueba se pasó en 3 h y 20 min. La temperatura de la cerveza en almacenamiento era 0°C.

30

El volumen combinado de los tanques de prueba era 1920 hL y se utilizaron aproximadamente 300 L de la solución de clarificadores. Esto equivale muy aproximadamente a la tasa de dosificación diana.

35

#### Evaluación del tanque de almacenamiento

Los datos analíticos de la planta se resumen en la Tabla 22 siguiente, que muestra datos analíticos para cerveza clarificada con pectina, y cerveza clarificada con colágeno, tomadas de los tanques de almacenamiento (dos tanques para cada cerveza). Se tomaron muestras después del llenado de los tanques. Los datos muestran la ausencia de diferencia significativa en el detalle analítico para las cervezas clarificadas con pectina frente a las cervezas clarificadas con colágeno durante el almacenamiento. El personal de la fábrica de cerveza juzgó cualitativamente la solidez de los fondos de los tanques como 'sólidos', no harinosos.

40

45

Tabla 22

		Control	Control	Prueba	Prueba
Número de Muestra		96902	96950	96590	96717
Fecha de toma de muestra		2/08/2005 16:38	2/08/2005 18:14	2/08/2005 10:59	2/08/2005 12:59
Localización de toma de muestra		ST_N16	ST_N17	ST_N13	ST_N14
Sabor del producto		PASA	PASA	PASA	PASA
Alcohol	% v/v	6,35	6,32	6,32	6,38
Densidad relativa (20/20)		1,00819	1,0083	1,00803	1,00821
Densidad actual	°P	2,1	2,13	2,06	2,11
Densidad original	°P	14	13,9	13,9	14
Color	Unidades EBC	11,5	11,3	10,7	10,9
pH		4,02	4,02	4,04	4,03
SO <sub>2</sub> total	mg/L	11	11	17	17
Oxígeno	mg/L	0,09	0,1	0,19	0,19

#### Filtración

5 La filtración se llevó a cabo en un filtro Filtrix Candle. Se utilizó un filtro recién preparado, haciendo pasar primeramente el control, seguido por la prueba. El adyuvante de filtración utilizado para el pre-recubrimiento era Dicalite Speedplus (agua dulce) y el adyuvante de filtración utilizado como la alimentación de cuerpo era Celite Standard Supercel (marina).

10 En las Figuras 16 y 17, los cambios en volumen de lodo, tasa de flujo del polvo adyuvante de filtración, presión de entrada del filtro, tasa de flujo del filtro (Fig. 17) y turbidez de entrada, así como opalinidad de descarga (Fig. 16) se registran a lo largo de la duración de la operación.

15 La cerveza de prueba cumplía los estándares de calidad con opalinidad del filtro dentro de especificación.

De acuerdo con los operadores de la sala de filtros en la fábrica de cerveza de Abbotsford, la cerveza dosificada con pectina se comportaba dentro de las expectativas para cervezas similares.

20 La cerveza de prueba utilizó de hecho más polvo adyuvante de filtración y se registraba un mayor aumento en la presión diferencial del filtro con el tiempo de filtración.

La tasa de aumento en la presión era 32 kPa/h para el control, y 68 kPa/h para la prueba. La tasa de dosificación media de polvo era 22 g/hL y 40 g/hL para el control y la prueba, respectivamente.

25 El consumo de polvo y la tasa de aumento de presión pueden variar debido a variabilidad en la calidad de la cerveza de una fermentación a otra; esto puede modificarse. Por ejemplo, incluso tiempos de decantación ligeramente mayores (3 días) reducen significativamente tanto la tasa de aumento de presión como el consumo de polvo, de tal modo que las cervezas clarificadas con colágeno y clarificadas con pectina se aproximan a valores comparables (véase como referencia el Ejemplo 9).

#### Evaluación de la cerveza brillante

35 Después de la filtración, la cerveza de control y la de prueba se analizaron como se resume en la Tabla 23 siguiente, que presenta descriptores de fabricación de cerveza para las muestras del tanque de cerveza brillante recuperadas para cerveza clarificada con pectina y la cerveza clarificada con colágeno.

40 Los datos para la cerveza clarificada con pectina y la cerveza clarificada con colágeno son muy similares. Ambas se evaluaron positivamente como 'limpias, de calidad disolvente, cremosa y afrutada'. La opalinidad en proceso era 33 FTU ASBC comparada con 22 FTU ASBC para la cerveza de prueba. Ambas están plenamente dentro del nivel diana de 50 FTU ASBC y la especificación de 60 FTU ASBC. (FTU significa unidades de turbidez de formazina).

**Tabla 23**

		Control	Prueba
Número de Muestra		98274	98375
Fecha de toma de muestra		4/08/2005 9:41	4/08/2005 11:04
Localización de toma de muestra		BB_L12	BB_L11
Sabor del producto		PASA	Pasa
Comentario		FIG CONTROL limpia; calidad disolvente; cremosa; afrutada	FIG PRUEBA limpia; calidad disolvente; cremosa; afrutada
Alcohol	% v/v	4,87	4,87
Densidad relativa (20/20)		1,00626	1,00617
Densidad actual	°P	1,61	1,58
Densidad original	°P	10,9	10,9
Amargor (Abs x 70)	Mg/L	24,2	25,3
Color	Unidades EBC	9,1	9,1
pH		4,16	4,16
Dióxido de carbono	% p/v	0,52	0,54
Oxígeno	Mg/L	0,2	0,16
Opalinidad en Proceso	FTU ASBC	33	22

5 Distribución del Tamaño de Partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó utilizando un Coulter Multisizer III con un tubo de 70 micrómetros, que contaba entre 2 y 42 micrómetros, y utilizando electrólito Isoton II (Fig. 18).

- 10 Se tomaron 3 muestras de cada tipo de cerveza a lo largo de un periodo de 3 horas. La cerveza clarificada con pectina tenía inicialmente un recuento de partículas menor y éste disminuía progresivamente a lo largo del periodo de muestreo. La cerveza clarificada con colágeno tenía un recuento de partículas mayor durante el tiempo equivalente en almacenamiento y éste disminuía también progresivamente, pero no de modo tan evidente a lo largo del periodo de tiempo.

15 Evaluación de la Filtrabilidad en Laboratorio

20 Muestras de cerveza de control y de prueba procedentes de las vasijas de almacenamiento se testaron utilizando el dispositivo de filtrabilidad descrito en la Figura 2. Los resultados aparecen en la Tabla 24, que muestra la estimación en laboratorio de la filtrabilidad de las cervezas de planta; cerveza clarificada con pectina LM101, cerveza clarificada con colágeno y una cerveza no clarificada para comparación. En la Tabla 24, se comparan la filtrabilidad y la opalinidad antes del filtro en una cerveza (sin clarificación alguna), el control tratado con colágeno y la cerveza de prueba tratada con Pectina. Los valores de opalinidad se obtuvieron con un equipo HACH 2100 AN utilizando modo de ratio.

25

**Tabla 24**

Tratamiento con clarificadores	Clarificadores de pectina LM101	Clarificadores de Colágeno	Sin clarificadores
Filtrabilidad s/2	17,3	12,4	26,6
Opalinidad antes del filtro. Unidades EBC	7,47	8,67	28

La filtrabilidad de la cerveza tratada con colágeno era mejor en este test que la de la cerveza de prueba. Esto está en línea con las expectativas, y es compatible con los datos de la prueba en planta (Figuras 16 y 17). La opalinidad en la cerveza clarificada con pectina era menor que la de la cerveza tratada con colágeno (véanse los datos de opalinidad en la Tabla 24 para las cervezas filtradas en laboratorio). La filtrabilidad reducida de la cerveza de pectina comparada con la cerveza clarificada con colágeno en esta prueba puede estar causada por residuos de pectina en la cerveza como se propone en el Ejemplo 11. Esto puede mejorarse con la adición de extracto de lúpulo, por aumento del tiempo de almacenamiento y por evitación de la sobredosificación de la solución de pectina.

10 Niveles de opalinidad y dióxido de azufre en la planta

Los niveles de dióxido de azufre y opalinidad se monitorizaron durante la prueba. La Tabla 25 presenta los datos para los niveles de dióxido de azufre y opalinidad en la cerveza de almacenamiento clarificada con pectina presentada al punto de dosificación de clarificadores de las centrifugas antes de la dosificación de los clarificadores. Había poca diferencia en la cerveza que se presentaba al punto de dosificación de clarificadores, con un ligero aumento en la opalinidad hacia el final de la operación.

**Tabla 25**

Tiempo(min)	SO <sub>2</sub> total (mg/L)	Opalinidad antes de dosificación (EBC, HACH 2100AN, modo ratio))
Comienzo	11	32
64	12	29,6
110	11	29,6
239	11	34,1
354	12	34,8

20 Se monitorizó también la turbidez del producto emergente del filtro. Los datos se tabulan a continuación (Tabla 26, que muestra la turbidez a la entrada y la salida de la cerveza clarificada con colágeno y la cerveza clarificada con Pectina). La cerveza clarificada con pectina es consistentemente más baja en turbidez que la cerveza clarificada con colágeno.

25

**Tabla 26**

Filtración (min)	Turbidez de entrada (EBC)	Turbidez de salida (EBC)
Operación de control con colágeno		
Comienzo	16,7	0,57
5	15,2	0,75
110	14,1	0,77
Operación de prueba con pectina		
Comienzo	11,5	0,6
69	8,5	0,50
119	7,9	0,60

Los datos indican que la cerveza procedente de filtración para la prueba era más limpia que el control. Esto está conforme a el medidor de opalinidad en línea y los datos de opalinidad en proceso y datos de distribución del tamaño de partícula.

30

El perfil de opalinidad para las cervezas de prueba y de control en diversas etapas después que las cervezas habían pasado a través del separador se muestran en la Figura 19.

35

El perfil de opalinidad durante el proceso está en línea con las expectativas. El clarificador de pectina clarifica más rápidamente que el clarificador de colágeno, y la clarificación es prácticamente completa al cabo de 24 horas. El clarificador de colágeno requiere 48 horas para conseguir un resultado de opalinidad similar.

- Análogamente, se midió el perfil de dióxido de azufre durante la prueba y se tabula en la Figura 20. El clarificador de prueba contiene un nivel significativo de dióxido de azufre y era de esperar un aumento en el nivel de dióxido de azufre durante el almacenamiento. El nivel de dióxido de azufre aumentaba desde 11,3 mg/l a 16,8 mg/l, comparado con el control que no exhibía cambio alguno desde inmediatamente después de los separadores. En cambio, la cerveza brillante, con indiferencia del tratamiento de clarificación, exhibía el mismo nivel de dióxido de azufre. Algo de dióxido de azufre, natural o añadido, puede eliminarse de la cerveza con el sedimento en el tanque de almacenamiento por reacción con las proteínas por sulfitólisis para producir derivados sulfónicos.
- 5
- 10 En Australia, las adiciones que exceden de 10 ppm de dióxido de azufre requieren etiquetado preceptivo aun cuando el nivel máximo en la cerveza está restringido a 25 ppm. Si la presente formulación de clarificadores de pectina se clasificara como adyuvante de proceso, esto no sería aplicable. Un adyuvante de proceso proporciona un proceso de producción tecnológica y no se arrastra al producto final. Si no se aplica el mismo, la flexibilidad para añadir dióxido de azufre a la cerveza será restringida. Si esto es inaceptable el nivel de dióxido de azufre en la solución de clarificadores puede reducirse en caso necesario. Puede existir una disminución concomitante en la eficiencia, pero esto dependerá del tipo de cerveza.
- 15

#### Cerveza envasada

- 20 La cerveza se envasó en botes de 375 ml. La cerveza fue analizada respecto a carácter de etiqueta y cualidades sensoriales por un panel de catadores expertos.

- A continuación se exponen las notas de sabor del panel de expertos: Botes de *prueba* (clarificados con Pectina): ccrea, cremosa, bien equilibrada, ligeramente seca, 7 (basada en un sistema de 8 puntos 1-8 en el cual 8 es un ejemplo excepcional y 1 es inaceptable). Botes de *control* (clarificados con colágeno): ligeramente sucia, ligeramente fina, cremosa, ligeramente sulfurosa, amarga, 6. No se identificó problema adverso alguno por los paneles de sabor expertos en ninguna de las cervezas.
- 25

- 30 Los análisis del producto acabado eran comparables como se indica en la Tabla 27, que muestra el análisis de botes de cerveza clarificada con pectina (Prueba) y botes de cerveza clarificada con colágeno (Control).

**Tabla 27**

Comentario		FIG Prueba 1 (Botes) PRUEBA (S11)	FIG Prueba 1 (Botes) Control (S12)
Número de muestra		100049	100051
Fecha de toma de muestra		8/08/2005 16:46	8/08/2005 16:46
Etapas de proceso		FINAL	FINAL
Tipo de paquete		375C	375C
Alcohol	% v/v	4,91	4,92
Opalinidad en frío Inicial	FTU ASBC	35	40
Dióxido de carbono	% p/v	0,533	0,517
Color	Unidades EBC	9,3	9,3
Diacetilo	mg/L	0,02	0,01
Pentanodiona	mg/L	0,01	0,01
Dicetonas vecinales totales	mg/L	0,03	0,02
Estabilidad de la espuma - Nibem	s	235	238
Calcio	mg/L	31	31
Cobre	mg/L	0,03	0,03
Hierro	mg/L	0,04	0,03
Magnesio	mg/L	58	58
Potasio	mg/L	364	365

ES 2 507 840 T3

Comentario		FIG Prueba 1 (Botes) PRUEBA (S11)	FIG Prueba 1 (Botes) Control (S12)
Sodio	mg/L	73	70
Cloruro	mg/L	211	213
Sulfato	mg/L	175	177
Amargor (Abs x 70)	mg/L	24,4	23,9
Densidad original	op	10,9	10,9
Densidad actual	op	1,59	1,59
pH		4,11	4,11
Comentario		algo de PM pequeño presente	algo de PM pequeño presente
Partículas		PASA	PASA
Materia inicial			
Extracto Real	°P	3,41	3,41
Densidad relativa (20/20)		1,00621	1,00618
Sulfuro de dimetilo libre	µg/L	12	11
Sulfuro de hidrógeno	µg/L	2	3
Metanotiol	µg/L	1	1
Acetato de etilo	mg/L	20,4	18,2
Hexonato de etilo	mg/L	0,2	0,2
Octonato de etilo	mg/L	0,56	0,51
Acetato de isoamilo	mg/L	2,13	2,08
Acetato de feniletilo	mg/L	0,93	0,77
Ésteres Totales	mg/L	24,2	21,8
Alcohol isoamílico	mg/L	75,8	73,4
Iso-Butanol	mg/L	16,6	16,1
n-Propanol	mg/L	13,3	12,5
Alcohol feniletílico	mg/L	40,2	34,2
Alcoholes Totales	mg/L	145,9	136,2
Ratio Alcohol/Éster		6,03	6,25
Dióxido de azufre total	mg/L	13	12

No hay cambio significativo alguno en ninguno de los análisis.

5 Estabilidad del sabor

La medida de la formación de radicales hidroxilo basada en Resonancia de Espín Electrónico (PBN como el agente de captura de radicales libres) demostró que la cerveza tratada con pectina exhibía un tiempo de retardo más largo que la cerveza de control, tratada con colágeno (Tabla 28). Esta diferencia se mantenía después de 14 y 28 días de almacenamiento de los botes a una temperatura de 30°C. El tiempo de retardo calculado a partir de los datos ESR se cree que está relacionado con el potencial antioxidante de la cerveza. Cuanto mayor es el tiempo de retardo, al que se hace referencia como  $E_a$ , tanto mayor es el potencial antioxidante de la cerveza. En tal caso, la cerveza tratada con pectina muestra un potencial antioxidante mayor que el control.

15

**Tabla 28**

Muestra	Días Después de envasado a 30°C	Tiempo de retardo ESR (min)	SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	Furfural (microgramos/L)
Prueba - Cerveza con clarificadores de pectina	0	112	15	-
	14	85	10	24
	28	90	11	46
Control - Cerveza con clarificadores de colágeno	0	80	18	-
	14	70	9	38
	28	79	10	79

5 El aumento en nivel de furfural puede adscribirse a que la cerveza de prueba es capaz de manipular la fatiga térmica mejor que el control.

Protocolo de Evaluación del Sabor Envejecido

10 La evaluación del sabor envejecido se llevó a cabo por un grupo de catadores experimentados:

Se presentaron 3 cervezas:

- cerveza de prueba después de almacenamiento en una sala caliente a 30°C durante 2 semanas
- 15 • cerveza de control almacenada en las mismas condiciones
- una cerveza "fresca" - tomada de la producción fresca en Abbotsford.

20 Se pidió a los panelistas que evaluaran diversos parámetros envejecidos, basados en la Rueda de Estabilidad de Sabor tal como fue proyectada por el Subgrupo Sensorial EBC. Se utilizó una escala 0-5 donde 0 indicaba no detectado y 5 significaba intenso. Se pidió luego a los panelistas evaluar (escala 1-5 con 1 = no envejecido, y 5 = muy envejecido) y clasificar las cervezas en una escala de envejecimiento (1 = envejecida mínimamente, 3 = envejecida al máximo). Se pidieron a los panelistas cualesquiera comentarios acerca del sabor. Se llevaron a cabo análisis estadísticos estándar para identificar diferencias significativas.

25 Evaluación del test de clasificación del sabor

30 Se realizó la evaluación del test de clasificación del sabor como se aplica usualmente en la industria. Los datos se muestran en la Tabla siguiente (Tabla 29 - datos de evaluación del Test de Clasificación del Sabor (Nota 1 = envejecimiento mínimo, 3 = envejecimiento máximo)). Los datos se analizaron en términos de bloques de criterio.

**Tabla 29**

Catador	Pectina LM101 (2 semanas 30°C) bote de cerveza	Colágeno (2 semanas 30°C) bote de cerveza	Bote de cerveza fresca
1	1	3	2
2	3	2	1
3	2	3	1
4	2	3	1
5	1	3	2
6	1	2	3
Sumas de rango	10	16	10
Promedio	1,67	2,67	1,67

El análisis de los datos del Test de Clasificación del Sabor se muestra en la Tabla 30 - Evaluación del Test de Clasificación del Sabor (escala 1-5 con 1 = no envejecida, 5 = muy envejecida). La conclusión es que no existe diferencia o preferencia significativa alguna entre las 3 muestras de cerveza.

5

**Tabla 30**

Bloque de criterio	Alfa (5%)	Alfa (1%)	F (Test de Friedman)
	5,99	9,21	4

Evaluación del test de tasa de sabores

10

Se analizaron datos de test de sabor en cuanto a preferencia. Los resultados se resumen en las Tablas 31 y 32 siguientes.

**Tabla 31**

Catador	Pectina LM101 (2 semanas 30°C) cerveza (A)	Colágeno (2 semanas 30°C) cerveza (B)	Cerveza fresca(C)
1	1	2	1
2	2	3	1
3	2	3	1
4	2	3	1
5	1	2	1
6	1	3	4
Suma	9	16	9

15

El análisis de los datos se resume a continuación (Tabla 32).

**Tabla 32**

	A-B	B-C	A-C
1	-1	1	0
2	-1	2	1
3	-1	2	1
4	-1	2	1
5	-1	1	0
6	-2	-1	-3
Suma	-7	7	0
Promedio	-1,17	1,17	0,00
Desv. Estándar, s	0,408	1,169	1,549
Estadística de Student	-7,00	2,44	0,00
%	0,046%	2,916%	50,000%

20

El análisis indica que el panel de expertos considera el producto de prueba similar a la cerveza fresca y más fresco que el control. La cerveza de control se consideró como más envejecida que la cerveza fresca.

Las calificaciones de sabor del panel de experto se han resumido en el gráfico de telaraña que se adjunta (Figura 21), junto con los comentarios de sabor no forzados (Tabla 33 - Descriptores del panel de sabor para las cervezas clarificada con colágeno y clarificada con pectina y una muestra fresca de cerveza para referencia).

5

**Tabla 33**

MUESTRA	Pectina LM101 (2 semanas 30C)	Colágeno (2 semanas, 30C)	Muestra Fresca
Panelista			
1	Todas similares - ninguna envejecida particularmente		
2	Floja	Sulfurosa floja	Fresca
3	Aroma ligeramente cocido, olfato de ésteres más bien bajo	Paladar de ésteres más bien bajo y más suave (diacetilo), ligeramente dulce	Grasa en olfato y paladar, amargor limpio, ligeramente resinosa
4	Ligeramente áspera y astringente, ligeramente floja y envejecida	Ligeramente áspera y astringente, ligeramente oxidada + seca/resinosa, ligeramente dulce	muy ligeramente envejecida, muy ligeramente astringente
5	Aroma envejecido inapreciable, sabor envejecido inapreciable	Olfato ligero de azúcar de cebada, pero sin aroma envejecido obvio. Sabor ligeramente envejecido, pero apenas apreciable	Aroma envejecido inapreciable
6	Granulada, fuerte-pulverulenta, pajiza	Parecida a papel, cartón, galletas, pasta, corteza de pan, pan	Correosa, parecida a pape

Tomados en su conjunto, los resultados muestran una tendencia en el sentido de que la cerveza de prueba (Pectina) se envejece mejor que el control de colágeno.

10

Los resultados ESR (tiempo de retardo) son una medida de la estabilidad del sabor, y muestran una tendencia similar, teniendo la cerveza de prueba un valor superior. Así pues, esta prueba indica que los clarificadores basados en Pectina pueden clarificar la cerveza de alta densidad después de tiempos de almacenamiento relativamente cortos. La filtración de la cerveza clarificada con pectina está dentro de los límites de una práctica aceptable y puede optimizarse para eficiencia práctica óptima. Los botes envasados de cerveza clarificada con pectina no exhiben defecto sensorial alguno comparados con la cerveza clarificada con colágeno en la prueba. Las cervezas clarificadas con pectina parecen envejecer mejor que la cerveza clarificada con colágeno utilizada en esta prueba.

15

Ejemplo 16 - Prueba en planta: Prueba de clarificadores basados en Pectina-LM101 con una cerveza de alta densidad

20

Se llevó a cabo una prueba en una fábrica de cerveza con clarificadores basados en Pectina CP Kelco (LM101) con una cerveza de alta densidad (OG 14° P). Un total de 4000 hectólitros de cerveza se dosificó con clarificadores de pectina LM101 en las mismas condiciones de dosificación que en el Ejemplo 15. Un segundo fermentador de la misma cerveza actuó como la cerveza de control, que se dosificó con clarificadores de colágeno. Los detalles de la prueba eran los mismos que los reseñados en el Ejemplo 15.

25

Evaluación de Filtración

30

Los datos de filtración de la cerveza tratada con pectina se muestran en la Figura 22 para la cerveza clarificada con pectina LM101. El control se filtró en dos partes, representándose los datos para la segunda parte de la cerveza de control (clarificada con colágeno) en la Figura 23. La tasa de dosificación del polvo adyuvante de filtración se controló por medio de un controlador de lógica difusa (Autodose), con tasa de aumento de presión y turbidez como entradas principales. La tasa de aumento de presión para la prueba era 46 kPa/h con una tasa de dosificación de polvo de 24 g/hL.

35

Para la segunda parte del control, la tasa promedio de aumento de presión era 36 kPa/h con una tasa de dosificación de polvo de 32 g/hL.

40

Evaluación del tanque de cerveza brillante

La cerveza de prueba estaba contenida en 3 tanques. Las notas sensoriales del panel de sabor de cerveceros expertos fueron como sigue:

Tanque 1	grasa, amarga, plena
Tanque 2	cérea, afrutada, tipo disolvente, ligera nota mantecosa y con sabor residual
Tanque 3	cérea, afrutada, amarga

5

Los comentarios para productos similares por entonces eran: cérea, dulce, de cualidad disolvente, ligera astringencia, ligeramente seca, afrutada, granular, pulverulenta, con contenido bajo de azufre, plena, acaramelada. El grupo sensorial nacional evaluó también muestras de los 3 tanques de prueba el día de la entrega. Sus comentarios fueron como sigue:

Tanque 1	limpia, ligeramente grasa, carácter de buena cerveza
Tanque 2	ligeramente afrutada, por lo demás muy similar
Tanque 3	limpia, afrutada.. Grasa, Ligeramente pulverulenta

10

El panel de sensores evaluó la cerveza de prueba como aceptable para el tipo de etiqueta.

Perfiles de opalinidad y dióxido de azufre de la cerveza en proceso

15 Antes de la adición de los clarificadores, la cerveza de alimentación para la adición de pectina tiene un nivel de dióxido de azufre de 11 mg/hL con una opalinidad de 35 unidades EBC. Después de la dosificación de los clarificadores basados en Pectina LM101, la opalinidad descendió a 11 EBC al cabo de aproximadamente 24 horas. Las lecturas de opalinidad después del filtro en la cerveza de alimentación y la clarificada con pectina LM101 de salida se muestran en la Tabla 34.

20

**Tabla 34**

Tiempo, min	Opalinidad de entrada (EBC)	Opalinidad de salida (EBC)	Vol pasado hL
Comienzo	12,5	0,75	300
70	14,1	0,51	1000
155	13,7	0,51	2000
255	14,3	0,48	3000
380	14,4	0,49	4000

25 El perfil de opalinidad a lo largo del proceso hasta después del filtro, se muestra en la Figura 24. Al cabo de 24 horas de almacenamiento, la turbidez se había estabilizado. Había un ligero aumento en opalinidad inmediatamente antes del filtro debido probablemente a transferencias. La opalinidad después del filtro era muy baja (0,5 EBC), y los niveles de dióxido de azufre en la alimentación antes de la dosificación eran 11 mg/l. Después de la adición de la solución de clarificadores de pectina, el nivel alcanzó 15 mg/l, y descendió luego a 13 mg/l en el producto acabado (Figura 25).

30

Cerveza envasada

La cerveza se envasó en botes de 375 ml. La cerveza se analizó respecto a analitos del carácter de etiqueta (Tabla 35) y calidad sensorial por un panel de catadores expertos.

35

**Tabla 35**

ES 2 507 840 T3

		PRUEBA (Botes)	Control (Botes)
Número de muestra		108184	108820
Fecha de toma de muestra		23/08/2005 16:46	23/08/2005 16:46
Etapas de proceso		FINAL	FINAL
Tipo de paquete		375C	375C
Alcohol	% v/v	4,9	4,96
Opalinidad en frío Inicial	FTU ASBC	45	50
Opalinidad en frío - Forzada	FTU ASBC	120	125
Dióxido de carbono	% p/v	0,518	0,53
Color	Unidades EBC	9	9,2
Diacetilo	mg/L	0,03	0,01
Pentanodiona	mg/L	0,02	0,01
Dicetonas vecinales totales	mg/L	0,05	0,02
Estabilidad de la espuma-Nibem	s	233	233
Calcio	mg/L	34	30
Cobre	mg/L	0,04	0,03
Hierro	mg/L	0,04	0,03
Magnesio	mg/L	56	59
Potasio	mg/L	366	371
Sodio	mg/L	72	63
Cloruro	mg/L	209	208
Sulfato	mg/L	178	162
Amargor (Abs x 70)	mg/L	25,2	24,9
Densidad original	op	10,9	11,1
Densidad actual	ρ	1,6	1,72
pH		4,07	4,12
Comentario		algo de PM pequeño presente	algo de PM pequeño presente
Material particulado inicial		PASA	PASA
Extracto Real	°P	3,42	3,55
Densidad relativa (20/20)		1,00625	1,00669
Sulfuro de dimetilo libre	μg/L	14	14
H <sub>2</sub> S	μg/L	2	2
Metanotiol	μg/L	1	1
Hexonato de etilo	mg/L	0,22	0,21
Acetato de etilo	mg/L	20,1	18,2
Octonato de etilo	mg/L	0,39	0,53
Acetato de isoamilo	mg/L	2,5	2,22
Acetato de feniletilo	mg/L	1,21	0,96
Ésteres Totales	mg/L	24,4	22,1
Alcohol isoamílico	mg/L	87,3	68,9

Isobutanol	mg/L	20,9	18,4
n-Propanol	mg/L	15,2	12,6
Alcohol feniletílico	mg/L	43,9	44
Alcoholes Totales	mg/L	167,3	143,9
Ratio		6,86	6,51
Dióxido de azufre total	mg/L	13	11

5 Se llegó a la conclusión de que no había discrepancias significativas entre las cervezas de control y de prueba. Un panel de sensores expertos evaluó también las cervezas. La cerveza de prueba se calificó como grasa, ligeramente floja, suave, resinosa, y recibió una calificación de 6 utilizando la carta de referencia estándar a que se hace mención en el Ejemplo 15. La cerveza de control se calificó de resinosa, seca, ligeramente áspera y se calificó también como 6.

10 En suma, esta prueba, que trató dos veces el volumen utilizado en el Ejemplo 15, pero que utilizó una cerveza de fermentador separada como la prueba, confirmó los hallazgos del Ejemplo 15. Sin embargo, la cerveza tratada con pectina en esta prueba se filtraba mejor que en la anterior, y la eficiencia de filtración se aproximaba al estándar de muy alta eficiencia de la cerveza clarificada con colágeno. No se registró efecto sensorial adverso alguno, y una vez más la evaluación sensorial así como los tests predictivos ESR, y los tests sensoriales de la cerveza de almacenamiento indicaban que los clarificadores de pectina proporcionan cierta ventaja de estabilidad sensorial.

15 Ejemplo 17 - Prueba en planta: Prueba de clarificadores basados en Pectina LM101 con una cerveza de densidad ultra-alta

20 Proceso

Una cerveza de Densidad Ultra-Alta, nominalmente Densidad Original 18° P, se trató con clarificadores de pectina LM101, y con clarificadores de colágeno. Un fermentador de 200 hL sirvió tanto para el control (clarificadores de colágeno) como para la prueba (clarificadores de pectina). Las condiciones de la preparación y dosificación de los clarificadores se describieron en el Ejemplo 15. Los niveles de dosificación para los clarificadores de colágeno eran los mismos que los utilizados en el Ejemplo 15. Los clarificadores de pectina se dosificaron a 1,6 g Pectina activa/hL a la densidad del fermentador.

25 Evaluación del tanque de almacenamiento

30 Tanto la cerveza de prueba como la de control se mantuvieron cada una en dos vasijas de almacenamiento horizontales. Los datos analíticos para los tanques de almacenamiento se muestran en la Tabla 36. No había diferencia significativa alguna entre las dos cervezas.

**Tabla 36**

Comentario		Clarificada con colágeno	Clarificada con colágeno	Clarificada con pectina LM101	Clarificada con pectina LM101
Número de muestra		100917	100954	100540	100675
Fecha de toma de muestra		9/08/2005 16:29	9/08/2005 18:14	9/08/2005 10:32	9/08/2005 12:05
Localización de toma de muestra		ST_N14	ST_N17	ST_N26	ST_N27
Procedente de la localización 1		FVB03	FVB03	FVB08	FVB08
Alcohol	% v/v	6,51	6,5	6,41	6,49
Densidad relativa (20/20)		1,02316	1,02307	1,02273	1,02306
Densidad actual	°P	5,86	5,84	5,76	5,84

Comentario		Clarificada con colágeno	Clarificada con colágeno	Clarificada con pectina LM101	Clarificada con pectina LM101
Densidad original	°P	17,7	17,6	17,4	17,6
Amargor (Abs x 50)	BU	17,4	17,3	16,5	16,5
Color	Unidades EBC	25,4	25	26,4	26,8
pH		4,22	4,22	4,27	4,26
Dióxido de azufre total	mg/L	14	13	15	15
Oxígeno	mg/L	0,15	0,17	0,15	0,13
Sabor del producto		PASA	PASA	PASA	PASA

Los comentarios de sabor (descriptores sensoriales) para las muestras tomadas de los tanques de almacenamiento de las cervezas de prueba y de test se indican en la Tabla 37.

5 **Tabla 37**

	Comentarios de sabor
Clarificada con colágeno	Dulce, acaramelada, grasa
Clarificada con colágeno	Sulfurosa, acaramelada, grasa
Clarificada con LM101 Pectina LM101	Carece de dulzor, seca, "fenólica". Ligeramente sulfurosa, "muy seca"
Clarificada con LM101 Pectina LM101	Afrutada pasada, sin ésteres, descompensada, seca

10 Los panelistas sensoriales observaron diferencias entre las dos cervezas. Sin embargo, esto se adscribió a la variación en la calidad de los dos fermentadores seleccionados para el estudio, más bien que a diferencias debidas a los clarificadores. Las diferencias estaban en armonía con la variación previamente anotada entre los fermentadores en esta etapa del proceso. Las cervezas se consideraron como conformes con su tipo y se consideraron coherentes con el carácter de etiqueta.

15 La muestra de prueba se dosificó con una tercera parte de la tasa de pectina utilizada en el Ejemplo 15 (1,6 g/hL frente a 4,94 g/hL). El nivel de dióxido de azufre introducido era correspondientemente más bajo, con aproximadamente 1,3 mg/l (para la densidad de venta). La tasa de dosificación en la sala de filtros de la fuente de dióxido de azufre se ajustó para cumplir un requerimiento global de un nivel máximo de adición de 8 mg/l.

Filtrabilidad en Laboratorio

20 La filtrabilidad de las cervezas del tanque de almacenamiento se ensayó utilizando el equipo de laboratorio descrito en el Ejemplo 12. Los datos se presentan en la Tabla 38. La filtrabilidad de las dos cervezas es comparable. Esto es evidente en la Figura 26, que muestra la comparación gráfica para la filtrabilidad de estas cervezas.

**Tabla 38**

		Cerveza clarificada con pectina	Cerveza clarificada con colágeno
Filtrabilidad	(s/L <sup>2</sup> )	104,6	95,9
Opalinidad antes del filtro	EBC	47,9	67,8
Opalinidad después del filtro	EBC	1,95	2,05

25 Los Gráficos de Tendencia para las cervezas de prueba y de control se presentan en las Figuras 27 y 28, y se utilizaron para determinar el consumo de alimentación de cuerpo y la tasa de aumento de presión.

La filtrabilidad en planta se resume en la Tabla 39.

**Tabla 39**

	CONTROL (Colágeno)	PRUEBA (Pectina) - Control de autodosis)
Tasa de aumento de presión	102 kPa/h	43,3 kPa/hr
Tasa promedio de dosificación de polvo	46 g/hL	44 g/hL

5 Durante la filtración de prueba, se cambió el control de gestión del filtro. Hacia el final de la prueba, esto dio como resultado una reducción en la tasa de dosificación de polvo y un aumento correspondiente en la tasa de aumento de presión. No pudo recuperarse la lógica del control, y el filtro se eliminó a alta presión. Los datos de prueba en la Tabla 39 son los resultados correspondientes al periodo en que el filtro se mantuvo bajo el control de lógica difusa Autodose.

10 Durante esta fase de la prueba, para niveles de dosificación comparables del adyuvante de filtración, la tasa de aumento de presión para la prueba (Pectina) era significativamente menor que la correspondiente a la cerveza tratada con colágeno.

15 Evaluación del Tanque de Cerveza Brillante

Las dos cervezas se filtraron al cabo de 48 horas de almacenamiento como se describe en el Ejemplo 15.

20 El análisis de las muestras del tanque de cerveza brillante para la cerveza UHG clarificada con colágeno y la cerveza UHG clarificada con pectina LM101 como se muestra en la Tabla 40 indica que los datos analíticos para las dos cervezas recuperadas de los tanques de cerveza brillante son comparables.

**Tabla 40**

Comentario		Clarificada con colágeno	Sulfuro de hidrógeno
Número de muestra		101854	102091
Fecha de toma de muestra		10/08/2005 21:08	11/08/2005 8:38
Tipo de muestra		BRGT_GEN	BRGT_GEN
Localización de toma de muestra		BB_L06	BB_M04
Alcohol	% v/v	2,77	2,76
Densidad relativa (20/20)		1,00986	1,00976
Densidad actual	°P	2,52	2,5
Densidad original	°P	7,9	7,8
Amargor (Abs x 70)	Mg/L	23,7	23,9
Color	Unidades EBC	11	10,8
pH		4,32	4,34
Dióxido de carbono	% p/v	0,53	0,525
Oxígeno	Mg/L	0,2	0,15
Dióxido de azufre total	Mg/L	12	9
Opalinidad en proceso	FTU ASBC	37	37
Sabor del producto		PASA	PASA
Comentario		CONTROL calentita; recuer-	PRUEBA ligeramente sulfurosa; seca; tostada;

Comentario		Clarificada con colágeno	Sulfuro de hidrógeno
		da ligeramente el lúpulo	sabor de coco; recuerda sólo ligeramente el lúpulo

Perfil de Opalinidad y Dióxido de Azufre

5 La opalinidad en ambas cervezas de prueba y de control era similar, y ligeramente menor antes del filtro para la cerveza clarificada con Pectina. Los niveles de dióxido de azufre alcanzaron un máximo durante el almacenamiento, siendo aproximadamente 15 mg/l para la cerveza tratada con pectina frente a 13,5 mg/l para el control. En el producto acabado, los niveles de dióxido de azufre eran 12 mg/l para la cerveza de prueba de pectina y 14 mg/l para el control.

10 En el punto de filtración, los niveles de dióxido de azufre eran similares a los que se muestran en la Tabla 41 (niveles de dióxido de azufre en cerveza UHG clarificada con colágeno y la cerveza UHG clarificada con pectina LM101 después de la filtración).

15 **Tabla 41**

Etapas	Dióxido de azufre en la cerveza tratada con pectina, mg/L	Dióxido de azufre en la cerveza tratada con colágeno, mg/L
Muestra de la línea post-filtración		
Cantidad filtrada (hL)		
300	12	10
900	12	13
1800	13	13
BBT	9	12

Los datos de opalinidad en planta después de la dosificación de los clarificadores se resumen en las Figuras 29 y 30.

20 Comparación en Proceso - Sabor y Compuestos Iónicos

Un panel de sabor de cerveceros expertos (National) evaluó muestras de los tanques de cerveza brillante. Los comentarios del panel de sabores fueron como sigue:

Cerveza de prueba (clarificada con pectina LM101)	Ausencia de lúpulo olfato, algo más en el paladar, clara, evaluación de compuestos iónicos 5 (calificación descrita en el Ejemplo 15)
Cerveza de control (clarificada con colágeno)	Menos lúpulo por olfato, más en paladar, plástica floral, calificación 5

25 Las muestras de las cervezas de prueba y de test fueron evaluadas por el panel de expertos sensoriales en un segundo día y los comentarios fueron como sigue:

Cerveza de prueba (clarificada con pectina LM101)	ligeramente dulce, ésteres satisfactorios, acabado ligeramente plástico, ligero aroma de lúpulo, paleta de lúpulo, acabado seco - calificación 6.
Cerveza de control (clarificada con colágeno)	Ésteres aparentemente más bajos, fina, con carencia de lúpulo, floja, ligeramente sulfurosa, empeora - calificación 5.

## ES 2 507 840 T3

Los efectos sensoriales se consignaron relacionados más bien con el proceso que asociados con la diferencia en los clarificadores utilizados para las cervezas de prueba y de control.

Ambas cervezas (Tanques de Cerveza Brillante) se analizaron en cuanto a compuestos iónicos (Tabla 42).

5

**Tabla 42**

	Colágeno	Pectina
Hierro	0,04	0,04
Cobre	0,03	0,04
Calcio	29	33
Magnesio	71	71
Sodio	70	78
Potasio	377	389

Los compuestos iónicos para ambas cervezas clarificadas con colágeno y con LM110 son comparables.

10

Producto Acabado - Analítica

La Tabla 43 es una comparación de las pruebas analíticas estándar para el producto acabado de prueba y de control. No se observó diferencia significativa alguna.

15

**Tabla 43**

Comentario		Botellas - PRUEBA (Pectina)	Botellas - CONTROL (Colágeno)
Número de muestra		103422	103424
Fecha de toma de muestra		8/08/2005 16:46	8/08/2005 16:46
Etapas de proceso		FINAL	FINAL
Tipo de paquete		375B	375B
Alcohol	% v/v	2,77	2,79
Opalinidad en frío Inicial	FTU ASBC	30	30
Opalinidad en frío - Forzada	FTU ASBC	75	115
Dióxido de carbono	% p/v	0,542	0,53
Color	Unidades EBC	10,7	10,8
Diacetilo libre	mg/L	0,01	0,01
Pentanodiona libre	mg/L	0,01	0,01
Dicetonas vecinales totales libres	mg/L	0,02	0,02
Estabilidad de la espuma – Nibem	S	302	295
Calcio	mg/L	22	23
Cobre	mg/L	0,03	0,04
Hierro	mg/L	0,04	0,03
Magnesio	mg/L	50	47
Potasio	mg/L	271	262
Sodio	mg/L	54	55
Cloruro	mg/L	175	176
Sulfato	mg/L	129	134

Comentario		Botellas - PRUEBA (Pectina)	Botellas - CONTROL (Colágeno)
Amargor (Abs x 70)	mg/L	23,2	23,9
Densidad original	°P	7,8	7,9
Densidad actual	°P	2,47	2,51
pH		4,31	4,28
Material particulado inicial		PASA	PASA
Extracto Real	°P	3,52	3,56
Densidad relativa (20/20)		1,00966	1,00982
Sulfuro de dimetilo libre	µg/L	10	11
Sulfuro de hidrógeno	µg/L	1	1
Metanotiol	µg/L	1	1
Acetato de etilo	mg/L	10,2	10,8
Hexonato de etilo	mg/L	0,05	0,05
Octonato de etilo	mg/L	0,13	0,1
Acetato de isoamilo	mg/L	0,54	0,52
Acetato de feniletilo	mg/L	0,44	0,4
Ésteres Totales	mg/L	11,4	11,9
Alcohol feniletílico	mg/L	20,8	19,5
Alcohol isoamílico	mg/L	33,8	28,6
Isobutanol	mg/L	6,3	5,4
n-Propanol	mg/L	6,1	5,1
Alcoholes superiores totales	mg/L	67	58,6
Ratio alcoholes superiores/ésteres		5,88	4,92
Dióxido de azufre total	mg/L	12	14

Evaluación del Sabor y Estabilidad del Sabor

- 5 La evaluación del sabor inicial del panel sensorial de expertos (National) sobre el producto acabado se muestra en la Tabla 44.

**Tabla 44**

Clarificada con pectina LM101	citral, cérea, recuerda ligeramente al lúpulo, resinosa, plástica, iónica, calificación 6
Clarificada con colágeno	pulverulenta, plástica, floja, resinosa, paladar de lúpulo bajo, calificación 5

- 10 Los catadores se refirieron al intervalo de variación en el carácter de etiqueta. Las presentes evaluaciones se consignaron dentro del intervalo de las notas de sabor y gusto para esta cerveza. La cerveza de prueba se calificó con nota más alta que el control. Esto muestra una tendencia similar a la expuesta en los Ejemplos 15 y 16. Los valores Ea del análisis ESR, que miden la supresión de radicales hidroxilo, se presentan en la Tabla 45.

**Tabla 45**

	Tiempo de retardo ESR (Ea), min	Dióxido de azufre, mg/L
Prueba	95	12
Control	85	14

Los valores del tiempo de retardo ESR (Ea) están sesgados hacia los niveles de dióxido de azufre. Generalmente, los niveles más altos de dióxido de azufre en la cerveza dan como resultado tiempos de retardo mayores. Basándose en estas medidas, la estabilidad de la cerveza clarificada con pectina es la más estable de las dos, lo que no podría haberse predicho a partir del nivel de dióxido de azufre solo.

Sumario

Aunque la tasa de dosificación para LM101 de 1,6 mg/l aplicada en este ejemplo no se considera como la tasa de dosificación óptima, la misma se comportaba todavía tan satisfactoriamente como los clarificadores de colágeno. De hecho, la evaluación sensorial de la cerveza acabada con clarificadores de pectina estaba por delante del control clarificado con colágeno. La estabilidad de la cerveza clarificada con pectina era mejor en los tests predictivos, y parece ser que los clarificadores de pectina se comportan mejor en la filtración que el producto clarificado con colágeno.

Ejemplo 18 - Pruebas en laboratorio y en planta: Tratamiento de la cerveza de densidad ultra-alta con clarificadores de pectina no amidados

Se realizaron pruebas en laboratorio y en planta con un clarificador de pectina no amidado y una cerveza de densidad alta (Densidad Original 14 P).

Preparación de la Solución de pectina

La pectina de manzana, AF702, es una pectina no amidada de manzana suministrada por Herbstreith & Fox. La solución de dosificación de pectina se preparó como una mezcla que contenía la pectina, metabisulfito de sodio, citrato de sodio y agua como se describe en el Ejemplo 9. La concentración nominal de la Pectina estandarizada en la solución de clarificadores era (5% (p/p). Véase:

Para 1000 L de solución de pectina (estandarizada):

- 50 kg de polvo de pectina - AF701 suministrada por H & F
- 20 kg de citrato de sodio (no se requiere ácido cítrico)
- 10 kg de metabisulfito de sodio (o potasio)
- 950 L de agua desionizada

La solución preparada es ligeramente viscosa, y de color pardo claro. El nivel de pectina activa era 78% basado en los métodos descritos en el Ejemplo 15. La concentración de la solución de clarificadores era por tanto 3,8% p/p basada en Pectina activa.

Filtración en laboratorio de la cerveza dosificada en planta y la dosificada en laboratorio

La prueba se llevó a cabo con cerveza de alta densidad (Densidad Original 14 P) de un fermentador de 4000 hL que se dividió entre control (clarificadores de colágeno), y prueba (clarificadores de pectina AF702 Herbstreith and Fox Gmb). La cerveza se centrifugó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 15 antes de ser dosificada en el camino hacia el almacenamiento. Las cervezas se mantuvieron en almacenamiento durante 48 horas.

Una muestra de la cerveza antes de la dosificación se ensayó en el laboratorio respecto a filtrabilidad. La cerveza se dosificó con clarificadores, y después de 48 horas, se midió la filtrabilidad (véase la descripción de filtrabilidad en el Ejemplo 11). Los resultados se muestran en la Figura 31. Se incluyó también en los tests una muestra de planta (48 horas de almacenamiento). La cerveza dosificada con 60 y 75 ppm (4,68 y 5,85 g/hL respectivamente con clarificadores AF702) tenía filtrabilidad equivalente, y ambas daban mejores resultados que el control. La muestra de tanque almacenada en planta exhibía la mejor filtrabilidad. Dada la extremada mezcladura en planta, esto no es sorprendente (Tabla 46).

**Tabla 46**

Régimen de Clarificadores		AF702 5,85 g/hL	Colágeno 200 mg/L*	a	Vasija de almacenamiento (AF702 a 5,85 g/hL)	AF702 4,68 g/hL	Control (sin clarificadores)
Filtrabilidad	(s/L <sup>2</sup> )	13,2	21,3		9,4	12,8	38,3
Opalinidad antes del filtro	EBC	2,97	21,90		7,23	6,02	45

## ES 2 507 840 T3

Régimen de Clarificadores		AF702 5,85 g/hL	Colágeno 200 mg/L*	Vasija de almacenamiento (AF702 a 5,85 g/hL)	AF702 4,68 g/hL	Control (sin clarificadores)
Opalinidad después del filtro	EBC	0,78	1,21	0,88	1,01	1,25

\* La concentración de clarificadores de colágeno era 2% p/p.

5 Las cervezas dosificadas con pectina AF702 muestran mejor filtrabilidad que la cerveza dosificada con el colágeno. La filtrabilidad del colágeno era 21,3 s/L<sup>2</sup>, mientras que el control era 38,3 s/L<sup>2</sup>. Los valores de filtrabilidad para la cerveza tratada con los clarificadores AF702 eran 13,2 s/L<sup>2</sup> y 12,8 s/L<sup>2</sup> (5,85, 4,68 g/hL de la tasa de dosificación de pectina activa respectivamente. La opalinidad antes del filtro era muy baja para la cerveza tratada con clarificadores AF702, con valores de 5,85 g/hL y 2,95 EBC, mientras que la opalinidad de la prueba era 21,9 EBC.

10 La cerveza dosificada en planta (Tabla 46, vasija de almacenamiento) se comportaba muy bien en términos de filtrabilidad. La opalinidad era similar a la de la cerveza de laboratorio que recibió 4,88 g/h de pectina. Existe por tanto gran probabilidad de que la tasa de dosificación pudiera reducirse aún más.

### Datos de Filtración en Planta

15 Se llevó a cabo una prueba en planta basada en el protocolo reseñado en el Ejemplo 15. Esta filtración era al menos tan satisfactoria como la esperada en general para el régimen de clarificadores basados en colágeno.

20 Los datos presentados a continuación corresponden a una operación de filtración del control para 2050 hL y la prueba a 1750 hL.

Los datos de filtración en planta demostraban que la tasa de aumento de presión para la cerveza de control era 68 kPa/h, y para la prueba era 41 kPa/h. La tasa de dosis de polvo para el control era 40 g/hL, comparada con la prueba de 25 g/hL.

25 En esta prueba con cerveza de densidad ultra-alta, los clarificadores AF702 se comportaban aún más eficazmente que los clarificadores usuales de colágeno.

### Ejemplo 19 - Especificidad de proteínas de pectina e Isinglass

30 El sulfito atenúa la actividad de los clarificadores de pectina, posiblemente por sulfitólisis, y posiblemente por afectar a la carga de proteínas.

35 La sulfitólisis rompe los enlaces disulfuro para formar tioles libres y sulfonatos cargados. Los tioles de proteína son capaces de formar nuevamente enlaces disulfuro por oxidación con oxígeno molecular. Cuando sucede esto, existe probabilidad de que las diferentes proteínas se acoplen unas a otras y formen agregados mayores. Podrían formarse también enlaces intramoleculares. Estos enlaces intramoleculares no favorecerían la floculación, sino probablemente la reticulación proteína-proteína.

40 Es sabido que los tioles están implicados en la formación de partículas en la cerveza durante el almacenamiento. Cuanto más sulfito esté presente en la cerveza, en presencia de cationes divalentes tales como Fe<sup>++</sup>, tanto más probable es esto. Quizás las proteínas rédox más reactivas acaben en flóculos de pectina. Es asimismo posible que otras proteínas más bien estables, tales como la albúmina, que normalmente no participaría en la formación de flóculos, lo hagan así debido a los tioles reactivos expuestos formados durante la sulfitólisis.

45 Las proteínas del flóculo pueden separarse y teñirse respecto a actividad rédox con reactivos específicos de tiol. Las proteínas pueden separarse por electroforesis unidimensional o bidimensional, y sobre la base de carga y tamaño. Por tanto, es posible evaluar si los flóculos de pectina exhiben preferencia para proteínas básicas frente a proteínas ácidas, proteínas pequeñas frente a proteínas grandes, o proteínas reactivas con tiol frente a proteínas inactivas frente al tiol.

50

### Proceso

#### Procesamiento de las Muestras

55 Se trataron cervezas VB clarificadas con pectina LM101, LM121, LMC 710, o AF702 (solución de dosificación de pectina al 1% p/p) y a 70 ppm, a 4°C, y se dejaron en reposo durante 48 h. Los sobrenadantes se separaron del sedimento por decantación. La suspensión de sedimentos, por lo general aproximadamente 5% del volumen de

cerveza original, se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. Los sedimentos se recuperaron después de la decantación del sobrenadante de cabezas.

5 Los sedimentos de flóculo se resuspendieron en 1 ml de tampón de muestra SDS (-) (Tris-Cl 0,0625 M, pH 6,8, 2% SDS, (-) sin presencia de reductor) que contenía EDTA 1 mM y se extrajeron a la temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras se centrifugaron luego a 14.000 g durante 15 min. Se recogieron los sobrenadantes y se guardaron como partes alícuotas a -30°C para análisis posterior.

10 Estimación de Proteínas

Las concentraciones de proteínas de las muestras de sedimentos de flóculo se determinaron utilizando el procedimiento de Bajary (BioRad).

15 Estimaciones de Tiol

La concentración de tiol de los sedimentos de flóculo se midió utilizando el ensayo estándar DTNB (ácido 5,5'-distiol (2-nitrobenzoico)) (Pierce Biotechnology Instruments: Ellman Reagent, aplicación No. 22582).

20 Marcación MPB de los tioles proteínicos

Tioles proteínicos libres en los flóculos se etiquetaron con MPB ((N'-(3-maleimidilpropionil)biotina, Molecular Probes), un derivado biotinilado de la N-etilmaleimida, NEM. La misma reacciona específicamente con los tioles libres, dando como resultado la fijación de un residuo biotina, que puede ser detectado subsiguientemente en Transferencias Western utilizando avidina-peroxidasa como el reactivo de revelado.

25 Partes alícuotas de las muestras se ajustaron a pH 8,0 por adición de 1 parte de Tampón de Fosfato de Sodio 0,2 M, pH 8,0 por 5 partes de muestra. Se añadió inmediatamente MPB a una concentración de 250 µM y las muestras se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 min. El exceso de MPB se extinguió luego por adición de DTT a una concentración final de 1 mM e incubación durante 15 min a la temperatura ambiente. Las muestras de MPB se guardaron luego como partes alícuotas a -30°C hasta que fueron analizadas por SDS PAGE y Transferencia Western.

30 Análisis SDS PAGE y TRANSFERENCIA WESTERN de muestras etiquetadas con MPB de sedimentos de flóculo

35 Muestras etiquetadas con MPB de sedimentos de flóculo se analizaron respecto a perfil de proteínas totales por SDS PAGE en geles al 15% con tinción Coomassie y respecto a perfiles de tioles proteínicos por una SDS PAGE paralela seguida por Transferencia Western con revelado por avidina-peroxidasa seguido por detección mediante quimioluminiscencia utilizando el procedimiento de revelado con luminol de Amersham (ACL, Amersham, Castle Hill, NSW, Australia; paquete de software Vision Works, y se analizaron utilizando el sistema de documentación y análisis en gel GDS 7600 (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido).

Se cargó una serie de geles con las muestras sobre una base de volúmenes iguales a fin de permitir la comparación de las cantidades relativas de proteína/tioles proteínicos presentes en las diferentes muestras. Otra serie de geles se cargó con muestras sobre una base de proteínas iguales (50 µg).

45 En todos los casos, las muestras se prepararon en tampón de muestra SDS (+) (el tampón de muestra (+) contiene ditiotreitól 20 mM).

50 Análisis por Electroforesis Bidimensional en Gel de muestras de sedimentos de flóculo

Se realizaron los análisis de la primera dimensión sobre Tiras de Enfoque Isoeléctrico Invitrogen de pH 3-10 cargadas con 30 µg de muestras de sedimentos de flóculo (no etiquetadas con MPB). Los análisis de la segunda dimensión se realizaron por SDS PAGE sobre geles al 15%. Los geles de la segunda dimensión se tiñeron con Rojo Rubí, y el patrón fluorescente de las manchas de proteína se registró utilizando un Analizador de Imágenes FLA empleando una longitud de onda de excitación de 435 nm.

55 Análisis

Los niveles de tioles proteínicos en los flóculos se resume en la Tabla 47.

60

**Tabla 47.** Tioles en las proteínas de flóculos de cerveza VP

Flóculo	Sedimentos de flóculo		
	mg/ml	uM SH	nmoles SH/mg

Flóculo	Sedimentos de flóculo		
	mg/ml	uM SH	nmoles SH/mg
AF702	7,2	11	1,5
LM101	11,3	11	1,0
LM121	12,8	15	1,2
ISSINGLASS 2-9	9,0	11	4,4
CERVEZA ENTERA2-9	2,8	11	3,9

El flóculo de Isinglass tiene una ratio tiol:proteína mayor que los flóculos de pectina. Las proteínas separadas por Pectina tienen que representar probablemente una distribución diferente de las separadas con Isinglass.

5 Para ensayar esto, los flóculos se resuspendieron en tampón ligeramente alcalino y se mezclaron con la sonda de tiol, MPB, y se analizaron luego utilizando SDS-PAGE y electroforesis en gel 2D.

#### 10 Análisis SDS PAGE y TRANSFERENCIA WESTERN

Muestras de los sedimentos de flóculo etiquetados con MPB se analizaron en geles de SDS-PAGE paralelos con tinción por azul Coomassie y por SDS PAGE/Transferencia Western para rebanar el estado rédox de los tioles proteínicos (Figura 32 (A) & (B)). Las muestras de sedimentos de flóculo etiquetadas con MPB se analizaron sobre una base de proteínas iguales (cargando 50 µg proteína).

15 La Figura 32 (A) muestra los patrones SDS PAGE/tinción con Coomassie para las proteínas de los flóculos de cerveza VB tratada con pectina, la proteína del flóculo VB de Isinglass y la proteína de cerveza VB entera (pista 2-AF 602, pista 4-LM101, pista 6-LM121, pista 8-Isinglass, pista 10-cerveza entera).

20 La Figura 32 (B) muestra la SDS PAGE/ Transferencia Western y visualiza la etiquetación del tiol proteínico (estado rédox de las proteínas). Los flóculos teñidos con azul Coomassie exhiben patrones típicos de tinción de la cerveza para las muestras de flóculos de pectina. Una banda intensa correspondiente a la proteína albúmina está presente en una posición correspondiente a peso molecular 40.000, y puede verse también una gama de proteínas de peso molecular bajo desde inferior a ~ 20.000 Daltons.

25 Los perfiles de proteínas y los perfiles de etiquetación con MPB eran similares para todos los agentes clarificadores de pectina; sin embargo el perfil de Isinglass era diferente. Todos excepto Isinglass arrancaban principalmente una proteína de 40 K con un grupo de proteínas de PM menor en la región de 10-15 K y algo de un material de PM menor aún no resuelto por estos geles. El Isinglass parece direccionarse principalmente a proteínas en la región de 10-15 K (lo mismo que puede verse en los sedimentos de cerveza de control no tratados con clarificador alguno (véanse las pistas 8 y 10, Figura 32 (A)).

30 La mayor parte de la etiquetación de flóculos con MPB (Figura 32 (B)) está asociada con las bandas en la región 10-15 K, aunque se observa también cierta etiquetación en la región de 40 K para aquellas muestras que contienen esta o estas proteínas. Si bien existen variaciones en la intensidad de etiquetación para los diferentes clarificadores, los patrones obtenidos con Isinglass son los más débiles de todos. Esto sugiere que los polipéptidos de 10-15 K direccionados por el Isinglass tienen menos tioles libres (quizás estén más oxidados) que los polipéptidos de 10-15 K separados por las pectinas.

#### 40 Análisis 2D en Gel

Se realizaron análisis 2D en gel sobre muestras de sedimentos de flóculo utilizando tinción con proteína Ruby Red (v.g. flóculos LM121 frente a Isinglass, cerveza VB; Figura 33 y 34).

45 Los patrones obtenidos con clarificadores de pectina son todos ellos más bien similares, mientras que el patrón obtenido para el flóculo del tratamiento con Isinglass es claramente diferente.

50 Los flóculos de pectina exhiben una serie de manchas en la región de las proteínas de peso molecular bajo, 10-15 K, que se extiende a lo largo de una gama de pls (puntos isoeléctricos) desde aproximadamente 5 a 7,5 (Figura 34). Los patrones en esta región de 10-15 K son muy similares tanto en términos de las manchas presentes como en términos de la intensidad relativa de las manchas. Esto se muestra claramente en la Figura 35, que se presenta la región de peso molecular bajo de los análisis 2D para las diferentes pectinas y el flóculo de Isinglass ((a) LM101, (b) LM121, (c) AF702, (d) LMC 702, y (e) Isinglass).

En el patrón de Isinglass, Figura 35 (e), la intensidad relativa de las manchas es muy diferente de la existente en los otros patrones ((a-d), Figura 35)). Esto se hace obvio por comparación de la totalidad de los patrones o por comparación de grupos de manchas.

5 Claramente, las bandas alrededor de 10-15 K como se ven en los geles de una sola dimensión (Figura 35), contienen una gama entera de variantes isoeléctricas y las más ácidas (probablemente formas oxidadas) tienden a dominar en el material unido al Isinglass.

10 Parece ser que el Isinglass se direcciona a las formas de proteínas ácidas (más oxidadas) más que las variantes de pectina. Por otra parte, parece ser que los flóculos de pectina dependen más de fuerzas electrostáticas para formar flóculos, preferiblemente con proteínas básicas (positivas).

15 Dado que los flóculos de colágeno contienen predominantemente proteínas activas rédox de peso molecular bajo, no es sorprendente que la acción de los clarificadores Isinglass no sea tan dependiente de los efectos del sulfito, dada dicha abundancia relativa de tioles reactivos.

20 Las pectinas, por otra parte, parecen tener menos probabilidad de acumular cantidades elevadas de proteínas reactivas con tiol. Así, en esta situación, el sulfito podría activar dichos flóculos por reducción de los disulfuros de proteína, lo cual podría crear de hecho tioles libres reactivos. Estos tioles podrían participar luego en la reticulación para la estabilización y crecimiento de los flóculos.

#### Referencias

25 Ciucanu I. y Kerek F. (1984) Carbohydr. Res., 131, 209-217.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebeis, P. A. y Smith, F. (1956) Anal. Chem., 18, 350-356.

30 Filisetti-Cozzi T.M.C.C. y Carpita N.C. (1991) Anal. Biochem., 197, 157-162.

Fry S. (1988) The Growing Plant Cell Wall: Chemical y Metabolic Analysis. Longman Scientific y Technical, Londres.

35 Laemmli E.K. (1970) Nature 227, 680-685.

Lim, YH, M. Pecar, D. Sudarmana, R. Peel, M. Freeman, y D. Hawthorne, "Effect of storage conditions on the Filtrabilidad of beer," Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly, vol. 29, pp. 37 - 41, 1992.

40 McConville, M. J., Homans, S. W., Thomas-Oates, J. E., Dell, A. y Bacic, A. (1990) J. Biol. Chem., 265, 7385-7394.

Persson J. y Nasholm T. (2001) Physiol. Plant. 113,352-358.

Tabla 1

Pectina	Suministrador	DE (%)	DA (%)	Conc. de azúcar (%)				Iones metálicos y citrato (%)						
				Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Fe	Cu	Ca	Mg	Na	K	Citrato	
HM121	Citrus Colloids	57	N/A	21,7	1,1	0,8	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,80	0,05	N/A	
LM101	CP Kelco	35	15	33,0	3,6	1,7	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,80	0,02	0,46	
LA110	Danisco	33	17	<0,1	29,5	<0,1	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	0,50	0,01	0,03	
LM102	CP Kelco	30	19	33,3	0,6	0,7	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,50	0,01	0,69	
CF005	Herbstreith & Fox	32-40	11-17	24	0,5	<0,1	<0,01	<0,01	0,01	0,02	0,65	0,06	0,02	
CF010	Herbstreith & Fox	30-36	14-20	22	0,2	<0,1	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,45	0,03	0,03	
CF020	Herbstreith & Fox	27-32	18-23	28	1,2	<0,1	<0,01	<0,01	0,01	0,01	1,24	0,17	N/A	
AY901	Herbstreith & Fox	42-47	N/A	<0,1	26,6	<0,1	<0,01	<0,01	0,10	<0,01	1,40	0,30	0,03	
AY801	Herbstreith & Fox	43-48	N/A	<0,1	5,4	0,1	<0,01	<0,01	1,20	<0,01	2,40	0,20	N/A	
LMC710	Danisco	48	N/A	<0,10	0,4	<0,1	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	1,20	0,12	N/A	
AF702	Herbstreith & Fox	38-44	N/A	20,0	0,33	<0,1	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,46	0,08	N/A	

Tabla 2

Cerveza	Estilo	Carga de malta	Lúpulo de caldera	Clarificadores de caldera	Levadura	Turbidez Inicial (EBC)	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)
LAGER	HG	75	No	No	A	50,8-76,8	24
FLEX	HG	75	25%	Sí	A	20,4	33
VB	HG	71	No	No	A	33,8-62,3	30-35
FICE	UHG	70	No	No	A	N/A	37
CPL	UHG	80	40%	No	A	61,8	39
RPL	HG	63	80%	No	J	36,2-49,6	N/A
CNM	UHG	80	40%	No	A	57,8-77,2	59
CD	HG	67	No	Sí	A	32,9-45,3	N/A
STELLA	HG	80	100%	No	I	10,9	N/A

Cerveza	Estilo	Carga de malta	Lúpulo de caldera	Clarificadores de caldera	Levadura	Turbidez Inicial (EBC)	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)
CC	HG	67	No	Sí	A	61,4-65,3	N/A

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una formulación de clarificadores para uso en la clarificación de cerveza, comprendiendo la formulación una Pectina seleccionada del grupo constituido por Pectina rica en ésteres metílicos con un DE de 50 a 65%, una Pectina pobre en ésteres metílicos con un DE mayor que o igual a 20%, y una Pectina amidada baja en ésteres metílicos con un DE de 20 a 40%, y un donante de dióxido de azufre, en donde la ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 3,5:1 a 7,5:1.
- 2.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 1, en la cual la ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 5:1.
- 10 3.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la cual el donante de dióxido de azufre es metabisulfito de potasio o metabisulfito de sodio.
- 4.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual la Pectina es una Pectina rica en ésteres metílicos con un DE de 50 a 60%.
- 15 5.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la cual la Pectina es una Pectina pobre en ésteres metílicos con un DE de 30 a 50%.
- 6.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 5, en la cual la Pectina es una Pectina pobre en ésteres metílicos con un DE de 35 a 45%.
- 7.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 5, en la cual la Pectina es una Pectina pobre en ésteres metílicos con un DE de 40%.
- 20 8.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la cual la Pectina es una Pectina amidada pobre en ésteres metílicos con un DE de 30 a 37%.
- 9.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 8, en la cual el grado de amidación de la Pectina amidada pobre en ésteres metílicos es de 10 a 25%.
- 25 10.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 8, en la cual el grado de amidación de la Pectina amidada pobre en ésteres metílicos es de 14 a 18%.
- 11.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende más de una Pectina.
- 30 12.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un agente tampón capaz de tamponar el pH de una solución de la formulación a un pH de 4,0 a 5,0.
- 13.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 12, en la cual el agente tampón es capaz de tamponar la solución a pH 4,5 hasta pH 5,0.
- 14.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la cual el agente tampón es capaz de tamponar la solución a aproximadamente pH 4,8.
- 35 15.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la cual el agente tampón es tampón citrato.
- 16.- La formulación de clarificadores conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un agente secuestrante para al menos un ion divalente.
- 40 17.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 16, en la cual el agente secuestrante forma quelatos con al menos uno de los iones calcio, magnesio, hierro y cobre.
- 18.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en la cual el agente secuestrante es citrato trisódico, ácido cítrico o una combinación de los mismos.
- 45 19.- La formulación de clarificadores conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual la formulación de clarificadores se encuentra en solución acuosa.
- 20.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 19, en la cual la Pectina en la solución acuosa está presente en 1 a 10% (p/v).

21.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en la cual la Pectina en solución acuosa está presente a 4 a 8,5% (p/v).

22.- La formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en la cual la Pectina en solución acuosa está presente a 5,5% (p/v).

5 23.- La formulación de clarificadores conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos un aditivo.

24.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 23, en la cual el al menos un aditivo es ácido tánico.

10 25.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 24, en la cual el ácido tánico está presente a una concentración final de 10 a 50 ppm del volumen total de cerveza.

26.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en la cual el ácido tánico está presente a una concentración final de 30 a 50 ppm del volumen total de cerveza.

15 27.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 23, en la cual el al menos un aditivo es extracto de lúpulo con 30 a 50% de etanol o extracto de lúpulo con agua ácida de un pH comprendido desde 1,8 a 2,0 hasta 0,1 a 0,5% (v/v) de volumen total del agua ácida.

28.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 23, en la cual el al menos un aditivo es extracto de lúpulo comercial.

29.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 23, en la cual el al menos un aditivo es citocromo C.

20 30.- La formulación de clarificadores conforme a la reivindicación 29, en la cual el citocromo C está presente a una concentración final de 5 a 20 ppm del volumen total de cerveza.

31.- La formulación de clarificadores conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 25 a 91% (p/p) de pectina, 5,5 a 50% (p/p) de citrato y 3,5 a 25% (p/p) de un donante de dióxido de azufre.

25 32.- La formulación de clarificadores conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 que comprende 5,5% (p/v) de pectina, 1,5% (p/v) de citrato de sodio, 0,5% (p/v) de ácido cítrico y 1,0% (p/v) de metabisulfito de potasio.

30 33.- Uso de una Pectina seleccionada del grupo constituido por una Pectina rica en ésteres metílicos con un DE de 50 a 65%, una Pectina pobre en ésteres metílicos con un DE mayor que o igual a 20%, y una Pectina amidada pobre en ésteres metílicos con un DE de 20 a 40%, y un donante de dióxido de azufre, en donde la ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 3,5:1 a 7,5:1, como formulación de clarificadores para clarificación de la cerveza, en la cual una cantidad de pectina está comprendida en el intervalo de 10 a 300 ppm inclusive, referida al volumen total de cerveza .

35 34.- El uso conforme a la reivindicación 33, en el cual la cantidad de pectina está comprendida en el intervalo de 40 a 80 ppm referido al volumen total de cerveza .

35.- Uso de una formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 en la clarificación de la cerveza.

40 36.- Un método de clarificación de la cerveza, que comprende añadir a la cerveza una formulación de clarificadores que comprende una Pectina seleccionada del grupo constituido por una Pectina rica en ésteres metílicos con un DE de 50 a 65%, una Pectina pobre en ésteres metílicos con un valor DE mayor que o igual a 20%, y una Pectina amidada pobre en ésteres metílicos con un DE de 20 a 40%, y un donante de dióxido de azufre, en el que la ratio de pectina a donante de dióxido de azufre es 3,5:1 a 7,5:1, y en el que la cantidad de pectina está comprendida en el intervalo de 10 a 300 ppm inclusive, referida al volumen total de cerveza.

45 37.- El método conforme a la reivindicación 36, en el que la cantidad de pectina está comprendida en el intervalo de 40 a 80 ppm inclusive, referida al volumen total de cerveza.

38.- Un método de clarificación de la cerveza, que comprende añadir a la cerveza una formulación de clarificadores conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32.

50 39.- El uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, que comprende adicionalmente los pasos de permitir que se forme un flóculo entre el material proteináceo y la Pectina; y retirar el flóculo y la pectina asociada de la cerveza.

40.- El uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en el cual la cerveza a la que se ha añadido la Pectina se procesa durante 12 a 168 horas.

5 41.- El uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, que comprende adicionalmente filtrar la cerveza tratada.

42.- Una cerveza que se ha sometido a un proceso de clarificación conforme al método de una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 3.



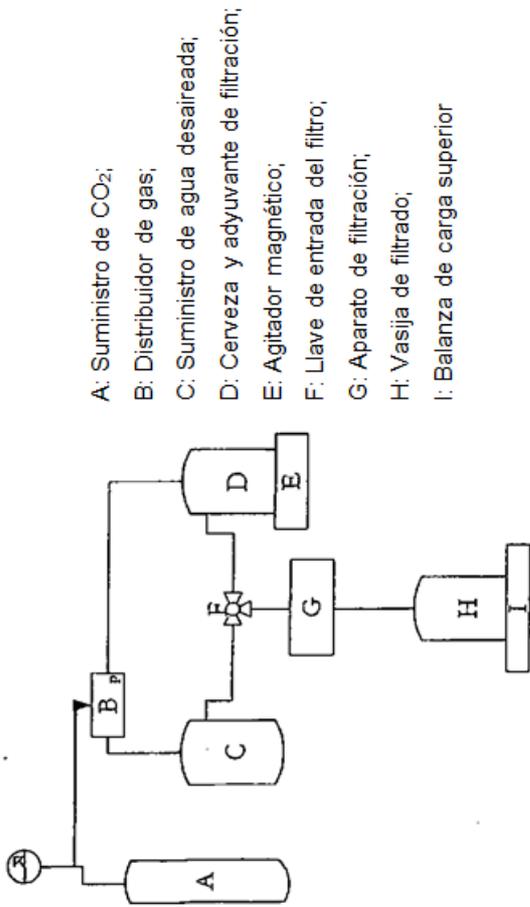


Figura 2

Figura 3a

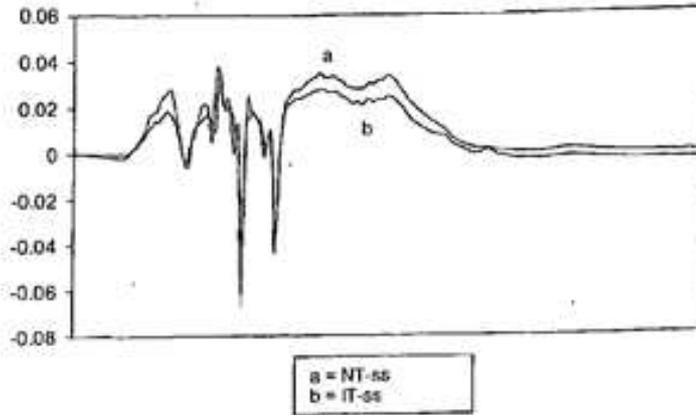


Figura 3b

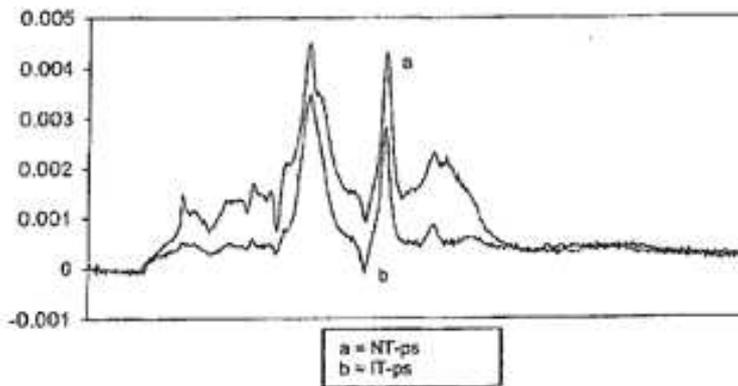


Figura 3c

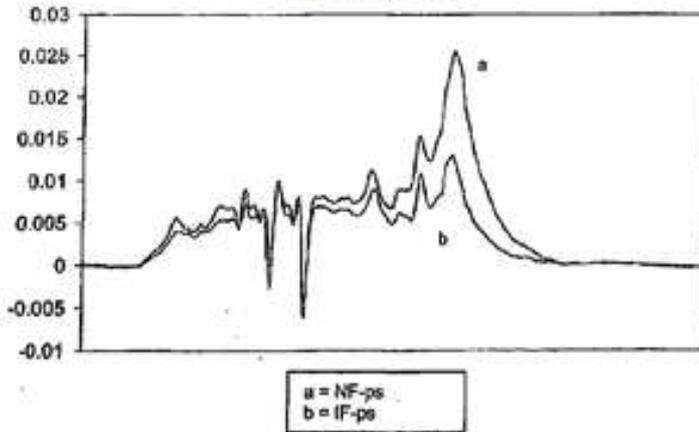
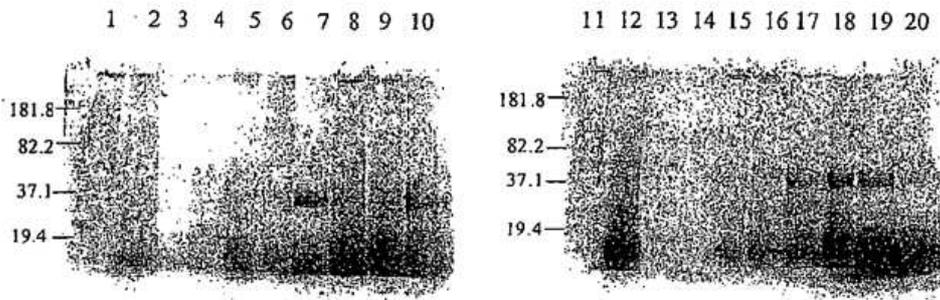


Figura 4



- 1 - Marcadores de PM
- 2 - Sedimento superior - Sin clarificador
- 3 - Sedimento superior - Isinglass
- 4 - Sedimento superior - PB-B
- 5 - Sobrenadante de flóculo - Sin clarificador
- 6 - Sobrenadante de flóculo - Isinglass
- 7 - Sobrenadante de flóculo - PB-B
- 8 - Sedimento de flóculo - Sin clarificador
- 9 - Sedimento de flóculo - Isinglass
- 10 - Sedimento de flóculo - PB-B

- 11 - Marcadores de PM
- 12 - Sedimento superior - Sin clarificador
- 13 - Sedimento superior - Isinglass
- 14 - Sedimento superior - PB-B
- 15 - Sedimento de flóculo - Sin clarificador
- 16 - Sedimento de flóculo - Isinglass
- 17 - Sedimento de flóculo - PB-B
- 18 - Sobrenadante superior - Sin clarificador
- 19 - Sobrenadante superior - Isinglass
- 20 - Sobrenadante superior - PB-B

Figura 5

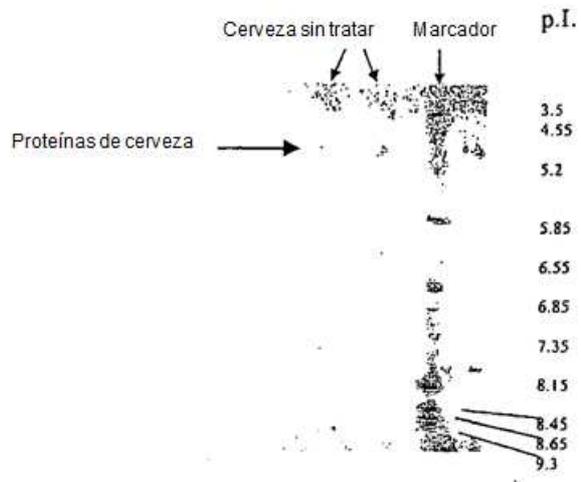
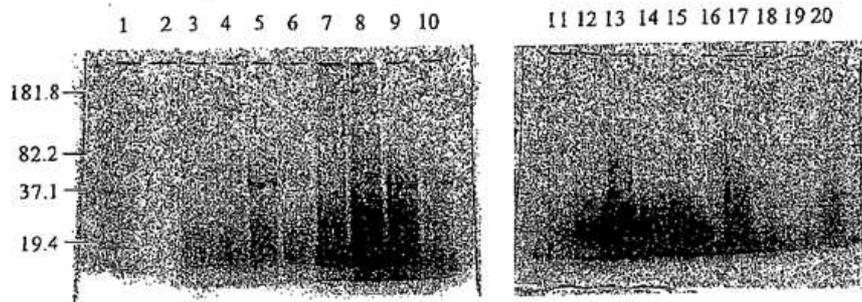


Figura 6

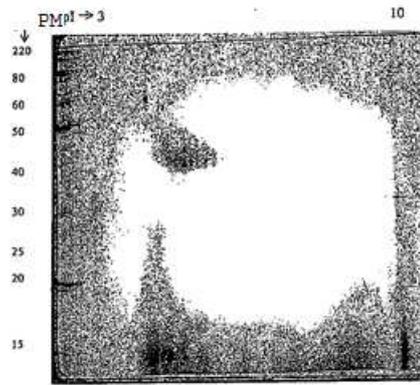


- 1 - Marcadores de PM
- 2 -
- 3 - Sobrenadante de flóculo - sin clarificador
- 4 - 4 - Sobrenadante de flóculo - Isinglass
- 5 - Sobrenadante de flóculo - PB-A
- 6 - Sobrenadante de flóculo - PB-C
- 7 - Sedimento de flóculo - sin clarificador
- 8 - Sedimento de flóculo - Isinglass
- 9 - Sedimento de flóculo - PB-A
- 10 - Sedimento de flóculo - PB-C

- 11 - Marcadores de PM
- 12 - Sobrenadante superior - sin clarificador
- 13 - Sobrenadante superior - Isinglass
- 14 - Sobrenadante superior - PB-A
- 15 - Sobrenadante superior - PBC
- 16 -
- 17 - Sedimento superior - Sin clarificador
- 18 - Sedimento superior - Isinglass
- 19 - Sedimento superior - PBA
- 20 - Sedimento superior - PBC

Figura 7

Cabezas de Isinglass



Flóculo de Isinglass

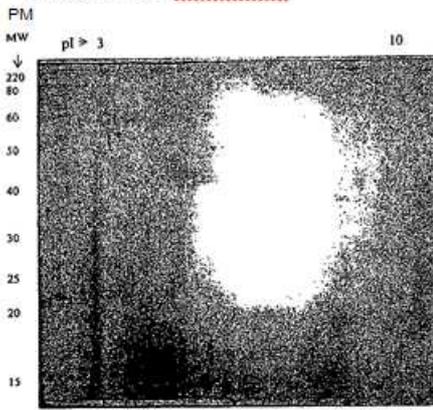


Figura 8

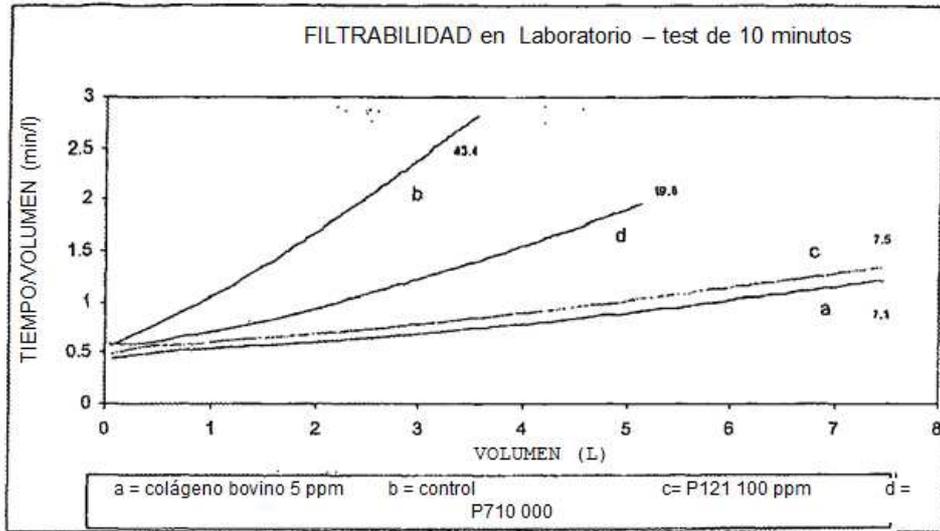


Figura 9

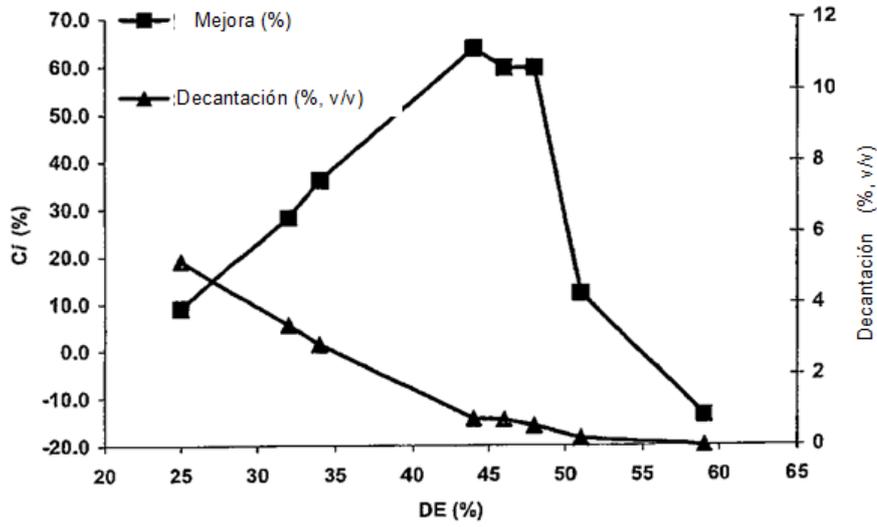


Figura 10

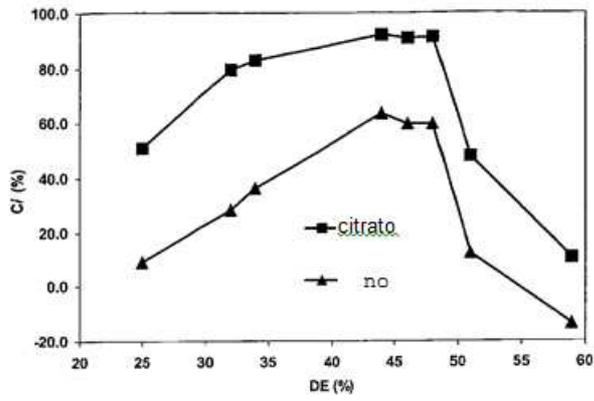


Figura 11

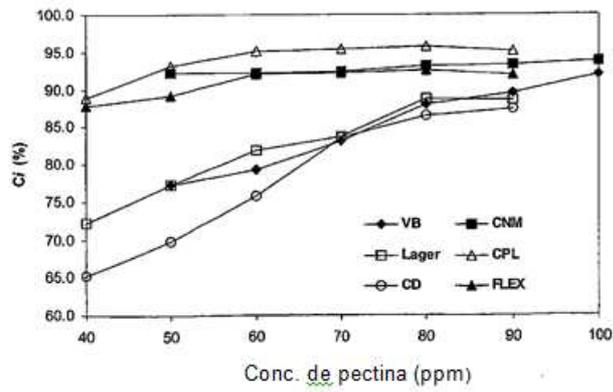


Figura 12

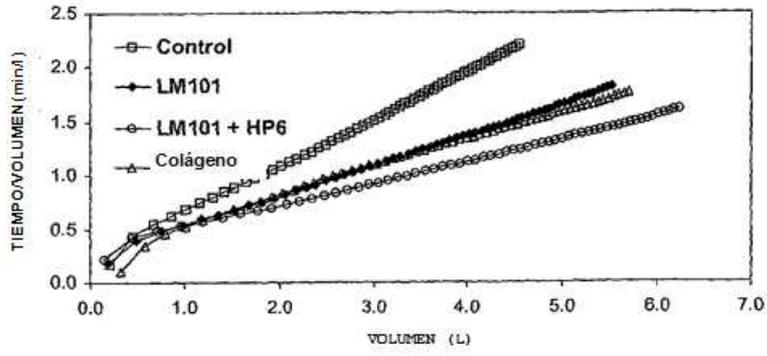


Figura 13

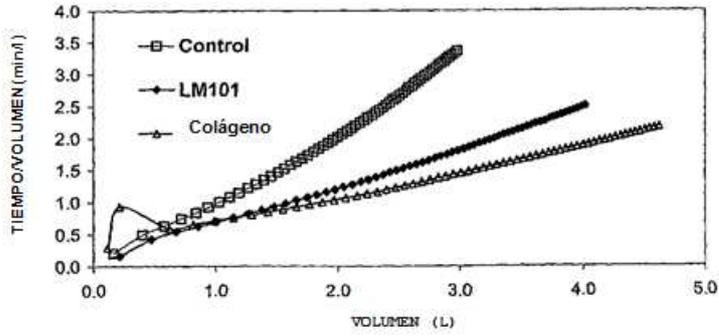


Figura 14

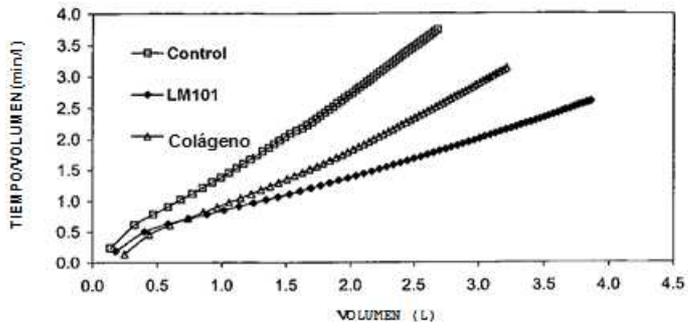


Figura 15

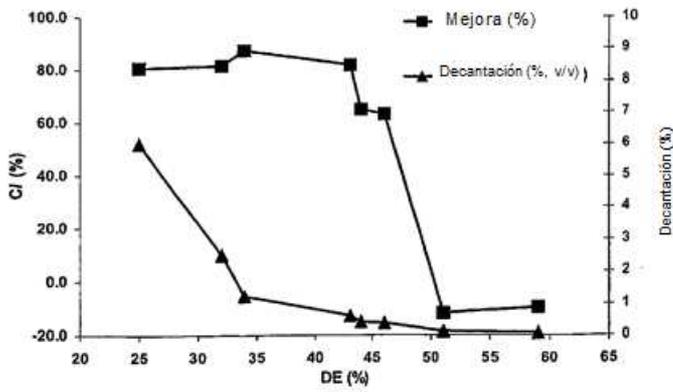


Figura 16

Fig. 1 Filtración  
Filtro FJ2 HGB. 4 agosto 2005  
Parámetros de turbidez

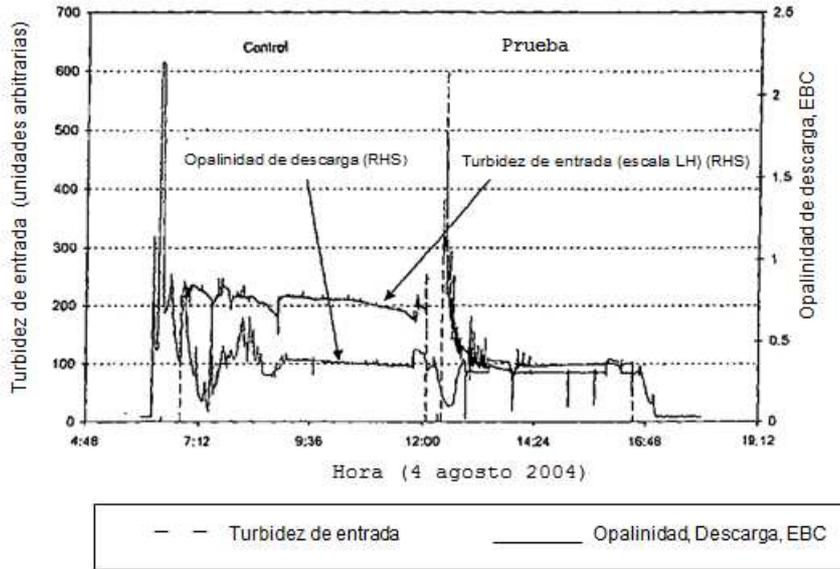


Figura 17

FIG 1 Filtración HGB. 4 agosto 2005. Variables de filtración principales

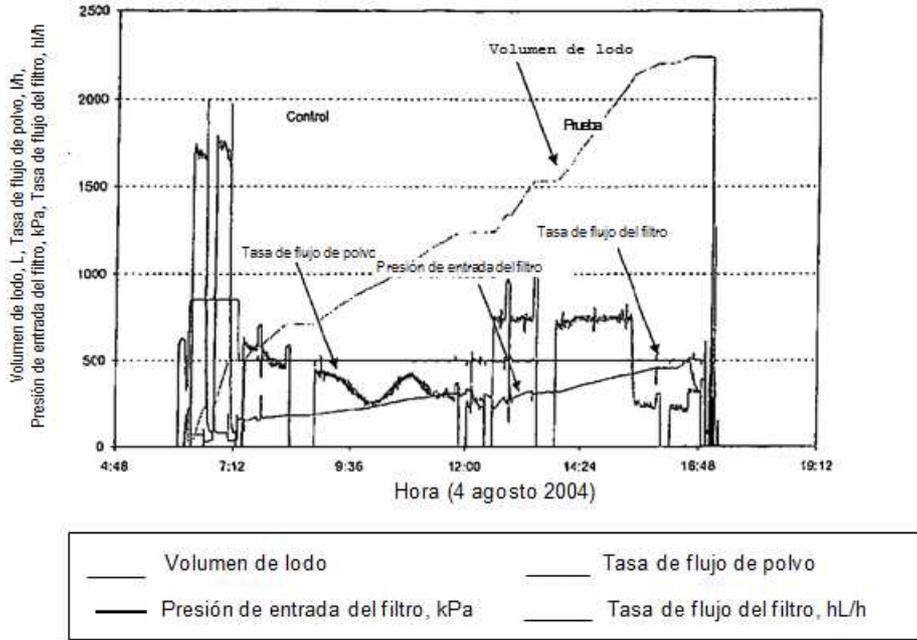
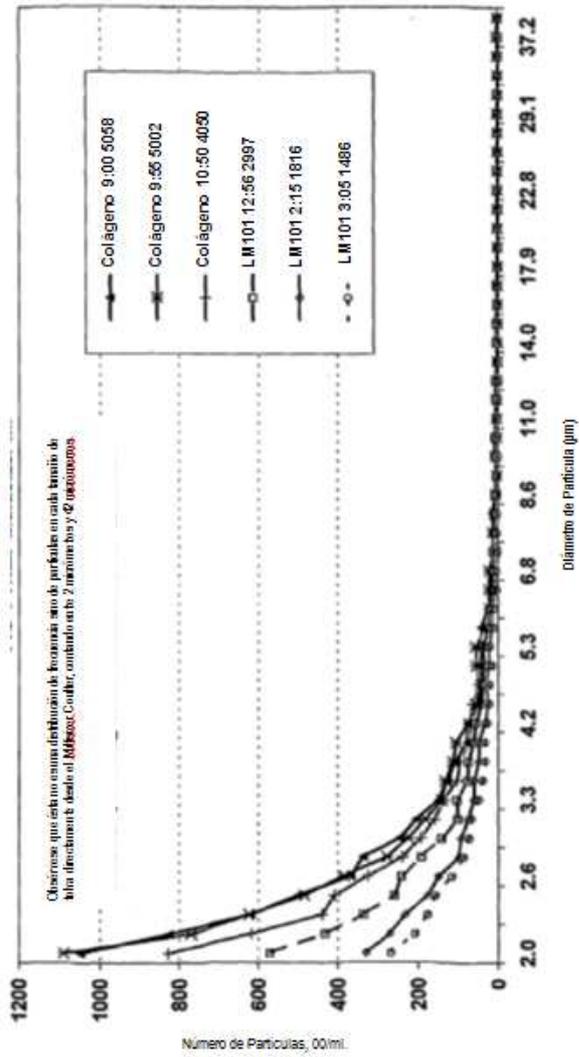


Figura 18

Distribución de Partículas de la Cierzo de Alta Densidad de la Fincha en Santa Fe de Bogotá  
 FES Tercer Nivel III



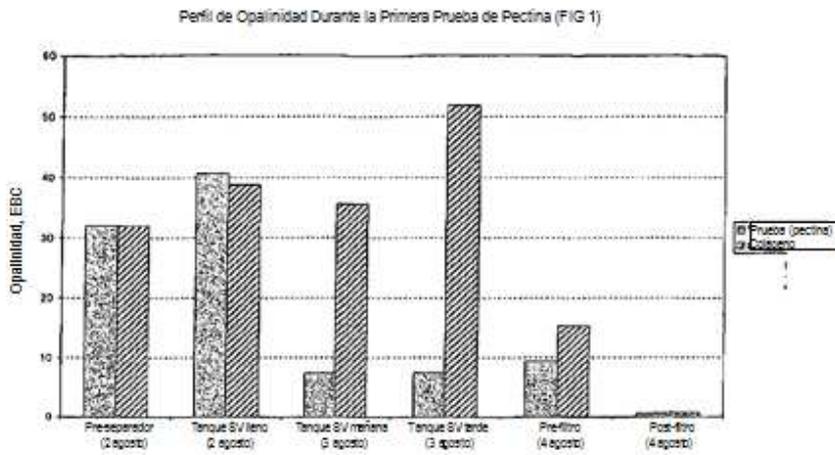


Figura 19

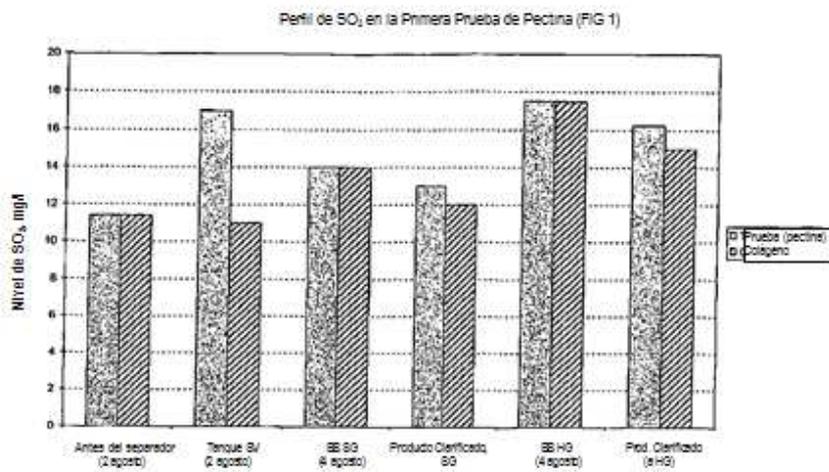


Figura 20

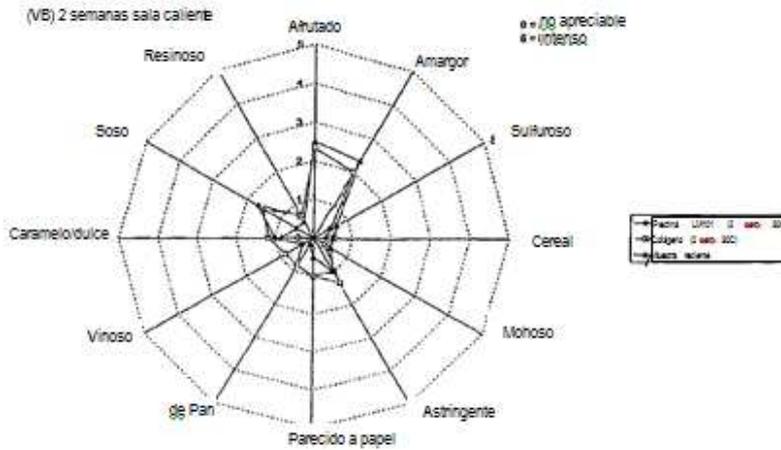


Figura 21

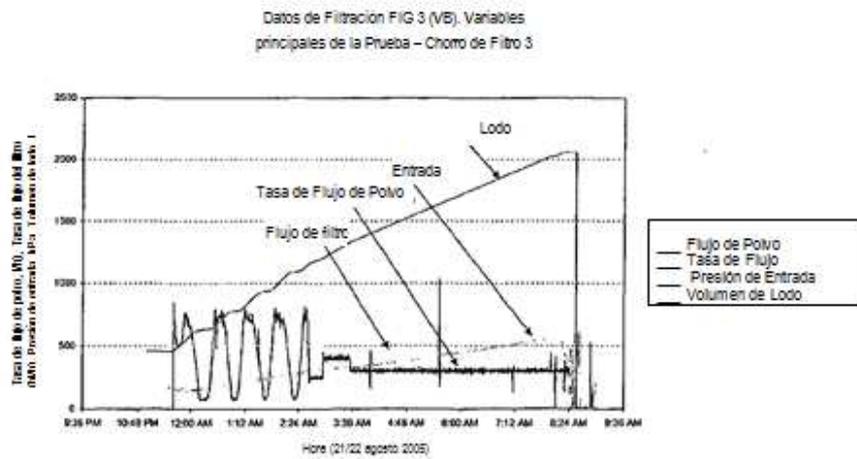


Figura 22

Figura 23

Filtración HGB (FIG 3) Parte de Control 2. Variables de Filtración Principales. Cierre de Filtro 1

Tasa de flujo de polvo, lb/h, Tasa de flujo del filtro, lbb/h, Presión de entrada, kPa, Volumen de lodo, l

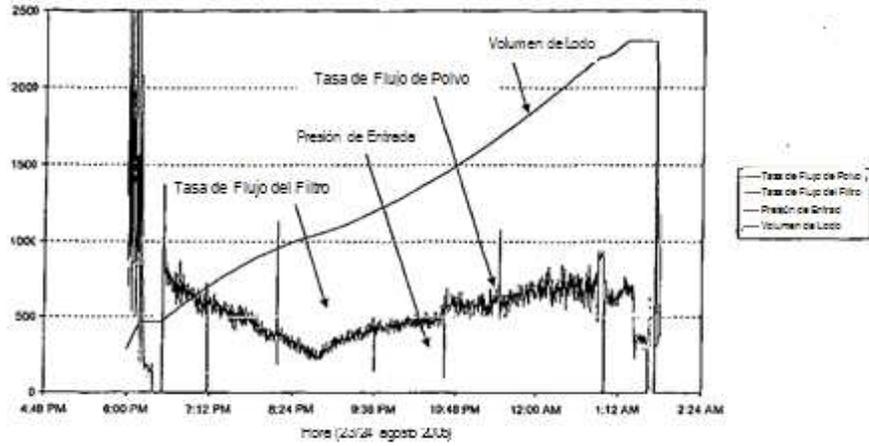
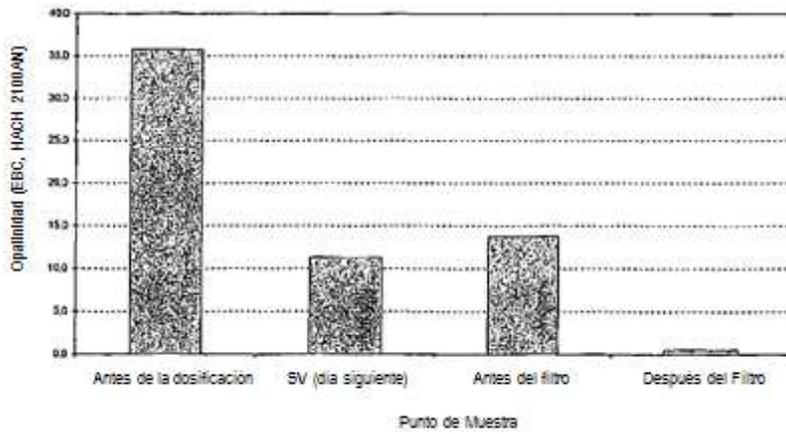


Figura 24

Eficiencia de Opalinidad en Planta FIG 3 Prueba (VB) PRUEBA



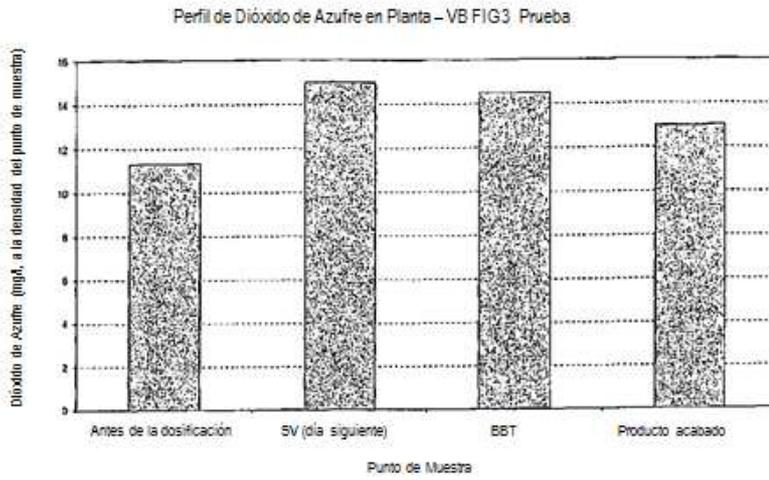


Figura 25

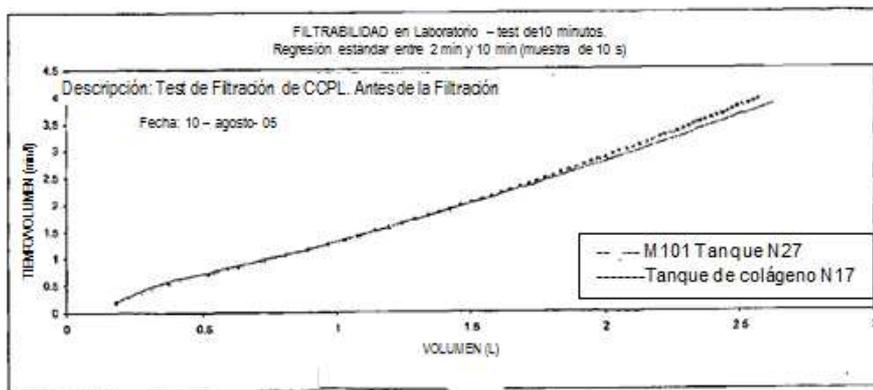


Figura 26

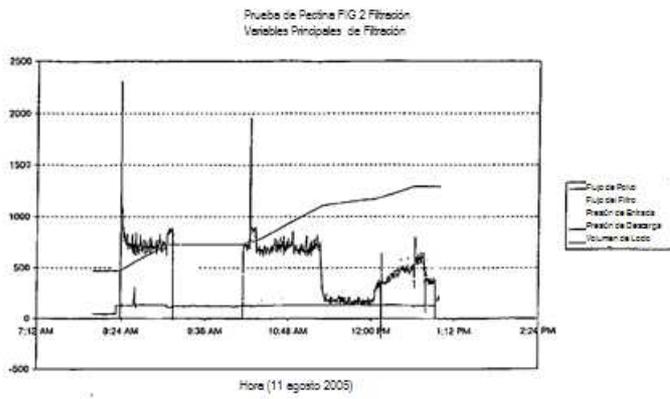


Figura 27

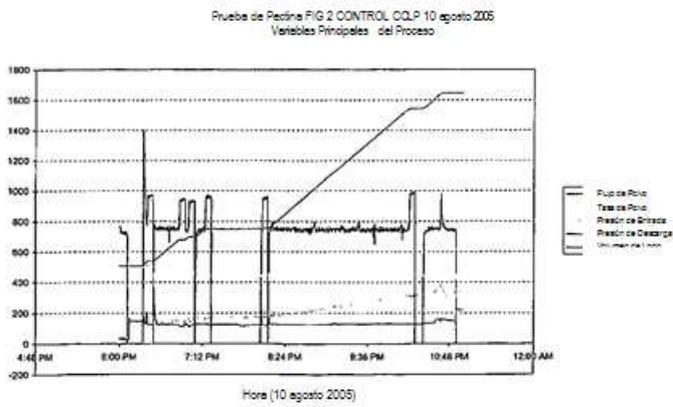


Figura 28

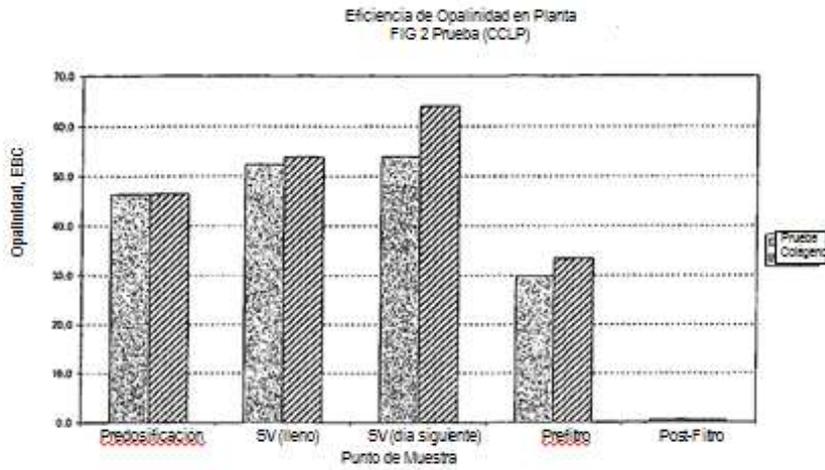


Figura 29

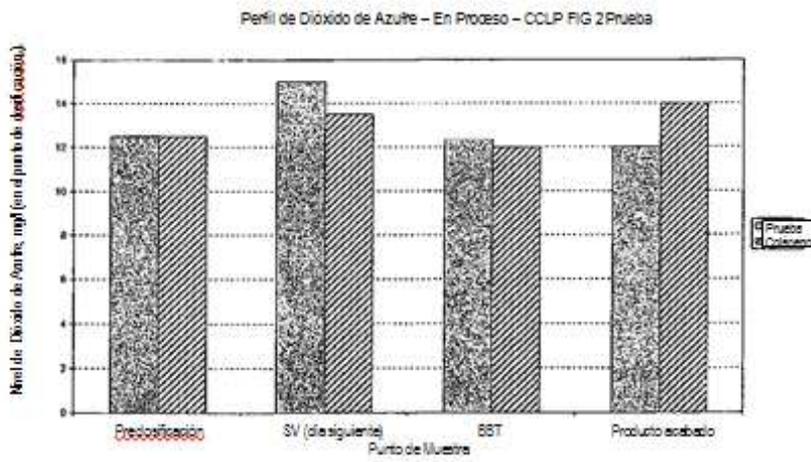


Figura 30

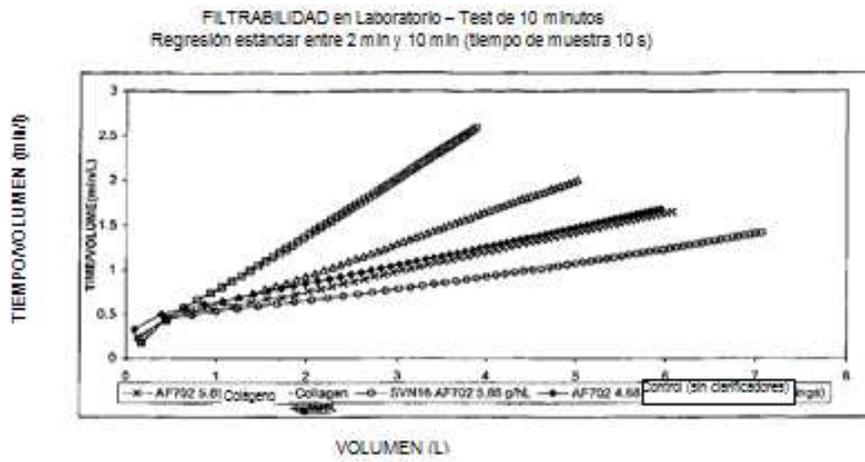


Figura 31

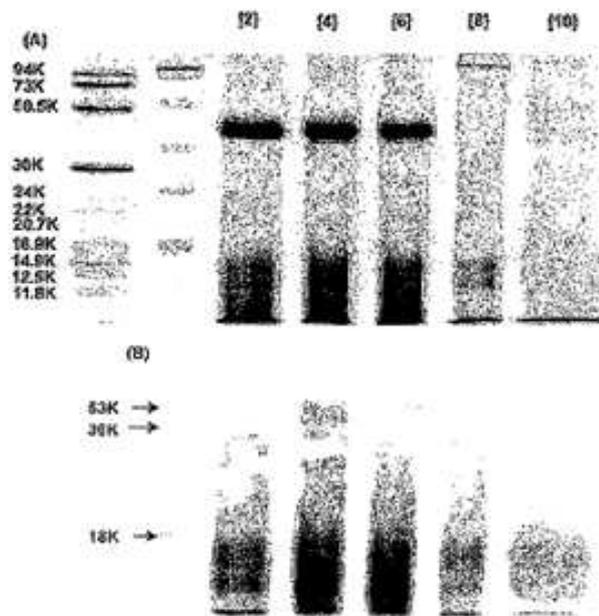


Figura 32

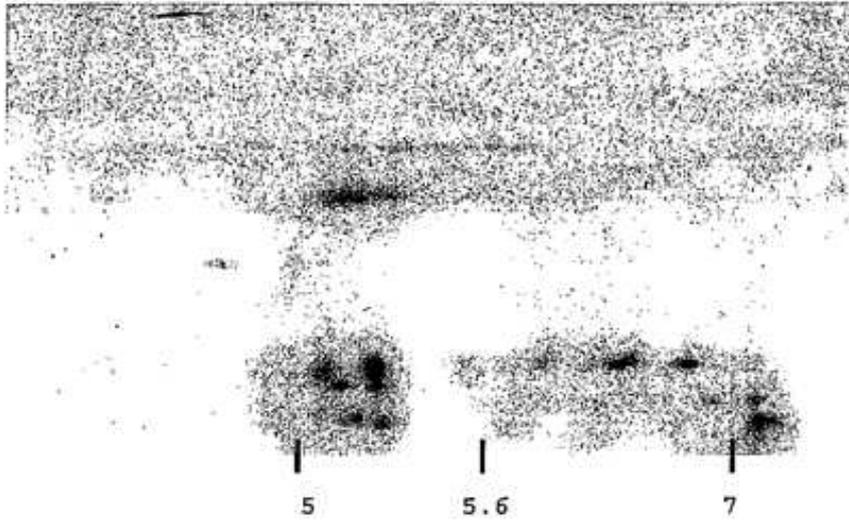


Figura 33

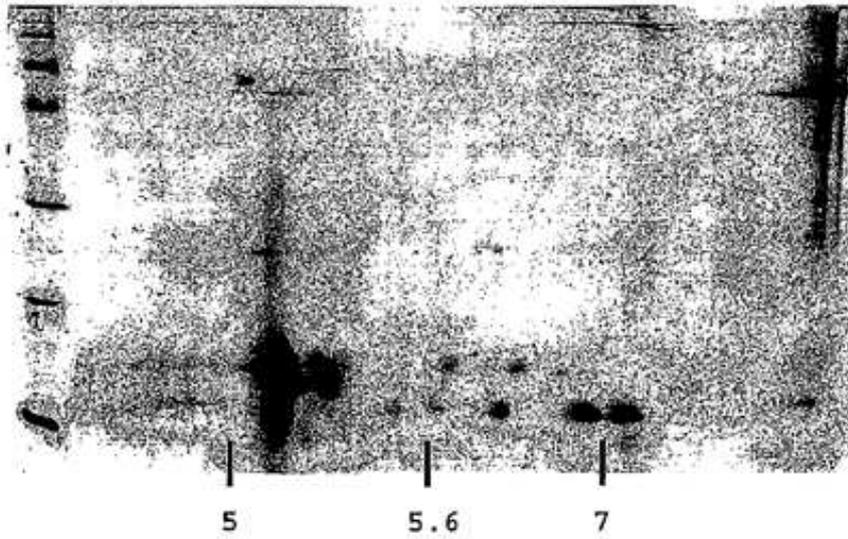


Figura 34

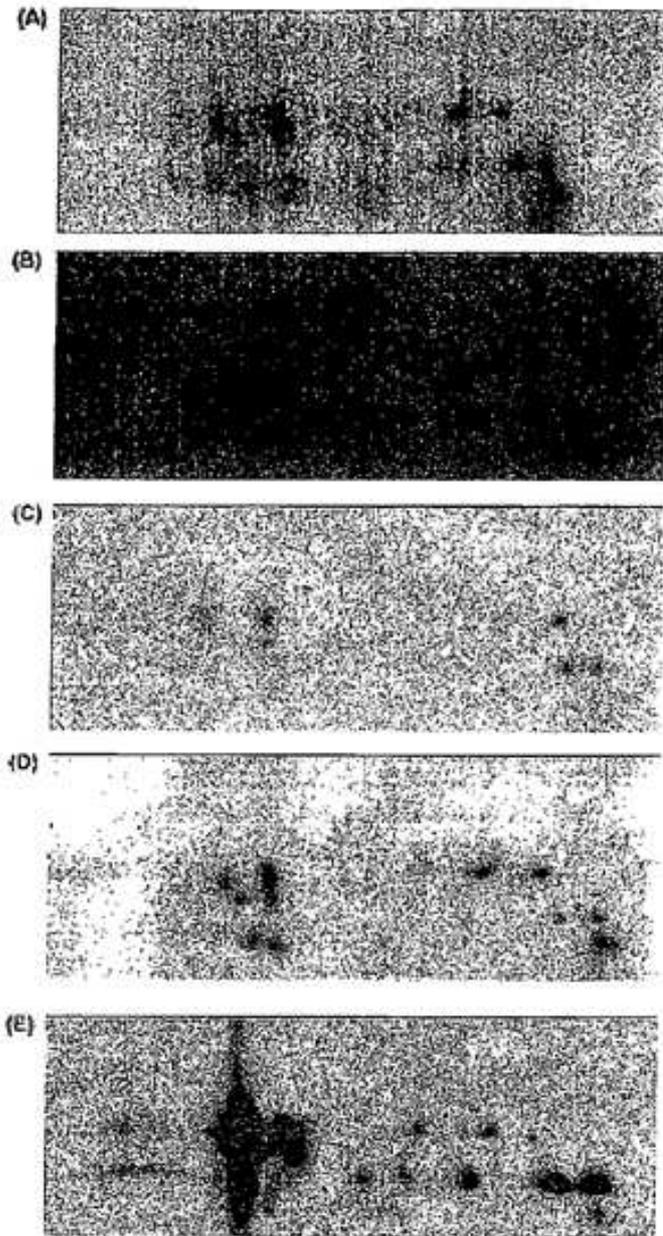


Figura 35