

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 867**

51 Int. Cl.:

C12C 5/00 (2006.01)

C12H 1/22 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

C12N 9/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2007 PCT/EP2007/056259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2007 WO07101888**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2007 E 07730303 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2041256**

54 Título: **Proceso de elaboración de cerveza mejorado**

30 Prioridad:

13.07.2006 EP 06117178

27.02.2007 US 903539 P

04.05.2007 US 924236 P

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

20.11.2017

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

NGUYEN, MINH-TAM;

EDENS, LUPPO y

ROON, VAN, JEROEN, LOUIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 867 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

Proceso de elaboración de cerveza mejorado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de elaboración de cerveza. En particular, se refiere a un método acelerado de elaboración de cerveza que implica una proteasa específica de prolina.

Antecedentes de la invención

10 En el proceso de elaboración de cerveza tradicional, el mosto obtenido extrayendo malta se inocula con levadura de cerveza y se deja que avance la fermentación durante aproximadamente 7 días con una temperatura máxima entre 8-15 °C dependiendo de si se usa un proceso de fermentación en frío o en caliente. Esta fermentación también se conoce como fermentación primaria. Una vez se completa la fermentación y la mayoría de los azúcares fermentables han sido convertidos en alcohol, se sedimentan las levaduras. En el caso de la cerveza de fermentación baja, las levaduras se recogen en el fondo de la fermentación, en otras cervezas se recogen en la parte superior de la fermentación. La cerveza "verde" resultante de esta fermentación primaria todavía contiene algunas levaduras no sedimentadas, además de niveles relativamente altos de componentes de aroma no deseables, en particular dicetonas, tales como diacetilo y acetil aldehído.

15 La conversión de estos últimos componentes de aroma no deseables en compuestos de sabor soso es un aspecto importante de la posterior fase de maduración de la cerveza. Especialmente la reducción de diacetilo, un compuesto con un sabor extraño mantecoso, en acetoina insípida es un proceso que requiere tiempo, pero de suma importancia. En el proceso de cerveza convencional, esta etapa de maduración tiene lugar durante aproximadamente una semana. En la fase posterior de la elaboración de la cerveza, la llamada fase de estabilización, la cerveza es retenida para promover la formación de agregados de proteína-polifenol, seguido de la eliminación de los agregados precipitados. Estos agregados de proteína-polifenol consisten en polifenoles y proteínas ricas en prolina, las denominadas proteínas que activan la turbidez, de la malta. La agregación y posterior precipitación de estos agregados se facilita durante la fase de estabilización enfriando la cerveza a 0 o incluso -2 °C durante aproximadamente 7 a 10 días. Según Narziss (Narziss, L. 1990 Ferment. 3, 54-62), el último periodo de estabilización en frío es indispensable. Después de eliminar la materia precipitada, los polifenoles y/o proteínas que activan la turbidez no precipitados son normalmente eliminados para prevenir la formación de una "turbidez en frío" en el producto envasado. Para este fin, los polifenoles residuales no precipitados pueden ser eliminados por absorción a polivinilpolipirrolidona (PVPP) y/o las proteínas que activan la turbidez restantes pueden ser eliminadas por absorción a gel de sílice. Más adelante, la PVPP y/o gel de sílice, que comprenden respectivamente los polifenoles y/o proteínas que activan la turbidez absorbidos, pueden eliminarse junto con la eliminación de cualquier levadura residual, por filtración en tierra de diatomeas.

20 En general, el proceso de producción de cerveza convencional anteriormente descrito dura aproximadamente 20 días. El producto resultante es completamente claro y estable de manera que no se producen cambios visibles durante su estabilidad en anaquel comercial.

25 Para aumentar la flexibilidad de la fábrica de cerveza y para ahorrar costes de capital, con los años se ha trabajado mucho para minimizar las fases de fermentación, maduración y de estabilización en el proceso de elaboración de cerveza (Narziss, L. 1990 Ferment, 3, 54-62). Por ejemplo, en el proceso de "fermentación a presión", la fermentación y maduración son aceleradas aumentando las temperaturas de fermentación y maduración: normalmente a temperaturas de aproximadamente 14-18 °C. En este enfoque, la fermentación más maduración se completan en el plazo de un periodo de 7 días. El proceso de producción completo, es decir, que incluye la estabilización, es considerablemente acortado a ligeramente más de 2 semanas. Sin embargo, las cervezas resultantes pueden desarrollar un sabor ligeramente a levadura y en general una clasificación de aroma menos favorable.

30 En la alternativa popular, el denominado proceso de "fermentación en frío-maduración en caliente", se obtienen cervezas con un sabor superior que se adhieren al proceso de fermentación a baja temperatura convencional. El tiempo de procesamiento más corto deseado se logra elevando la temperatura de la fase de maduración a 18 a 22 °C. Como resultado, el sabor verde de la cerveza fresca se supera en el plazo de un periodo de 2 a 3 días. La estabilización de la cerveza se logra por métodos convencionales. Aunque las cervezas obtenidas tienen una calidad excelente, los costes de energía de este proceso son relativamente altos.

35 En otro enfoque más para acelerar la maduración de la cerveza, la cerveza verde es minuciosamente centrifugada para eliminar levaduras y entonces se pasa a través de biorreactores que contienen altas densidades de levaduras inmovilizadas. En combinación con una etapa de calentamiento anaerobia a 90 °C, todo el diacetilo se reduce a acetoina en el plazo de un periodo de 1-2 horas. También se estabiliza esta cerveza rápidamente madurada con el periodo de almacenamiento en frío usual y tratamiento con PVPP o gel de sílice. Este enfoque de biorreactor es, sin embargo, propenso a generar aromas extraños a levadura y es probable que los gastos de capital sean altos debido a que se requiere equipo tecnológico avanzado.

Además, la introducción de enzimas recientemente desarrolladas que se añaden durante la fase de fermentación de la cerveza está empezando a tener un impacto sobre la fabricación de la cerveza. En un enfoque muy reciente, se usa una endoproteasa específica de prolina como una alternativa al tratamiento con PVPP o gel de sílice para prevenir la formación de turbidez en frío (documento EP 1 326 957). Durante la fermentación de la cerveza, la enzima hidroliza selectivamente las proteínas ricas en prolina que activan la turbidez, previniendo así la precipitación de complejos de proteína-polifenol. Ventajas informadas de este método son el hecho de que la PVPP o el gel de sílice son redundantes debido a que la turbidez en frío es eficazmente prevenida por la enzima. Además, el método da una etapa de procesamiento considerablemente simplificada durante esta etapa final y la más vulnerable en el procesamiento de la cerveza, pero no tiene efecto significativo sobre la duración del proceso de elaboración de cerveza. En la práctica, las reacciones entre PVPP y los polifenoles y/o entre el gel de sílice y las proteínas que activan la turbidez son casi instantáneas. La eliminación del tratamiento con PVPP o gel de sílice, por tanto, no da un proceso de elaboración de cerveza más corto. En otro enfoque enzimático, una enzima adicional tal como una carboxipeptidasa que escinde prolina y/o una endoproteasa que escinde glicina puede añadirse a un proceso de producción de cerveza, además de endoproteasa específica de prolina para disminuir adicionalmente la formación de turbidez (véase el documento WO3/104382).

En otro enfoque enzimático más, la enzima alfa-acetolactato descarboxilasa se añade al mosto con posos. Esta adición previene la formación de diacetilo durante la fermentación de la cerveza de manera que el periodo de maduración, que pretende principalmente reducir los niveles de diacetilo, puede reducirse 2 a 3 días (véanse los documentos US 5.108.925 y US 4.708.875).

Aunque existen muchos informes sobre el acortamiento de la fase de maduración de la producción de cerveza, hasta la fecha no están disponibles informes sobre los métodos viables para acelerar la fase de estabilización de la cerveza. Sin embargo, este periodo de estabilización normalmente dura aproximadamente una semana a temperaturas de aproximadamente 0 °C interrumpiendo capacidad considerable y requiriendo entrada de energía considerable. El documento WO2005/027953, por ejemplo, desvela un proceso para la producción de cerveza en el que se añade una endoproteasa específica de prolino para reducir los niveles de epítopes de gluten. La fermentación de la cerveza fue seguida de una maduración en frío de 5 días.

Obviamente, sería de gran importancia económica acortar y simplificar adicionalmente el proceso de producción de cerveza. Un proceso de producción acortado y simplificado tal se añadiría a la flexibilidad de las plantas de elaboración de cerveza, reduciendo así los costes fijos, además de los laborales.

Sumario de la invención

Según la invención, se proporciona el uso de una proteasa específica de prolina para la aceleración de un proceso de elaboración de cerveza, preferentemente acortando el periodo de fermentación baja.

La invención también proporciona:

- un método de aceleración de un proceso de elaboración de cerveza que comprende preparar una cerveza en presencia de una proteasa específica de prolina, en el que se acorta el periodo de fermentación baja; y
- un método para la producción de cerveza que comprende fermentar un mosto en presencia de una proteasa específica de prolina, seguido de una fase de maduración y fase de estabilización, en el que la fase de estabilización tiene una duración inferior a 5 días.

Además, la invención proporciona una cerveza obtenible por un método de la invención y una botella, barril o lata que comprende una cerveza tal.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la intensidad de dispersión normalizada acumulada en función del tamaño de partícula medido por PCS en cervezas de diez meses de la planta piloto de IFBM.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de una proteasa específica de prolina para acelerar el proceso de elaboración de cerveza. En particular, se refiere al uso de una proteasa específica de prolina para acelerar el proceso de elaboración de cerveza acortando y simplificando la fase de estabilización de la producción de cerveza.

La fase de estabilización también puede ser llevada a cabo a una temperatura más alta que en procesos de elaboración de cerveza convencionales. En efecto, por tanto, la invención se refiere a un proceso en el que la fase de post-fermentación del proceso de elaboración de cerveza se acorta en comparación con los procesos del estado de la técnica y/o a una temperatura más alta que los procesos del estado de la técnica. Por consiguiente, la invención también se refiere a un método de aceleración del proceso de elaboración de cerveza que comprende llevar a cabo el proceso en presencia de una proteasa específica de prolina. En un proceso tal, la fase de

estabilización puede ser más corta y/o llevarse a cabo a una temperatura más alta en comparación con los procesos de elaboración de cerveza convencionales.

Se usan una gran variedad de procesos de elaboración de cervezas en el mundo. Normalmente, sin embargo, todos estos procesos comprenden básicamente al menos las siguientes etapas, o estadios correspondientes a las mismas:

- 5 • Fermentación
- Maduración
- Estabilización
- Filtración (sin embargo, algunos procesos no usan filtración)

10 El proceso comprende opcionalmente una etapa o etapas adicionales para aumentar adicionalmente la estabilidad, por ejemplo la estabilidad en anaquel. A este respecto, puede usarse cualquier técnica conocida, por ejemplo, el uso de un tratamiento de polivinilpirrolidona (PVPP) y/o gel de sílice. Normalmente, una etapa adicional tal puede llevarse a cabo entre la fase de estabilización y de filtración final, aunque una etapa tal podría llevarse a cabo en alguna otra parte del proceso.

15 Los detalles de cada etapa de proceso podrían diferir considerablemente en los diferentes procesos, y al llevar a cabo un proceso de elaboración de cerveza, el experto en la materia tendrá sus propias definiciones para cada fase. Para evitar cualquier falta de claridad, en el contexto de la presente invención, los términos fermentación, maduración, estabilización, tratamiento con PVPP y con gel de sílice y filtración pretenden ser los mismos que los desvelados en la descripción. Obsérvese que en algunos procesos la fermentación también se conoce como fermentación primaria. La fase de fermentación es la fase en la elaboración de la cerveza prevista para fermentar los azúcares disponibles en alcohol por las levaduras añadidas. La fase de maduración también se conoce como fermentación secundaria y está prevista para convertir los componentes de aroma no deseables tales como dicetonas en componentes de mejor sabor. La fase de estabilización pretende promover la formación de agregados de polifenol-proteína y permitir su precipitación. El tratamiento con PVPP y/o con gel de sílice, si se usa, pretende eliminar respectivamente polifenoles y proteínas que activan la turbidez no precipitados para convertir el producto envasado en más estable en anaquel. Finalmente, la etapa de filtración, si se usa, pretende eliminar polifenoles y proteínas que activan la turbidez precipitados, cualquier levadura residual, el PVPP y/o gel de sílice antes del envasado.

25 Generalmente, durante la elaboración de la cerveza pueden comprobarse varios parámetros. El fin de la fase de fermentación puede, por ejemplo, determinarse midiendo la densidad de la cerveza que se prepara, para determinar la reducción en el extracto fermentable, tal como la cantidad de glucosa. El fin de la fase de fermentación se considera generalmente el comienzo de la fase de maduración. El fin de la fase de maduración, y así el comienzo de la fase de estabilización, pueden normalmente determinarse midiendo la cantidad de diacetilo presente en la cerveza. Sin embargo, en la práctica, esto puede variar dependiendo del tipo de cerveza deseado. Por ejemplo, en algunas fábricas de cerveza la fase de maduración se considera terminada una vez el nivel de dicetonas vecinales está por debajo de aproximadamente 0,10 mg/l y en otras una vez el nivel de dicetonas vecinales está por debajo de aproximadamente 0,05 mg/l. Por consiguiente, un experto será capaz de definir el fin de la fase de maduración y el comienzo de la fase de estabilización según un nivel de dicetonas vecinales deseado.

30 En el contexto de la presente invención, el comienzo de la fase de estabilización puede definirse como el momento donde los niveles de diacetilo han sido reducidos a menos de aproximadamente 0,10 mg/ litro si se miden según el método de EBC 9.24.1 Dicetonas vecinales en la cerveza: Método espectrofotométrico. En el contexto de la presente invención, el fin del periodo de estabilización se define como el momento donde la cerveza se somete a su etapa de filtración final, o en el supuesto caso de que un tratamiento con PVPP y/o con gel de sílice sea parte del proceso de elaboración de la cerveza, una vez la cerveza se pone en contacto con PVPP y/o gel de sílice. Si el proceso es uno en el que no se lleva a cabo filtración, el fin del periodo de estabilización se define como el momento en el que la cerveza se envasa.

35 Según una realización de la presente invención, el tiempo necesario para la estabilización puede ser acortado a menos de aproximadamente 5 días. Preferentemente, es menos de 4 o 3 días. Más preferentemente, se acorta a menos de 2 o 1 días. Lo más preferentemente, se acorta a un grado tal que en la escala de producción, la duración de la estabilización se reduce al equivalente del periodo requerido para enfriar la cerveza desde la fase de maduración hasta la temperatura deseada, por ejemplo la temperatura deseada para la filtración y/o el envasado de la cerveza. Este periodo se denomina convencionalmente el periodo de enfriamiento. Acortar el periodo de estabilización al tiempo necesario para enfriar la cerveza hasta la temperatura deseada es altamente ventajoso, ya que entonces la duración de la fase de estabilización solo depende de la capacidad de enfriamiento disponible.

40 La cerveza de la fase de maduración se enfría tradicionalmente a una temperatura de aproximadamente -2 °C hasta e incluyendo aproximadamente 0 °C. Sorprendentemente, se ha encontrado que, tras el uso de una proteasa específica de prolina según la invención, la fase de estabilización puede no solo ser acortada, sino que también

- 5 puede realizarse a una temperatura más alta que la convencionalmente usada. Tradicionalmente, hay procesos de estabilización que se llevan a cabo a temperaturas más altas, pero estos procesos necesitan mucho más tiempo, por ejemplo 6 semanas y más. Por tanto, en otra realización de la invención, el periodo de estabilización, que puede normalmente ser un periodo de estabilización acortado como se ha definido anteriormente, se realiza en una cerveza preferiblemente enfriada a como máximo aproximadamente 2 °C, más preferentemente a como máximo aproximadamente 3 °C, 4 °C, 5 °C o 6 °C o incluso más preferentemente a como máximo aproximadamente 7 °C o aproximadamente 8 °C, y lo más preferentemente a la temperatura deseada usada para el envasado, es decir, para el llenado de botellas o barriles.
- 10 La temperatura deseada para el envasado puede diferenciarse de proceso a proceso, pero se lleva a cabo preferentemente a una temperatura hasta e incluyendo 8 °C, preferentemente aproximadamente 7 °C, con el fin de obtener el nivel deseado de dióxido de carbono disuelto en la cerveza. En un proceso donde la cerveza solo se enfría a la temperatura requerida para el envasado, se requiere considerablemente menos energía que en los procesos conocidos en la técnica.
- 15 En una realización preferida según la invención, la fase de estabilización se reduce al periodo requerido para enfriar la cerveza desde la temperatura al final de la fase de maduración hasta la temperatura deseada para el envasado, omitiendo así el periodo de estabilización en frío convencional.
- 20 Según la invención, por tanto, la cerveza puede enfriarse a como máximo aproximadamente 2 °C, más preferentemente a como máximo aproximadamente 3 °C, 4 °C, 5 °C o 6 °C, incluso más preferentemente a como máximo aproximadamente 7 °C o 8 °C y lo más preferentemente a la temperatura deseada usada para el envasado. La cerveza puede entonces envasarse directamente, es decir, en esta realización, la cerveza no se mantiene durante ningún periodo de tiempo a la temperatura a la que se ha enfriado.
- 25 En la invención, pueden llevarse a cabo etapas de procesamiento adicionales para lograr la clarificación y/o estabilidad adicionales, si se requiere. De hecho, si se usa una fase de estabilización acortada que se corresponde con el periodo requerido para enfriar la cerveza a la temperatura deseada para el envasado, puede desearse tratar la cerveza con PVPP y/o gel de sílice, por ejemplo. Esto puede ayudar a garantizar la estabilidad en anaquel prolongada.
- 30 La cerveza estabilizada según la presente invención puede ser adicionalmente procesada para lograr un nivel de clarificación y estabilidad que hace el producto aceptable para venta. Esto se logra generalmente usando una etapa de tratamiento adicional. También puede usarse una etapa de filtración. Ésta es normalmente la etapa final en el proceso de elaboración de la cerveza antes del envasado.
- 35 Puede usarse cualquier técnica conocida a este respecto. Por ejemplo, tal tratamiento de clarificación y/o estabilidad adicional puede lograrse usando un tratamiento adsorbente adecuado, tal como tratamiento con PVPP, gel de sílice, galotánicos o agarosa insoluble reticulada inmovilizada. El uso de estos tratamientos y su aplicación a la elaboración de cerveza es bien conocido para aquellos expertos en la materia. La PVPP normalmente se añade a una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 g/hl. El gel de sílice normalmente se añade a una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 g/hl.
- 40 Ejemplos de agarosas insolubles reticuladas inmovilizadas incluyen los sistemas de estabilización combinados descritos en los documentos WO97/43401 y US 6.001.406 y la resina del sistema de estabilización combinado fabricada por GE Health Care Bioscience AB (véase Taylor et al. 2006, Use of the Combined Stabilisation System and its impact on beer composition, Proceedings of the Institute of Brewing and Distilling, Asia Pacific Section, Hobart, Australia). Alternativamente, o además, podría usarse un tratamiento enzimático, tal como tratamiento con papaína, para lograr estabilidad y/o claridad adicionales.
- 45 Los tratamientos descritos anteriormente pueden usarse en una forma inmovilizada, por ejemplo partículas de PVPP inmovilizadas.
- 50 Todos los tratamientos adicionales explicados anteriormente pueden usarse conjuntamente con el procedimiento de estabilización de la invención. Puede usarse una combinación de los tratamientos adicionales, por ejemplo dos, tres, cuatro o todos de tales tratamientos adicionales, conjuntamente con el procedimiento de estabilización de la invención.
- 55 Convenientemente, tal tratamiento de clarificación y/o estabilidad adicional puede llevarse a cabo una vez una cerveza ha sido estabilizada según la invención. La invención también se refiere, sin embargo, a procesos en los que un tratamiento de clarificación y/o estabilidad adicional se lleva a cabo en algún otro punto en el proceso o simultáneamente con estabilización según la invención.
- En una realización preferida de la invención, se usa la endoproteasa específica de prolina como se desvela en el documento EPA-1326957, haciendo así opcionalmente el tratamiento con PVPP y de sílice superfluos y haciendo redundantes los costes inherentes para equipo para la regeneración de PVPP y los costes laborales asociados a la operación de este equipo. Adicionalmente, se aumenta el potencial antioxidante natural de la cerveza y mejora la

estabilidad coloidal marginal de muchas cervezas tratadas con PVPP o gel de sílice. Además, se reduce drásticamente el riesgo de exposición a oxígeno de la bebida y se minimizan las corrientes residuales.

En una realización preferida de la presente invención, este acortamiento de la fase de estabilización se combina con un acortamiento de la fase de maduración (la fase que principalmente pretende convertir el diacetilo en acetoína). En el contexto de la presente invención, el comienzo de la fase de maduración se define en lo sucesivo como el momento donde el grado de atenuación aparente alcanza de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, más preferentemente de aproximadamente el 77 a aproximadamente el 84 %, como se estima usando una medición de densidad de la cerveza. La densidad de la cerveza puede medirse por un picnómetro o un medidor de densidad (métodos de EBC 8.2.1 y 8.2.2 respectivamente) y el límite de atenuación se determina según el método de EBC 8.6.1 u 8.6.2 (Fermentabilidad, límite de atenuación del mosto). En el contexto de la presente invención, el fin de la fase de maduración puede definirse como el momento donde los niveles de diacetilo han sido reducidos a menos de aproximadamente 0,10 mg/litro si se miden según el método de EBC 9.24.1 Diketonas vecinales en la cerveza: Método espectrofotométrico. La fase de maduración puede ser acortada por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la maduración puede ser acelerada usando temperaturas altas como se describe para los procesos de "fermentación a presión" y de "fermentación en frío-maduración en caliente" (Narziss, L. 1990 Ferment, 3, 54-62). La maduración también puede ser acortada usando levaduras inmovilizadas en un enfoque de biorreactor o empleando actividad de acetolactato descarboxilasa (ALDC: EC 4.1.1.5.; véanse, por ejemplo, los documentos US 5.108.925 o US 4.708.875). Usando uno o una combinación de estos métodos, la maduración puede limitarse a dos días, un día o incluso menos de un día como sea factible usando un biorreactor operado a una temperatura alta.

En el contexto de la presente invención, la fase que incorpora tanto las fases de maduración como de estabilización de la producción de cerveza se llama el periodo de fermentación baja.

Por consiguiente, la invención proporciona el uso de una proteasa específica de prolina para acelerar un proceso de elaboración de cerveza. Normalmente, la aceleración se produce a modo de un acortamiento del periodo post-fermentación, por ejemplo por acortamiento de la duración del periodo de fermentación baja, preferentemente reduciendo el periodo de estabilización.

Los términos "acelerar" y "acortar" en este contexto están previstos para indicar un proceso de elaboración de cerveza que necesita menos tiempo para ser llevado a cabo en comparación con un proceso equivalente donde no se usa una proteasa específica de prolina. La aceleración generalmente se produce como consecuencia de un periodo de post-fermentación acortado, es decir, ese periodo puede llevarse a cabo durante menos tiempo si se usa una proteasa específica de prolina en comparación con un proceso equivalente que no usa una enzima tal.

Si el uso de la invención se combina con medidas para acortar la fase de maduración, el periodo de fermentación baja completo puede ser restringido a menos de 8, 7 o 6 días. Preferentemente, se restringe a menos de 5, 4 o 3 días. Más preferentemente, se restringe a menos de 2 días. Incluso más preferentemente, el periodo de fermentación baja completo se restringe a menos de 24 horas.

En una realización preferida de la presente invención, un periodo de fermentación baja que se restringe a 4 días o menos puede lograrse combinando una proteasa específica de prolina con una acetolactato descarboxilasa, por ejemplo una alfa-acetolactato descarboxilasa.

En una realización preferida, la proteasa específica de prolina y, opcionalmente, la acetolactato descarboxilasa, se añaden a la fermentación primaria. Después de esta fermentación primaria, la cerveza verde puede someterse a un procedimiento de maduración rápida y entonces, después de que los niveles de diacetilo se hayan reducido a menos de aproximadamente 0,10 mg/litro, la cerveza puede ser inmediatamente enfriada a aproximadamente 2 °C, preferentemente a aproximadamente 5 °C, más preferentemente a aproximadamente 7 °C, y lo más preferentemente a una temperatura adecuada para el envasado y entonces, opcionalmente, filtrarse para obtener una cerveza clarificada, lista para el embotellado. De esta forma, puede lograrse una aceleración de la fase de post-fermentación, y también del proceso de elaboración de cerveza global.

Las ventajas del proceso según la invención se aplican a cervezas de fermentación baja fermentadas en la parte superior, además de a las fermentadas en la parte inferior. Las cervezas fermentadas en la parte superior fermentan y maduran muy rápidamente pero, al igual que las cervezas fermentadas en la parte inferior, requieren largos periodos de almacenamiento en frío para eliminar los complejos de polifenol-proteína. Las ventajas del proceso según la invención se aplican particularmente a cervezas de fermentación baja fermentadas en la parte inferior. El uso y método de la invención también pueden aplicarse a cervezas en las que ha tenido lugar fermentación espontánea.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método en el que la proteasa específica de prolina se usa según la invención. Es decir, la invención proporciona un método de aceleración de un proceso de elaboración de cerveza, preferentemente reduciendo la duración del periodo de fermentación baja (tal como reduciendo la duración del periodo de estabilización), método que comprende llevar a cabo dicho proceso de elaboración de cerveza en presencia de una proteasa específica de prolina. La fase de fermentación baja, por ejemplo la fase de estabilización, puede llevarse a cabo a temperatura superior a la normalmente usada en los procesos de elaboración de cerveza

convencionales. Normalmente, la duración de la fase de estabilización será el tiempo requerido para enfriar la cerveza desde la fase de maduración hasta la temperatura de envasado.

En el contexto de la presente invención, las palabras péptido y proteína se usan indistintamente. En el contexto de la presente invención, las palabras "niebla", "opacidad" y "turbidez" también se usan indistintamente.

- 5 Para determinar el momento donde el grado aparente de atenuación alcanza de aproximadamente el 77 a aproximadamente el 84 %, se usa la medición de densidad de la cerveza. Se usa el método de EBC 9.24.1 Dicetonas vecinales en la cerveza: Método espectrofotométrico para cuantificar los niveles de diacetilo. Obsérvese que el método de EBC 9.24.1 se diseña para medir dicetonas en general, sin embargo como el diacetilo es con creces el principal componente de las dicetonas, por tanto en el contexto de la presente invención el resultado de este método de medición se considera indicativo del nivel de diacetilo. El nivel de diacetilo puede medirse
10 alternativamente con un cromatograma de gases usando el método de EBC 9.24.2 Dicetonas vecinales en la cerveza. Para cuantificar la cantidad de turbidez en una bebida, puede usarse un turbidímetro. En un turbidímetro se mide la cantidad de luz que es dispersada a un ángulo prescrito con respecto a la dirección del haz de luz incidente. Se sabe que las mediciones de turbidez son muy adecuadas para la medición de turbidez formada como resultado
15 de las interacciones proteína-polifenol.

Un polifenol se define como un compuesto que tiene una estructura química cuya estructura contiene al menos dos anillos aromáticos sustituidos con al menos un grupo hidroxilo o que tiene una estructura química que contiene al menos un anillo aromático sustituido con al menos dos grupos hidroxilo. Ejemplos de polifenoles son taninos y flavonoides, que incluyen, por ejemplo, catequinas, flavonoles y antocianinas.

- 20 El término "cerveza", como se usa en el presente documento, pretende cubrir al menos la cerveza preparada a partir de mezclas preparadas a partir de cereales no malteados, además de todas las mezclas preparadas a partir de cereales malteados, y todas las mezclas preparadas a partir de una mezcla de cereales malteados y no malteados. El término "cerveza" cubre las cervezas fermentadas en la parte inferior, pero también las fermentadas en la parte superior, además de las cervezas preparadas con auxiliares, y cervezas con todos los posibles contenidos de alcohol.
25

- La cantidad de proteasa específica de prolina que se añade durante la fermentación puede variar dependiendo de los niveles de malta usados y el tipo de fermentación llevada a cabo. En una realización preferida del uso y/o método según la invención, se añaden de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 15 unidades (PPU), por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 12,5 unidades (PPU) de actividad de endoproteasa específica de prolina,
30 por hectolitro de una cerveza 100 % malta a, por ejemplo, aproximadamente 12 grados Plato. No puede especificarse una cantidad máxima de actividad de proteasa específica de prolina que va a añadirse. La cantidad máxima es, por ejemplo, dependiente de la cantidad deseada de reducción o prevención de turbidez, la composición de la cerveza en el pH al que la proteasa tiene su actividad máxima. La definición de unidad de la enzima se proporciona en la sección Materiales y métodos de la presente solicitud.

- 35 La proteasa específica de prolina puede añadirse a diferentes estadios durante la preparación de una cerveza. La adición de la enzima al principio de la fermentación da los mejores resultados posibles. Sin embargo, la enzima puede añadirse a una mezcla o a una cerveza fermentada antes de que se haya formado la turbidez.

- En este texto, los términos proteasa específica de prolilo, proteasa específica de prolina, endoproteasa específica de prolina, endopeptidasa específica de prolina y proteasa que tiene una actividad específica de prolilo o expresiones
40 similares se usan indistintamente.

- La proteasa específica de prolina puede usarse en la invención en una forma aislada o purificada. Por "aislada" o "purificada" está prevista una proteasa específica de prolina eliminada de su entorno nativo. Por ejemplo, la proteasa específica de prolina recombinantemente producida expresada en células hospedadoras se considera aislada con el fin de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido sustancialmente purificados por
45 cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación de una única etapa desvelado en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

- Una proteasa específica de prolina adecuada para su uso en la invención puede recuperarse de cultivos celulares recombinantes por métodos muy conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido y métodos cromatográficos tales como
50 cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una proteasa específica de prolina adecuada para su uso en la invención puede ser un producto naturalmente purificado, un producto o una síntesis química, un producto producido por una técnica recombinante a partir de un hospedador procarionta o eucariota, que incluye, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, fúngicas, de plantas superiores, de insecto y de mamífero.

- 55 Se entenderá, sin embargo, que la proteasa puede ser mezclada con vehículos o diluyentes que no interferirán con el fin previsto de la enzima y todavía se considerará como aislada. Una proteasa específica de prolina adecuada para su uso en la invención también puede estar en una forma más sustancialmente purificada. Por consiguiente, la

proteasa específica de prolina puede estar comprendida en una preparación en la que más del 70 %, por ejemplo más del 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, de las proteínas en la preparación es una proteasa específica de prolina.

Normalmente, la proteasa específica de prolina puede estar en una forma libre de o sustancialmente libre de cualquier otra proteasa.

- 5 Una proteasa específica de prolina adecuada para su uso en la invención puede usarse en una forma inmovilizada de manera que puedan tratarse grandes cantidades de proteína que contienen líquidos. Las formas para seleccionar materiales de soporte apropiados y métodos de inmovilización adecuados han sido ampliamente descritas en la bibliografía, por ejemplo en "Immobilization of Enzymes and Cells" (ed. Gordon F. Bickerstaff; ISBN 0-89603-386-4).

10 En el contexto de la presente invención, una proteasa específica de prolina se define como una proteasa que corta proteínas o péptidos en sitios donde la proteína o péptido contiene un resto de prolina en su cadena. Preferentemente, una proteasa específica de prolina es una endoproteasa que "corta" (hidroliza) proteínas o péptidos en sitios donde la proteína o péptido contiene un resto de prolina. En el método según la invención, se usa preferentemente una endoproteasa específica de prolina que hidroliza el enlace peptídico en el extremo carboxi de restos de prolina. Ejemplos de tales enzimas son prolil oligopeptidasas (EC 3.4.21.26), además de la prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus niger* informada en J. Agric Food Chem, Vol 53 (20), 7950-7957, 2005) y las dipeptidil peptidasas específicas de prolina tales como DPP IV (EC 3.4.14.5). Una endoproteasa específica de prolina que corta restos de prolina en su extremo NH₂ se describe, por ejemplo, en una publicación en Nature del 15 de enero de 1998, Vol. 391, p. 301-304.

20 Como es típico para actividades de enzima, la actividad de endoproteasas específicas de prolina depende del pH. Normalmente, se usa en la invención una endoproteasa específica de prolina que tiene una actividad específica de prolilo máxima a un pH que se corresponde con el pH de la cerveza (o mezcla o mosto, etc.) a la que se añade. En una realización preferida del método según la invención, una proteasa con un óptimo de pH ácido, es decir, con un óptimo de pH de 6,0 o más bajo - por ejemplo pH 5, 4, o 3 - se añade a la fermentación primaria de la cerveza. En una realización más preferida del uso y/o método según la invención, se añade una proteasa con un óptimo de pH ácido y que es secretada activamente por un microorganismo de calidad alimentaria en el caldo de fermentación a la fermentación de la cerveza.

30 Las proteasas específicas de prolina se encontraron ampliamente en animales y plantas, pero su presencia en microorganismos parece estar limitada. Hasta la fecha, se han identificado proteasas específicas de prolina en especies de *Aspergillus* (documento EP 0 522 428), *Flavobacterium* (documento EP 0 967 285) y *Aeromonas* (J. Biochem, 113, 790-796), *Xanthomonas* y *Bacteroides*. Aunque las enzimas específicas de prolina de la mayoría de estos organismos son activas a aproximadamente pH 8, la enzima de *Aspergillus* es óptimamente activa a aproximadamente pH 5. La proteasa específica de prolina de la invención puede aislarse de una de las especies microbianas anteriormente mencionadas, particularmente de una especie de *Aspergillus*. Preferentemente, la endoproteasa específica de prolina se aísla de una cepa de *Aspergillus niger*. Más preferentemente, la endoproteasa específica de prolina se aísla de un hospedador de *Aspergillus niger* manipulado para expresar en exceso un gen que codifica una endoproteasa específica de prolina, aunque otros hospedadores, tales como *E. coli*, son vectores de expresión adecuados. Por ejemplo, la clonación y producción en exceso de la endoproteasa específica de prolina derivada de *Flavobacterium* en, entre otros, *E. coli*, ha proporcionado ciertas endoproteasas específicas de prolina en una forma pura. Un ejemplo de una construcción de producción en exceso tal se proporciona en World Journal of Microbiology & Biotechnology, Vol 11, pp 209-212. Se usa preferentemente un hospedador de *Aspergillus niger* para producir una auto-construcción no recombinante que utiliza promotores de *A. niger* para accionar la expresión de un gen que codifica una endoproteasa específica de prolina de *A. niger*.

45 Lo más preferentemente, la endoproteasa específica de prolina es la endoproteasa como se desvela en el documento EPA-1326957, proteasa que se incorpora en el presente documento por referencia. En el documento EPA-1326957, también se desvela el uso de la endoproteasa específica de prolina en la elaboración de cerveza. En ese documento, sin embargo, solo se desvela el uso para reducir la turbidez en bebidas. No se ha desvelado que la endoproteasa específica de prolina pudiera usarse para acelerar el proceso de elaboración de cerveza como tal. Además, para el experto en la materia, el tratamiento con PVPP y/o con gel de sílice es conocido por ser instantáneo. No se han desvelado métodos en los que se acortó el periodo de fermentación baja o el periodo de estabilización. En caso de que se usara un proceso convencional sin una fase de estabilización apropiada, sería evidente para el experto en la materia que esto produciría cervezas de mala calidad, por ejemplo con respecto a la estabilidad coloidal y claridad. Fue, por tanto, sorprendente que, tras el uso de una endoproteasa específica de prolina en la elaboración de cerveza, el proceso pudiera ser acortado sin efectos perjudiciales sobre la calidad de la cerveza.

55 La actividad de acetolactato descarboxilasa añadida durante la fermentación puede variar entre límites conocidos para el experto en la materia. Una indicación de las actividades requeridas se proporciona en un documento por Hannemann (MBAA TQ, Vol 39, no 3, 2002, 149-155).

Las modernas fábricas de cerveza se esfuerzan por eliminar todos los polvos a granel como PVPP, gel de sílice o tierra de diatomeas del proceso de elaboración de cerveza. En este enfoque, la filtración de la tierra de diatomeas

final se sustituye por una filtración en membrana o filtración de flujo cruzado. Según otra realización de la invención, el proceso de producción de cerveza según la invención puede llevarse a cabo sin el uso de ningún polvo a granel como PVPP o hidrogel de sílice o tierra de diatomeas para la filtración. Por consiguiente, la cerveza preparada según el uso y/o método de la invención puede estar libre de, o sustancialmente libre de, PVPP y/o hidrogel de sílice y/o tierra de diatomeas.

Usando el método según la invención, la cerveza puede ser clarificada usando técnicas de filtración tales como filtración de flujo cruzado. Por consiguiente, la invención cubre un proceso en el que una cerveza se prepara usando una proteasa específica de prolina en combinación con un filtro de membrana de flujo cruzado.

La presente invención se refiere a un método de elaboración de cerveza, por el cual se usa una proteasa específica de prolina, por el cual el periodo de estabilización puede ser acortado con respecto a un proceso de elaboración de cerveza en el que no se usa proteasa específica de prolina, mientras que se mantienen al menos las mismas propiedades con respecto a la claridad visual de la cerveza según la terminología de EBC 9.29 para la determinación visual.

La invención también se refiere a cerveza obtenida por el método según la invención. Normalmente, la claridad de las cervezas puede ser juzgada de diversas formas. El método de EBC 9.29 describe cómo se mide la turbidez en las cervezas. Las unidades de EBC se miden en turbidímetros con un ángulo de 90 grados. Alternativamente, puede hacerse evaluación visual. Según el método de EBC 9.29, es decir, cuando se miden las unidades de EBC con un ángulo de dispersión de 90 grados, la cerveza que tiene una turbidez inferior a 0,5 unidades de EBC será visualmente evaluada como "brillante". En caso de que la turbidez de la cerveza esté entre aproximadamente 0,5 y 1,0 unidades de EBC, la cerveza se evaluará visualmente como "muy clara", entre 2 y 1 unidades de EBC "muy ligeramente turbia", entre 2 y 4 unidades de EBC "turbia" y por encima de 8 unidades de EBC "muy turbia". Por supuesto, no debe esperarse equivalencia exacta entre las diferentes escalas de turbidez o entre observaciones visuales hechas en diferentes laboratorios, pero no puede esperarse una gran discrepancia. Además, finalmente, la inspección visual como se hace por el consumidor será importante desde un punto de vista comercial. Por tanto, se acepta generalmente que una cerveza debe ser (casi) brillante para ser comercialmente aceptable, es decir, tener un valor de unidades de EBC medido con dispersión a 90 grados de como máximo 1.

Sorprendentemente, se ha encontrado que para la cerveza preparada con el método según la invención, el valor de unidades de EBC no se correspondió con la evaluación visual por un panel entrenado. Se supuso que las cantidades más altas de proteína y polifenoles todavía presentes en la cerveza producían valores de dispersión a 90 grados más altos, pero no pueden detectarse a simple vista. Como se muestra en los ejemplos, se ha encontrado posible tener una evaluación visual de "brillante" para una cerveza que tiene un valor de unidades de EBC superior a 1 y también una evaluación visual de "casi brillante" para una cerveza que tiene un valor de unidades de EBC superior a 2, que oscila hasta incluso a 8. Es decir, la cerveza obtenida según el método de la invención tiene una composición (físico)química diferente a las cervezas convencionalmente elaboradas.

Esto ha sido confirmado usando análisis de partículas de cervezas estabilizadas por diferentes métodos. Esto mostró que las cervezas estabilizadas según la invención comprenden partículas que son más pequeñas en promedio que aquellas identificadas en cervezas estabilizadas usando PVPP o hidrogel de sílice.

Por tanto, otro aspecto de la invención es una cerveza que tiene una turbidez superior a 1 unidad de EBC, preferentemente igual o superior a 1,25, y lo más preferentemente igual o superior a 1,5, mientras que la evaluación visual por un panel entrenado usando terminología de EBC clasificará la cerveza como "brillante" inmediatamente después de la elaboración de la cerveza y medida a 1 °C. En otra realización, la invención se refiere a una cerveza que tiene una turbidez superior a 2 unidades de EBC, preferentemente superior a 3, más preferentemente superior a 4, incluso más preferentemente superior a 6, y lo más preferentemente superior a 8 unidades de EBC, mientras que la evaluación visual por un panel entrenado usando terminología de EBC clasificará la cerveza como "casi brillante" medida a 1 °C después de al menos 3 meses de almacenamiento de la cerveza a temperatura ambiente, preferentemente al menos 6 meses de almacenamiento de la cerveza o lo más preferentemente 9 meses de almacenamiento de la cerveza a temperatura ambiente.

La cerveza obtenida según el uso y/o método de la invención normalmente se envasará. Puede usarse cualquier envase adecuado, por ejemplo una botella, un barril o una lata. La cerveza preparada según el uso y/o método de la invención también puede envasarse en un tanque a granel. Por consiguiente, la invención proporciona un envase que comprende la cerveza obtenida según el uso y/o método de la invención, por ejemplo una botella, un barril o una lata que comprende una cerveza tal.

En lo sucesivo, la invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediciones de actividad de enzimas específicas de prolina

Se prueba la actividad de endoproteasas específicas de prolina que tienen óptimos de pH por debajo de pH 6,0 en el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA a 37 °C en un tampón citrato/difosfato de sodio a pH 4,6. La actividad de

endoproteasas específicas de prolina que tienen óptimos de pH neutro se prueban en el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA a 37 °C en un tampón fosfato a pH 7,0.

La actividad de dipeptidil dipeptidasas que tienen un óptimo de pH por debajo de pH 6,0 se prueban en el péptido sintético Gly-Pro-pNA a 37 °C en un tampón citrato/difosfato de sodio a pH 4,6.

- 5 La actividad de dipeptidil dipeptidasas que tienen óptimo de pH por debajo de pH 6,0 se prueban en el péptido sintético Gly-Pro-pNA a 37 °C en un tampón fosfato a pH 7,0.

Los productos de reacción de todas las proteasas específicas de prolina se monitorizan espectrofotométricamente a 405 nM. Una unidad (1 PPU) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de p-nitroanilida por minuto bajo estas condiciones de ensayo.

10 **Análisis durante el proceso de elaboración de cerveza**

Los diversos análisis se llevaron a cabo según la edición de 2004 de "Analytica - EBC" (Fachverlag Hans Carl, Núremberg, Alemania), a menos que se indique lo contrario. Los análisis de la malta se llevaron a cabo según los siguientes métodos de EBC 4-2, 4-5-1, 4-9-1, 4-3-1, 4-18, 8-13-2, 4-8, 4-15 y 4-14. La maceración se monitorizó midiendo la tasa de sacarificación y la filtración de masa de malta. Los mostos se analizaron según EBC 4-5-1, 4-7-2, 4-11, además de nitrógeno de amino libre (método de EBC 8.10), nitrógeno total (bien por el método de EBC 8.9.1 - Kjeldahl - o bien por 8.9.2 - Método de combustión de Dumas), pH y polifenol de mosto total (método de EBC 8.12). Los diversos experimentos de fermentación fueron seguidos de temperatura, disminución del extracto y presión. La población de levadura se determinó en la inoculación, primer día de fermentación y antes de la filtración de la cerveza. El diacetilo se midió por cromatografía de gases durante la fermentación, maduración y justo antes de la filtración. La filtración de la cerveza se monitorizó por recuentos de levadura antes y después de la filtración, por las disminuciones de presión relevantes y caudales. El oxígeno disuelto se midió en agua carbonatada, en cerveza la entrada y salida de filtración y en la cerveza embotellada. Los diversos análisis de cerveza incluyeron los métodos de EBC 9.4, 9.6, 9.7, 9.8, 9.11, 9.24.1, 9.24.2, 9.29, 9.30, 9.35, 9.37, Ross & Clark y NIBEM (9.42) para los valores de retención de cabeza, trans-2-nonenal, y potencia reductora. El desarrollo de turbidez fue seguido usando diversas mediciones de turbidez a diversas temperaturas (véase el Ejemplo 2) a ángulos de dispersión de 25 y 90 grados usando el medidor de turbidez VOS ROTA 90/25 (Haffmans, Venlo, Los Países Bajos). Las pruebas de caducidad se llevaron a cabo según la prueba de estabilidad en anaquel predictiva de EBC 9.30.

El proceso de elaboración de cerveza

30 Todos los experimentos de elaboración de cerveza se llevaron a cabo a una escala de 20 hl con 300 kg de malta pilsen (tipo Heineken A) y 950 l de agua para la maceración. La elaboración de cerveza incorporó un proceso de maceración con el siguiente régimen de temperaturas: 45 °C durante 20 minutos, 45 a 64 °C en 20 minutos, a 64 °C durante 15 minutos, de 64 a 76 °C en 12 minutos, a 76 °C durante 25 minutos y finalmente de 76 a 78 °C en 5 minutos, seguido de filtración de la masa de malta. Para el burbujeo se usó agua caliente. La cocción fue durante 90 minutos y se añadió lúpulo en forma de gránulos de lúpulo. Se llevó a cabo estabilización en frío en condiciones como se especificaron en los ejemplos individuales. La cerveza se filtró usando un filtro de placa recubierto con un pre-recubrimiento de grado grueso y uno de grado fino. El pre-recubrimiento de grado fino también se usó como auxiliar filtrante. Para el embotellado se usó una envasadora Carbofill. Las botellas se pasteurizaron durante 15 minutos a 60 °C.

EJEMPLOS

- 40 Ejemplo 1 (comparativo)

Producción de cerveza a escala piloto

45 En la fábrica de cerveza piloto semi-industrial de 20 hl en IFBM (Institute Français de la Brasserie et de la Malterie, Vandoeuvre-les-Nancy, Francia) se elaboraron dos mostos de malta puros en condiciones idénticas. Durante la fermentación, a uno de estos mostos se añadió una proteasa específica de prolina (Brewers Clarex de DSM Food Specialities, Delft, Los Países Bajos, que contenía 5 PPU/gramo de producto) en una concentración de 10 PPU/hectolitro de mosto, además de acetolactato descarboxilasa (Maturex L de NOVO, Bagsvaerd, Dinamarca, que contenía 1.500 ADU/gramo de producto) en una concentración de 4500 ADU/hectolitro de mosto al principio de la fermentación. Esta fermentación se designó "fermentación de ensayo". El otro mosto se fermentó como tal, y se designó la "fermentación de control".

Elaboración de cerveza

55 Las cervezas se produjeron a partir de 300 kg de malta de cebada y gránulos de lúpulo. Las condiciones de maceración fueron una relación de agua:molienda de 4:1 (vol/peso), pH 5,6. El diagrama de maceración incluyó una primera etapa a 45 °C durante 20 minutos, una segunda etapa a 64 °C durante 15 minutos, una tercera etapa a 74 °C durante 30 minutos, y finalmente un trasvase del mosto a la cuba a 78 °C durante 5 minutos. Las velocidades de calentamiento fueron 1 °C/minuto cada vez. Después del trasvase del mosto a la cuba, la mezcla de malta se

filtró en una cuba de filtración; primero se aplicaron recirculación del mosto y burbujeos en caliente (78 °C) a pH 5,6. Los mostos resultantes se cocieron durante 90 minutos, después de lo cual se realizaron buenas separaciones de precipitados con un remolino.

Fermentación

- 5 Las fermentaciones se llevaron a cabo con la cepa de levadura de la parte inferior Rh como se compró de VLB (Berlín, Alemania) inoculando con 17.10^6 células viables/ml del mosto de 12 °C Plato. El proceso de fermentación se realizó a 12 °C hasta 5 °C Plato (3 días) y luego continuó a 14 °C hasta el fin de la fermentación (3 días).

Post-fermentación

- 10 Al final de la fermentación, la fermentación de control se mantuvo a 14 °C durante tres días más para reducir los niveles de diacetilo. Después de este periodo de maduración, la cerveza se enfrió a 0 °C en un día y la cerveza se estabilizó durante 5 días a 0 °C antes del tratamiento con PVPP de un solo uso a una dosificación 30 g/hl, filtración de cerveza con tierra de diatomeas y embotellado.

- 15 Para la fermentación de ensayo, sin embargo, no se aplicó periodo de maduración. Además, el periodo de estabilización se restringió al periodo requerido para enfriar la cerveza a 4 °C. Directamente después del fin de la fermentación, la cerveza se enfrió a 4 °C durante un periodo de 4 días, siguiendo una disminución de temperatura lineal. Debido a que se usó Brewers Clarex durante la fermentación, no se añadieron agentes estabilizantes de la cerveza (tales como PVPP o gel de sílice). En su lugar, después de enfriarse las cervezas, se filtraron directamente con tierra de diatomeas, y posteriormente se embotellaron. Se ensayaron parámetros de cerveza estándar (por ejemplo, pH, color, amargor, etanol, etc.) según los métodos establecidos por la Convención cervecera europea (EBC), que se describen en su "Analytica - EBC".
- 20

Resultados

- 25 Generalmente, el análisis de cervezas estándar indica que los parámetros de la cerveza fueron similares para tanto la fermentación de control como de ensayo. Los niveles de oxígeno disueltos fueron comparables en ambos ensayos e inferiores a 0,2 mg/l. Los niveles de turbidez iniciales fueron comparables para ambas cervezas, mientras que la cerveza de ensayo tiene valores significativamente más bajos en la prueba de turbidez fría del alcohol según L. Chapon (método de EBC 9.41). Adicionalmente, durante la prueba de caducidad de la cerveza "Predicción de la estabilidad en anaquel de la cerveza" (método de EBC 9.30), la cerveza de ensayo rindió mejor que la cerveza de la fermentación de control.

- 30 El nivel de dicetonas vecinales de las cervezas de tanto las fermentaciones de ensayo como de control estuvo por debajo de 0,10 mg/litro (medido con el método de EBC 9.24.1 Dicetonas vecinales en la cerveza: Método espectrofotométrico). Se realizó el análisis sensorial por un panel entrenado (que consiste en ocho personas) en IFBM (Vandoeuvre-les-Nancy, Francia) en un procedimiento normalizado, en el que después de probar la muestra, los peritos asignaron una puntuación de intensidad para los atributos de sabor. Los resultados se recogieron para formar un perfil sensorial de la muestra. Las pruebas se hicieron según las pautas para el análisis sensorial, descritas en el Capítulo 13 de la edición de 2004 "Analytica - EBC". No pudieron observarse diferencias de sabor significativas para el panel de sabor entre la cerveza de la fermentación de control y de ensayo.
- 35

Conclusión

- 40 Este ejemplo demuestra que por la aplicación de una proteasa específica de prolina y acetolactato descarboxilasa podría producirse una cerveza que tiene parámetros de cerveza estándar (medidos con métodos establecidos por la Convención cervecera europea (EBC)) que son similares a los parámetros de la cerveza de referencia y que no muestra diferencias de sabor significativas en comparación con la cerveza de referencia. Además, el uso según la invención conduce a un proceso que ahorra tiempo, debido a que un periodo de fermentación baja de 9 días (control) podría reducirse a 4 días. Además, podrían lograrse ahorros de energía significativos, enfriando a 4 °C durante 4 días, en lugar de enfriar a 0 °C en un día y manteniendo esta temperatura durante otros 5 días.

Ejemplo 2

Acortamiento del periodo de estabilización en frío y sus efectos sobre la claridad de enzima estabilizada, cervezas 100 % malta

- 50 Se llevaron a cabo ensayos de elaboración de cerveza para evaluar el efecto de una endoproteasa específica de prolina en cervezas 100 % malta tras el uso de periodos de estabilización en frío acortados. Para este fin, se prepararon seis mostos diferentes y se fermentaron según exactamente el mismo protocolo (véase Materiales y métodos). A cinco fermentadores, la proteasa específica de prolina de *Aspergillus niger* se añadió a una concentración de 0,125 PPU/litro (véase Materiales y métodos para la definición de actividad) y en las cinco fermentaciones, la enzima se añadió al mosto frío, antes de la inoculación. La sexta fermentación sirvió de referencia y no se añadió enzima específica de prolina. Todos los fermentadores se inocularon con levadura de fermentación baja fresca (aprox. 17 millones de células/ ml de mosto) y la fermentación tuvo lugar a 12 °C hasta 5 plato seguido
- 55

de un aumento de temperatura hasta 14 °C para la eliminación de dicetonas vecinales tales como diacetilo. Al final de la maduración (en este caso nueve días después del comienzo de la fermentación), la cerveza se enfrió a menos 1 °C. La cerveza madurada de todos los fermentadores con la enzima añadida se mantuvo durante diversos periodos a menos 1 °C y luego se filtró a través de tierra de diatomeas. Cuatro lotes a los que la enzima específica de prolina se había añadido se filtraron como tales. El quinto lote con proteasa específica de prolina añadida se trató en línea con PVPP de uso único (40 g/hl; inyectado al filtro de cerveza) y entonces se filtró.

La cerveza madurada del fermentador sin enzima añadida también se enfrió a menos 1 °C y se sometió a un protocolo de estabilización 'clásica', es decir, la cerveza se mantuvo a menos 1 °C durante 9 días seguido del mismo tratamiento en línea con 40 g/hl de PVPP de uso único y, posteriormente, se filtró con tierra de diatomeas. Después de envasar, las botellas se pasteurizaron a 15 PU y se guardaron a 20 °C.

Después de un periodo de almacenamiento de seis semanas, las diversas cervezas se sometieron a mediciones de turbidez a 20 °C y a 1 °C. Para este fin, la cerveza se preincubó durante 24 horas a la temperatura de medición, es decir, o bien 1 o bien 20 °C y luego se midió la turbidez de la cerveza a esta temperatura. Las lecturas de turbidez se registraron usando un turbidímetro que medía una dispersión a 90 y 25 grados. Los datos de dispersión a 90 y 25 grados obtenidos con este turbidímetro (un Haffmans VOS ROTA 90/25) se muestran en la Tabla 1 como valores de "H90" y "H25", respectivamente, junto con la temperatura de medición relevante. Antes de estas mediciones de turbidez, las botellas se agitaron para homogeneizar y se dejaron tiempo suficiente para que desaparecieran las burbujas de gas. Se llevaron a cabo múltiples mediciones para garantizar que las burbujas de gas no influyeran en la lectura. Aparte de estas mediciones de turbidez, se llevaron a cabo evaluaciones visuales y de sabor usando un panel entrenado (n=5).

Tabla 1.

	Lote 1 comparativo	Lote 2	Lote 3	Lote 4 comparativo	Lote 5 comparativo	Referencia
Número de días de estabilización a -1 °C	0	1	3	5	0	9
Enzima espec de prol	sí	sí	sí	sí	sí	no
PVPP (40 g/hl)	no	no	no	no	sí	sí
Turbidez real (H25) a 20 °C	0,30	0,31	0,32	0,28	0,28	0,27
Turbidez real (H25) a 1 °C	0,34	0,34	0,37	0,32	0,30	0,28
Turbidez real (H90) a 20 °C	0,48	0,59	1,06	0,83	0,48	0,48
Turbidez real (H90) a 1 °C	0,52	0,66	1,17	0,90	0,53	0,49
Prueba de caducidad según EBC 9.30 (H25)	0,70	0,35	0,33	0,27	0,22	0,22
Prueba de caducidad EBC 9.30 (H90)	1,0	0,75	1,26	0,92	0,52	0,48
Evaluación visual a 8 °C a las seis semanas después del embotellado (terminología de EBC 9.29)	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante
Sabor (3 semanas después del embotellado)	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno

Según una inspección visual, todas las cervezas embotelladas, es decir, que incluyen la cerveza tratada con enzimas que no se sometió a ningún periodo de estabilización en frío, fueron completamente claras después de enfriarse durante 24 horas a 8 °C después de un periodo de almacenamiento de seis semanas a 20 °C.

Bastante sorprendentemente, estas evaluaciones de turbidez visual no estuvieron completamente en línea con las diferentes lecturas de turbidez obtenidas. Según la norma de EBC, las cervezas medidas según el método de EBC 9.29 (medidas a ángulo de dispersión de 90 grados) y que dan valores entre 1,0 y 2,0 EBC son "muy ligeramente turbias". Por encima de 2,0 EBC, las cervezas empiezan a ser "ligeramente turbias". Las lecturas de dispersión a 90 grados dieron valores de hasta 1,26 EBC (véase la Tabla 1), y todas estas cervezas fueron evaluadas visualmente como "brillantes". Esta discrepancia se trata en el Ejemplo 3.

También es considerable que, según el panel de sabor de expertos, ninguna de las cervezas producidas mostró un perfil de sabor anormal.

Ejemplo 3 (comparativo)

Mediciones de turbidez y formación de turbidez

5 Se realizaron tres fermentaciones de 20 hl según el protocolo descrito en el Ejemplo 2 para un mosto 100 % malta de 12 Plato. La primera fermentación (referencia) se llevó a cabo sin la adición de una proteasa específica de prolina durante la fermentación. A las dos otras fermentaciones, la proteasa específica de prolina de *A. niger* se añadió en la inoculación en concentraciones de 0,125 y 0,20 PPU/l respectivamente. Al final de la maduración (en este caso
10 nueve días después del comienzo de la fermentación), las tres cervezas se estabilizaron en frío durante 5 días a 1 °C, después de lo cual se eliminaron la levadura y los precipitados fríos. En ningún caso se aplicó un tratamiento con PVPP o con gel de sílice. Las tres cervezas se filtraron sobre un filtro de tierra de diatomeas, que tenía un pre-recubrimiento de grado grueso y uno de grado fino. Finalmente, las cervezas se embotellaron y se pasteurizaron a 15 PU y luego se guardaron a temperatura ambiente para estudios de estabilidad en anaquel.

15 Después de diversos periodos de almacenamiento, la cerveza se preincubó durante 24 horas a 1 °C y luego se midió la turbidez de la cerveza a esta temperatura al ángulo de dispersión de 90 grados. Antes de la medición, las botellas se agitaron para homogeneizar y se dejaron tiempo suficiente para que desaparecieran las burbujas de gas. Se llevaron a cabo múltiples mediciones para garantizar que las burbujas de gas no influyeran en la lectura. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2.

Meses de almacenamiento a 20 °C	0	3	6	9
	Valores de H90 (EBC) medidos a 1 °C			
Referencia (sin enzima)	7,2	24,8	20,7	21,8
Fermentación + enzima (0,125 PPU/l)	1,5	4,6	7,5	6,9
Fermentación + enzima (0,20 PPU/l)	1,3	4,0	6,9	5,2

20 Junto con las mediciones de turbidez, las cervezas fueron visualmente inspeccionadas por un panel entrenado (n=5) y se juzgaron usando la terminología de EBC 9.29.

25 Como era de esperar, las cervezas de referencia no tratadas con enzima mostraron altos valores de EBC H90. En línea con estos altos valores de H90, la inspección visual clasificó todas las muestras a t= 0, 3, 6 y 9 meses como "muy turbias" (las clasificaciones usaron la terminología especificada en el método de EBC 9.29).

De las cervezas tratadas con enzima, solo las muestras frescas (t=0) mostraron bajos valores de H90 (1,5 y 1,3 EBC respectivamente). A diferencia de las expectativas de los inventores, las lecturas del panel visual para las cervezas tratadas con enzima frescas (t=0 meses) fueron "brillantes" mientras que, basándose en los valores de H90 como se obtuvieron, se esperó una clasificación de "muy ligeramente turbias".

30 Las muestras tratadas con enzima almacenadas durante periodos más largos mostraron todas valores de H90 de 4 EBC o más altos. Sorprendentemente, las clasificaciones visuales obtenidas a partir de las dos cervezas tratadas con enzima después de 3, 6 y 9 meses de almacenamiento se clasificaron como "casi brillantes" en vez de "turbias", como era de esperar a partir de sus valores de H90.

35 Por tanto, los presentes inventores llegan a la conclusión de que, como resultado del uso de la proteasa específica de prolina en el proceso de fermentación de la cerveza, los valores de dispersión de H90 instrumentales no son indicativos de la percepción de turbidez visual, ni de la estabilidad coloidal de la cerveza envasada según la invención. Además, los presentes inventores llegan a la conclusión de que la cerveza según la invención es diferente de las cervezas conocidas en la técnica.

Ejemplo 4 (comparativo)

Análisis del tamaño de partícula de las cervezas estabilizadas por diferentes métodos

40 En la fábrica de cerveza piloto semi-industrial del IFBM (Institute Français de la Brasserie et de la Malterie, Vandoeuvre-les-Nancy, Francia), se realizaron cuatro fermentaciones según el protocolo descrito en el Ejemplo 2 para un mosto 100 malta de 12 Plato. A una de las fermentaciones se añadió la proteasa específica de prolina de *A. niger* en la inoculación a una concentración 0,125 PPU/l. A las otras tres fermentaciones no se añadió proteasa
45 específica de prolina. Al final de la maduración (en este caso nueve días después del comienzo de la fermentación),

5 todas las cervezas se estabilizaron en frío durante 5 días a 1 °C, después de que se eliminaran la levadura y los precipitados fríos. Una de las tres cervezas que no se estabilizó con la proteasa específica de prolina se estabilizó entonces con 30 g/hl de PVPP de uso único (inyectada en línea de la filtración de cerveza). Otra cerveza a la que no se añadió proteasa específica de prolina se estabilizó con 30 g/hl de hidrogel de sílice (inyectado en línea a la filtración de cerveza). La cerveza tratada con la proteasa específica de prolina de *A. niger* y la cerveza de control "no tratada" restante se filtraron como tales, es decir, sin la adición de PVPP o hidrogel de sílice. Las cuatro cervezas se filtraron sobre un filtro de tierra de diatomeas, que tenía un pre-recubrimiento de grado grueso y uno de grado fino, y se añadió un auxiliar filtrante de tierra de diatomeas durante la filtración en todos los casos. Finalmente, las cervezas se embotellaron y se pasteurizaron a 15 PU y luego se guardaron a temperatura ambiente. Durante el proceso, los niveles de oxígeno se minimizaron cuidadosamente, y se encontró que eran comparables para las cuatro cervezas.

10 Después de aproximadamente 10 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, la distribución del tamaño de partícula de las cuatro cervezas se estudió en Brewing Investigación Internacional (BRI, Nutfield, Reino Unido) usando espectroscopía de correlación fotónica (PCS) a 6 °C. Esta técnica no cuenta partículas como tales, sino que proporciona una lectura de dispersión de la luz y es capaz de atribuir proporciones de esa dispersión a clases de partículas de tamaño específico, permitiendo por este documento la comparación de las distribuciones del tamaño de partícula de las cuatro muestras de cerveza.

15 La intensidad de dispersión normalizada acumulada se representa en la Figura 1. La Figura 1 indica que en la cerveza de control "no tratada" toda la luz dispersada resulta de las partículas más pequeñas de 2000 nanómetros. Para las cervezas estabilizadas con PVPP e hidrogel de sílice, todas las partículas que dispersan luz son más pequeñas de aproximadamente 1250 y 750 nm, respectivamente. Sin embargo, las partículas en la cerveza tratada con proteasa específica de prolina son mucho más pequeñas en promedio: no se encontraron partículas más grandes de 385 nm. Para la comparación, los gráficos en la Figura 1 se cuantificaron por dos variables:

- d50, el diámetro de partícula al que el 50 % de la dispersión de luz es de partículas más pequeñas que el diámetro, y;
- 25 • d90, el diámetro de partícula al que el 90 % de la dispersión de luz es de partículas más pequeñas que el diámetro.

Los últimos datos se proporcionan en la Tabla 3.

30 **Tabla 3: valores de d50 y d90 (véase el texto para la explicación) para las muestras de cerveza del IFBM con estabilización diferente. NT: No tratadas, PVPP: polímero de polivinilpirrolidona, SHG: hidrogel de sílice, PSP: proteasa específica de prolina.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>d₅₀ (nm)</i>	<i>d₉₀ (nm)</i>
<i>NT-control</i>	6	895	1073
<i>30 g/hl de PVPP</i>	6	556	1141
<i>30 g/hl de SHG</i>	6	537	629
<i>0,125 PPUII de PSP</i>	6	325	361

35 Ambos de los valores de d50 y d90 en la Tabla 3 indican que las partículas que generan dispersión en la cerveza con la proteasa específica de prolina son sustancialmente más pequeñas que en las cervezas estabilizadas con PVPP o hidrogel de sílice. Esto está en línea con la hipótesis de los presentes inventores, que la hidrólisis de las proteínas que activan la turbidez por la proteasa específica de prolina previene o reduce la formación de complejos de proteína-polifenol durante el envejecimiento. Los presentes inventores llegan a la conclusión de que, como resultado de la acción de la proteasa específica de prolina, las proteínas que activan la turbidez se hidrolizan de manera que los complejos entre proteínas y polifenoles siguen siendo más pequeños durante el almacenamiento, conduciendo así a la discrepancia observada entre la evaluación de turbidez visual por paneles de experto y las lecturas de dispersión a 90 grados instrumentales relativamente altas. Otra vez, los presentes inventores llegan a la conclusión de que la cerveza obtenible usando el método de la invención es diferente de las cervezas conocidas en la técnica.

Ejemplo 5

45 **Acortamiento del periodo de estabilización en frío y sus efectos sobre el desarrollo de turbidez en cervezas 100 % malta después del almacenamiento de 4 y 6 meses a temperatura ambiente**

En este ejemplo se proporcionan los datos sobre la estabilidad a largo plazo de las cervezas descritas en el Ejemplo 2. Las cervezas embotelladas y pasteurizadas se almacenaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C)

durante un periodo de hasta 6 meses. Después de 4 y 6 meses de almacenamiento, las cervezas (Lotes 1, 2, 3, 4 y 5 más la Referencia como se enumera en la Tabla 1) se analizaron usando mediciones de turbidez y la evaluación visual también se describió en el Ejemplo 2. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

	Lote 1 comparativo	Lote 2	Lote 3	Lote 4 comparativo	Lote 5 comparativo	Referencia
Número de días de estabilización a -1 °C	0	1	3	5	0	9
Enzima espec de prol	sí	sí	sí	sí	Sí	no
PVPP (40 g/hl)	no	no	no	no	Sí	sí
Datos obtenidos después de 4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente						
Turbidez real (H25) a 20 °C	0,60	0,58	0,51	0,38	0,36	0,36
Turbidez real (H25) a 1 °C	1,69	1,25	0,87	0,61	0,57	0,55
Turbidez real (H90) a 20 °C	0,82	0,87	1,32	0,96	0,65	0,51
Turbidez real (H90) a 1 °C	2,76	1,96	2,17	1,44	0,68	0,69
Evaluación visual a 8 °C	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	brillante	brillante	brillante	brillante
Evaluación visual a 1 °C	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	brillante	Brillante
Datos obtenidos después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente						
Turbidez real (H25) a 20 °C	1,78	1,64	1,56	1,40	1,34	1,35
Turbidez real (H25) a 1 °C	2,17	1,74	1,38	1,12	1,10	1,04
Turbidez real (H90) a 20 °C	1,59	1,49	2,11	1,52	1,07	1,04
Turbidez real (H90) a 1 °C	4,24	3,10	2,97	1,94	1,11	1,00
Evaluación visual a 8 °C	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	brillante	brillante
Evaluación visual a 1 °C	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	Muy ligeramente turbio	brillante	brillante

5

Los datos proporcionados en la Tabla 1 del Ejemplo 2 muestran que después de 6 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, tras la evaluación visual según EBC 9.29, todas las cervezas embotelladas y pasteurizadas se clasifican como "brillantes". Según estos datos, el uso de la proteasa específica de prolina sola garantiza las excelentes cervezas, aunque el periodo de estabilización en frío se reduce al periodo requerido para enfriar la cerveza madurada a menos 1 °C, es decir, esencialmente sin un periodo de mantenimiento a esta baja temperatura. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 4, la estabilidad de la turbidez de las cervezas cambia cuando las cervezas se almacenan durante periodos más largos. Después de cuatro meses de almacenamiento a ambiente,

10

5 todas las cervezas tratadas con enzima que reciben una estabilización en frío de 0 hasta 5 días desarrollan una turbidez muy leve. Por tanto, los presentes inventores llegan a la conclusión de que si la proteasa específica de prolina se usa en combinación con un periodo de estabilización en frío mínimo, las cervezas 100 % malta siguen siendo visualmente estables durante un periodo de al menos hasta 6 semanas. La cerveza del Lote 5, tratada con la proteasa específica de prolina más PVPP, sigue siendo "brillante" aún cuando se sometió al periodo de estabilización sub-cero mínimo. Así, el último hallazgo indica que el usar una proteasa específica de prolina en combinación con PVPP permite un espectacular acortamiento del periodo de estabilización en frío sin ningún efecto perjudicial en la estabilidad de la turbidez a largo plazo de la cerveza. El hecho de que los presentes inventores estén tratando con cervezas 100 % malta, hace este hallazgo incluso más sorprendente.

10 Ejemplo 6

Combinación del tratamiento enzimático con periodos de estabilización cortos a temperaturas elevadas

15 Aparte de la duración del periodo de estabilización en frío, también la energía requerida para enfriar la cerveza a por debajo de 0 °C añade coste muy significativo al proceso de producción de cerveza. Por tanto, los beneficios de uso de una proteasa específica de prolina deben idealmente no estar limitados a los periodos de estabilización en frío mucho más cortos, sino que deben hacer redundantes las temperaturas de estabilización sub-cero. Para probar la última opción, los presentes inventores iniciaron un nuevo conjunto de experimentos de elaboración de cerveza a escala piloto. Se llevaron a cabo seis ensayos de elaboración de cerveza a escala de 20 hl, esencialmente en las condiciones descritas en la sección de Materiales y métodos y en el Ejemplo 2 de la presente solicitud. Otra vez, los efectos de uso de una proteasa específica de prolina se compararon con el uso de PVPP y sílice. Se usaron 20 diversos protocolos de estabilización en frío que oscilaban de algunas horas a 4 días a 0 y 7 °C. Debido a que la proteasa específica de prolina más PVPP parece presentar una potente combinación estabilizadora de cerveza, se repitieron las condiciones del Lote 5 del experimento descritas en el Ejemplo 2. Sin embargo, en el presente experimento, la cerveza no se enfrió a menos 1 °C sino a 7 °C solo. La última temperatura proporcionaría una opción conveniente, ya que representa una temperatura máxima normalmente usada para el envasado de botellas o barril.

25 En la primera fermentación de 20 hl, la cerveza madurada se sometió a un periodo de estabilización en frío que implicó 1 día de enfriamiento a 0 °C, seguido de un periodo de almacenamiento de 4 días a 0 °C. Entonces, la cerveza se filtró con tierra de diatomeas y se dividió en 2 partes durante la filtración de cerveza: los primeros 7 hl se trataron por PVPP 30 g/hl mezclada con tierra de diatomeas (auxiliar filtrante) y los últimos 7 hl se trataron con Siligel S (Spindal, Armainvilliers, Francia; 40 g/hl) también mezclado con tierra de diatomeas (auxiliar filtrante). Después de la filtración, las cervezas se embotellaron y se pasteurizaron. En la Tabla 5, estos dos productos se denominan Lote 1 (con PVPP) y Lote 2 (con gel de sílice).

35 La segunda fermentación de 20 hl se llevó a cabo de exactamente la misma forma que la primera fermentación. Sin embargo, en este caso, la cerveza se sometió a un periodo de estabilización en frío que implicó 1 día de enfriamiento a 7 °C seguido de un periodo de almacenamiento de 4 días a 7 °C. Estos dos productos se denominan Lote 3 (con PVPP) y Lote 4 (con gel de sílice).

40 Tanto la tercera como la cuarta fermentación de 20 hl se llevaron a cabo añadiendo la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* en el mosto frío antes de la inoculación a una concentración de 0,125 PPU/l. La cerveza resultante de esta tercera fermentación se sometió a un periodo de estabilización en frío que implica 1 día de enfriamiento a 0 °C seguido de un periodo de almacenamiento de 4 días a 0 °C, seguido de filtración en tierra de diatomeas (sin adición de ni PVPP ni gel de sílice), embotellamiento y pasteurización (Lote 5). La cerveza de la cuarta fermentación se sometió a un periodo de estabilización en frío que implicó 1 día de enfriamiento a 7 °C seguido de un periodo de almacenamiento de 4 días a 7 °C. Otra vez seguido de filtración en tierra de diatomeas (sin adición ni de PVPP ni de gel de sílice), embotellamiento y pasteurización (Lote 6).

45 En la quinta fermentación, la estabilización en frío se llevó a cabo precisamente enfriando la cerveza madurada a 0 °C (que dura menos de un día), después de que la cerveza se filtrara con tierra de diatomeas. Entonces, la cerveza resultante se dividió otra vez en 2 partes durante la filtración de la cerveza: los primeros 7 hl se trataron con PVPP 30 g/hl mezclada con tierra de diatomeas (Lote 7). Los últimos 7 hl de esta cerveza se trataron con Siligel S 40 g/hl, también mezclado con tierra de diatomeas (auxiliar filtrante), se embotellaron y pasteurizaron (Lote 8).

50 En la sexta fermentación, otra vez se añadió la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* en el mosto frío, antes de la inoculación a una concentración de (0,125 PPU/l). Después de la maduración, la cerveza se enfrió directamente a 7 °C y se trató con PVPP 30 g/hl mezclada con tierra de diatomeas. Después de la filtración, también esta cerveza se embotelló y pasteurizó directamente. En la Tabla 5 la cerveza resultante se denomina Lote 9.

55 Poco después del embotellado, todas las cervezas se sometieron a un gran número de análisis de cervezas estándar tales como niveles de alcohol, amargor, diacetilo, polifenol y nonenal. Además, se determinaron los valores de retención de cabeza (NIBEM y Ross & Clark). Los datos obtenidos mostraron que las cualidades de las diversas cervezas obtenidas son similares y no podrían mostrarse diferencias inesperadas. Los análisis sensoriales también mostraron solo diferencias menores. Como era de esperar, las diferencias más grandes se encontraron en el rendimiento de las cervezas en diversas pruebas de caducidad. Por ejemplo, datos de caducidad según EBC 9.30 y

5 turbidez final después de una prueba de envejecimiento acelerada a 60 °C de 6 días se determinaron poco después del embotellado de las diversas cervezas. Los resultados de estas mediciones se muestran en la Tabla 5 (véase "Caducidad" además de "6 días 60 °C). La Tabla 5 también proporciona los diversos datos de turbidez H90 y evaluaciones visuales de la cerveza embotellada como se registró después de un periodo de almacenamiento de 8 semanas a temperatura ambiente. La medición de estos datos de H90 se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

Tabla 5

	Lote 1 comparativo	Lote 2 comparativo	Lote 3 comparativo	Lote 4 comparativo	Lote 5 comparativo	Lote 6 comparativo	Lote 7 comparativo	Lote 8 comparativo	Lote 9
Días a 0 °C	4	4	-	-	4	-	Enfriar solo 0	Enfriar solo 0	-
Días a 7 °C	-	-	4	4	-	4	-	-	Enfriar solo 0
+ enzima prol	No	no	no	no	sí	Sí	no	no	sí
+ PVPP	30 g/hl	no	30 g/hl	no	no	No	30 g/hl	no	30 g/hl
+ Silice	No	40 g/hl	no	40 g/hl	no	No	no	40 g/hl	no
Prueba de caducidad: EBC 9.30 Turbidez final a 1 °C (H90)	1,70	5,07	3,57	11,4	1,62	1,58	1,85	6,30	0,68
Prueba de caducidad: 6 días 60 °C 24 h a 1 °C (H90)	7,41	14,15	11,48	38,82	3,22	4,02	7,60	15,18	2,09
Datos obtenidos después de 8 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente									
(H90) a 1 °C	0,62	2,97	1,13	6,71	0,97	1,74	1,14	3,31	0,63
(H90) a 20 °C	0,69	0,71	0,50	0,58	0,82	1,50	1,08	0,60	0,54
Visual a 8 °C	Brill.	Brill.	Brill.	Vsh	Brill.	Brill.	Vsh	Vsh	Brill.
Visual a 1 °C	Brill.	Sh	Vsh	Turbias	Brill.	Brill.	Vsh	Sh	Brill.
"Brill": Brillante, "Vsh": Muy ligeramente turbia, "Sh": Ligeramente turbia. Todos tras la evaluación visual según EBC 9.29 después del almacenamiento durante 24 horas. "Enfriar solo 0" se refiere a un enfriamiento a la temperatura indicada sin un periodo de mantenimiento posterior a esa temperatura.									

10 Los datos proporcionados en la Tabla 5 demuestran una vez más que el uso de la proteasa específica de prolina sola permite periodos de estabilización en frío espectacularmente acortados (véase el Lote 5). Adicionalmente, los datos en la Tabla 5 demuestran que un periodo de estabilización corto tal también es factible a temperaturas elevadas (véase el Lote 6). Como tal, este hallazgo es económicamente altamente relevante para una categoría específica de cerveceros. Los datos presentados en el Ejemplo 5 en combinación con los valores de caducidad de EBC 9.30 relativamente altos para las cervezas estabilizadas sin usar la proteasa específica de prolina como se muestra en la Tabla 5 del presente ejemplo también sugieren que estas condiciones de estabilización pueden no ser adecuadas para garantizar cervezas visualmente brillantes después de periodos de almacenamiento prolongados. Si se prevén periodos en anaquel de largo plazo, los datos presentados aquí (Lote 9) sugieren que un protocolo de "Enfriar a la temperatura de embotellamiento solo", que es un enfriamiento rápido a aproximadamente 7 °C, es adecuado a condición de que una proteasa específica de prolina se combine con un tratamiento con PVPP. Así, el hallazgo más sorprendente del presente ejemplo es que combinar la proteasa específica de prolina (opcionalmente en combinación con PVPP si se esperan periodos en anaquel de largo plazo) parece permitir una omisión completa del periodo de estabilización en frío. La implicación es un atajo de procesamiento muy significativo: de la maduración directamente al llenado de botellas e incluso generar cervezas visualmente brillantes estables en anaquel.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de cerveza que comprende fermentar un mosto en presencia de una proteasa específica de prolina, seguido de una fase de maduración y fase de estabilización, en el que la fase de estabilización tiene una duración inferior a 5 días.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, en el que la duración de la fase de estabilización se reduce al tiempo requerido para enfriar la cerveza a la temperatura final deseada para la filtración y/o envasado.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, por el cual la fase de estabilización tiene lugar a una temperatura adecuada para el envasado de la cerveza, preferentemente a aproximadamente 7 °C.
- 10 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una alfa-acetolactato descarboxilasa también está presente durante la fermentación.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la duración del periodo de fermentación baja es inferior a 8 días.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se usa PVPP.
- 15 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una etapa de filtración, en el que se usa un filtro de membrana de flujo cruzado.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteasa específica de prolina es una proteasa específica de prolina con un óptimo de pH ácido.
9. Cerveza obtenible por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una botella, lata o barril que comprende cerveza según la reivindicación 9.

20

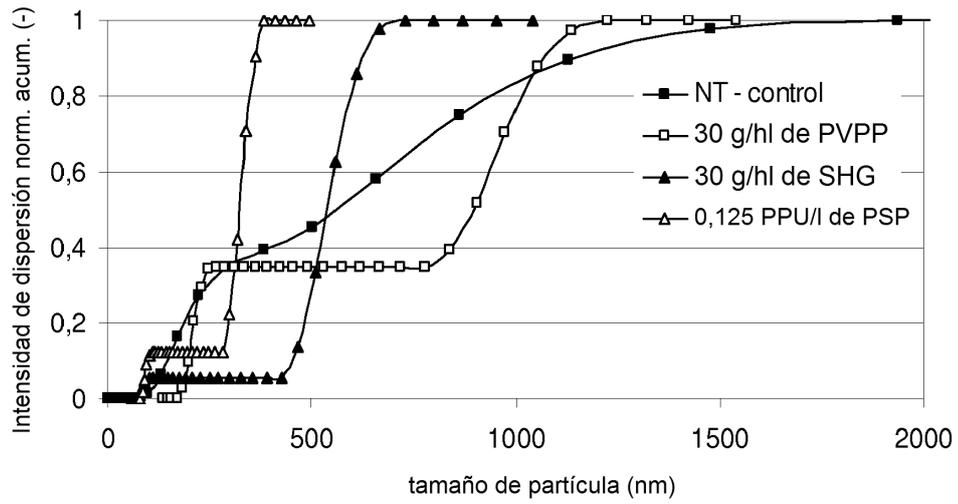


Figura 1:

Intensidad de dispersión normalizada acumulada en función del tamaño de partícula medido por PCS en cervezas de diez meses de la planta piloto de IFBM. Para el método de estabilización, véase la leyenda. NT: no tratada, PVPP: polímero de polivinilpirrolidona, SHG: hidrogel de sílice, PSP: proteasa específica de prolina.