

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 741**

51 Int. Cl.:

C12M 1/02 (2006.01)

C12C 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2014 PCT/GB2014/050886**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2014 E 14724125 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2976420**

54 Título: **Agentes novedosos y usos y métodos de preparación de los mismos**

30 Prioridad:

22.03.2013 GB 201305297

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**BARTH-HAAS UK LIMITED (100.0%)
Hop Pocket Lane
Paddock Wood, Kent TN12 6DQ, GB**

72 Inventor/es:

**COOK, DAVID y
LINFORTH, ROBERT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 712 741 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

Agentes novedosos y usos y métodos de preparación de los mismos.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a agentes y métodos para clarificar bebidas, y en particular para flocular levaduras, o la eliminación de turbidez fría, o ambos. Se describen los métodos de preparación de tales agentes.

Introducción

En la industria de alimentos y bebidas, durante la producción de ciertas bebidas es normal que los fabricantes incluyan una etapa de aclarado del producto. El procedimiento de aclarado o clarificación de bebidas es importante para producir bebidas con mejor apariencia y aprobación del consumidor.

10 El problema es particularmente relevante para las industrias de elaboración de cerveza y vino. Durante la producción de bebidas elaboradas, varios ingredientes pueden dar como resultado un producto turbio que es inaceptable para los consumidores. Las proteínas, los polifenoles y las levaduras en suspensión pueden dar como resultado un producto turbio, y el objetivo del procedimiento de clarificación es eliminar lo suficiente de esos ingredientes para proporcionar un producto transparente.

15 Se encuentran disponibles varios agentes, o hallazgos, para la clarificación de productos elaborados. Diversos productos derivados de algas marinas, como Irish Moss y carragenina, son efectivos para la eliminación de proteínas por coagulación y precipitación. Los polifenoles se pueden eliminar usando gelatina y polivinilpirrolidona (PVPP).

20 La eliminación de la levadura suspendida presenta un problema. Las cervezas de barril, en particular, son propensas a la turbidez debido a la presencia de levaduras en suspensión, aunque el problema no se limita a las ales de barril. Con el fin de eliminar la levadura para aclarar la cerveza, es necesario flocular la levadura para permitir que se asiente en un sedimento que se puede eliminar del producto. Por lo tanto, los agentes de clarificación también incluyen agentes floculantes de levadura.

25 Un agente floculante de levadura usado comúnmente en la industria de la elaboración de cerveza es el isinglass. El isinglass es un producto de colágeno obtenido de la vejiga natatoria de peces. A pesar de que isinglass es un eficaz agente de clarificación y agente floculante de levadura, su origen es motivo de cierta controversia entre los consumidores, quienes pueden encontrar que el uso de vejigas natatorias de peces es desagradable. Los consumidores vegetarianos y veganos no consideran que los productos que contienen isinglass sean apropiados para sus necesidades dietéticas. La cuestión de si el uso de isinglass puede hacer que un producto kosher no kosher sea también un punto discutible. Por lo tanto, el uso de isinglass limita la aceptabilidad de los productos y un agente de clarificación alternativo, preferiblemente que es capaz de flocular la levadura, que es económico y fácil de producir, y que supera estas y otras desventajas de los agentes de clarificación y floculación disponibles en la técnica anterior.

30 ITO (Memoirs of the College of Science, University of Kyoto, Series A, Vol XXXI, No 2, Article 6, 1967 [XP003022714]) describe los efectos floculantes de la levadura de los taninos de lúpulo y los taninos de malta.

35 El documento US 2009/0169691 describe la mejora del efecto floculante de la pectina por los extractos de etanol y CO₂ del lúpulo, a través de las isohumulonas atribuibles a los extractos.

Resumen de la invención

40 En su sentido más amplio, la presente invención proporciona el uso como un agente de clarificación o una preparación floculante de levadura de un extracto de lúpulo en el que el extracto se prepara mediante una etapa de extracción de lúpulo con un solvente mixto de un solvente orgánico y agua; y una etapa de eliminación del solvente después de la extracción.

45 A continuación se describe un agente de clarificación y/o un agente floculante de levadura. El agente de clarificación puede mostrar la actividad floculante de la levadura. En particular, la invención proporciona un agente de clarificación que no requiere el uso de vejigas natatorias de pescado para su producción. El agente se produce a partir de lúpulos y, sorprendentemente, es fácilmente derivable del propio procedimiento de elaboración de la cerveza. Por lo tanto, el agente tiene la ventaja de una mayor aceptabilidad, ya que puede verse como un ingrediente natural en productos que requieren clarificar. La divulgación proporciona además métodos para proporcionar el agente de clarificación, y usos del agente de clarificación para flocular la levadura y eliminar la turbidez de una bebida. También se describen los métodos de clarificación, incluida la levadura floculante.

50 Preferiblemente, los lúpulos son lúpulos completos, lúpulos extraídos con solvente, o lúpulos agotados de un procedimiento de elaboración de la cerveza.

- En algunas realizaciones, los lúpulos usados son lúpulos extraídos previamente. Estos pueden haber sido extraídos usando un solvente, tal como un alcohol, o usando CO₂. Estos lúpulos extraídos previamente son, por lo tanto, un producto de desecho derivado de la preparación de extractos de lúpulo para fines de elaboración de cerveza, estos lúpulos se pueden denominar lúpulos agotados. En algunas realizaciones se usan conos de lúpulo para la extracción. Se puede usar cualquiera de las variedades conocidas de lúpulo utilizadas en la industria de elaboración de cerveza.
- 5
- Preferiblemente, el solvente orgánico está presente en el solvente mixto en una cantidad de aproximadamente 10% v/v o más, preferiblemente 20% v/v o más, más preferiblemente 30% v/v o más.
- 10
- Preferiblemente, el solvente orgánico está presente en el solvente mixto en una cantidad de aproximadamente el 90% v/v o menos.
- Preferiblemente, el solvente orgánico comprende acetona o alcohol.
- Preferiblemente, el solvente es un solvente mixto que comprende acetona y agua en una cantidad de 30-90% v/v de acetona, preferiblemente 40-80% v/v de acetona, más preferiblemente aproximadamente 70% v/v; o un solvente mixto que comprende alcohol y agua en una cantidad de 10-90% v/v de alcohol, preferiblemente 20-90% v/v de alcohol, más preferiblemente aproximadamente 80% v/v.
- 15
- Preferiblemente, el alcohol es metanol o etanol o una mezcla de los mismos.
- Preferiblemente, la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 100 °C o menos, preferiblemente a aproximadamente 50 °C o menos, más preferiblemente a aproximadamente 30 °C o menos, incluso más preferiblemente a aproximadamente 10 °C o menos.
- 20
- La preparación, que se puede proporcionar simplemente agitando los lúpulos en el medio de extracción para proporcionar un extracto en bruto, contiene el agente de clarificación, que puede mostrar actividad floculante de la levadura. En algunos procedimientos, el extracto en bruto se purifica o limpia adicionalmente mediante diversos métodos de extracción conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, centrifugación, ajuste de pH o tratamiento enzimático.
- 25
- El procedimiento de extracción puede implicar la agitación de los lúpulos, y puede incluir además moler los lúpulos en el medio de extracción elegido. En otros procedimientos, la extracción se puede lograr bombeando solvente a diversas presiones a través de una celda de extracción cargada con material de lúpulo.
- La preparación se puede obtener purificando adicionalmente el extracto por extracción frente a diversos disolventes. En algunos métodos, la preparación se purifica por extracción con acetato de etilo. En algunos métodos, los lúpulos se extrajeron previamente con un solvente tal como hexano antes de la extracción con el solvente mixto.
- 30
- Los métodos se pueden suplementar con una purificación adicional de la preparación que contiene el agente de clarificación, que puede mostrar la actividad floculante de la levadura, en una o más columnas de extracción en fase sólida. Adecuadamente, la preparación se puede cargar en una o más de una columna de ciano, una columna Sep-Pak C18 o una columna Sephadex LH-20. La preparación que contiene el agente de clarificación se puede eluir de la columna de ciano, por ejemplo, en acetonitrilo al 30%, o de la columna Sep-Pak C18 con metanol, o de LH-20 con mezclas de acetona/agua.
- 35
- La invención proporciona además el uso de las preparaciones de la invención para la clarificación de muestras, y en particular la floculación de levadura, en la necesidad de la misma. Preferiblemente, las preparaciones se usarán en la fabricación de bebidas elaboradas para proporcionar productos clarificados. La preparación se puede usar sola en tales métodos o junto con cualquier otro agente de clarificación o agente floculante conocido, por ejemplo, pero no limitado a isinglass, Irish Moss, PVPP y carragenina.
- 40
- En otro aspecto, la invención proporciona además el uso de una proantocianidina como agente de clarificación o floculante de levadura, en donde la proantocianidina tiene un peso molecular de 10 a 150 kDa.
- 45
- Descripción detallada
- Ahora se proporcionarán detalles adicionales de la invención junto con ejemplos específicos que muestran la producción y caracterización del nuevo agente de clarificación.
- Breve descripción de las figuras
- 50
- La figura 1 muestra el efecto de variar la cantidad de licor de lúpulo que contiene el agente de clarificación en la capacidad de la preparación para flocular la levadura.
- La figura 2 muestra una inspección visual de la levadura tratada con agua (a) y con el agente de clarificación que muestra la actividad floculante de la levadura de la invención (b).

La figura 3 (a) muestra el espectro visible de una muestra hidrolizada en butanol HCl durante 20 minutos a 100 °C. La máxima estaba a 552nm y el hombro a 542nm.

La figura 3 (b) muestra, para comparación, parte de los espectros de absorción para una variedad de antocianidinas, y se toma de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852856/>.

- 5 La figura 3 (c) muestra el espectro de masas de una muestra hidrolizada en butanol HCl durante 20 minutos a 100 °C. El ion principal estaba en m/z 287.

Descripción detallada

10 Se muestra en este documento que una preparación extraída de lúpulos, preferiblemente extraída de lúpulos extraídos con CO₂, y por lo tanto un producto de desecho de la industria de elaboración de cerveza, tiene una potente actividad de clarificación y, en particular, actividad floculante de la levadura, y se puede usar como agente de clarificación en la preparación de, entre otras cosas, bebidas elaboradas.

Extracción de lúpulo

15 Se puede usar cualquier variedad de lúpulos como material de partida para la producción de las preparaciones de la invención. Conos de lúpulo; lúpulos en polvo o en pellas o lúpulos procesados; Los materiales de lúpulo agotado o el material de lúpulo agotado extraído con solvente se pueden usar como fuentes del material de clarificación. La actividad de clarificación, que puede incluir la actividad floculante de la levadura, presente en los lúpulos, se puede extraer de manera muy simple y económica mediante la preparación de un extracto en bruto en agua. Alternativamente, se puede usar un medio de extracción a base de alcohol o solvente orgánico. La agitación del lúpulo durante la noche a temperatura ambiente en agua proporciona un medio/preparación de extracción con actividad de clarificación, que incluye la actividad floculante de la levadura. El agente activo pasa a través de un filtro de 1.2 µm y se puede purificar o limpiar mediante una variedad de técnicas de extracción conocidas.

20 La extracción se puede llevar a cabo durante un período de minutos u horas, por ejemplo, 0.5 horas, 2 horas, 3 horas o más, y se puede llevar a cabo durante la noche, o hasta 24 horas o más. Los tiempos de extracción más prolongados, por ejemplo, 24 horas o más, no disminuyen la actividad de los extractos. En algunas realizaciones, la extracción se lleva a cabo en frío, 0 °C o justo por encima. En otras realizaciones, la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente o alrededor de ella. En otras realizaciones, la extracción se lleva a cabo a una temperatura elevada, por ejemplo a 30, 40, 50 o 60 °C o más.

25 La actividad floculante de la levadura en el extracto (licor de lúpulo) se puede determinar y rastrear a través del procedimiento de purificación o limpieza simplemente, según el ejemplo 2, midiendo la OD de una muestra que contiene levadura suspendida. Alternativamente, y según el ejemplo 12, el tamaño del sedimento formado también se puede usar para determinar la actividad floculante. La floculación también se puede visualizar por microscopía como se muestra en el ejemplo 6.

30 La capacidad del agente extraído (licor de lúpulo) para reducir la turbidez en un líquido se puede determinar midiendo la dispersión hacia adelante desde un líquido en un ángulo de 90°. Cuanto mayor sea la dispersión, mayor será la cantidad de partículas pequeñas, por lo general proteínas, y de este modo la turbidez en el líquido.

35 En una realización, la actividad floculante de la levadura se extrae en una mezcla acuosa de agua y un alcohol, tal como etanol o metanol. En algunas realizaciones, la actividad se extrae del lúpulo en un medio de metanol en agua del 10% al 90% (v/v). En otras realizaciones, la actividad se extrae de lúpulos en un medio etanol en agua (v/v) del 10% a 90%, preferiblemente aproximadamente 80%.

40 En algunas realizaciones, los lúpulos se someten a extracción con acetona acuosa, y el extracto de acetona contiene el agente de clarificación, que preferiblemente muestra la actividad floculante de la levadura. La acetona se mezcla preferiblemente con agua para proporcionar una solución de acetona a aproximadamente 50 a aproximadamente 80% v/v. Preferiblemente, el medio de extracción es aproximadamente 70% de acetona. En una realización, el polvo de lúpulo se extrae durante dos horas a temperatura ambiente en acetona al 70%. La muestra se filtra y la acetona se elimina por evaporación rotatoria. La muestra se ajusta a pH 3.6 y se reparte en 2 volúmenes de acetato de etilo. La fase acuosa se retiene. Después de una evaporación rotatoria adicional para eliminar el acetato de etilo, la muestra se deja precipitar, y el sobrenadante contiene el agente activo. Las especies contaminantes se mantienen en el precipitado.

45 Para limpiar o purificar adicionalmente el agente activo en la preparación (para extractos de solventes tanto acuosos como orgánicos, como se describe en este documento), se puede emplear la extracción en fase sólida. En un ejemplo, la preparación se puede cargar en cartuchos C18 SPE equilibrados con metanol y luego con agua. La muestra se puede cargar en agua y la actividad se conserva en el cartucho y se puede eluir con metanol.

50 En otra realización, un extracto preparado a partir de lúpulos por cualquiera de los métodos descritos en este documento se puede aplicar a una columna de ciano, por ejemplo, un cartucho de CN 500/3 mL, acondicionado previamente con acetonitrilo (ACN) y equilibrado con agua. La muestra se carga en agua y se puede eluir con 20% o

30% de ACN. La elución de ACN se puede emplear como una elución en gradiente contra el ácido acético, o puede ser una elución isocrática. En realizaciones preferidas, la muestra se carga en el cartucho en condiciones ácidas, por ejemplo a aproximadamente pH 3.5.

5 En otra realización más, un extracto preparado a partir de lúpulo por cualquiera de los métodos descritos en este documento se puede aplicar a una columna LH-20 Sephadex en una solución de etanol al 80% v/v. El agente activo se eluye con acetona al 50%.

10 Además de la extracción en fase sólida, los extractos preparados a partir de lúpulos por cualquiera de los métodos descritos en este documento se pueden limpiar adicionalmente mediante extracción contra solventes orgánicos, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, centrifugación, ajuste del pH o tratamiento con enzimas. En una realización preferida, el extracto se puede extraer adicionalmente contra acetato de etilo para eliminar productos contaminantes.

Preparaciones y usos del agente de clarificación derivado del lúpulo.

15 Las preparaciones de la presente divulgación son preferiblemente agentes de clarificación que son capaces de flocular la levadura y clarificar las bebidas elaboradas. Se cree que el principal agente activo de las preparaciones puede ser una proantocianidina debido a su comportamiento en los diversos métodos de extracción descritos y ejemplificados en este documento, y en vista de su caracterización detallada en el ejemplo 12.

20 Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, son flavonoides poliméricos. Los detalles de su química y los métodos para su aislamiento y manejo se pueden encontrar en <http://www.users.muohio.edu/HAGERMAE/>. El análisis por LC-MS de extractos de la invención hidrolizados con butanol/HCL (Ejemplo 12) revela un perfil de espectrometría de masas compatible con la presencia de cianidina y robinetidinina, y el espectro visible medido del hidrolizado en butanol/HCL también es característico de la cianidina. El espectro visible mostró una absorbancia alrededor de 550 nm típico de las antocianidinas, el trabajo LC-MS lo confirma y sugiere que se basa en la catequina y/o la epicatequina. El fraccionamiento por tamaño sugiere que las proantocianidinas en las preparaciones de la invención están en un intervalo desde 15 a 50 kDa, pero podrían ser más grandes, por ejemplo, hasta 150 kDa. El ingrediente activo de las preparaciones es soluble en acetona y en agua a pH ácido a alcalino.

30 En una realización, las preparaciones se usan para la clarificación de bebidas elaboradas mediante la floculación de levadura en estas. En otras realizaciones, las preparaciones se usan para la clarificación de bebidas elaboradas mediante la eliminación de péptidos que han precipitado en estas. La preparación se puede añadir a las cervezas sin un cambio en la naturaleza del producto de la cerveza (aparte de la clarificación). El producto, cuando se añade a la cerveza, tiene un impacto mínimo en el sabor y el aroma de la bebida terminada. Las preparaciones se pueden usar solas para aclarar las bebidas elaboradas o se pueden usar junto con uno o más agentes de clarificación conocidos. Por ejemplo, la preparación de la invención se utiliza junto con isinglass para clarificar la cerveza. En otro ejemplo, la preparación se usa junto con carragenina para clarificar la cerveza, y en otro ejemplo más, la preparación se usa junto con Irish Moss para clarificar la cerveza. Otros agentes de clarificación y combinaciones de agentes de clarificación que se pueden usar junto con las preparaciones de la invención serán evidentes para el experto.

40 La preparación se puede suministrar en forma de polvo después de la concentración y evaporación de un extracto preparado según cualquiera de los métodos descritos en este documento, usando una gama de técnicas de evaporación que serán bien conocidas para los expertos en el arte. La preparación se puede compactar o formar en un comprimido. En otras realizaciones, el producto se puede suministrar como una solución en agua, etanol, una mezcla de agua/etanol, acetona o una mezcla de acetona/agua, o en un portador apropiado para uso en la industria de alimentos y bebidas, tal como el propilenglicol.

45 La invención se explicará ahora más detalladamente y se proporcionarán más detalles en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención, sino simplemente ilustrarla. Los ejemplos, junto con el conocimiento del experto en el arte, harán aparentes realizaciones alternativas para el experto en el arte.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Extracción acuosa (referencia)

50 Se añadieron 300 mL de agua a 10 g de lúpulos de cono entero de Saaz y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. El agua se retiró por decantación y se usó como la preparación o el extracto que contenía el agente de clarificación, también denominado en este documento "licor de lúpulo". Luego se demostró que el agua decantada demuestra actividad de clarificación, por ejemplo, para flocular la levadura y eliminar o reducir la turbidez.

Ejemplo 2 - Ensayo de floculación (Referencia)

55 Se añadieron 2 mL del licor (o de un control de agua) de la extracción del ejemplo 1 a 12.4 mL de cerveza verde de 3 días, cerca del final de la fermentación principal. La muestra se mezcló durante 15 minutos. Las tapas de los tubos se retiraron y las muestras se dejaron reposar durante diferentes períodos de tiempo. La OD de 100 μ L de la mezcla

ES 2 712 741 T3

(eliminada con una jeringa) de 15 mm por debajo del menisco se midió a 600 nm después de una dilución en agua de 10 veces.

Tabla 1: valores de OD para control y muestras de licor de lúpulo

tiempo	control 1	control 2	lúpulo 1	lúpulo 2
10	0.79	0.83	0.51	0.33
20	0.85	0.88	0.45	0.35
30	0.84	0.89	0.37	0.40
45	0.92	0.84	0.34	0.33
60	0.80	0.76	0.41	0.39

- 5 De la tabla 1, el licor/extracto de lúpulo de los lúpulos tuvo un efecto significativo sobre la floculación (también se observaron diferencias en la formación de sedimentos). Las muestras se mantuvieron durante 15 minutos y se analizaron para determinar la OD para determinar la actividad. Usando el extracto totalmente acuoso (a estos niveles) sería necesario extraer aproximadamente 25 g de lúpulo para aclarar 4.5 litros de cerveza verde.

Ejemplo 3 - Efecto de la filtración (Referencia)

- 10 Las muestras de licor de lúpulo del ejemplo 1 se filtraron a través de un filtro de 1.2 μm para ver si el efecto fue causado por fragmentos de cono de lúpulo como agregados grandes.

Las muestras filtradas dieron una OD de 0.5 y 0.41 similares a las fracciones activas y se concluyó que el material activo pasa a través de filtros.

Ejemplo 4 - Extracción en fase sólida (referencia)

- 15 Se pasó una muestra del licor de lúpulo del ejemplo 1 (8 mL) a través de 2 acondicionadores y se equilibraron (4 mL de metanol, luego 4 mL de agua) cartuchos C18 Strata-x 200 mg/6 mL (Phenomenex) en serie. Esta "carga" se comprobó para la actividad (Tabla 2).

Tabla 2 Lecturas de OD para los controles de carga y agua de SPE

Réplicas	Agua de control	Carga C18 SPE
1	0.81	0.78
2	0.74	0.73
3	0.76	0.82

- 20 Las lecturas ópticas se realizaron como se describe en el ejemplo 2 con las muestras se dejaron reposar durante 15 minutos antes de que se realizaran las mediciones de OD.

El activo fue retenido por el cartucho SPE cuando se cargó en agua. A continuación se hicieron intentos para recuperar el material activo. En un experimento separado, la recuperación de la muestra del cartucho SPE se intentó con metanol. Se aplicó una muestra de 4 mL en agua, el cartucho se lavó con 4 mL de agua y se intentó la elución con 4 mL de metanol. No se encontró actividad en las fracciones ya sea de lavado o de elución.

- 25

Se probó un segundo estilo de cartucho (C18 Sep-Pak; Waters). Se cargó una alícuota (8 mL, pH 7) de la muestra/licor de lúpulo (Ejemplo 1) en un Sep-pak C18 plus equilibrado y acondicionado (metanol/agua). La carga era de color naranja no turbia, el cartucho se secó al vacío durante 30 minutos y se usó acetato de etilo (25 mL) para eluir una fracción verde. Esto fue seguido por una elución con 25 mL de metanol. Los solventes se eliminaron mediante evaporación rotatoria y las fracciones se redisolviaron en agua. No se observó floculación cuando se comprobó la actividad de la carga o la fracción de acetato de etilo. El compuesto activo se eluyó en la fracción de metanol. Este comportamiento es consistente con el de las proantocianidinas poliméricas con un alto número de

- 30

subunidades (referencia: Methods in polyphenol analysis. Edited by Celestino Santos-Buelga, Gary Williamson. Royal Society of Chemistry 2003).

5 Se comprobó la retención y recuperación de la sustancia activa de un cartucho de ciano 500 mg/3 mL. El cartucho se acondicionó con acetonitrilo (ACN), se equilibró con agua; la muestra se cargó en agua y se eluyó con 30, 70 o 100% de ACN. El cartucho se lavó después de cargar con agua.

Tabla 3: Actividad de clarificación de fracciones de la CN SPE determinada por análisis OD.

Fracción	OD1	OD2
Carga de agua	0.63	0.56
30	0.40	0.41
70	0.76	0.82
100	0.84	0.90
Control de agua	0.91	0.84

10 El activo se eluyó en acetonitrilo al 30%. Dado que el pH puede afectar la recuperación/carga del extracto en el cartucho SPE, los extractos se cargaron a pH 3.5, 5.5 y 7.5. Los extractos se recogieron como carga, el 30% y el 70% se eluyó con acetonitrilo. Tener en cuenta que el extracto a pH 3.5 dejó la mayor parte del color en el cartucho durante la carga, el pH 7.5 como mínimo. Los resultados de la recuperación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Recuperación de CN SPE a pH variable

pH	pH 3.5		pH 5.5		pH 7.5	
	OD Rep 1	OD Rep 2	OD Rep 1	OD Rep 2	OD Rep 1	OD Rep 2
Carga	0.69	0.61	0.39	0.26	0.25	0.30
30% de ACN	0.25	0.23	0.26	0.21	0.42	0.37
70% de ACN	0.67	0.67	0.58	0.57	0.70	0.60

15 La sustancia activa se pegó al cartucho a pH 3.5 en agua y se eluyó en acetonitrilo al 30%. A valores de pH más altos, el activo se eluyó con la carga.

Se fraccionaron más muestras mediante SPE usando etapas de acetonitrilo al 10% frente a solución reguladora de fosfato en un cartucho SPE de ciano 500 mg/3 mL, y los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Elución de ciano 500/3 mL en ACN frente a solución reguladora de fosfato.

% de ACN	OD 1	OD 2
0 carga	0.66	0.54
10	0.63	0.59
20	0.39	0.46
30	0.60	0.57
40	0.65	0.60
50	0.55	0.57

Control de agua	0.58	0.55
-----------------	------	------

El activo se eluyó en la fracción de acetonitrilo al 20%.

Ejemplo 5 - Efecto de la dilución del licor de lúpulo sobre la actividad (Referencia)

5 Los siguientes experimentos se realizaron para determinar si la dilución afecta o no a la actividad. Se mezclaron muestras de cerveza verde de 3 días con diferentes cantidades del licor de lúpulo del ejemplo 1.

Tabla 6: lecturas de OD para muestras de cerveza con diferentes cantidades de licor de lúpulo añadidas

Cantidad añadida (mL)	OD
2	0.4
2	0.38
1	0.36
0.5	0.75
0.25	0.62
0.125	0.90
0.0	0.83

10 La figura 1 muestra una gráfica de la OD en función de la cantidad de licor de lúpulo añadido. Se puede ver que las muestras que contienen 2 mL o 1 mL parecen haber sido floculadas, mientras que las cantidades más bajas dieron respuestas más débiles. Esto demuestra que para obtener un extracto totalmente acuoso, deberían extraerse alrededor de 12.5 g de lúpulo para inducir la floculación de la levadura en 4.5 litros de cerveza verde.

Ejemplo 6 - Evaluación de floculación por microscopía (Referencia)

La figura 2 muestra una inspección visual de muestras de levadura tratadas con la preparación de floculante (licor de lúpulo) del ejemplo 1 o control (agua).

15 Ejemplo 7 - Variaciones en la metodología de extracción.

La extracción del ejemplo 1 se varió para mostrar el efecto de la temperatura, la molienda y la adición de metanol al medio de extracción.

20 En cada caso, la extracción se llevó a cabo en incubadoras estáticas durante 4.5 horas. Se extrajeron 5 g de lúpulo en 150 ml de solvente. La molienda se llevó a cabo en un solvente usando un mezclador ultra-turrax de alto cizallamiento a alta velocidad durante 2 minutos. Para la mezcla de agua y metanol, la proporción metanol: agua fue de 50:50.

Las muestras se filtraron en un embudo Buchner/matraz y luego se filtraron con jeringa (1.2 µm), luego se congelaron a -18 °C hasta que se analizaron para determinar su actividad. Las muestras se analizaron usando 2 mL del extracto.

25 Los resultados se presentan en la tabla 7. La clarificación más fuerte de la cerveza verde fue con la mezcla de metanol: agua.

Tabla 7: Los valores de OD son la media de los valores por duplicado

Análisis	Temp.	Molienda?	Solvente	OD (2mL)
1	30	no	H ₂ O	0.28
2	60	no	H ₂ O	0.21

ES 2 712 741 T3

3	60	sí	H ₂ O	0.44
4	30	sí	MeOH:H ₂ O	0.135
5	60	no	MeOH:H ₂ O	0.09
6	30	sí	H ₂ O	0.33
7	30	no	MeOH:H ₂ O	0.205
8	60	sí	MeOH:H ₂ O	0.145

Ejemplo 8 - Fraccionamiento de tamaño (Referencia)

Se cargaron 2 x15 mL de un extracto de lúpulo (Ejemplo 1) en agua en dos unidades de centrifugación de fraccionamiento de 3 kDa y se giraron a 35000 rpm durante varias horas (4 h). La fracción > 3 kDa se retuvo y luego se fraccionó en un tubo de fraccionamiento de 30 kDa. La actividad floculante se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Actividad de floculación de muestras fraccionadas por tamaño.

muestra	Rep 1	Rep 2
Control de agua	0.67	0.56
<3 kDa	0.64	0.63
>3 y <30 kDa	0.20	0.23
>30k Da	0.34	0.32

La actividad se detectó en las fracciones de 3 a 30 y > 30 kDa. Por lo tanto, el floculante parece estar activo en un intervalo de pesos moleculares que incluyen los intervalos de 3-30 kDa y > 30 kDa.

10 Ejemplo 9 - Evaluación de diferentes cepas de levadura (Referencia)

Se introdujeron dos levaduras secas suministradas con kits de preparación casera y 2 levaduras de elaboración de cerveza lager comerciales en un kit Edme IPA (volúmenes de 2 L) fermentados durante 3 días, se acumularon y se usaron para estudios de sedimentación. Se combinaron 2 mL de un extracto de Saaz acuoso filtrado (Ejemplo 1) con 12 mL de cada cerveza (se añadieron 2 mL de agua como control para cada fermentación). Para estos estudios se registró la profundidad del sedimento formado. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Profundidad del sedimento (mm) de sedimentación de levadura después del tratamiento de 4 levaduras diferentes con un extracto de lúpulo Saaz

levadura	Saaz Rep 1	Saaz Rep 2	Agua Rep 1	Agua Rep 2
Levadura de elaboración de cerveza Lager 1	7	6	1	1
Levadura de elaboración de cerveza Lager 2	7	8	0	0
YBB (kit de elaboración casera 1)	10	10	0	0

YTB (kit de elaboración casera 2)	10	10	0	0
-----------------------------------	----	----	---	---

Todas las levaduras fueron sedimentadas por el agente derivado del lúpulo.

Ejemplo 10 - Efecto del pH en la sedimentación (Referencia)

- 5 El efecto del pH se probó combinando 2 mL de extracto de Saaz con 12 mL de cerveza verde de 3 días, ajustando el pH y luego permitiendo que las muestras se mezclaran antes de reposar durante 15 minutos y midiendo el sedimento formado. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 10: Formación de sedimentos en función del pH.

pH	Profundidad de sedimento pH (mm)
2.5	2
3.5	13
4.5	9
5.5	6
6.5	0

- 10 Los resultados muestran que el pH es importante para el procedimiento de bioensayo, con un óptimo a un pH compatible con el de las bebidas elaboradas.

Ejemplo 11 - Extracción de acetona

- 15 Se extrajeron 5 g de polvo de lúpulo extraído con CO₂ durante 2 h a temperatura ambiente con 100 mL de acetona al 70%. La muestra se filtró, se añadió agua y la acetona se eliminó del filtrado por evaporación rotatoria. Este último se ajustó a pH 3.6, luego se sometió a partición contra 2 volúmenes de acetato de etilo que se desecharon. Esto eliminó mucho color y debería haber eliminado pequeñas moléculas fenólicas. La fase acuosa se evaporó por rotación para eliminar cualquier acetato de etilo residual. La muestra se dejó luego a 6 °C durante 3 h, momento en el que se formó un precipitado. Esto se eliminó por centrifugación, 10 min a 4000 rpm y se retuvo el sobrenadante. El volumen de extracto final fue de 50 mL.

- 20 Se añadieron 10 mL del sobrenadante a 1 galón de cerveza verde. Esta floculó la levadura que posteriormente se sedimentó. La cerveza terminada clarificada con la preparación de lúpulo parecía similar en apariencia y carácter a una clarificada con isinglass. La extracción de acetona dio como resultado un extracto más activo que cuando se usa agua sola (Ejemplo 5). Se requirió 1 g de lúpulo para preparar un extracto de acetona que pudiera clarificar un galón de cerveza verde en comparación con 12.5 g de un extracto totalmente acuoso.

Ejemplo 12 - LC-MS de las antocianidinas

- 25 La figura 7 (a) muestra el espectro visible de una muestra (Ejemplo 11) hidrolizada en butanol HCl durante 20 minutos a 100 °C. Se observó un máximo a 552 nm y el hombro a 542 nm. Estas características son consistentes con la producción de antocianidinas.

La figura 7 (b) muestra, para comparación, parte de los espectros de absorción para una variedad de antocianidinas, y se toma de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852856/>.

- 30 El extracto hidrolizado con butanol/HCl se analizó mediante infusión directa LC-MS (modo de ion positivo, velocidades de infusión de 10 µl/min del extracto a un voltaje de cono de 60 V) que mostró un pico principal a m/z 287. Esto sería compatible con cianidina o robinetinidina que tienen máximos de absorción visibles de 535 y 525 nm respectivamente. La cianidina (de la catequina y la epicatequina) es más común, la robinetinidina proviene de extractos de tanino de quebracho.

- 35 Ejemplo 13 - Efecto sobre la turbidez

Las bebidas, y en particular la cerveza, pueden sufrir una turbidez o turbidez que aparece cuando los complejos de proteína-polifenol precipitan parcialmente en la bebida. La formación de turbidez tiende a ocurrir cuando las bebidas se enfrían antes del consumo y, a menudo, se conoce como "turbidez fría". Si bien el producto no se ve afectado en

términos de sabor, la apariencia puede no ser atractiva para el consumidor. Se puede usar un extracto de preparación/licor de lúpulo según la invención para reducir o prevenir la formación de turbidez.

5 Los datos presentados a continuación en las tablas 11 y 12 demuestran que una preparación de lúpulo obtenida por extracción con agua o alcohol acuoso (Tabla 11) o por extracción con acetona acuosa o alcohol acuoso (Tabla 12) de lúpulos agotados después de la extracción con solvente es capaz de reducir la turbidez fría en muestras de cerveza (tener en cuenta que los datos en las tablas 11 y 12 se refieren a la clarificación de diferentes lotes de cerveza turbia).

10 En los experimentos, se añadieron partes alícuotas de las preparaciones de lúpulo e isinglass (control positivo) a una cerveza verde a 4 °C. Se dejó que se aclararan, y se eliminó la levadura residual mediante centrifugación, luego se determinó el ángulo de dispersión de 90 ° (turbidez). Se dejó que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente y se volvió a medir la turbidez. La diferencia entre estos dos valores es la turbidez fría. El ángulo de dispersión de 90 ° mide la dispersión de la luz debido a pequeñas partículas en suspensión. Los datos presentados en las tablas 11 y 12 muestran que las preparaciones de lúpulo disminuyeron tanto la turbidez como la turbidez fría.

15 Tabla 11: Impacto de las preparaciones de lúpulo obtenidas a partir de lúpulos Galena agotados después de la extracción supercrítica de CO₂ y un isinglass comercial en la turbidez fría en cerveza

Agente de clarificación	Tasa de dosificación (mL de extracto / 0.2 L de cerveza)	Turbidez @ 4°C (H ₄ °C) (en unidades EBC)	Turbidez @ RT (HRT) (en unidades EBC)	Turbidez fría (H ₄ °C-HRT) (en unidades EBC)
Control no clarificado	-	0.83	0.37	0.46
Isinglass (Murphy's Alkleer A)	0.5	0.35	0.33	0.02
Lúpulos Galena agotados extraídos en etanol al 20% (acuoso)	4.5	0.5	0.4	0.1
Lúpulos Galena agotados extraídos en agua	3	0.61	0.4	0.21

Tabla 12: Impacto de las preparaciones de lúpulo obtenidas a partir de lúpulos agotados después de la extracción de CO₂, y un isinglass comercial, sobre la turbidez fría en la cerveza.

Agente de clarificación	Dosificación óptima (mL extracto / 0.2 L de cerveza)	Turbidez @ 4°C (H ₄ °C) (en unidades EBC)	Turbidez @ RT (HRT) (en unidades EBC)	Turbidez fría (H ₄ °C-HRT) (en unidades EBC)
Control no clarificado	-	2.155	0.445	1.71
Isinglass (Murphy's Alkleer A)	4	0.54	0.2	0.34
Mezcla de lúpulos agotados extraídos en acetona al 70% (acuoso)	4.5	0.51	0.24	0.27
Mezcla de lúpulos agotados extraídos en	6	1.31	0.43	0.88

etanol al 20% (acuoso)				
------------------------	--	--	--	--

Ejemplo 14: Actividad floculante extraída de conos de lúpulo completos de diversas variedades (Referencia)

Se extrajeron muestras de lúpulos completos (5 g) durante la noche en un lecho de rodillos en 150 mL de agua a temperatura ambiente antes de la filtración, luego se congelaron a -18 °C hasta que se necesitaron. Luego, estos extractos se analizaron para determinar la actividad de floculación agregando 2 mL de cada extracto a 15 mL de cerveza verde, mezclando y dejando que las muestras permanezcan en reposo. La OD de las muestras se midió a partir de una parte alícuota de la muestra extraída justo debajo del menisco. Los controles (sin extracto añadido) mostraron una OD de alrededor de 0.7, los valores más bajos de OD indicaron que la levadura estaba floculada por el extracto. Las 4 variedades en la tabla 13 mostraron floculación de extractos de lúpulos completos.

5

10

Tabla 13

Variedad de lúpulo	OD resultante de la adición de 2 mL de extracto a 15 mL de cerveza verde
Saaz	0.35
Pilgrim	0.22
Goldings	0.58
Target "seeded"	0.45

Ejemplo 15: Extracción acuosa de lúpulos en un intervalo de valores de pH (Referencia)

Los lúpulos se añadieron a agua y el pH de la lechada de agua/lúpulo se ajustó a un intervalo de valores de pH usando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. El licor de lúpulo se analizó para determinar la actividad de floculación en función de la cantidad de extracto que fue necesaria para inducir la floculación de levadura. Como se puede observar en la tabla 14, todos los extractos mostraron actividad de floculación, aunque esta actividad fue menor a pH 9 que a otros niveles de pH. Un puntaje de actividad más bajo indica que se necesitó menos extracto para inducir la floculación. También se determinaron las propiedades ópticas de los extractos y el extracto llevado a cabo a pH 3 mostró la mayor transmisión de luz, lo que indica una mayor claridad. Esto mostró que la extracción del agente de clarificación se puede llevar a cabo en un intervalo de valores de pH.

15

20

Tabla 14

pH de extracción	Puntaje de actividad	% de transmisión (600 nm)
9	8	58.3
8	4	67.3
7	4	66.3
6	4	65.1
5	4	65.1
4	4	85.5
3	4	89.3
2	4	63.3

Ejemplo 16: Análisis de extractos de diferentes muestras de lúpulo agotado.

5 Se extrajeron muestras de los residuos de lúpulo después de la extracción de CO₂ con acetona al 70% para determinar si el agente de clarificación estaba presente y para evaluar las diferencias entre las muestras. Se añadieron partes alícuotas de los extractos (licor de lúpulo) a la cerveza y se registró la cantidad de extracto necesaria para inducir la formación de la misma profundidad de sedimento. Todas las variedades de lúpulo mostraron actividad de floculación (Tabla 15). Un puntaje de actividad más bajo indica que se necesitó menos extracto para inducir la floculación. La mayoría de los extractos tuvieron una actividad similar, con Galena produciendo un extracto más activo (con respecto a las actividades de clarificación según lo determinado por la floculación de la levadura) y Magnum un extracto menos activo.

Tabla 15

Variedad de lúpulos	Puntaje de actividad
Galena	0.0625
Summit lote 1*	0.125
Zeus	0.125
Target*	0.0625
Summit lote 2	0.125
Hallertau Hallertauer Magnum	0.25
Hallertau Herkules	0.125
Hallertau Hallertauer Taurus	0.125

10

Todas las muestras se extrajeron previamente con CO₂ supercrítico, además de: *extraídas con CO₂ líquido (subcrítico)

REIVINDICACIONES

1. Uso como un agente de clarificación o una preparación floculante de levadura de un extracto de lúpulo en el que el extracto se prepara mediante una etapa de extracción de lúpulo con un solvente mixto de un solvente orgánico y agua; y una etapa de eliminación del solvente después de la extracción.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el solvente orgánico está presente en el solvente mixto en una cantidad de aproximadamente 10% v/v o más, preferiblemente 20% v/v o más, más preferiblemente 30% v/v o más.
3. Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el solvente orgánico está presente en el solvente mixto en una cantidad de aproximadamente el 90% v/v o menos.
- 10 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el solvente orgánico comprende acetona o alcohol.
5. Uso según la reivindicación 1, en el que el solvente es un solvente mixto que comprende acetona y agua en una cantidad de 30-90% v/v de acetona, preferiblemente 40-80% v/v de acetona, más preferiblemente aproximadamente 70% v/v.
- 15 6. Uso según la reivindicación 5, en el que la etapa de eliminación del solvente comprende la eliminación de acetona.
7. Uso según la reivindicación 1, en el que el solvente es un solvente mixto que comprende alcohol y agua en una cantidad de 10-90% v/v de alcohol, preferiblemente 20-90% v/v de alcohol, más preferiblemente aproximadamente 80% v/v.
- 20 8. Uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 7, en el que el alcohol es metanol o etanol o una mezcla de los mismos.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 100 °C o menos, preferiblemente a aproximadamente 50 °C o menos, más preferiblemente a aproximadamente 30 °C o menos, incluso más preferiblemente a alrededor de 10 °C o menos.
- 25 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los lúpulos son lúpulos completos, lúpulos extraídos con solvente o lúpulos agotados de un procedimiento de elaboración de cerveza.
11. Uso de una proantocianidina como agente de clarificación o floculante de levadura, en el que la proantocianidina tiene un peso molecular de 10 kDa a 150 kDa.
- 30 12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la producción de un alimento o bebida, preferiblemente en el que la bebida es una cerveza, una lager, una ale o vino.

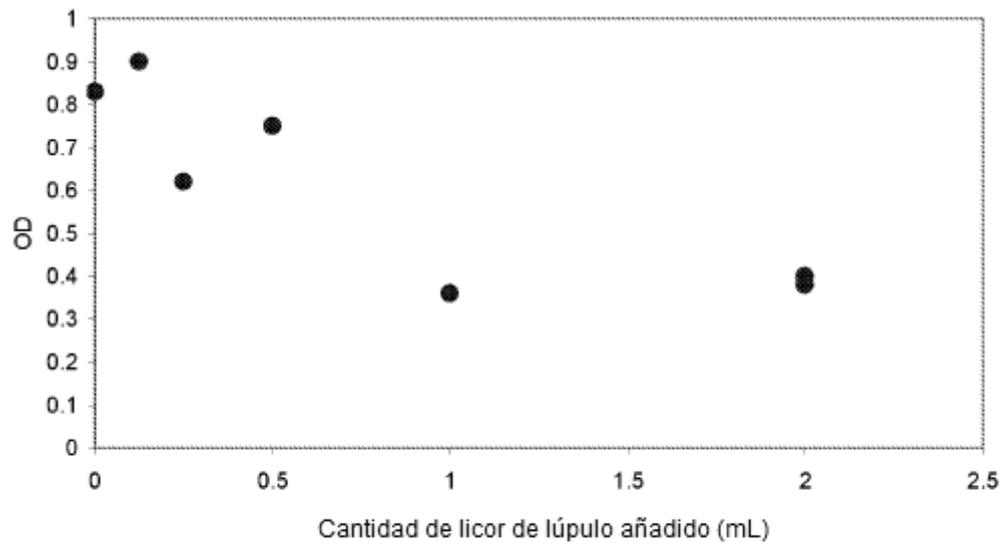
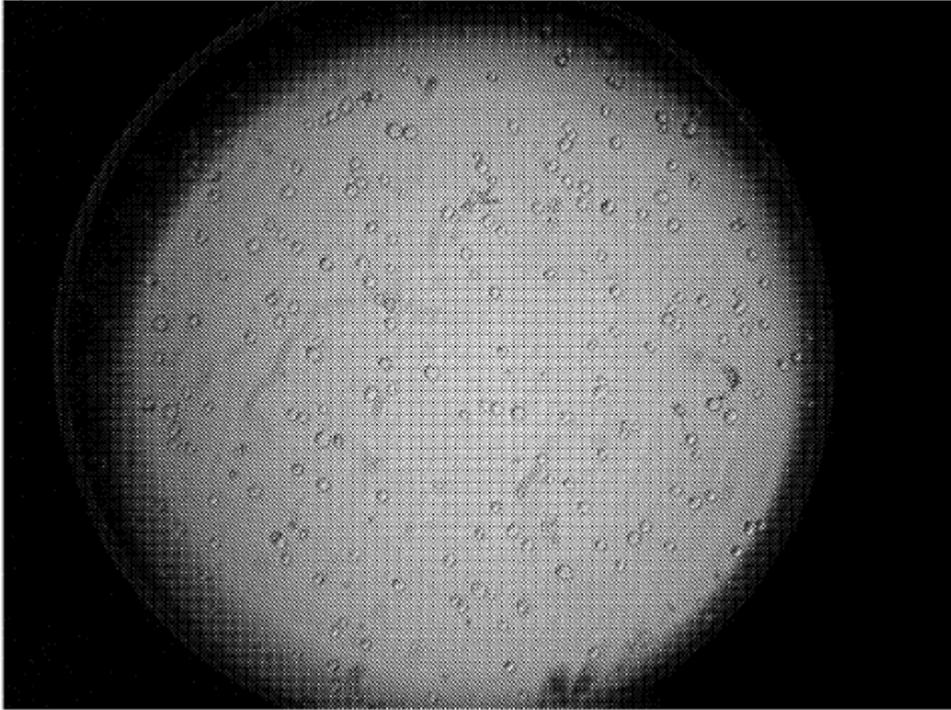


Figura 1

(a) no-floculente



(b) floculente

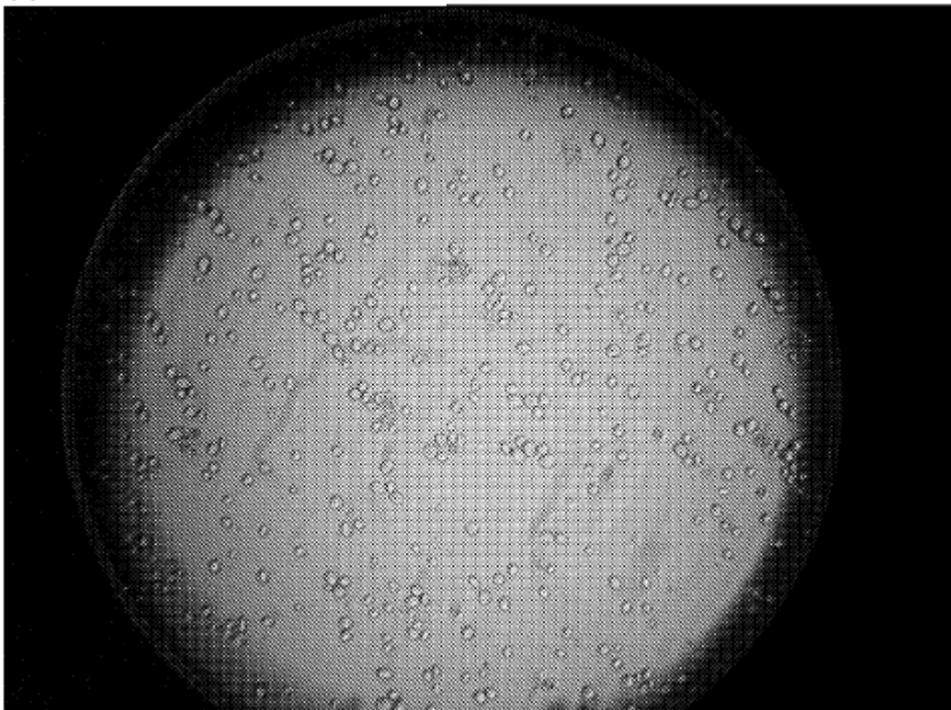


Figura 2

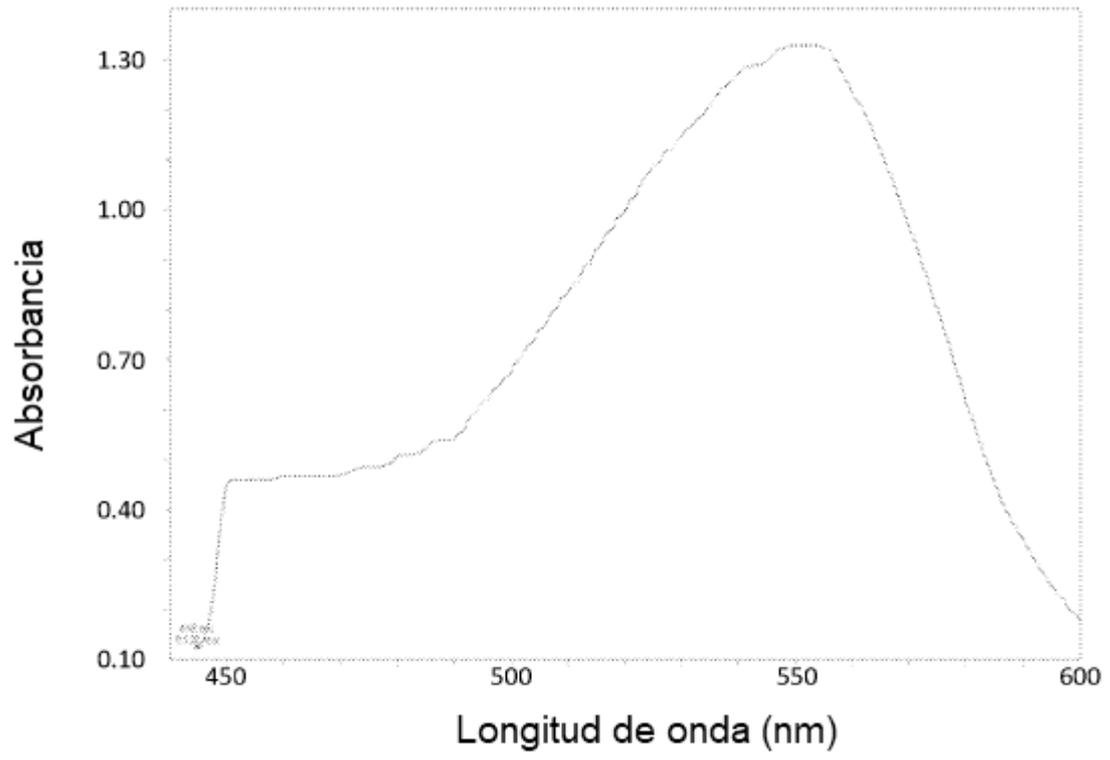
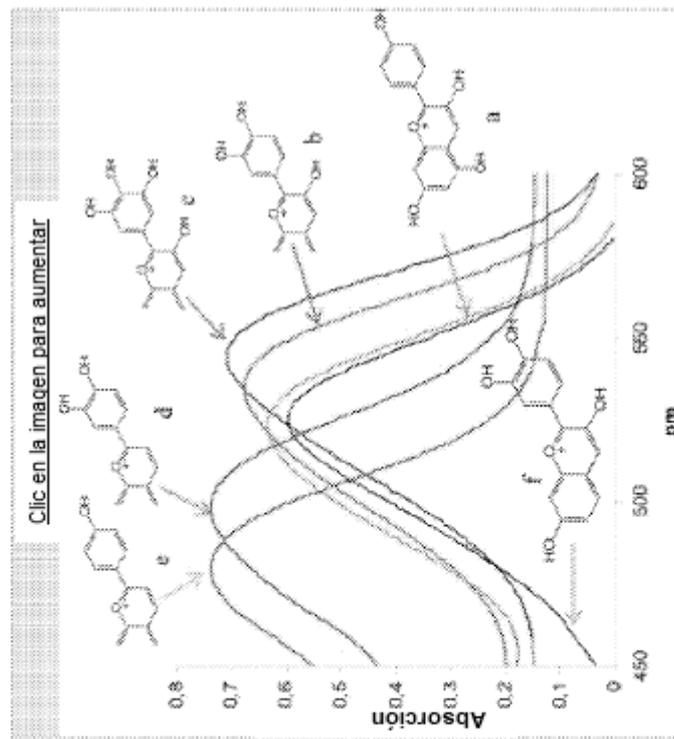


Figura 3(a)



Parte de los espectros de absorción de las antocianidinas (a-f) con patrones de hidroxilación divergentes. Con la excepción de la pelargonidina (a) y la robinetinidina (f), las estructuras de cianidina (b), delphinidina (c), luteolinidina (d) y apigeninidina (e) solo se muestran parcialmente.

Imágenes en este artículo

Figura 3(b)

Descripción de la muestra

PA_1_60 1 (0.502)

Scan ES+
7.36e8

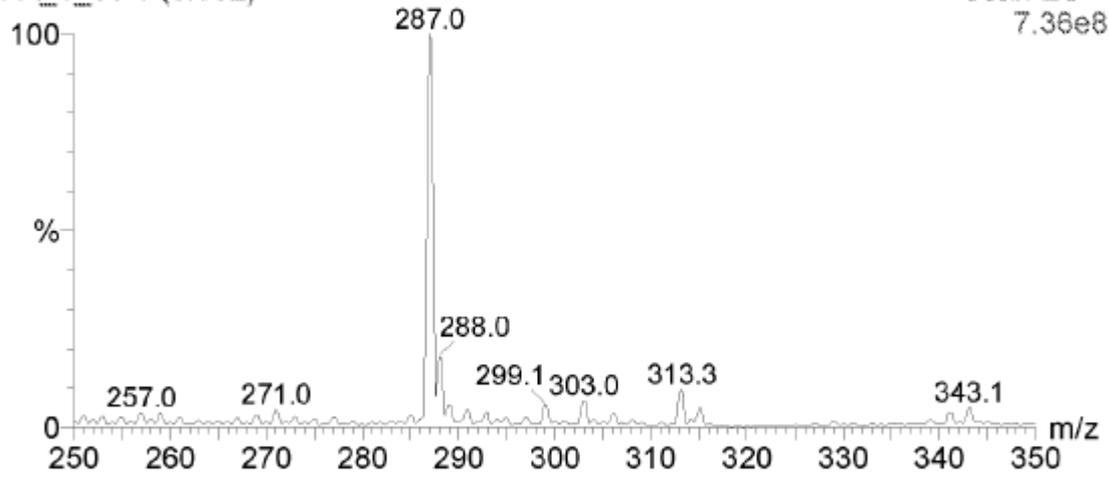


Figura 3(c)