

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 950**

51 Int. Cl.:

A23L 2/62 (2006.01)

C12H 1/14 (2006.01)

C12C 5/02 (2006.01)

C12C 12/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2017 PCT/FR2017/051702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2018 WO18002505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2017 E 17745397 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3474681**

54 Título: **Utilización de un extracto proteico de levadura para estabilizar la turbidez de la cerveza**

30 Prioridad:

27.06.2016 FR 1655992

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GOSELIN, YVES;
MENIN, RUDY y
MEULEMANS, STÉPHANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 805 950 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

Utilización de un extracto proteico de levadura para estabilizar la turbidez de la cerveza

La presente invención tiene por objeto una nueva utilización de un extracto proteico de levadura, a saber, para estabilizar la turbidez de una bebida, y en particular cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca.

5 La cerveza representa una de las únicas bebidas universales, presente prácticamente todos los países del mundo. Una cerveza se compone de cuatro ingredientes principales, a saber, agua, lúpulo, cebada y levadura. La larga transformación de estos elementos en cerveza se extiende durante un período que varía de dos a tres semanas (para las cervezas industriales) hasta algunos meses (para las cervezas de guarda, cervezas de alta fermentación, cervezas trapenses ...). La pureza y las cualidades del agua son determinantes para la claridad y el sabor de la
10 cerveza. La proporción de las principales sales minerales contenidas en el agua (sodio, cloruro, calcio, magnesio, sulfato y bicarbonato) influirán en la suavidad o dureza en boca, pero también durante la fabricación de la cerveza.

La cerveza blanca, al contrario de lo que se podría creer, no designa un color de cerveza sino un ingrediente: el trigo. Las cervezas blancas son cervezas que contienen una gran proporción de trigo además de cebada (y otros cereales eventuales). Las cervezas blancas presentan generalmente una turbidez natural (salvo si la cerveza se ha
15 filtrado) lo que les da un aspecto lechoso. Es este aspecto lechoso y la proximidad semántica en alemán a blanco (*weiss*) y trigo (*weizen*) lo que explica la utilización de la palabra "blanca". Sin embargo, utilizando maltas tostadas o caramelo, es posible hacer cervezas blancas ambarinas, oscuras, incluso negras.

Tradicionalmente, existen dos grandes tipos de cervezas blancas:

20 - las «*weissbier/weizenbier*» alemanas, hechas con una mayoría de trigo malteado y malta de cebada como complemento, fermentadas con levaduras específicas que producen muchos fenoles y dan toques de especias como clavo,

- las blancas belgas (o *witbier* en flamenco) procedentes principalmente de cebada malteada y trigo crudo o malteado, más frecuentemente especiadas con cáscaras de naranja amarga o dulce y semillas de cilantro.

25 La turbidez de la cerveza es causada en gran parte por residuos proteínicos (aproximadamente 40 al 75%), polifenoles (1,1-7,7%) y en cantidad menor por carbohidratos (2-15%)^{1,2}. La turbidez puede deberse igualmente a otros residuos tales como almidón, pentosanos, oxalato, β -glucanos, etc.³.

Además, existen dos formas de turbidez: la turbidez por frío que es reversible y la turbidez permanente que resulta de la oxidación de la cerveza durante su envejecimiento⁸. En ambos casos, los compuestos implicados principalmente en la formación de coloides son proteínas y polifenoles.

30 La turbidez por frío se forma progresivamente cuando la temperatura disminuye hasta cerca de 0°C, pero desaparece cuando la cerveza se vuelve a calentar. Se trata en este caso de una asociación temporal y por tanto reversible entre proteínas y polifenoles que no están unidos covalentemente si no por puentes de H, enlaces hidrófobos e iónicos.

35 En cuanto a la turbidez permanente, a medida que se prolonga la oxidación de los polifenoles durante el envejecimiento de la cerveza, los enlaces que los unen a las proteínas se multiplican y fortalecen para convertirse en enlaces covalentes. Los complejos insolubles creados ya no se disuelven bajo el efecto del calor y la turbidez se vuelve permanente⁹. Tengamos en cuenta que la presencia de ciertos iones metálicos favorece igualmente la aparición de esta última.

40 Hasta la fecha se han realizado varios estudios con el fin de identificar las proteínas que originan la turbidez. Así, las proteínas ácidas derivadas de la albúmina y las globulinas de la cebada podrían ser responsables de la formación de la turbidez⁴. Se ha demostrado igualmente que las proteínas ricas en prolina están implicadas en la formación de la turbidez^{1,3,5,6,7}. En lo que respecta a los polifenoles, los implicados en la estabilidad coloidal son los flavonoides.

45 En el campo de la cerveza, y particularmente la cerveza blanca, es necesario que la cerveza presente una turbidez permanente y estable. En efecto, el aspecto «lechoso» forma parte integrante de la cerveza blanca debido a la presencia de trigo en la receta. Esto contribuye a la tipicidad de esta cerveza y la hace atractiva para el consumidor.

Con el fin de mejorar y/o ajustar la turbidez o turbiedad de la cerveza, la sidra u otras bebidas, alcohólicas o no alcohólicas, es posible añadir uno (o varios) agente(s) de enturbiamiento.

Los agentes de enturbiamiento añadidos a las bebidas les confieren un aspecto más natural.

50 Entre los agentes de enturbiamiento utilizados habitualmente en las bebidas, se podrán citar proteínas, gomas solubles en agua y gomas solubles en aceite.

Como ejemplo de goma soluble en agua, se pueden citar la goma arábica o goma de acacia, que actúa en la bebida impidiendo la precipitación de partículas en suspensión.

Se pueden citar igualmente, como ejemplos de agente de enturbiamiento, los comercializados:

- bajo la denominación «Cloudix WB®» de CBS («*Customized Brewing Solutions*»), que es una emulsión de un extracto de copra en agua,
- bajo la denominación «Biocloud®» de Kerry, que es un derivado de levadura.

5 Además, el documento FR2369798 describe la utilización de un extracto proteico de suero de la leche para estabilizar la turbiedad de una bebida. El documento JP2006275751 describe un procedimiento de estabilización de la turbiedad de bebidas alcohólicas fermentadas, comprendiendo dicho procedimiento la selección de levaduras que contienen la menor cantidad posible de manoproteínas. Por otra parte, es conocida (véase la página de internet http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2016/12/SpringFiner_FR.pdf, así como en el documento US2013/309721) la utilización de un extracto proteico de levadura para la clarificación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas para estabilizar la turbiedad. Se conoce igualmente la utilización de un extracto de levaduras con el fin de estabilizar la turbiedad de las cervezas (véase <http://brewing-solutions.com/products/?id=21>).

10 Sin embargo, los agentes de enturbiamiento de la técnica anterior no son necesariamente adecuados para la cerveza, y principalmente la cerveza blanca, donde no siempre son estables. En efecto, a pesar de su presencia en la cerveza blanca, su turbiedad disminuye con el tiempo.

15 Por tanto, persiste actualmente la necesidad de desarrollar nuevos agentes de enturbiamiento o de turbiedad para las bebidas, y más particularmente para la cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca.

Los autores de la presente invención han descubierto, de manera bastante inesperada y sorprendente, que un extracto proteico de levadura permitía estabilizar la turbidez o la turbiedad de las bebidas, y principalmente la cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca, y esto de manera satisfactoria con el tiempo.

20 Este descubrimiento es completamente inesperado ya que un extracto proteico de levadura ha sido descrito principalmente en la técnica anterior para su utilización para el encolado de bebidas, en particular vino¹⁰.

El «encolado» es una técnica que consiste en introducir en un producto que se ha de tratar (líquidos, mostos) una sustancia capaz de flocular y sedimentar precipitando en su sedimentación las partículas en suspensión en dicho producto, con el fin de mejorar principalmente la limpidez, la filtrabilidad y la estabilidad de dicho producto. Por tanto, por encolado, las partículas visibles y/o invisibles en suspensión en el producto, así como la carga de coloides, que son responsables de la turbidez y la falta de filtrabilidad de dicho producto, se reducen mucho, o incluso se eliminan totalmente.

25

El descubrimiento de los autores de la presente invención es completamente inesperado ya que, según la invención, el extracto proteico de levadura tiene, de alguna manera, el efecto contrario al preconizado en la técnica anterior.

30 En efecto, según la invención, el extracto proteico de levadura no se utiliza para eliminar las partículas en suspensión por precipitación (encolado), sino por el contrario para impedir la precipitación de las partículas en suspensión (estabilización de la turbidez).

Por tanto, la presente invención tiene por objeto la utilización de un extracto proteico de levadura para estabilizar la turbidez o la turbiedad de una bebida, principalmente la cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca.

35 En la presente solicitud, la turbidez de la bebida, y principalmente de la cerveza, designa la turbidez de la bebida, y principalmente de la cerveza.

La turbiedad designa el contenido de un fluido en materias que lo enturbian.

La turbiedad se mide por diferentes métodos de fotometría de los medios turbios, como la nefelometría, la opacimetría y la turbidimetría. En general, se expresa en UNT (Unidad Nefelométrica de Turbiedad). En el campo de la industria cervecera, las unidades de medida de la turbidez son EBC (*European Brewing Convention*), ASBC (*American Society of Brewing Chemists*), Helm y FTU (*Formazine Nephelometric Unit*). La relación entre estas diferentes unidades es la siguiente: 1 EBC = 69,2 ASBC = 40 Helm = 4 FTU (Analytica EBC - método 9.30).

40

Las mediciones de turbiedad se efectúan utilizando un aparato tal como el turbidímetro o el nefelómetro. Se trata generalmente de un receptor fotoeléctrico que mide la luz dispersada por el líquido. Más particularmente, es la dispersión de la luz por las suspensiones lo que permite evaluar la concentración de sustancias en suspensión en un líquido. Este aparato consiste generalmente en una fuente de luz blanca o luz infrarroja. En nefelometría, la luz dispersa se mide en un ángulo de 90° y un ángulo de 25° respecto a la luz incidente. En turbidimetría, la luz dispersa es medida por un detector colocado en el eje de la luz incidente.

45

El extracto proteico de levadura («EPL») utilizado según la invención designa los productos resultantes de la plasmólisis y lisis de la levadura «íntegra», es decir, de levadura «entera», viva o desactivada.

50

El extracto proteico de levadura utilizado según la invención comprende de 30 a 40% en peso de proteínas que presentan un peso molecular superior a 15 kDa, y preferiblemente superior a 30 kDa.

El extracto proteico de levadura utilizado según la invención comprende además de 10 a 14% en peso de ribonucleótidos con un número medio de bases de 280.

A modo de ejemplo, un extracto proteico de levadura utilizado ventajosamente según la invención comprende:

- 5 superior a 30 kDa,
 - de 30 a 40% en peso de proteínas que presentan un peso molecular superior a 15 kDa, y preferiblemente
 - de 10 a 14% en peso de ribonucleótidos con un número medio de bases de 280,
- definiéndose los porcentajes en peso en relación con el peso total del EPL.

10 El extracto proteico de levadura (EPL) tal como se utiliza según la invención es particularmente ventajoso ya que se obtuvo según un procedimiento que ha permitido la extracción y la preservación de las proteínas originales de una cepa de levadura especialmente seleccionada.

Las principales etapas del procedimiento de preparación del EPL son las siguientes:

- 15 - plasmólisis de una levadura íntegra (entera), con el fin por una parte de liberar las macromoléculas internas de dicha levadura en su estado original y por otra parte de inactivar las enzimas de lisis de estas macromoléculas,
- separación por centrifugación,
- recuperación de la fracción soluble que contiene el EPL, y
- eventualmente, secado de la fracción soluble.

El extracto proteico de levadura utilizado según la invención podrá presentarse en forma de un polvo o un líquido más o menos concentrado, y preferiblemente en forma de un polvo.

20 Según la invención, la levadura se elige, por ejemplo, del grupo que comprende *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida*, y es preferiblemente *Saccharomyces* y ventajosamente *Saccharomyces cerevisiae*.

Como ejemplo de un EPL utilizado según la invención, se podrá citar el comercializado por la sociedad Fermentis con la denominación «Spring'Finer®».

25 Se trata más particularmente de un extracto proteico procedente de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Exclusivamente de origen levaduriano, el EPL «Spring'Finer®» está exento de alérgenos.

Según un modo de realización ventajoso de la invención, el extracto proteico de levadura se encuentra en forma de polvo y se utiliza con un contenido que varía de 5 g (gramo) a 80 g por hectolitro (hL) de bebida, preferiblemente de 20 a 60 g/hL, y más preferiblemente de 30 a 50 g/hL.

30 Cuando la bebida es cerveza, y principalmente cerveza blanca, entonces la utilización de un extracto proteico de levadura con un contenido de 30 a 50 g/hL es particularmente adecuado.

Según un modo de realización ventajoso de la invención, el extracto proteico de levadura permite estabilizar la turbidez de la bebida, y en particular de la cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca, a una turbiedad que varía de 40 a 120 EBC, preferiblemente de 50 a 110 EBC e incluso más preferiblemente de 60 a 100 EBC, para un período de tiempo que varía de 0 a 80 días, midiéndose los valores de turbiedad con el nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25 a una temperatura de 4°C y un ángulo de 90° (Analytica EBC - método 9.30).

35 El nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25 está diseñado para medir la turbidez de la cerveza en botellas y en cubetas según dos ángulos de medición:

- 40 - las partículas inferiores a 1 µm, tales como las proteínas, que causan principalmente la dispersión de la luz en un ángulo de 90°,
- las partículas superiores a 1 µm, tales como las levaduras, que causan principalmente la dispersión de la luz en un ángulo de 25°.

Este instrumento cumple las recomendaciones recientes de MEBAK.

45 Los valores de turbiedad se expresan en EBC, ASBC, Helm o FTU. La relación entre estas diferentes unidades es la siguiente: 1 EBC = 69,2 ASBC = 40 Helm = 4 FTU.

La utilización de concentraciones apropiadas del extracto proteico de levadura permite una estabilidad satisfactoria en el tiempo de la turbidez de las bebidas, y principalmente de la cerveza, y preferiblemente de la cerveza blanca.

Se entiende por estabilidad en el tiempo una estabilidad de hasta 80 días en condiciones de conservación a una temperatura de 4°C.

50 La presente invención se ilustrará ahora con ayuda de los ejemplos y figuras siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y, por tanto, de ninguna manera son limitativos.

El EPL utilizado en los ejemplos de la invención es el EPL «Spring'Finer®», y está designado indiferentemente por «EPL» o «EPL Spring'Finer». Se trata de un producto totalmente soluble, que se presenta en una forma microgranulada que favorece su disolución y asegura su empleo. No necesita ningún tratamiento previo a su uso, tal como ajustes de pH u otros.

- 5 El EPL de la invención se compara con el agente de enturbiamiento de la técnica anterior, a saber «Biocloud®» comercializado por Kerry, que es un derivado de levadura.

Los valores de turbiedad descritos en los ejemplos de la invención se miden con el turbidímetro de Haffmans VOS ROTA 90/25, y se expresan en EBC.

- 10 La Figura 1 ilustra la influencia de la concentración (g/hL) del agente de enturbiamiento (EPL y Biocloud) sobre la turbiedad (EBC) de la cerveza estabilizada del tipo «pils», en un ángulo de 90° (Fig. 1a) y un ángulo de 25° (Fig. 1b) en el tiempo t_0 . Las turbiedades se miden a una temperatura de 4°C.

- 15 La Figura 2 ilustra los valores de turbiedad (EBC) obtenidos en función del tiempo (expresada en días) para una cerveza no estabilizada a la que se ha añadido un EPL «original», es decir, que no ha sido pasteurizado. Las muestras se conservaron a 20°C y las mediciones se efectuaron a una temperatura de 20°C y en un ángulo de 90°. Se analizaron diferentes concentraciones de EPL (0, 20, 30, 50 g/hL).

La Figura 2a se refiere a los resultados obtenidos cuando la muestra de cerveza no se agitó antes de la medición y la Figura 2b cuando la muestra de cerveza se agitó antes de la medición.

- 20 La Figura 3 ilustra los valores de turbiedad (EBC) obtenidos en función del tiempo (días) para una cerveza no estabilizada a la que se ha añadido un EPL «original». Las muestras se conservaron a 4°C y las mediciones se efectuaron a una temperatura de 4°C y en un ángulo de 90°. Se analizaron diferentes concentraciones de EPL (0, 20, 30, 50 g/hL).

La Figura 3a se refiere a los resultados obtenidos cuando la muestra de cerveza no se agitó antes de la medición y la Figura 3b cuando la muestra de cerveza se agitó antes de la medición.

- 25 La Figura 4 ilustra los valores de turbiedad (EBC) obtenidos en función del tiempo (días) para una cerveza no estabilizada a la que se ha añadido un EPL pasteurizado a 70°C durante 20 minutos. Las muestras se conservaron a 20°C y las mediciones se efectuaron a una temperatura de 20°C y en un ángulo de 90°. Se analizaron diferentes concentraciones de EPL (0, 20, 30, 50 g/hL).

La Figura 4a se refiere a los resultados obtenidos cuando la muestra de cerveza no se agitó antes de la medición y la Figura 4b cuando la muestra de cerveza se agitó antes de la medición.

- 30 La Figura 5 ilustra los valores de turbiedad (EBC) obtenidos en función del tiempo (días) para una cerveza no estabilizada a la que se ha añadido un EPL pasteurizado a 70°C durante 20 minutos. Las muestras se conservaron a 4°C y las mediciones se efectuaron a una temperatura de 4°C y en un ángulo de 90°. Se analizaron diferentes concentraciones de EPL (0, 20, 30, 50 g/hL).

- 35 La Figura 5a se refiere a los resultados obtenidos cuando la muestra de cerveza no se agitó antes de la medición y la Figura 5b cuando la muestra de cerveza se agitó antes de la medición.

La Figura 6 es un histograma que resume el conjunto de datos obtenidos en las figuras 2 a 5. Más particularmente, ilustra las turbiedades obtenidas para un EPL a una concentración de 30 g/hL (EPL original, EPL pasteurizado 20 minutos a 70°C) en una cerveza no estabilizada, a 20°C, 4°C, con o sin agitación.

- 40 La Figura 7 es un histograma que ilustra las turbiedades obtenidas para un EPL a una concentración de 30 g/hL (EPL original, EPL pasteurizado 20 minutos a 70°C antes de la adición a las botellas y EPL pasteurizado 20 minutos a 70°C en las botellas con la cerveza) en una cerveza estabilizada del tipo «pils», a 20°C, 4°C, con o sin agitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación del EPL de la invención con un agente de enturbiamiento de la técnica anterior «Biocloud®»

- 45 Este ejemplo estudia la influencia de la concentración del agente de enturbiamiento (EPL o Biocloud) sobre la turbiedad de la cerveza estabilizada del tipo «pils».

El agente de enturbiamiento EPL (Spring'Finer) según la invención se compara con el agente de enturbiamiento Biocloud® de la técnica anterior.

- 50 La cerveza utilizada es del tipo «pils». Denominada igualmente pilsener, pilsen o pilsner. Se trata de un tipo de cerveza rubia y límpida, de baja fermentación emparentada con el tipo lager. Tiene una graduación alcohólica de 5 grados y posee un amargor medio, dependiendo del tipo de lúpulo utilizado.

Antes de su adición a las botellas, cada agente de enturbiamiento (EPL o Biocloud) se disuelve en un volumen de cerveza pils equivalente a una botella. La masa de agente de enturbiamiento utilizada es tal que éste se concentra 100 veces. Se trata de añadir a continuación a las botellas el agente de enturbiamiento en solución en una relación de 1/100 de su volumen.

5 Las concentraciones finales analizadas varían de 0 a 50 gramos (g) de agente de enturbiamiento por hectolitro (hL) de cerveza pils.

Con el fin de ilustrar lo anterior, he aquí hay un ejemplo en cifras para la concentración final de 50 g/hL de agente de enturbiamiento. Se disuelven 12,5 g de agente de enturbiamiento en 250 mL de cerveza pils, lo que da una concentración de 5000 g/hL. A continuación, se añaden 2,5 mL de esta solución a las botellas de 250 mL de cerveza pils. Si el factor de dilución es 100 (250/2,5), la concentración final será 50 g/hL de agente de enturbiamiento por botella de 250 mL de cerveza pils.

Las muestras se homogenizan (agitan) antes de la medición.

15 Las mediciones de turbiedad en un ángulo de 90° y un ángulo de 25° de las muestras de cerveza se efectúan a una temperatura de 4°C con el nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25. Los valores de turbiedad se expresan en EBC.

Resultados

Los resultados se ilustran en el Figura 1 (Fig. 1a y Fig. 1b).

Los valores de turbiedad aumentan linealmente con la concentración del agente de enturbiamiento.

20 El EPL provoca una turbidez más fina en la cerveza que Biocloud. En efecto, se observa que para el EPL, la turbiedad a 90° es más alta que a 25°, mientras que para Biocloud se observa lo contrario.

Conclusión

Parece que el EPL ofrece una turbidez más fina que Biocloud, lo que le da la ventaja de ser más homogéneo y, por tanto, más atractivo para el consumidor. Además, tiene menos tendencia a sedimentar en el fondo de la botella, lo que influye así favorablemente en la estabilidad de la turbidez con el tiempo.

25 **Ejemplo 2: Influencia del tipo de cerveza y de la temperatura sobre los valores de turbiedad obtenidos con el EPL**

Productos analizados:

Agente de enturbiamiento de la invención EPL (Spring'Finer)

30 Cerveza A: cerveza filtrada, estabilizada (se han retirado todos los complejos «proteínas-polifenoles» responsables de la turbidez) y pasteurizada.

Cerveza B: cerveza centrifugada y pasteurizada (no estabilizada).

Cerveza C: cerveza centrifugada (no pasteurizada y no estabilizada).

35 Antes de la adición a las botellas, el agente de enturbiamiento EPL se disuelve en un volumen de cerveza A, B o C equivalente a una botella y se pasteuriza durante 20 minutos a una temperatura de 70°C. La masa de agente de enturbiamiento utilizada es tal que éste se concentra 100 veces. Se trata a continuación de añadir a las botellas el agente de enturbiamiento en solución en una relación de 1/100 de su volumen.

La concentración final en cada botella es 30 gramos (g) de EPL previamente disuelto por hectolitro (hL) de cerveza.

Las muestras se homogenizan (agitan) antes de la medición.

40 Las mediciones de turbiedad de las muestras de cerveza se efectúan en un ángulo de 90°, a una temperatura de 20°C y 4°C con el nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25. Los valores de turbiedad se expresan en EBC.

Resultados

Los resultados se ilustran en la tabla 1 siguiente.

45 *Tabla 1:* Valores de turbiedad (EBC) en un ángulo de 90° para muestras de cerveza (A, B, C) que comprenden 30 g/hL de EPL (previamente pasteurizado en solución), y para dos cervezas blancas comerciales belgas (Blanca 1, Blanca 2), a 20°C y 4°C.

Cerveza	Turbidez a 90° (EBC) 20°C	Turbidez a 90° (EBC) 4°C
A (ensayo 1)	13	30
A (ensayo 2)	26	51
B	20	96
C	28	100
Blanca 1	23	100
Blanca 2	35	100

Los valores de turbiedad son superiores para una temperatura de 4°C que para una temperatura de 20°C: el EPL está implicado en la formación de la turbiedad por frío debido a la asociación de polipéptidos y polifenoles.

- 5 Como se esperaba, la formación de turbiedad por frío en presencia de EPL es mejorada en cervezas no estabilizadas (B y C). En efecto, en la cerveza estabilizada (A) se han retirado todos los complejos «proteínas-polifenoles» responsables de la turbiedad.

Conclusión

El EPL añadido a las cervezas no estabilizadas (B y C) permite alcanzar una turbiedad por frío similar a la de las cervezas blancas comerciales belgas (Blanca 1 y Blanca 2).

10 **Ejemplo 3: Estabilidad de la turbiedad asociada con la utilización del EPL en cervezas no estabilizadas**

Productos analizados:

Agente de enturbiamiento EPL (Spring'Finer) de la invención

Cerveza C: cerveza centrifugada (no pasteurizada y no estabilizada).

- 15 Antes de la adición a las botellas, el agente de enturbiamiento EPL se disuelve en un volumen de cerveza C equivalente a una botella. La masa de agente de enturbiamiento utilizada es tal que éste se concentra 100 veces. Se trata a continuación de añadir el agente de enturbiamiento en solución a las botellas en una relación de 1/100 de su volumen.

Tratamientos:

Sin pasteurización: EPL original

- 20 Solución de EPL 100 veces concentrada (obtenida por disolución previa en la cerveza C), pasteurizada durante 20 minutos a 70°C antes de su adición a las botellas.

Las concentraciones analizadas finalmente en las botellas son 0, 20, 30 y 50 g de EPL disuelto previamente/hL de cerveza.

- 25 Las mediciones de turbiedad de las muestras de cerveza se efectúan a 90°, a una temperatura de 20°C y 4°C con el nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25. Los valores de turbiedad se expresan en EBC.

Las turbiedades de las cervezas que contienen EPL se miden durante un período de 75 días. Las cervezas se almacenan a 20°C y 4°C y se mide su turbiedad antes de la homogeneización (agitación) y después de la homogeneización de las muestras (con el fin de reproducir las condiciones de servicio de la cerveza: «vierta primero medio vaso y agite suavemente la botella antes de llenar el vaso»).

30 *Resultados*

Los resultados se ilustran en las figuras 2 a 6.

1) *EPL original en solución (sin pasteurización del agente de enturbiamiento EPL)*

Se ilustran los valores de turbiedad obtenidos en función del tiempo para la cerveza C a la que se ha añadido el EPL original a diferentes concentraciones:

- 35 - Figura 2a (sin agitación antes de la medición) y Figura 2b (con agitación antes de la medición), para una temperatura de 20°C,
- Figura 3a (sin agitación antes de la medición) y Figura 3b (con agitación antes de la medición), para una temperatura de 4°C.

2) *EPL en solución pasteurizado durante 20 minutos a una temperatura de 70°C antes de su adición a las botellas*

Se ilustran los valores de turbiedad obtenidos en función del tiempo para la cerveza C a la que se ha añadido el EPL en solución pasteurizado a diferentes concentraciones:

- Figura 4a (sin agitación antes de la medición) y Figura 4b (con agitación antes de la medición), para una temperatura de 20°C,

5 - Figura 5a (sin agitación antes de la medición) y Figura 5b (con agitación antes de la medición), para una temperatura de 4°C.

3) *Resumen de los puntos 1 y 2 para la concentración de 30 g/hL*

En la Figura 6 se ilustran los valores de turbiedad para la cerveza C a la que se han añadido el EPL original y el EPL en solución pasteurizado en una relación de 30 g/hL, medidos a 20 y 4°C, con o sin agitación.

10 *Observaciones y conclusiones de las figuras 2 a 6*

El objetivo principal de la utilización de un agente de enturbiamiento es que la turbidez se mantenga estable con el tiempo y, por tanto, no sedimente en el fondo de las botellas.

Incluso si la turbidez de la cerveza debido a la utilización de EPL (original o pasteurizado) disminuye ligeramente al principio, finalmente se estabiliza.

15 Nuevamente, los valores de turbiedad son superiores para una temperatura de 4°C que para una temperatura de 20°C: el EPL está implicado en la formación de la turbidez por frío debido a la asociación de polipéptidos y polifenoles.

La utilización del EPL original es por tanto una buena opción ya que, por una parte, es fácil de utilizar y, por otra parte, permite una buena estabilidad de la turbidez de la cerveza con el tiempo.

20 **Ejemplo 4: Estabilidad de la turbidez asociada a la utilización del EPL en una cerveza pils**

Productos analizados:

Agente de enturbiamiento de la invención EPL (Spring'Finer)

Cerveza A: cerveza filtrada, estabilizada (se han retirado todos los complejos «proteínas-polifenoles» responsables de la turbidez) y pasteurizada.

25 Antes de la adición a las botellas, el agente de enturbiamiento EPL se disuelve en un volumen de cerveza A equivalente a una botella. La masa de agente de enturbiamiento utilizada es tal que éste se concentra 100 veces. Se trata de añadir a continuación a las botellas el agente de enturbiamiento en solución en una relación de 1/100 su volumen.

Tratamientos:

30 Sin pasteurización: EPL original

Solución de EPL concentrada 100 veces (obtenida por disolución previa en cerveza A) pasteurizada durante 20 minutos a 70°C antes de añadirla a las botellas.

Pasteurización de las botellas durante 20 minutos a 70°C después de la adición de la solución de EPL concentrada 100 veces no pasteurizada.

35 Las concentraciones analizadas finalmente en las botellas son 0, 20, 30 y 50 g de EPL disuelto previamente/hL de cerveza.

Las mediciones de turbiedad de las muestras de cerveza se efectúan a 90°, a una temperatura de 20°C y 4°C con el nefelómetro de Haffmans VOS ROTA 90/25. Los valores de turbiedad se expresan en EBC.

40 Las turbiedades de las cervezas que contienen EPL se miden durante un período de 75 días. Las cervezas se almacenan a 20°C y 4°C y se mide su turbiedad antes de la homogeneización (agitación) y después de la homogeneización de las muestras.

Resultados

45 Los valores de turbiedad medidos en un ángulo de 90° para la cerveza A a la que se han añadido el EPL original (30 g/hL), el EPL disuelto y previamente pasteurizado (30 g/hL) y el EPL disuelto pasteurizado en botellas con cerveza (30 g/hL), a 20 y 4°C, con o sin agitación, se ilustran en la Figura 7.

Observaciones y conclusiones

Se deduce de la figura 7 que la turbidez en la cerveza que comprende el EPL original o el EPL pasteurizado disminuye significativamente durante el almacenamiento de la cerveza.

5 La estabilidad de la turbidez durante el tiempo en presencia del EPL (original o pasteurizado) a 4°C se ve impactada negativamente en las cervezas estabilizadas, mientras que este no es el caso en las cervezas no estabilizadas (véase la figura 6)

En efecto, en las cervezas estabilizadas de tipo pils (cerveza A), se han retirado todos los complejos «proteínas-polifenoles» responsables de la turbidez.

10 Además, la pasteurización de la cerveza que comprende el EPL previamente disuelto parece afectar al agente de enturbiamiento en su estructura y afecta por tanto a la estabilidad de la turbidez. En efecto, cuando la muestra no se homogeneiza antes de la medición, se observa una caída significativa de la turbidez, mientras que ésta se vuelve a poner completamente en suspensión cuando se agita la botella, lo que hace suponer una degradación del EPL.

Bibliografia

1. Steiner E., Becker T. and Gastl M., Turbidity and Haze Formation in Beer - Insights and Overview, 2012, J. Inst. Brew., 116, 360-368.
- 5 2. Delvaux, F., Delvaux, F.R., Delcour, J.A., Characterisation of the colloidal haze in commercial and pilot scale Belgian white beers, 2000, J. Inst. Brew., 106, 221-227.
3. Bamforth, C. W., Beer haze. 1999, J. Am. Soc. Brew. Chem., 57(3), 81-90.
4. Loisa, M., Nummi, M. and Daussant, J., Quantitative determination of some beer protein components by an immunological method, 1971, Brauwissenschaft, 24(10), 366-368.
- 10 5. Asano, K., Shinagawa, K. and Hashimoto, N., Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation, 1982, J. Am. Soc. Brew. Chem., 40(4), 147-154.
6. Limure, T., Nankaku, N. Watanabe-Sugimoto, M., Hirota, N., T. Z., Kihara, M., Hayashi, K., Ito, K. and Sato, K., Identification of novel haze-active beer proteins by proteome analysis, 2009, J. Cereal Sci., 49(1), 141-147.
7. Leiper, K. A., Stewart, G. G. and McKeown, I. P., Beer polypeptides and silica gel. Part I. Polypeptides involved in haze formation, 2003, J. Inst. Brew., 109(1), 57-72.
- 15 8. Nadzeyka, A., Altenhofen, U. and Zahn, H., The significance of beer proteins in relationship to cold break and age-related haze Formation, 1979, Brauwissenschaft, 32(6), 167-172.
9. Siebert, K. J., Carrasco, A. and Lynn, P.Y., Formation of protein-polyphenol haze in beverages, 1996, J. Agr. Food Chem., 44(8), 1997-2005.
- 20 10. Revue des œnologues, N° 120; pages 47-50, 2006.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un extracto proteico de levadura para estabilizar la turbidez o turbiedad de una bebida, principalmente cerveza, y preferiblemente cerveza blanca.
- 5 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el extracto proteico de levadura comprende de 30 a 40% en peso de proteínas que presentan un peso molecular superior a 15 kDa y preferiblemente superior a 30 kDa.
3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el extracto proteico de levadura comprende de 10 a 14% en peso de ribonucleótidos con un número medio de bases de 280.
4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el extracto proteico de levadura se presenta en forma de un polvo o de un líquido más o menos concentrado, y preferiblemente en forma de un polvo.
- 10 5. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la levadura se selecciona del grupo que comprende *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida*, y es preferiblemente *Saccharomyces* y ventajosamente *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el extracto proteico de levadura se encuentra en forma de polvo y se utiliza con un contenido que varía de 5 g (gramos) a 80 g por hectolitro (hL) de bebida, preferiblemente de 20 a 60 g/hL, y más preferentemente de 30 a 50 g/hL.
- 15 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que la bebida es cerveza, preferiblemente cerveza blanca.
8. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el extracto proteico de levadura permite estabilizar la turbidez de la bebida, y especialmente la cerveza, y preferiblemente la cerveza blanca, a una turbiedad que varía de 40 a 120 EBC, preferiblemente de 50 a 110 EBC y aún más preferentemente de 60 a 100 EBC, durante un período de tiempo que varía de 0 a 80 días, midiéndose los valores de turbiedad con un nefelómetro de Haffmans
20 VOS ROTA 90/25 a una temperatura de 4°C y en un ángulo de 90° (Analytica EBC - método 9.30).

Figura 1

Fig. 1a

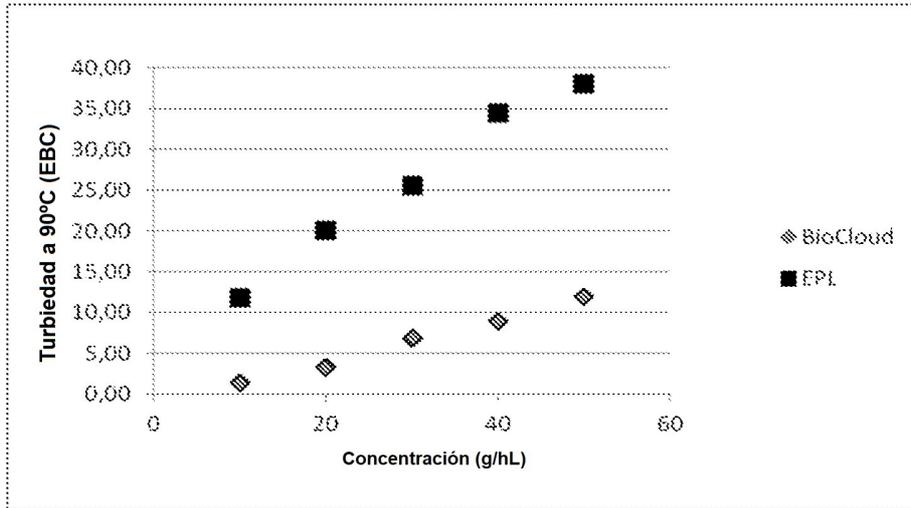


Fig. 1b

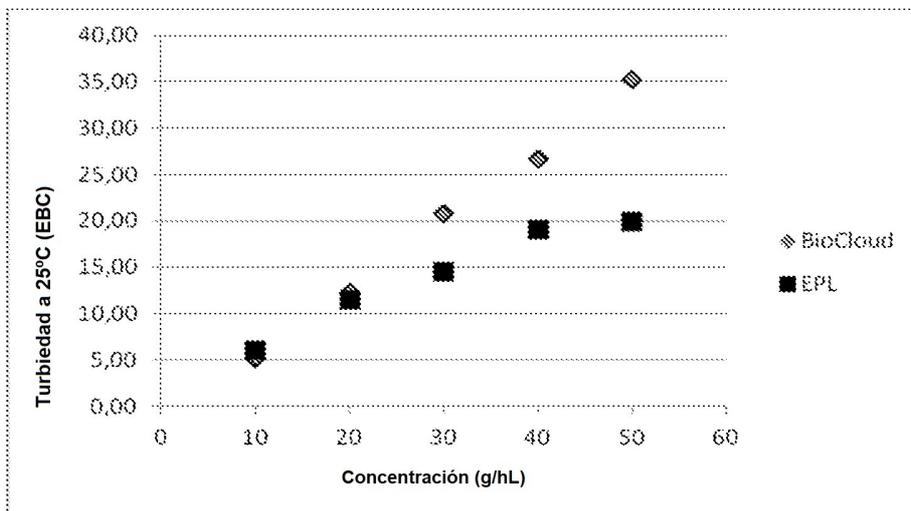


Figura 2

Fig. 2a

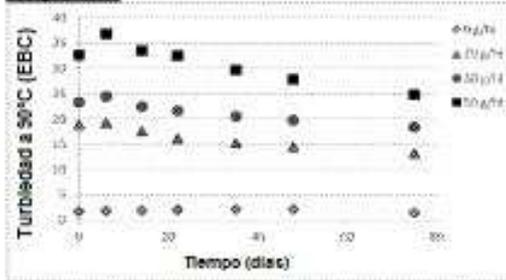


Fig. 2b

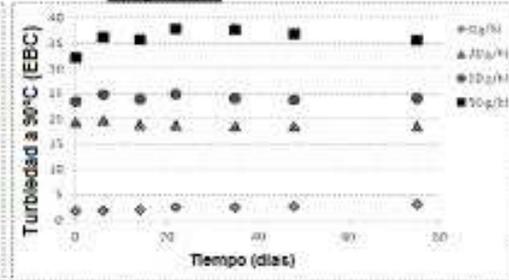


Figura 3

Fig. 3a

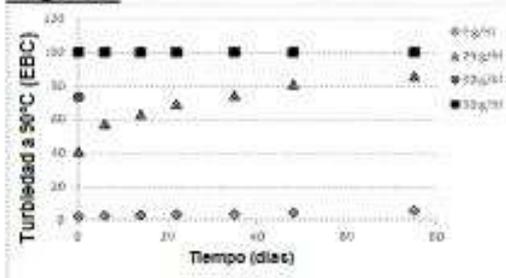


Fig. 3b

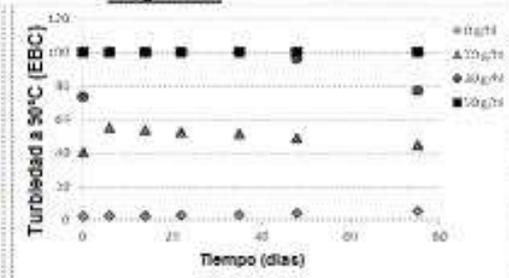


Figura 4

Fig. 4a

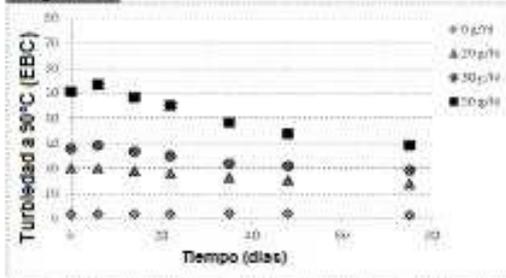


Fig. 4b

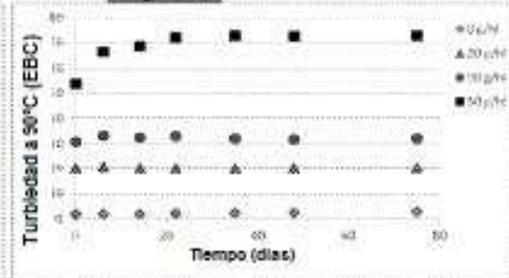


Figura 5

Fig. 5a

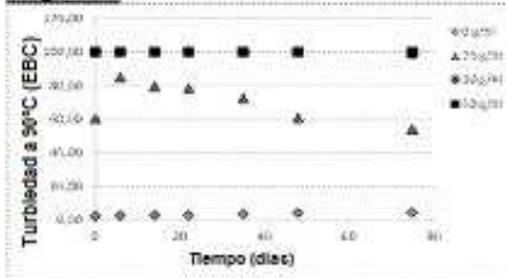


Fig. 5b

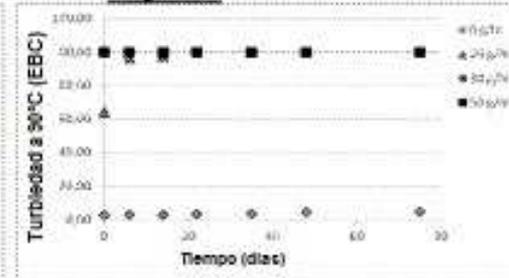


Figura 6

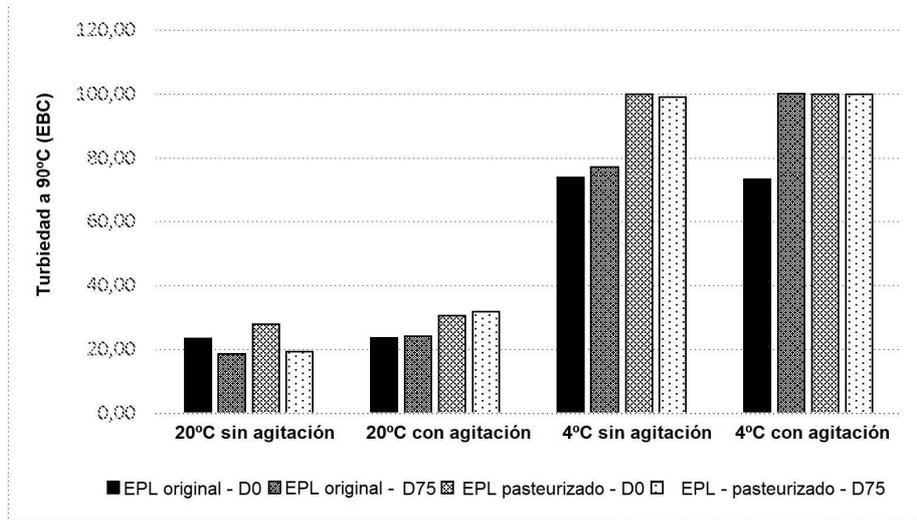


Figura 7

