



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría  
en Tecnología de los Alimentos.**

Maestranda  
***María Mercedes Latza Rovaletti***

## **Modelo de optimización del proceso de estabilización de bebidas fermentadas**

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Tecnología de los Alimentos”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
***Dra. Elisa Benítez***  
Co-Directora  
***Mgter. Marta Horianski***

**Posadas, Misiones 2016**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-  
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS QUIMICAS Y NATURALES**

**“Modelo de optimización del proceso de estabilización  
de bebidas fermentadas”**

**Tesis para optar al grado de  
Magíster en Tecnología de los Alimentos**

**ALUMNA: LATAZA ROVALETTI MARIA MERCEDES**

**DIRECTORA: Dra. Benítez Elisa (UTN)  
CO- DIRECTORA: Mgt. Horianski Marta (UNaM)**

**AÑO: 2016**

## DEDICATORIA

*A mi querido esposo por comprender mis largas horas de estudio y viajes. A mis padres y a mi hijo Tomás.*

## **FIRMAS JURADO DE TESIS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi Directora de Tesis la Dra. Benítez Elisa, por el apoyo, por su guía y su constante interés en mis investigaciones y a mi Co Directora Mgt. Horianski Marta por su aporte y ayuda en esta investigación.

A la Dra Sosa Laura, Directora del grupo QUITEX, por su dedicación, conocimiento y acompañamiento en general.

A todos mis compañeros de trabajo del grupo QUITEX-UTN y del Laboratorio de la Dirección de Bromatología por su apoyo, comprensión y colaboración en mis ausencias por mis viajes y exámenes.

A la Universidad Tecnológica Nacional- Facultad Regional Resistencia y CONICET por financiar esta investigación.

## RESUMEN

La inestabilidad coloidal, físicoquímica, más común, en la cerveza cristalina, es causada por las interacciones entre las proteínas y los polifenoles. La combinación de ambos produce un velo visible, que reduce significativamente la vida útil de la bebida. Las proteínas precursoras de velo, se combinan con el ácido tánico (AT); un polifenol, polimerizado utilizado para revelar la concentración de proteínas formadoras de velo en la cerveza.

La cerveza también contiene un número de constituyentes que podrían influenciar la respuesta turbidimétrica del ácido tánico en la formación del velo proteína-polifenol, siendo uno de ellos los polisacáridos, que se sabe, se encuentran formando las partículas coloidales.

En este trabajo, se utilizó una metodología de superficie de respuesta para predecir la influencia de los polisacáridos totales (PST) y proteínas en la formación del velo. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una metodología de Diseño Central Compuesto (DCC). Las muestras de cerveza fueron preparadas con concentraciones variables de polisacáridos totales y proteínas. El rango de concentración de PST utilizado fue de 1,34 a 2,23 g L<sup>-1</sup> y concentraciones de proteínas entre 0,11 a 0,18 g L<sup>-1</sup>.

Al observar los resultados se visualizó que el incremento de la turbiedad en respuesta a la adición de PST fue similar a la respuesta obtenida al adicionar las proteínas. Los análisis de regresión indicaron una correlación y dependencia significativa entre los valores observados con los valores de respuesta previstos ( $R^2 = 97,87\%$  y  $R^2 [\text{adj}] = 95,75\%$ ). Además, estos valores indicaron que el modelo experimental puede explicar el 95,75% del total de la variación. Por lo tanto, la utilización de AT como indicador de la presencia de proteínas formadoras de velo que es comúnmente usado, podría conducir a errores considerables, debido a que los polisacáridos también pueden reaccionar con AT causando incrementos considerables en la turbiedad, cuya interacción no fue considerada en estudios previos.

## ABSTRACT

Colloidal instability in crystal beer is mainly caused by interactions between proteins and polyphenols. These two combine producing a visible haze that reduces the physical shelf life of beer. The haze active proteins (HAPs) react with tannic acid (TA); therefore, this reaction provides a way to determine HAP concentrations in beer. Beers also contain a number of constituents that may influence the protein–polyphenol haze formation, one of which is the polysaccharides, which are known to form colloidal particles. We used a response surface methodology to predict the influence of total polysaccharides (TPS) and proteins on beer haze. Experiments were carried out using the Central Composite Design (CCD) methodology. Samples of beer were prepared with variable concentrations of TPS and proteins. TPS concentrations ranged between 1,34 and 2,23 g L<sup>-1</sup> and proteins concentrations between 0,11 and 0,18 g L<sup>-1</sup>. Results show that the increase in turbidity in response to TPS addition was similar to that in response to protein addition. Our regression analyses indicate a significant dependency and correlation between the observed values and the predicted response values ( $R^2 = 97,87\%$  and  $R^2 [\text{adj}] = 95,75\%$ ). Furthermore, these values indicate that our experimental model can explain 95,75% of the total variation. Therefore, using TA as an indicator of the presence of HAPs, as commonly done, can lead to considerable errors, since the polysaccharides also react with TA, and this reaction actually causes a considerable increase in turbidity, whose interaction was not considered in previous studies.

## INDICE

### Contenido

CAPITULO I	1
1.1 INTRODUCCION	1
1.1.1 Consumo de Cerveza	1
1.1.2 Situación Problema	1
1.1.3 Factores que provocan la formación de velo	2
1.1.4 Reducción de los polifenoles HA en la cerveza	6
1.1.5 Reducción de las proteínas HA en la cerveza	6
1.2 METODOLOGIA PROPUESTA	7
1.2.1 Factores que influyen la determinación de la turbidez	8
1.2.2 Análisis Estadístico	10
1.2.3 Contribuciones del plan de trabajo	11
1.3 ALCANCES Y DEFINICION DEL PROBLEMA	11
1.3.1 Partículas precursoras de velo	11
1.3.2 Objetivos	12
CAPITULO II	13
2.1 CONSIDERACIONES GENERALES	13
2.1.1 Historia	13
2.2 ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA	13
2.2.1 Malteado	13
2.2.2 Molienda	16
2.2.3 Maceración	17
2.2.4 Cocción del mosto	17
2.2.5 Clarificación del mosto, enfriamiento y aireación	18
2.2.6 Fermentación	18
2.2.7 Etapa de Filtración	19
2.2.8 Etapas de refinación	20
CAPITULO III	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Materiales	23
3.2 Obtención de cerveza artesanal en la planta piloto de la UTN-FRRE	23
3.3 Modificación de la fuerza iónica	27
3.4 Evaluación de la influencia de los polisacáridos nativos y agentes precursoras de velo; Gelatina (G) y AT	28
3.5 Metodología de superficie de respuesta para identificar la magnitud de la interacción entre los polisacáridos y el ácido tánico	29



3.6 Pruebas con Sílica Gel .....	30
3.7 Determinaciones químicas .....	31
3.8 Preparación de la muestra para microscopia electrónica de barrido.....	32
3.9 Análisis Estadístico.....	32
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>33</b>
4.1 Modificación de la Fuerza Iónica .....	33
4.2 Interacción entre los Polisacáridos Totales (PST) y las proteínas (P) naturales de la Cerveza .....	33
4.3 Interacción entre los Polisacáridos Totales (PST) y los Polifenoles (PP) naturales de la cerveza. ....	39
4.1.4 Interacción entre HA-proteínas y PST sobre la respuesta turbidimétrica del Ácido Tánico ( $\tau_{AT}$ ).....	40
4.5 Interacción de las Proteínas-HA y los PST sobre la respuesta turbidimétrica de la Gelatina. ....	43
4.6 Estabilización de Cerveza por Tratamiento con SG: Efecto de los Polisacáridos..	46
4.7 Interacción de los Polisacáridos con la Sílica Gel .....	50
5-CONCLUSIONES.....	51
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>52</b>
5.1 Propuesta para futuros trabajos.....	52
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>53</b>



# **CAPITULO I**

## **1.1 INTRODUCCION**

### **1.1.1 Consumo de Cerveza**

De acuerdo a datos de la Cámara de la Industria Cervecera Argentina del año 2012, en los últimos veinte años la producción nacional de cerveza ha tenido un crecimiento notable, se registra un crecimiento del 247% durante el período, partiendo en el año 1990 con 6.170 mil hectolitros hasta el año 2011 con 21.433 mil hectolitros (Ablin, 2013). El consumo per cápita es de alrededor de 44,7 litros al año para la cerveza, siendo líder entre las bebidas alcohólicas (Ablin, 2014). Asimismo, el sector cervecero se ubica en el tercer puesto del ranking de alimentos y bebidas de mayor facturación en los canales minoristas, luego de las gaseosas y galletitas. Las cervezas ocupan aproximadamente el 11% del total de las ventas de bebidas ,ubicándose en el cuarto puesto, luego de las sodas, gaseosas y jugos (Grillo Trubba, 2004). Si bien este sector cuenta con métodos de producción competitivos, requiere de una actualización constante de la tecnología utilizada.

### **1.1.2 Situación Problema**

Las bebidas luego del proceso de fermentación muestran una turbidez apreciable debido a la presencia de proteínas, levaduras y restos vegetales que deben ser eliminados para obtener una sensación visual y un sabor agradable en el producto final (Lataza Rovaletti y Col., 2014; Benítez y Col., 2013; Steiner y Col., 2010; Siebert, 2006, 2009; Fleet y Siebert, 2005).

En la industria de producción de cerveza cristalina, por ejemplo, se realiza un período de reposo luego de la fermentación de varios días para eliminar la mayor parte de las levaduras y restos sólidos (Bamforth, 2009). Sin embargo, luego del mencionado período, aún permanecen restos celulares que continúan causando una turbidez apreciable a la bebida y por lo tanto se hace necesario una etapa de filtración,

habitualmente mediante el uso de tierras de diatomeas (Bamforth, 2009; Atkinson, 2005). Si bien la tecnología de microfiltración se está implementando en este tipo de bebida no es utilizada por la gran mayoría de ellas, ya que no se obtiene los mismos resultados en cuanto a la brillantez y estabilidad del producto obtenido (Buttrick, 2010). Posteriormente, continúa la etapa de estabilización, para evitar que luego del envasado se forme velo en la cerveza (Bamforth, 2009).

### **1.1.3 Factores que provocan la formación de velo**

El velo postenvasado es provocado principalmente por la interacción entre proteínas y polifenoles, que causan con el tiempo partículas coloidales de tamaño variable. Por lo tanto para evitar que esas partículas se formen, se suele disminuir la concentración de polifenoles o de proteínas (Siebert, 2009). Sin embargo no todas las proteínas y polifenoles en las bebidas son formadores de velo, a aquellos polifenoles formadores de velo se los denominará en esta tesis polifenoles HA (*haze active*, de sus siglas en inglés que significan formadores de velo) y a las proteínas formadoras de velo como proteínas HA.

La interacción proteína-polifenol, al menos inicialmente, es reversible y por tanto, no covalente. Los puentes de hidrogeno aceptores y disolventes no polares interfieren con la formación de turbidez, pero no así, las sales (Asano y Col, 1982;. Siebert, 1999). Como resultado, se concluyó que la interacción involucra enlaces de hidrógeno y uniones hidrófobas, pero no la unión iónica.

Se ha demostrado que cuatro factores influyen en la interacción proteína-polifenol en sistemas modelos, como por ejemplo gliadina y ácido tánico: concentración de proteínas, concentración de polifenoles, pH y contenido de alcohol (Siebert, 1999). Si el contenido de proteína se mantiene constante y la concentración de polifenoles se incrementa, la turbiedad, aumenta, pero sólo hasta cierto punto y luego comienza a descender (Fig. 1.1).

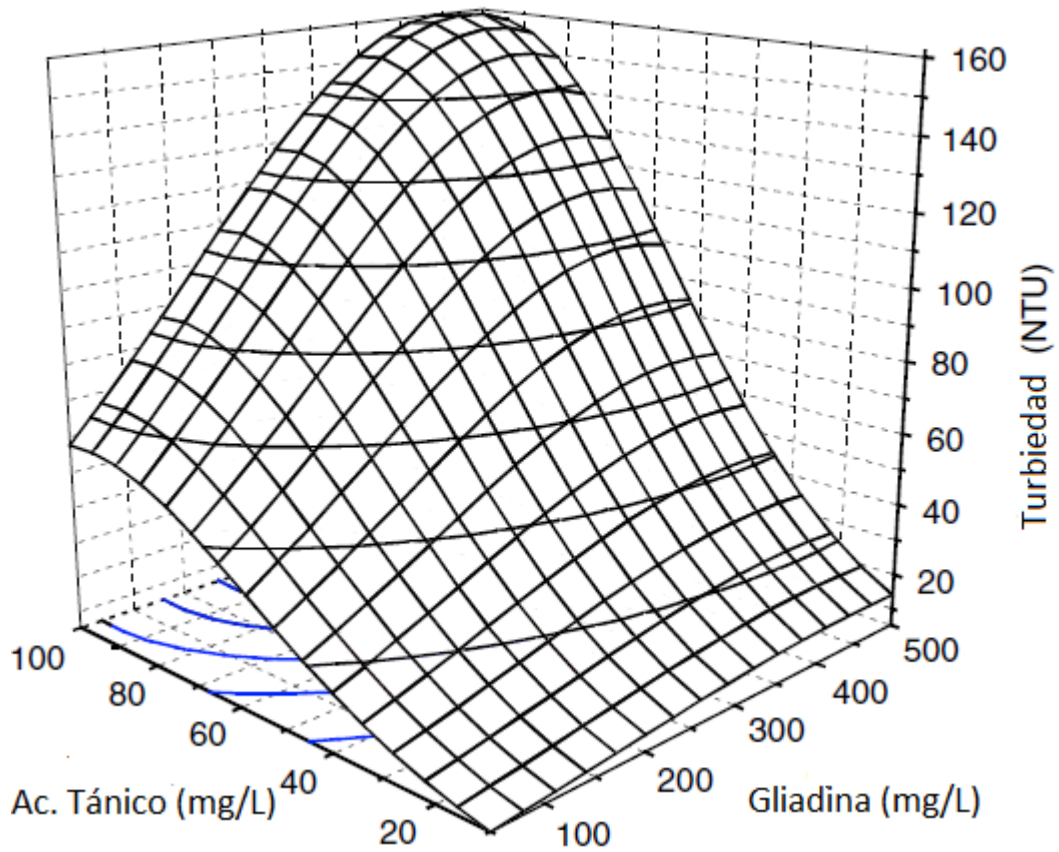


Fig 1.1: Efecto de la concentración de la gliadina y el AT sobre la turbiedad para un 6% de alcohol y un pH 3,7. Fuente: Siebert (1999)

Del mismo modo, si la cantidad de polifenol se mantiene constante y aumenta la de proteína, de nuevo la turbiedad sufre un incremento, para luego disminuir. Se propuso un mecanismo que explica este comportamiento ( Fig. 1.2) (Siebert y Col., 1999).

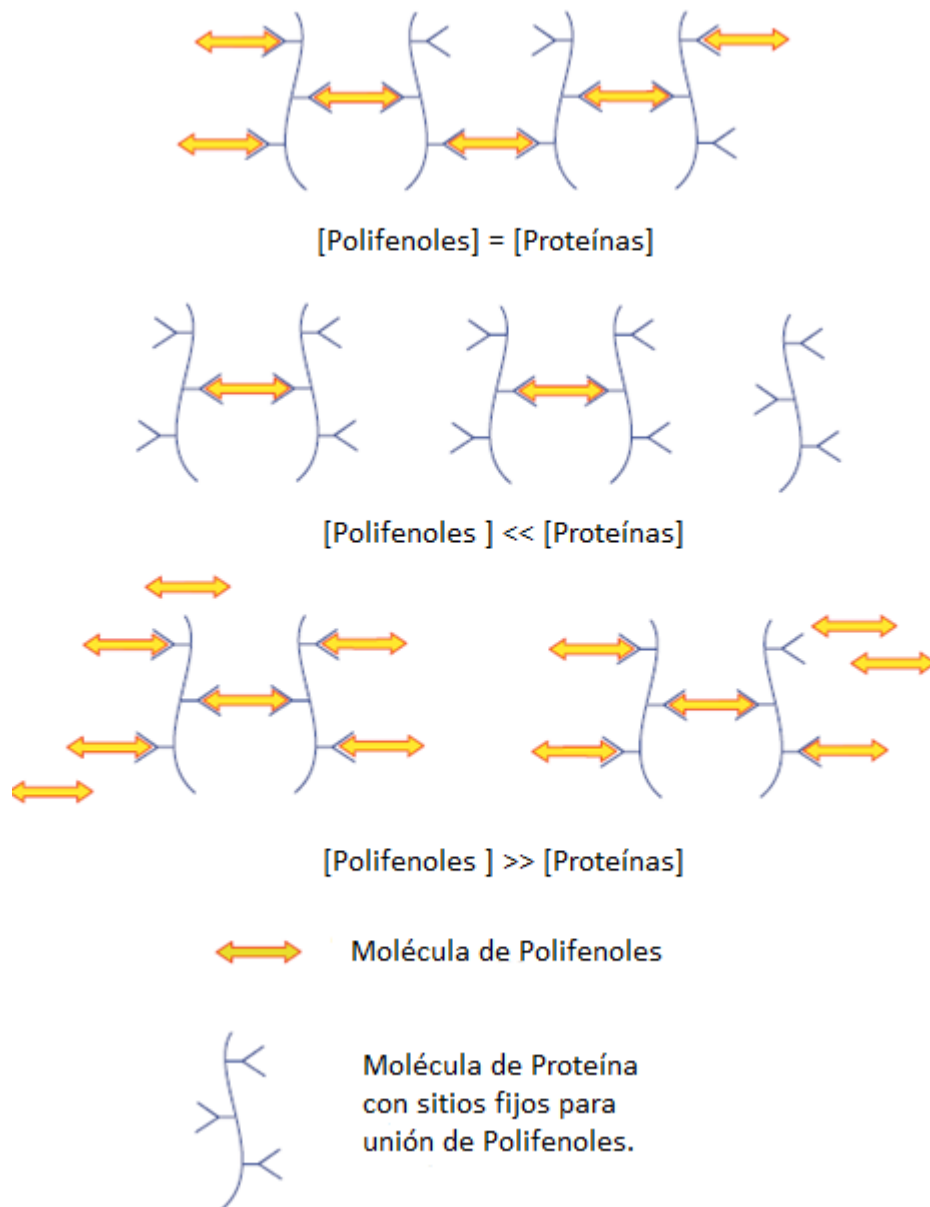


Fig 1.2: Mecanismo de interacción entre Proteínas y Polifenoles. Fuente: Siebert y Col (1996).

Si se considera que los polifenoles HA tienen al menos dos extremos de unión y las proteínas HA, tienen un número finito de sitios en donde los polifenoles pueden unirse, la mayor formación de la red, se produciría cuando el número de extremos de polifenoles coincida con el número de sitios de unión de proteínas, en ese momento, se corresponde al tamaño de partícula más grande y a la mayor dispersión de luz.

En el caso de un sistema rico en proteínas como la cerveza, los polifenoles serían fácilmente capaces de tender un puente sobre dos proteínas juntas, pero relativamente pocos de estos “complejos” se unirían, esto da lugar a partículas más pequeñas y menor dispersión de luz. En una situación rica en polifenoles como el jugo de fruta o el

vino, la mayoría de los sitios de adhesión en las proteínas estarían saturados, pero relativamente pocos de los otros extremos de los polifenoles encontrarían unión con una proteína vacante. Esto también daría lugar a partículas más pequeñas y menor dispersión de la luz.

Los efectos del pH y de concentración de etanol, sobre la formación del velo, fueron estudiados en un sistema modelo, formado por gliadina y ácido tánico ( Siebert y Col., 1996). Se pudo observar, que el pH, tuvo un llamativo efecto (Fig. 1.3); aproximadamente , se produjo 7 veces mas velo, para las mismas concentraciones de proteínas y polifenoles cerca de un pH 4,0 – 4,2 que para un pH 3,0. Para valores de pH mayores a 4,2, el velo disminuyo. Este efecto puede ser debido al incremento de carga sobre la proteína, a valores de pH por encima y por debajo del punto isoeléctrico, a mayores valores de carga, la interaccion que resulta ser no ionica, resulta en la repulsión de moleculas de proteínas entre ellas.

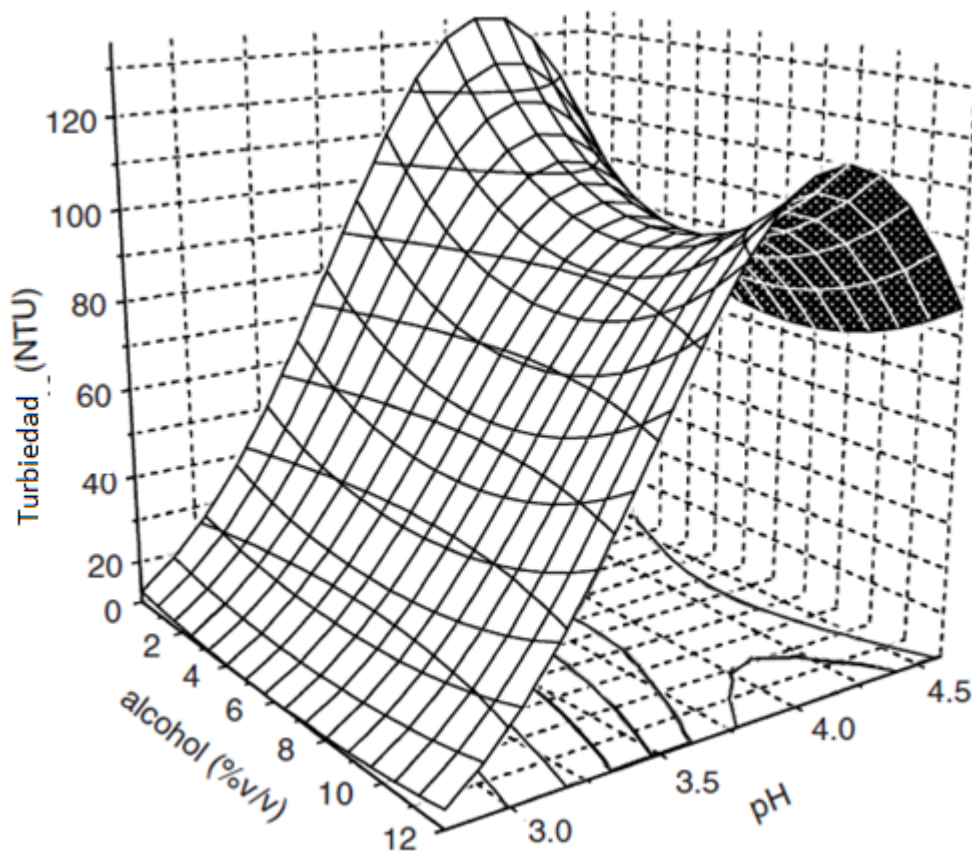


Fig 1.3: Efectos del alcohol y el pH sobre la turbiedad, en el modelo de superficie de respuesta con 275 mg/L de gliadina y 55mg/L de AT. Fuente: Siebert y Col., 1996

El etanol no posee efecto sobre el vel, cerca del pH del jugo de fruta y vino, pero al pH de la cerveza y del jugo de manzana, resulta en un primer modesto decline, seguido de un incremento para concentraciones mas altas. Es conocido que un solvente no polar puede prevenir la formación de velo (Asano y Col., 1982). Es también posible, que un solvente semipolar (etanol) pueda interferir en la formación del velo. A niveles mayores de etanol, podría causar la precipitación de la proteína.

#### **1.1.4 Reducción de los polifenoles HA en la cerveza**

El método más ampliamente difundido, tanto mundialmente, como en Argentina, para reducir el contenido de polifenoles HA es el de utilizar polivinilpolipirrolidona (PVPP). Este método de reducción, del precursor de turbidez, luego de la filtración, tiene el inconveniente que al reducir la concentración de polifenoles, reduce además, la capacidad antioxidante de la bebida y permite que sea más susceptible a la oxidación, cambiando principalmente su sabor. Por lo tanto para evitar este deterioro en la industria se utiliza al agregado de antioxidantes artificiales, que pueden observarse en los envases de cerveza cristalina como Antioxidante 224, que de acuerdo al Código Alimentario Argentino se denomina así, al metabisulfito de potasio.

#### **1.1.5 Reducción de las proteínas HA en la cerveza**

En la cerveza se pueden distinguir dos tipos fundamentales de proteínas: aquellas que causan espuma, que por lo tanto es fundamental conservarlas, y aquellas que causan velo postensado por su combinación con polifenoles naturales de la cerveza, que por lo tanto habría que eliminarlas.

Otro método, menos difundido para disminuir la formación de velo en la cerveza, es el uso de Sílica Gel (SG), que a diferencia de la utilización de PVPP, reduce selectivamente polipéptidos, provenientes de las proteínas degradadas, involucrados en la formación del velo y no las proteínas formadoras de espuma (Leiper y Col., 2003a). La SG posee una estructura muy porosa con una gran área superficial. Su superficie está cubierta con grupos silanol (SiOH) que se unen a los residuos de prolina en los polipéptidos. La SG es altamente selectiva a las proteínas del velo debido a su alto nivel de prolina presente en ellas (Asano y Col., 1982). Las proteínas involucradas en la



espuma contienen muy poca cantidad de prolina y por ello no son afectadas por la sílica (Leiper y Col., 2003).

Asimismo, otra gran ventaja del uso de la SG radica en que reduce el gluten de la cerveza, que produce la enfermedad celíaca. El gluten de la cerveza contiene gran proporción de prolina y es por ello que interacciona con la SG.

Si bien el proceso de estabilización realizado en la industria es eficiente y reduce casi por completo las partículas coloidales que causan la turbiedad e impiden la formación de velos postenvasados por un período de aptitud considerable, el consumo de agente estabilizante es muy superior al óptimo y se desconoce la interacción específica de cada uno de ellos con los componentes de la bebida fermentada.

Por lo tanto es necesario determinar la influencia que causa la variación de la composición de las bebidas fermentadas sobre el consumo de agente estabilizante y sus interacciones específicas. Por ejemplo, las proteínas presentan carga positiva y la SG carga negativa, por ese motivo interaccionarán hasta que uno de los componentes se agote (en general las proteínas) y por ello se utiliza un exceso considerable de sílica gel que sería interesante reducir por cuestiones económicas. Dilucidar el mecanismo de acción y las interacciones específicas permitirá desarrollar un modelo que permita predecir y optimizar la operación de refinamiento de una bebida clarificada.

En el presente estudio se investigó sobre la composición de las partículas coloidales provenientes de bebidas fermentadas luego de la filtración, la composición del medio y su influencia en el proceso de **estabilización**. Asimismo se investigó sobre la interacción específica de las proteínas nativas con el agente estabilizante, con el fin de determinar la concentración óptima del mismo.

## **1.2 METODOLOGIA PROPUESTA**

La metodología propuesta pretende disminuir la concentración de proteínas, ya que la cerveza presenta una mayor proporción de proteínas formadoras de velo que de polifenoles formadores de velo (Siebert, 2006, 2009), por lo tanto existe mayor riesgo de formación de velo post envasado por una reducción inadecuada de las mismas. Solo 2 mg/l de proteína formadora de velo en la cerveza es suficiente para causar una turbidez de 1 EBC (Chapon, 1994). Las proteínas en la cerveza provienen principalmente de la malta, adjuntos como maíz y arroz contienen poca proteína. Delvaux y Col., (2000) analizaron el velo postenvasado de un amplio rango de cervezas

bélgicas comerciales y fueron detectados proteínas y polifenoles como se esperaba, sin embargo una cantidad significativa de carbohidratos, que en algunos casos correspondía al 95% del velo, también fue encontrada.

Mediante una metodología basada en la determinación de la turbiedad luego del agregado de agente estabilizante y gelatina sería posible determinar la concentración óptima del agente. La metodología propuesta ha sido utilizada previamente en un estudio de clarificación de jugos turbios de fruta y ha demostrado ser efectiva para la identificación de las interacciones de proteína y agentes clarificantes (Benítez y Lozano, 2007, Benítez y Col., 2013; Lataza Rovaletti y Col., 2014).

En este trabajo se estudió la interacción específica entre la proteína y el agente estabilizante SG y el efecto que ejercen los polisacáridos nativos sobre esa interacción. En simultáneo se buscó estandarizar la metodología para la determinación de proteínas HA. Estos estudios servirán para construir un modelo de interacción entre el ácido tánico, las proteínas y los polisacáridos, y finalmente predecir el consumo de agente estabilizante.

### **1.2.1 Factores que influyen en la determinación de la turbidez**

El fenómeno de la turbidez en las bebidas, ocurre, cuando el paso de la luz a través de una muestra, es reflejada por las partículas en suspensión. Un observador, percibe la luz reflejada y en consecuencia la muestra parece turbia. Las partículas, de mayor tamaño, por lo general sedimentan y no forman sistemas estables. Los sistemas estables, lo forman, aquellas partículas, cuyas densidades, son similares a la del líquido donde se encuentran suspendidas o cuando las mismas son lo suficientemente pequeñas para que la energía térmica ambiental, las mantenga suspendidas indefinidamente. A estas últimas, se las denomina coloides. La temperatura ambiental, proporciona, la energía necesaria, que resulta en el movimiento browniano.

El instrumento utilizado para realizar dichas mediciones, se denomina nefelómetro.

Un nefelómetro es un turbidímetro, con un detector en un ángulo de 90°. Fig 1.4 (Siebert, 2009).

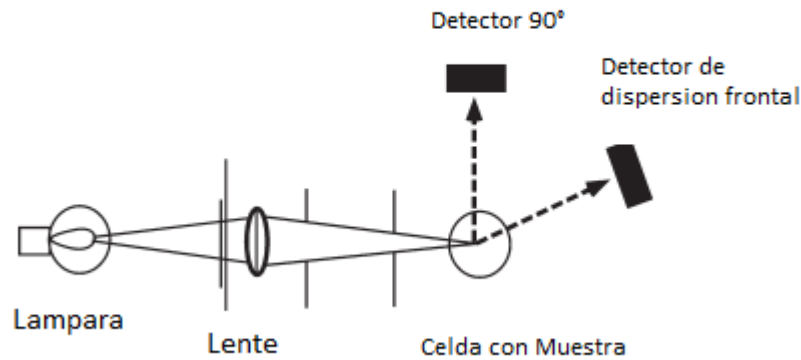


Fig 1.4: Trayectoria de la luz en un turbidímetro. Fuente: Siebert, 2009.

Ha sido observado, que el tamaño de las partículas, así como la concentración, la intensidad de la iluminación, el color de la solución y el fondo de visualización, influyen en la percepción de la turbiedad (Steiner, 2009). La Turbiedad es cuantificada en unidades nefelométricas (NTU).

La determinación de la turbidez es utilizada en esta tesis con dos fines bien establecidos. Por un lado para la determinación de la cantidad de partículas coloidales iniciales y por otro para determinar la interacción de las proteínas con el AT.

### 1.2.1.1 Determinación de la cantidad de partículas coloidales iniciales en la cerveza

La turbidez depende de la concentración, del tamaño y del índice de refracción de las partículas en suspensión (McClements, 2005). El diámetro promedio ( $\bar{D}$ ) y turbiedad nefelométrica ( $\tau$ ) son parámetros sencillos de medir y útiles para describir el tamaño de las partículas.

La expresión de la Ecuación 1.1 se uso para describir el comportamiento turbidimétrico de las partículas coloidales en jugo de manzana (Benitez y Col 2007b; Benitez y Col 2010) y cerveza (Benítez y Col., 2013) que deriva de la ecuación propuesta por Dobbins y Jizmagian (1966):

$$\tau = \frac{3}{2} \frac{C}{\rho_m} \frac{Q_{av}}{D} \quad 1.1$$

Donde  $\rho_m$  es la densidad de la fase continua.  $C$  es la concentración de partículas y  $Q_{av}$  es la eficacia de la dispersión promedio de las partículas irregulares y polidispersas. Para una muestra de cerveza en donde  $\rho_m$ ,  $Q_{av}$  y el tamaño de partículas promedio ( $D$ ) permanece constante, pueden agruparse esas variables obteniendo la turbidez específica para ese sistema ( $\tau_e$ ) (Benítez y Col., 2007a).

En consecuencia es posible utilizar la ecuación 1.2 para predecir la concentración inicial de partículas coloidales, conocida la  $\tau_e$  del sistema:

$$\tau = \tau_e C \quad 1.2$$

### **1.2.1.2. Determinación de la interacción de las proteínas con el AT**

Del mismo modo que las partículas coloidales dispersan la luz, también cuando las proteínas HA interaccionan con el AT se genera el fenómeno de dispersión, siendo este último mayor, por la presencia de partículas. Este fenómeno es muy utilizado en la industria de la cerveza porque permite cuantificar la cantidad de proteínas HA presentes (Taylor y Col., 2015).

### **1.2.2 Análisis Estadístico**

Las proteínas interaccionan con el AT, aumentando la turbidez de la dispersión coloidal, ese aumento de turbidez es útil para determinar la concentración de proteínas en la cerveza. Para predecir la influencia de los polisacáridos totales (TPS) y de las proteínas de la cerveza sobre la formación de velo, hemos utilizado la metodología de superficie de respuesta (MSR)

MSR, es una combinación de técnicas matemáticas y estadísticas, utilizadas para el desarrollo, mejoramiento y optimización de un proceso, utilizada además para evaluar, la significancia relativa, de varios factores, incluso en la presencia de interacciones complejas.

MSR, usualmente, posee tres pasos: 1) diseño del experimento. 2) modelado de la superficie de respuesta a través de la regresión. 3) Optimización.

El objetivo principal de la MSR es determinar, las condiciones óptimas operacionales del proceso, o determinar una región que satisfaga las especificaciones operativas.

La aplicación del diseño de técnicas estadísticas experimentales, en el desarrollo de procesos da a lugar al desarrollo de mejores productos, reduciendo la variabilidad, los tiempos y costos operativos. Diversas variedades, de diseños factoriales, se encuentran disponibles, entre los más conocidos, tenemos el Diseño Central Compuesto (Hasan, 2010)

Adicionalmente, hemos investigado el efecto de la fuerza iónica sobre la respuesta turbidimétrica ( $\tau$ ) durante la formación del velo. Finalmente proponemos un modelo experimental para predecir la influencia de los TPS y proteínas sobre la turbiedad de AT.

### **1.2.3 Contribuciones del plan de trabajo**

La mayor contribución de este trabajo es el mejoramiento operacional del proceso de *estabilización* de la industria cervecera por optimización de la concentración del agente estabilizante a utilizar, y por consiguiente una reducción de los costos asociados. Por otro lado, la metodología planteada servirá para afrontar problemas en procesos similares en otras industrias regionales.

## **1.3 ALCANCES Y DEFINICION DEL PROBLEMA**

### **1.3.1 Partículas precursoras de velo**

La cerveza luego de la fermentación, desarrolla una turbiedad significativa, debido a la presencia de levaduras y tejido celular proveniente del procesamiento de la malta (Benítez y Col., 2013; Fleet y Siebert, 2005; Siebert, 2006; Van der Sman y Col., 2012). Para poder producir una bebida clara, con una buena apariencia visual, las partículas coloidales deben ser removidas (Fleet y Siebert, 2005; Siebert, 2006; Steiner y Col., 2010). La cerveza es filtrada usualmente con tierra de diatomeas (Atkinson, 2005; Bamforth, 2009). Posteriormente, la etapa de estabilización sigue impidiendo la formación de velo post envasado (Bamforth, 2009; Briggs y Col., 2004).

La causa más común de velo post envasado, es debido a la interacción entre proteínas y polifenoles y eventualmente producida por partículas coloidales de tamaños variables (Siebert, 2009; Steiner y Col., 2010).

Dos tipos fundamentales de proteínas han sido identificadas en la cerveza, las que causan espuma que deben ser retenidas y las responsables de la formación de velo que deberían ser reducidas. Diferentes enfoques se han empleado, para determinar la cantidad de proteína formadora de velo. El enfoque más aproximado consiste en añadir una determinada cantidad de AT a la muestra (Bamforth, 2009; Siebert, 2006, 2009). Cualquier incremento de la turbiedad, será proporcional a la cantidad de proteínas precursoras de velo. La ventaja de este enfoque, radica en que solo responden, aquellas sustancias capaces de formar velo con los polifenoles (Siebert, 2006, 2009).

La fuerza iónica puede modificar la respuesta turbidimétrica de la interacción de las proteínas con AT. Benítez, Genovese y Lozano (2007<sup>a</sup>) estudiaron el efecto de KCl en las partículas coloidales de jugo de manzana. Las sales usualmente encontradas en la cerveza son: potasio (200-450 mg L<sup>-1</sup>) como cationes y cloruros (120-500 mg L<sup>-1</sup>) y fosfatos (170-600 mg L<sup>-1</sup>) como aniones (Buiatti, 2009). Por lo tanto, como el comportamiento de la interacción de AT con jugo de manzana es similar a la de AT con cerveza y por el tipo de sales presentes se utilizó KCl en este estudio.

La gelatina, tiene la habilidad de unirse al AT, de la misma manera que lo hacen las proteínas de la cerveza, debido a que poseen composiciones similares de prolina y son similares en el grado de desnaturalización. Hoff, Armstrong y Haff (1980) demostraron que la fuerza iónica influencia la hidrofobicidad del enlace entre AT y gelatina o poli-prolina. Diferentes interacciones entre gelatina y proteínas de la cerveza con AT podría indicar además, diferencias en la composición del medio líquido circundante de las proteínas y ser esas diferencias que influyen en la fuerza iónica.

### **1.3.2 Objetivos**

El objetivo general de esta tesis es mejorar y optimizar la respuesta turbidimétrica del ácido tánico por su interacción con las proteínas y polisacáridos naturales de la cerveza, para ello se plantean los siguientes objetivos particulares.

- (i) Identificar las variables más influyentes en la respuesta turbidimétrica del agente revelador, ácido tánico.
- (ii) Construir un modelo que permita predecir el comportamiento del agente revelador en función de la composición.

## **CAPITULO II**

### **2.1 CONSIDERACIONES GENERALES**

#### **2.1.1 Historia**

La mención más antigua de esta bebida, se encontró en unas tablas de arcilla escritas en lenguaje sumerio, donde era llamada *Siraku* y cuya antigüedad se remonta a 4.000 años a.C. (Jaume Camps Rabadà, 2015)

Entre los siglos XIV y XVI surgen las primeras grandes factorías cerveceras, entre las que destacan las de Hamburgo y Zirtau, en Alemania. A finales del siglo XV, el duque de Raviera Guillermo IV promulga la primera ley de pureza de la cerveza alemana, que prescribía el uso exclusivo de malta de cebada, agua, lúpulo y levadura en su fabricación. La auténtica época dorada de la cerveza comienza a finales del siglo XVIII con la incorporación de la máquina de vapor a la industria cervecera y el descubrimiento de la nueva fórmula de producción en frío, y culmina en el último tercio del siglo XIX, con los hallazgos de Pasteur relativos al proceso de fermentación (Rangel y Col 2009).

Actualmente Argentina, utiliza como norma de regulación, el CAA (Código Alimentario Argentino), norma que en su artículo 1080 (Cap. XIII) define a la Bebida Cerveza, del siguiente modo: “Se entiende exclusivamente por cerveza la bebida resultante de fermentar, mediante levadura cervecera, al mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros. Podrá tener hasta un 80% en peso de la totalidad de los adjuntos cerveceros referido a su extracto primitivo, pero no menos del 20% en peso de malta”. Atendiendo a esta consideración se describirá a continuación el método más general utilizado para elaborar cerveza.

### **2.2 ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA**

#### **2.2.1 Malteado**

El malteado es un proceso que hoy en día se realiza en industrias distintas a las de la elaboración de cerveza, llegando la malta a las instalaciones de cerveza en sacos o a granel para ser utilizada. Existen algunos productores que todavía tienen sus propias malterías,

aunque son la excepción, ya que en caso de necesitarse un tipo especial, ésta se obtendrá en las malterías según las especificaciones de cada elaborador de cerveza.

El malteado consiste en introducir los granos de cebada en unos tanques con agua tibia donde se remojan, y se oxigenan continuamente con aire saturado, para mantener la humedad durante dos o tres días. A continuación se llevan los granos de cebada a germinación, en donde por el efecto de la humedad y del calor comienzan a germinar. Este proceso, dura aproximadamente una semana, obteniéndose la llamada malta verde. Debido a este fenómeno natural, el almidón de la cebada se hace soluble, preparándose para su conversión en azúcar. Para detener la germinación, se traslada los granos germinados al área de secado en donde se hará pasar aire seco y caliente, para obtener de esta manera, la malta, que será de un tipo u otro dependiendo de la temperatura a la que se seque. Si se seca a baja temperatura, se obtiene una malta pálida que se utiliza en la elaboración de cervezas más pálidas y doradas. Cuanto mayor sea la temperatura, más oscura será la malta obtenida y por tanto la cerveza que se elabore a partir de ella. El carácter de la malta obtenida no sólo influirá en el color de la cerveza, sino también en el sabor y aroma (Briggs y Col., 2004). El objetivo de esta etapa es además, disminuir el contenido del agua en la malta por debajo de un 5%.

#### **2.2.2.1 Adjuntos**

Los adjuntos, son preparados de cereales como ser, maíz, trigo, arroz (deben ser cocinados por separados de la malta). Luego son mezclados con la malta en el proceso de maceración. La utilización de adjuntos, altera el carácter de la malta. El almidón de los adjuntos, se hidroliza, durante la maceración, debido a la presencia de enzimas naturales, proporcionando de esta manera, azúcares más pequeños (Briggs y Col., 2004).

#### **2.2.2.2 Agua**

En la elaboración de la cerveza, se conoce al agua utilizada como “Licor”. Esta última, debe ser pura, pero a la vez contener sales apropiadas para la cerveza que se esté elaborando. Por lo que suele ser habitual, en cervecerías más grandes, ajustar la calidad del Licor a la cerveza que se necesita elaborar. Generalmente, el agua es tratada, por diferentes procesos como ser; sedimentación, floculación, filtración. Luego el agua es desinfectada por diferentes métodos como ser: cloro, hipocloritos, dióxido de cloro, ozono y menor frecuencia iones plata. Los más usados son el cloro y los hipocloritos, ya que proveen un efecto residual, pero deben ser posteriormente eliminados por ser el cloro un oxidante muy fuerte. Generalmente es eliminado a través de filtración con carbón activado (Briggs y Col., 2004). En la Tabla 2.1 se detallan las



cantidades máximas y mínimas de sustancias, que puede contener el agua a ser utilizada en la elaboración de cerveza.

**Tabla 2.1** Lista de máximos y mínimos de concentración de sustancias, que no deben ser excedidas en el agua, en la UK en 2001.

Parameter	Units	Concentration or value
Colour	mg/l (Pt/Co scale)	20
Turbidity	Formazin units	1
Odour	Dilution number	3 at 25 °C
Taste	Dilution number	3 at 25 °C
Temperature	°C	25
pH (limits)	pH units	6.5–10.0
Conductivity	$\mu$ S/cm at 20 °C	2500
Permanganate value	O <sub>2</sub> , mg/l	5
Total organic carbon, TDC	C, mg/l	no significant increase
Total coliform bacteria	number/100 ml	0
Faecal coliform bacteria	number/100 ml	0
Faecal <i>Streptococci</i> , <i>Enterococci</i>	number/100 ml	0
<i>Clostridium perfringens</i>	number/100 ml	0
Sulphate reducing <i>Clostridia</i>	number/20 ml	≤ 1
Colony counts	number/ml at 25 or 37 °C	no significant increase
(In some regions tests are also carried out for Protozoa, such as <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> )		
Radioactivity (total indicative dose)	MSv/year	0.1
Tritium	Bq/l	100
Boron	B mg/l	1
Chloride	Cl, mg/l	250
Calcium	Ca, mg/l	250
Total hardness	Ca, mg/l	60 (minimum)
Alkalinity	HCO <sub>3</sub> , mg/l	30 (minimum)
Sulphate	SO <sub>4</sub> , mg/l	250
Magnesium	Mg, mg/l	50
Sodium	Na, mg/l	200
Potassium	K, mg/l	12
Dry residues (after 180 °C)	mg/l	1500
Nitrate	NO <sub>3</sub> , mg/l	50
Nitrite	NO <sub>2</sub> , mg/l	0.5
Ammonia, ammonium ions	NH <sub>4</sub> , mg/l	0.5
Kjeldahl nitrogen	N, mg/l	1.0
Dissolved or emulsified hydrocarbons		
Mineral oils	$\mu$ g/l	10
Benzene	$\mu$ g/l	1
Phenols	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH, $\mu$ g/l	0.5
Surfactants (detergents)	as lauryl sulphate, $\mu$ g/l	200
Aluminium	Al, $\mu$ g/l	200
Iron	Fe, $\mu$ g/l	200
Manganese	Mn, $\mu$ g/l	50
Copper	Cu, mg/l	2
Zinc	Zn, mg/l	5
Phosphate	P, mg/l	2.2
Fluoride	F, mg/l	1.5
Silver	Ag, $\mu$ g/l	10
Arsenic	As, $\mu$ g/l	10
Bromate	BrO <sub>3</sub> , $\mu$ g/l	10
Cadmium	Cd, $\mu$ g/l	5
Cyanide	CN, $\mu$ g/l	50
Chromium	Cr, $\mu$ g/l	50

Fuente: (MacDonald, 2001)

## 2.2.2 Molienda

La molienda, es una de las etapas principales del proceso de elaboración de la cerveza. El objetivo principal de la molienda, es lograr una distribución de las partículas, que se adapte mejor a las subsecuentes etapas del proceso de elaboración. Gran parte de la malta, se convertirá en harina, de manera de permitir el ingreso del agua. Esta hidratará las partículas y permitirá que las enzimas de la malta, se activen. Sin embargo, es importante, que el componente de la cáscara permanezca lo más intacto posible. Esto es debido, a que se utilizará, para formar el lecho del filtro, a través del cual, se filtrará el mosto.

La malta molida, se almacena brevemente, antes de dirigirse al mezclador, donde entrara en contacto con agua caliente, para comenzar el proceso de hidrólisis. (Fig 2.1) ( Bamforth, 2003)

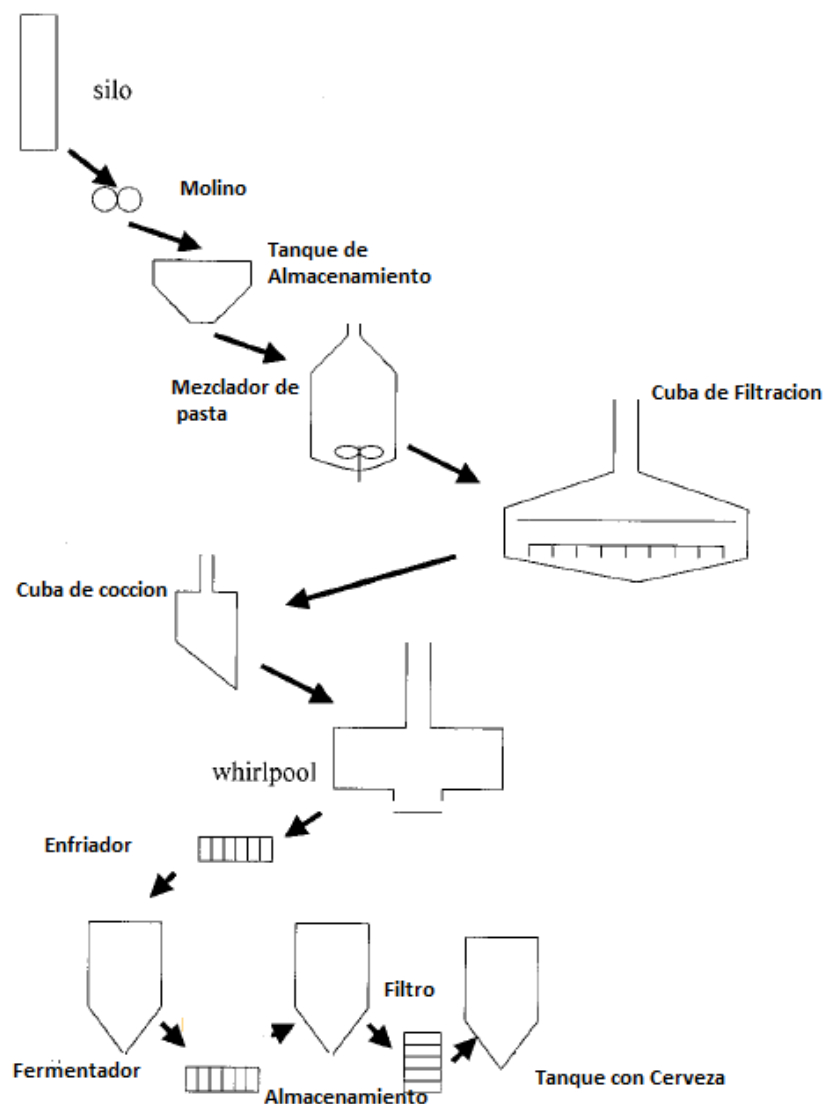


Fig 2.1: Etapas de elaboración de cerveza comercial. Fuente: (Bamforth, 2003)

### **2.2.3 Maceración**

El proceso de maceración, comienza a una temperatura relativamente baja, como ser 45-50 °C: de manera de activar las enzimas sensibles a esas temperaturas. Luego la temperatura alcanza al menos unos 65°C, y a esta temperatura, todo el almidón, se encuentra, gelatinizado. Se trata de la conversión, de una estructura cristalina, de difícil digestión a un estado desorganizado, de fácil acceso para la enzima amilasa, responsable de convertirlo en azúcares fácilmente fermentables (Bamforth, 2003).

La pasta es mantenida a esta temperatura, por aproximadamente una hora, antes de que la temperatura vuelva a incrementarse, hasta los 76°C. Este aumento, es utilizado para detener la actividad enzimática.

A partir de ahora, podríamos decir que se tiene una solución azucarada, y se procede a separar la misma, de los granos que se encuentren “agotados”, en una cuba de filtración (Fig 2.1). El objetivo de esta etapa es obtener un mosto, lo más claro posible, conteniendo tanto como sea posible, los productos solubles de la maceración. Recibiendo el nombre de “Extracto”. Posteriormente, para facilitar el lavado de los granos, se utiliza un burbujeo con agua caliente, con el cuidado de no utilizar un exceso de agua, ya que estaríamos diluyendo el mosto. Los granos agotados, son vendidos como alimento para ganado (Bamforth, 2003).

### **2.2.4 Cocción del mosto**

Durante la cocción se agrega el lúpulo para amargor y aroma. Este último posee resinas, que son extraídas durante la ebullición, y a su vez, transformadas en formas solubles y amargas. El lúpulo, también, posee una mezcla compleja de aceites esenciales, que son los responsables de proporcionarles las diferentes personalidades a las cervezas.

Esta etapa es también útil para concentrar el mosto, en un mayor o menor grado, eliminar sabores indeseables, inactivar cualquier enzima que pudiera haber sobrevivido a las etapas anteriores, esterilizar el mosto, coagular el material proteico, promover la formación del complejo proteína-polifenol (Benítez y Col., 2013b).

Un punto muy importante del hervido del mosto, es la coagulación de muchas de las proteínas de la malta, un proceso que es promovido por los polifenoles extraídos de la malta y el lúpulo. Si estas proteínas, no son removidas, posteriormente, formaran un velo por su interacción con los polifenoles y por lo tanto, sedimentos, que comercialmente son anti estéticos (Bamforth, 2003)

### 2.2.5 Clarificación del mosto, enfriamiento y aireación

Al finalizar, la ebullición, el mosto contiene restos de lúpulo y otros materiales orgánicos suspendidos y por lo cual se procede a una separación (Briggs y Col., 2004).

Hoy en día, en muchas cervecerías, se utiliza el *Whirlpool* para realizar esta etapa. El mosto hervido es trasladado a este equipo, donde ingresa tangencialmente al interior del recipiente y permanece girando por alrededor de una hora. Las fuerzas centrípetas hacen que los sedimentos converjan al centro.

En este momento, el mosto, se encuentra casi listo para iniciar la fermentación, pero antes del agregado de las levaduras, el mismo debe ser enfriado. Para ello, se utiliza un intercambiador de calor, donde existe una transferencia térmica entre el mosto caliente y el agua fría, hasta la temperatura deseada para la fermentación, encontrándose alrededor de los 6°C para la elaboración de cerveza lager y alrededor de los 15-20°C para la elaboración de cerveza ale.

Antes de la adición de la levadura, se burbujea un poco de oxígeno (aire) en el mosto. Aunque el proceso de fermentación que conduce a la producción de alcohol es anaeróbico, en la levadura, ciertas partes de su membrana, requieren algo de oxígeno que la ayudan a crecer. (Bamforth, 2003).

### 2.2.6 Fermentación

La fermentación, se inicia con el sembrado de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). En algunos, pocos casos, se utilizan mezclas de levaduras. Las cepas de levadura varían en sus propiedades y los sabores que imparten.

Las levaduras metabolizan los carbohidratos fermentables, provenientes de la malta u otros cereales, presentes en el mosto, dando productos como alcohol etílico, dióxido de carbono y calor.

Las fermentaciones, pueden ocurrir en la cima del mosto, llamándose, fermentaciones altas, donde las levaduras (*S. cerevisiae*) fermentan en la parte superior del recipiente, ocurren a una temperatura entre 15°C a 20°C, durante 2 o 3 días, denominándose *cerveza Ale*. También, podemos tener las fermentaciones bajas, donde las levaduras (*S. carlsbergis*) se depositan en el fondo, ocurriendo a temperaturas más bajas, entre 7°C a 10°C, denominándose *cerveza Lager*, con una duración de aproximadamente 15 días. (Briggs y Col., 2004).

Las levaduras se seleccionan con referencia a:

1. Su velocidad y grado de crecimiento
2. La velocidad y extensión de la fermentación
3. El sabor y aroma de la cerveza producida
4. En sistemas de fermentación antiguos, es importante que las levaduras de fermentación alta, formen una buena cabeza de espuma, y las levaduras de fermentación baja, sedimenten claramente.

Cuando la fermentación primaria ha finalizado o está finalizando, la densidad de las levaduras disminuyen, pero todavía la cerveza se encuentra inmadura, ya que no ha desarrollado los sabores correspondientes, Por lo cual, se comienza, una segunda fermentación, donde el sabor de la cerveza se refina. A veces, se suele agregar un poco más de mosto nuevo, para mejorar el metabolismo de la levadura. (Briggs y Col., 2004).

### **2.2.7 Etapa de Filtración**

Algunos cerveceros, utilizan centrifugas entre las etapas de fermentación y filtración o entre las etapas de filtración y estabilización, para reducir aún más la cantidad de partículas coloidales (Buttrick, 2010). La etapa de filtración, implica la eliminación de cualquier resto de células de levadura y la disminución de proteínas y polifenoles formadores de velo (Briggs y Col., 2004). Hoy en día, muchas industrias han implementado el uso de membranas de micro filtración (MF) (Bamforth, 2009; Buttrick, 2007) en lugar de la filtración convencional con filtro prensa, utilizando coadyuvantes de filtración, principalmente tierra de diatomeas (*Kieselguhr*) y además; perlita, celulosa o carbón activado (Fillaudeau y Col, 2007). Sin embargo, el *Kieselguhr*, es el material predilecto, ningún otro material alcanza la misma performance y otorga tal brillantez a la cerveza (Buttrick, 2007).

En esta etapa además, es cuando se debe controlar, si la bebida, posee la concentración adecuada de CO<sub>2</sub>, según las exigencias de las diferentes normas (Bamforth, 2003).

La cerveza debe estabilizarse, de tal manera que no ocurran cambios visibles durante su vida comercial, que puede oscilar hasta las 52 semanas desde la fecha de envasado.

Para obtener la cerveza deseada, la misma, debe llegar a esta etapa con < 0,2 millones de células de levadura / ml de cerveza y por lo cual, los procesos discutidos anteriormente son cruciales para el éxito de la filtración de la cerveza.

La fuerza motriz para la filtración es la diferencia de presión entre la entrada del filtro y la salida. La presión es siempre mayor en la entrada y la diferencia de presión es un indicador de la resistencia del filtro al paso del líquido. Un aumento en esta diferencia de presión indica la aproximación hacia el final de la filtración. Un factor importante a tener en cuenta, en esta etapa, es la temperatura de la cerveza, ya que mientras más fría se encuentre, se favorecerá la formación de más velo y por lo tanto se podrá filtrar más cantidad. La turbidez de la cerveza que sale de esta etapa debe ser  $< 0,5$  EEBC. En las buenas prácticas de filtración, las pérdidas de color, extracto, amargura y espuma potencial, deben ser mínimas (Briggs y Col., 2004).

## **2.2.8 Etapas de refinación**

### **2.2.8.1 Estabilización**

#### **2.2.8.1.1 Remoción de Proteínas**

Como ya se ha mencionado en el Capítulo I, las cervezas, deben ser claras y permanecer de esa manera, desde el momento que salen de la Cervecería hasta que llegan al consumidor.

La turbiedad, da la primera impresión visual al consumidor. Por lo tanto, es importante, poseer métodos, no solo para identificar el velo, sino además para inferir en su curso (Steiner y Col., 2010).

Por lo tanto, además de eliminar los restos de levadura, se debe trabajar en disminuir los precursores de velo, de manera de asegurar la estabilidad de la misma.

Una gama de sustancias, pueden causar velo no-biológico (Steiner y Col., 2010):

- $\beta$ - glucanos: Pueden conducir a formar brumas, difíciles de observar a simple vista, pero que causan altas dispersiones de luz.
- $\alpha$ -glucanos (almidón): pueden comportarse de forma similar a los  $\beta$ -glucanos.
- Pentosanos: pueden derivarse de adyuvantes del trigo.
- Bacterias muertas provenientes de la malta.
- Oxalato de calcio, su solubilidad en agua es baja, y precipita en forma de cristales.
- Partículas extrañas, provenientes de contaminaciones accidentales.

Sin embargo, el tipo más común, importante y problemático de velo no biológico es el que deriva de la interacción de proteínas y polifenoles y es a la eliminación de los precursores de estos polímeros a los que los tratamientos de estabilización de la cerveza se dirigen.

Un tratamiento eficaz con respecto a estabilidad del velo es el almacenamiento en frío de la cerveza durante unos siete días, debido a que el frío, promueve la formación de velo. Esta técnica permite una reducción en el costo de otros tratamientos de cerveza diseñados para eliminar proteínas y polifenoles. (Briggs y Col., 2004).

### *Precipitación*

Dado que las proteínas forman complejos con los polifenoles que provocan turbidez no es sorprendente que una clase de polifenol puede ser utilizado para la eliminación de la proteína precursora de velo. El AT reacciona con las proteínas para formar un complejo insoluble. Esto es el resultado de la interacción entre los grupos cetónicos en los grupos de tanino y nucleófilos (SH, NH<sub>2</sub>) en la proteína.

La adición de AT, comúnmente se realiza en la etapa de maduración a 0°C y requiere al menos 24 horas de tiempo de contacto para mayor eficacia. En esencia, los taninos actúan como un precipitante de las proteínas precursoras de velo. Cuando se adiciona el AT al tanque frío se forma un gran volumen de sedimentos, que se ubican en el fondo del tanque. Esto requiere un movimiento cuidadoso de la cerveza desde arriba o el uso de una centrífuga o filtro para separar la cerveza, de los sedimentos. Si esto no se hace con cuidado, las pérdidas de cerveza podrían ser altas. Por esta razón el uso de ácido tánico para la eliminación de la proteína ha ido en disminución, en años recientes (Briggs y Col., 2004).

### *Adsorción*

La Sílica gel, es utilizada como adsorbente de proteínas. Existen dos formas comerciales: hidrogel (>30% Agua) y xerogel (< 10% Agua). La adición de la Sílica Gel (SG), se realiza después de la etapa de filtración. La adsorción, se produce, en un corto lapso de contacto (80% de la adsorción se logra en < de 3 min).

Las proteínas de la cerveza, están asociadas con la formación de espuma de la misma. Esa fue la preocupación por los efectos de los geles de sílice sobre la espuma y su retención.

La secuencia de aminoácidos en la proteína determina su equilibrio hidrófilo/ hidrófobo. Es generalmente aceptado, que las proteínas hidrofílicas son precursoras de velo y las proteínas hidrofóbicas promueven la formación de espuma (Briggs y Col., 2004).

Los sitios activos de la prolina en estos polipéptidos se unen a grupos hidroxilo de la SG de modo que las proteínas involucradas en la formación del velo son adsorbidas mientras que las proteínas de la espuma que contienen poca prolina no se ven afectadas por el tratamiento con SG (Leiper y Col., 2005).

#### **2.2.8.1.2 Remoción de Polifenoles**

Todavía existe cierta preocupación de los cerveceros sobre las técnicas que dependen únicamente de la eliminación de la proteína para la estabilización de la cerveza, ya que se cree que afectarían la espuma de la cerveza.

También se han desarrollado técnicas para eliminar los polifenoles de la cerveza. Los polifenoles responsables de la formación de velo, mediante la interacción con las proteínas que provienen de malta con una pequeña contribución de lúpulo.

##### *Adsorción*

Los primeros trabajos implicaban el uso de materiales sintéticos como el nylon 66 , que eran adsorbentes efectivos de polifenoles. Luego, se desarrolló el polímero PVPP (polivinilpirrolidona). Este es un polímero reticulado, que es insoluble en agua, alcohol y ácido, tiene una gran área superficial para adsorción de los polifenoles precursores de velo. Esto ocurre en la superficie del material a través de enlaces de hidrógeno.

Esta remoción se basa en la interacción de los grupos hidroxilos de los anillos aromáticos con los grupos carbonilos de PVPP (Leiper y Col., 2005).

El PVPP puede ser empleado como un “agente de un solo uso” y en esta situación el complejo insoluble PVPP-Polifenol se elimina en el filtro, a través de la filtración en profundidad con tierra de diatomeas.

La PVPP se muele a un polvo fino con una gran superficie en relación al peso y se utiliza en dosis de  $15 \pm 25$  g / hl. (Briggs y Col., 2004).



## CAPITULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Equipos y materiales para la obtención de cerveza

- ❖ Molino a rodillo para malta.
- ❖ Tres recipientes de acero inoxidable AISI 304 de 50 L.
- ❖ Bastidor con quemadores a gas.
- ❖ Intercambiador de Tubos con funcionamiento en contracorriente.
- ❖ Dos fermentadores tronco cónico de plástico grado alimenticio de capacidad 60 L.
- ❖ Balanzas.
- ❖ Bombas apropiadas.
- ❖ Tapadora manual para tapa corona.
- ❖ Tierra de diatomeas (Standard Super - Cel, porosidad = 3,5  $\mu\text{m}$  permeabilidad =  $2,8 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ , Refil, Argentina).
- ❖ Filtro de papel Whatman N°3.

##### 3.1.2 Otros

- ❖ Iodo
- ❖ *Levaduras Lager*

#### 3.2 Obtención de cerveza artesanal en la planta piloto de la UTN-FRRE

La obtención de Cerveza artesanal, para el desarrollo de esta tesis, se llevó a cabo, en la Planta Piloto de la Facultad Regional Resistencia - Universidad Tecnológica Nacional (UTN).

A continuación se detalla en forma de diagrama de flujo, las etapas de elaboración de la cerveza en la planta piloto.

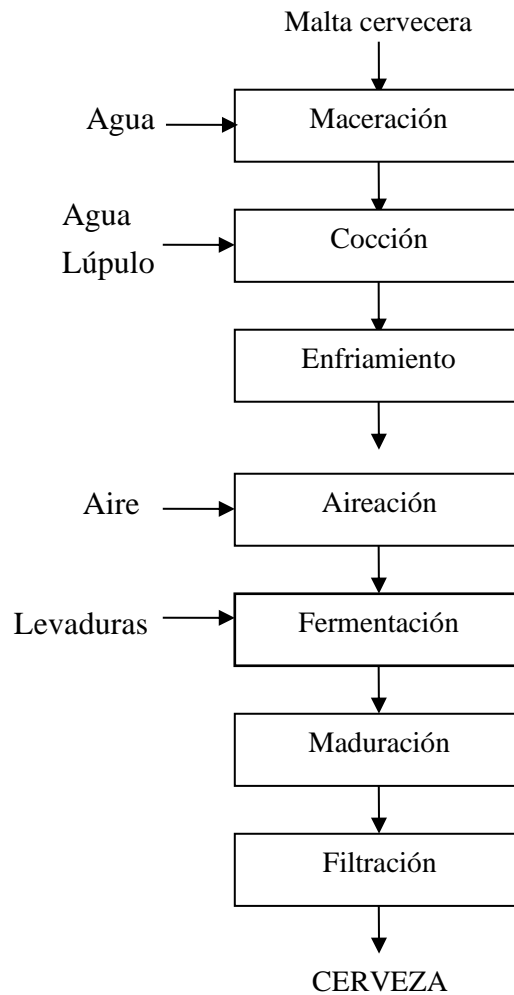


Fig 3.1: Diagrama de Flujo de Fabricación de Cerveza

El trabajo experimental se realizó en la Planta Piloto de la Facultad Regional Resistencia, que posee una línea de proceso para la elaboración de cerveza.

### 3.2.1 Maceración

Durante la primera parte del proceso, la malta es molida y mezclada con el agua de elaboración y da inicio a la maceración. El agua que se utiliza para el proceso, primero pasa por los filtros de carbón activado y osmosis inversa para la desmineralización y desclorinación. Se deben

controlar los valores de pH y conductividad del agua, ya que las levaduras necesitan un ambiente apropiado para desarrollarse. El equipo de la planta piloto utilizado en la primera etapa, se muestra en la Figura 3.2.

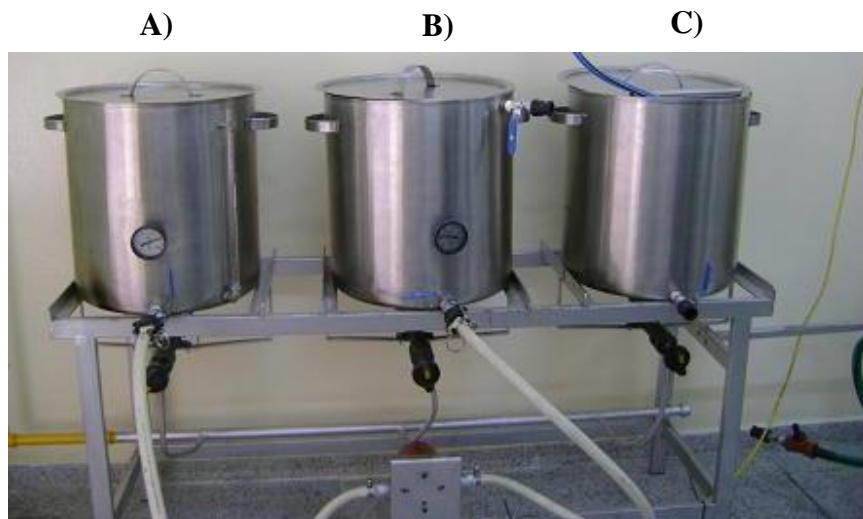


Figura 3.2: Ollas de acero inoxidable de 50 L donde se realizan las etapas de maceración y cocción.

En el primer recipiente (A) se realiza el calentamiento del agua hasta 65 °C para el macerado, durante 90 minutos que ocurre en el segundo recipiente (B). Una vez finalizada la maceración se incorpora el macerado al tercer recipiente (C) y se calienta hasta ebullición, luego del hervor permanece en el recipiente durante 60 minutos.



Figura 3.3: Macerado

Durante el macerado, que ocurre en el recipiente B (Fig. 3.3), las complejas moléculas de almidón y proteínas presentes en el grano son degradadas por enzimas específicas en condiciones definidas de pH y temperatura (el pH no debe ser inferior a 4) a moléculas más simples como azúcares y péptidos. Pasado el tiempo de la maceración, se realiza una prueba de Iodo para observar si todavía existe almidón sin degradar. Si todavía existe almidón, el Iodo se torna azul porque ingresa a los intersticios del almidón, formando un complejo, si no existe almidón, el Iodo conserva su color.

### **3.2.2 Ebullición/Lupulización**

Luego de la desaparición del almidón, se extrae el mosto y se lo trasvasa al recipiente C, para volverlo a calentar, lavar la malta, y hervirlo durante 1 hora. En esta etapa, se procede a el agregado del lúpulo, cuya función es la de contribuir con la formación del sabor, aroma, y amargor. Dependiendo de la cantidad y de la variedad de lúpulo que se utilice, la cerveza tendrá un mayor o menor amargor y aroma.

Este mosto, luego, es dejado en reposo, durante 30 min antes de enfriarlo.

### **3.2.3 Enfriamiento del Mosto**

Una vez finalizado el hervor, el mosto lupulizado es separado de los turbios y es enfriado en un intercambiador de calor hasta alcanzar la temperatura de inoculación requerida por las levaduras. Hasta aquí abarcan las etapas calientes del proceso. El mosto enfriado se airea rápidamente para aportar oxígeno, un nutriente esencial para las levaduras.

### **3.2.4 Fermentación**

Para la etapa de fermentación, se utilizaron levaduras Lager (Saflager S-23, Fernebtis, France), colocando  $0,63\text{g L}^{-1}$ . La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de  $12 \pm 2^\circ\text{C}$ , por un período de 15 días.

### **3.2.5 Maduración**

A continuación se separa la levadura que precipitó y se almacena a una temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . Aquí se produce una segunda fermentación en la que las levaduras transforman el azúcar que

queda en alcohol. Esto se puede favorecer añadiendo mosto parcialmente fermentado, en el que todavía queda azúcar.

Durante este periodo la cerveza desarrollará un carácter especial dependiendo del tiempo que se deje madurar. Una buena cerveza tendrá un periodo de maduración mínimo de tres o cuatro semanas, llegando hasta dos o tres meses.

En la planta piloto se realizó la maduración por un período de 7 días y luego un reposo en frío a  $3\pm 2^{\circ}\text{C}$  por otros dos días.

### **3.2.6 Filtración**

En esta etapa, se procedió a filtrar la cerveza, en un embudo Buchner ( $\varnothing = 50$  mm) con una pre-capa de 1g de tierra de diatomeas (Standard Super - Cel, porosidad =  $3,5 \mu\text{m}$  permeabilidad =  $2,8 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ , Refil, Argentina) sobre un filtro de papel Whatman N°3 a presión negativa (-50hPa).

La metodología fundamental seguida en esta tesis está planteada en 4 ensayos experimentales que se describen a continuación y tres ítems finales sobre las determinaciones fisicoquímicas realizadas y el análisis estadístico.

### **3.3 Modificación de la fuerza iónica**

La influencia de la fuerza iónica en la interacción entre proteínas y AT, fue evaluada a través de dos ensayos. El primer ensayo consistió en la adición a las muestras de cerveza de concentraciones creciente de KCl (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,1M) y subsecuentemente la adición de una solución de AT (Sigma-Aldrich, Alemania) a concentración constante de  $55 \text{ mg L}^{-1}$ . La turbiedad fue medida con un turbidímetro, luego de 30 min. El segundo ensayo, consistió en utilizar una solución de gelatina (G) (Sigma-Aldrich, Alemania) que poseía la misma concentración de proteínas presentes (la concentración de proteínas en la muestra, se determinó, utilizando la técnica de *Bradford, 1976*) en las muestras de cerveza. El nivel de alcohol fue fijado en 4% con etanol 96% (Biopack, Argentina) y el pH = 4 fue fijado utilizando una solución de buffer (Biopack, Argentina). La solución de gelatina fue adicionada a las muestras de cerveza, con concentraciones crecientes de KCl (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,1M) y subsecuentemente se adiciono una solución con concentración constante de AT. La turbiedad fue medida luego de 30 min.

Debido a la diferencia en la fuerza iónica entre la muestra de la cerveza y la gelatina, la conductividad eléctrica de la muestra de cerveza se mide y se correlaciona con la fuerza iónica de una solución de KCl (Benítez y Col., 2007a). Esta correlación proporciona una estimación para la fuerza iónica de la muestra de cerveza.

### **3.4 Evaluación de la influencia de los polisacáridos nativos y agentes precursores de velo; Gelatina (G) y AT**

#### **3.4.1 Preparación de la solución concentrada de PST**

Las proteínas formadoras de velo, fueron extraídas de la cerveza utilizando bentonita (0,5 wt.%/ volumen comercial Bentonita sódica tipo I; La Elcha; Mendoza, Argentina) (Benítez y Lozano, 2007) y PVPP (15 g L<sup>-1</sup>, Polyclar 10, TUDELA, Argentina) (Mitchell y Col., 2005). La Bentonita es utilizada para remover las proteínas (Sadosky y Col., 2002; Siebert, 2009) y la PVPP para remover los polifenoles. Para verificar la remoción de las proteínas, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), así como el método de Folin-Ciocalteu para verificar la remoción de los polifenoles (Singleton y Col., 1999), de esta manera se constató la ausencia de partículas precursoras de velo. Luego de la extracción de proteínas y polifenoles, los PST fueron concentrados por precipitación con etanol (80%) y secados a 40 ° C como lo describe Segara y Col. (1995).

#### **3.4.2 Determinación de la interacción entre los PST y el AT con medición de la turbidez ( $\tau_{AT}$ )**

Es conocido que el AT se combina de forma selectiva con las proteínas HA, pero se desconoce si interactúa con los PST. Para explorar, esta interacción, soluciones de PST, extraídos de muestras de cerveza preparada en la planta piloto, en concentraciones crecientes en un rango de  $0,2 \pm 0,05$  a  $3,2 \pm 0,4$  g L<sup>-1</sup>, fueron adicionados a cinco muestras de cerveza y agua respectivamente. Las soluciones, reposaron durante 30 minutos y se midió posteriormente la turbidez. Subsecuentemente, la solución de AT (55 mg L<sup>-1</sup>), fue adicionada a las muestras. La solución se dejó reposar, durante otros 30 min para luego medir nuevamente, la turbidez.

### **3.4.3 Ensayo para determinar la interacción de los PST con G sobre la turbidez ( $\tau_G$ )**

Conocemos que la G se une selectivamente con los polifenoles formando un velo (Benítez y Lozano, 2007; Siebert, 2006, 2009), pero se desconoce las interacciones entre la G y los polisacáridos. Por lo tanto, se procedió a añadir concentraciones crecientes de PST, con un rango desde  $0,2 \pm 0,05$  a  $3,2 \pm 0,4$  g L<sup>-1</sup> a muestras de cerveza y agua respectivamente. La turbidez fue medida luego de los 30 min. Luego una solución de gelatina ( $55$  mg L<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, Alemania) fue adicionada (Van Buren 1989). Las soluciones se dejaron reposar por 30 min y posteriormente se procedió a medir la turbidez nuevamente.

## **3.5 Metodología de superficie de respuesta para identificar la magnitud de la interacción entre los polisacáridos y el ácido tánico**

### **3.5.1 Ensayo para determinar la interacción entre PST y HA-proteínas sobre la turbidez $\tau_{TA}$ y $\tau_G$**

La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó para estudiar la influencia simultánea de los PST y HA-proteínas sobre la turbidez  $\tau_{TA}$ , permitiéndonos encontrar el pico máximo de interacción entre ambas variables.

La superficie de respuesta en 3D resulta útil para determinar el efecto individual y acumulativo de los factores y la interacción mutua entre ellos y la variable dependiente.

Las proteínas de la cerveza fueron obtenidas concentrando el sobrenadante, sin efectuar el tratamiento con bentonita, luego de la extracción de los PST y Polifenoles.

La concentración de sobrenadante, se realizó bajo vacío, sin exceder los 60 °C, con el fin de eliminar el etanol utilizado para la extracción de los PST. Considerando que tanto el contenido de alcohol como el pH pueden modificar la  $\tau_{TA}$ , se procedió a fijar el contenido de alcohol de las muestras en 4% así como el valor de pH = 4 (Biopack, Argentina). El AT fue adicionado a las muestras, y la turbidez medida luego de 30 min. La G fue adicionada, luego de 24 hs y se procedió a medir nuevamente la turbidez ( $\tau_G$ ). El análisis por superficie de respuesta fue utilizado para caracterizar los efectos del AT

y la G. Cada factor se fijó a dos niveles diferentes (k). El número total de corridas (N) fue calculado como:

$$N = 2^k + 2 \cdot k + x_0 \quad 3.1$$

Donde  $x_0 = 3$  es el número de puntos centrales. Para obtener las estimaciones se utilizó la metodología de mínimos cuadrados (Kumar y Col., 2008):

$$\tau = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad 3.2$$

Donde  $\beta_0$  es la constante,  $\beta_i$  es la pendiente o el efecto lineal del factor  $X_i$ ,  $\beta_{ii}$  es el efecto cuadrático del factor  $X_i$ ,  $\beta_{ij}$  es el efecto de interacción entre los factores de entrada y el error residual  $\varepsilon$ .

Los experimentos fueron realizados utilizando un diseño Central Compuesto (CCD). Las respuestas resultantes para cada combinación de variables están enumeradas en las tablas 4.3 y 4.4

### **3.6 Pruebas con Sílica Gel**

#### **3.6.1 Interacción entre Sílica Gel y los Polisacáridos de Cervezas comerciales y la obtenida en planta piloto tratadas con PVPP**

Se utilizaron 4 (cuatro) muestras de cervezas comerciales, 1 (una) obtenida en la Planta Piloto de Ingeniería Química de la Facultad Regional Resistencia y 1 (una) muestra de dextrinas obtenida por tratamiento enzimático de almidón soluble (Biopack, Argentina), para evaluar la interacción de la SG con los polisacáridos, en ausencia de proteína. Se utilizaron muestras comerciales debido a que el tratamiento elegido en Argentina para estabilizar la cerveza es a través del uso de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), que elimina polifenoles, por lo tanto las muestras conservarían parte de las proteínas formadoras de velo y los polisacáridos, que es lo que se quiere analizar. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento con SG a diferentes concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 g/L, durante un tiempo de contacto de 2 horas (Mitchell y Col., 2005).



### **3.6.2 Interacción entre Sílica Gel y Polisacáridos nativos extraídos de Cerveza de la planta piloto**

#### **3.6.2.1 Preparación de la muestra Símil Cerveza con los Polisacáridos Nativos**

Para realizar el ensayo, se partió de una muestra de cerveza obtenida en la planta piloto de la Facultad. Se preparó una solución madre de Bentonita (Type I, la Elcha, Mendoza) (0,5 %), previa hidratación de 48 hs. Se trató la muestra de cerveza con Bentonita, para extraer las proteínas precursoras de velo, en una ampolla de decantación. Se trabajó en exceso con una concentración de 1% de Bentonita en la muestra. Se procedió a dejar en reposo 24 hs y se filtró. Luego se trató la misma con un exceso de PVPP en una concentración de 80 g L<sup>-1</sup> para extraer los polifenoles. Se adicionaron 100 mL de la solución concentrada a 300 mL de cerveza. Se dejó 24 hs en reposo y se filtró la muestra.

Una vez, extraídos los polifenoles y las proteínas, se procedió a trabajar con la técnica de Segara y Col (1995) para la precipitación de los polisacáridos.

Una vez obtenidos los polisacáridos, se procedió a pesarlos y a preparar una solución madre. Luego, se preparó una solución símil Cerveza con los polisacáridos, manteniendo un pH = 4 (se utilizó un buffer a pH 4) y una concentración alcohólica del 4% (se utilizó etanol 96%).

#### **3.6.2.2 Tratamiento de las muestras Símil Cerveza con SG**

Se armaron dos juegos idénticos, de tubos de ensayos cada uno con 10 ml de símil cerveza. Se trató un juego de tubos con SG al 0,5 g/L y se los mantuvo agitándolos en un agitador orbital durante 1,5 h. El otro juego de tubos, no se trató con SG.

Se filtraron las muestras con tierra de diatomeas y se procedió a adicionarles AT y a medir la turbidez. Las determinaciones, se realizaron por triplicado.

### **3.7 Determinaciones químicas**

El contenido de proteínas se determinó utilizando el método Bradford (1976). El contenido total de polifenoles (TPP) y el contenido de PST fueron determinados con el

método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Col., 1999) y el método de Fenol-Sulfúrico (Segara y Col., 1995), respectivamente.

La turbiedad ( $\tau$ ) fue medida a 20°C en 15 mL en un vial estándar, utilizando un PC nefelómetro compacto (Oaklon T-100, USA). Cada muestra fue medida por triplicado con un tiempo de 30 min de reposo en el vial antes de realizar las mediciones.

### **3.8 Preparación de la muestra para microscopía electrónica de barrido**

Para el análisis de las partículas por escaneo de microscopía electrónica (SEM) se utilizó una muestra de cerveza diluida pre etapa de filtración (1ml de cerveza en 100 ml de agua) y una muestra sin diluir de cerveza filtrada, ambas se fijaron con 2,5% de glutaraldehído en un buffer de fosfato con pH= 7,2 . Es necesario realizar una dilución de la cerveza pre filtrada de manera de obtener una densidad similar a la de la cerveza filtrada.

Gotitas de cada muestra fijada fueron colocadas en un cubreobjetos con un film de polilisina durante 1h. Polilisina ( $\epsilon$ -poly-L-lysine, EPL) es una sustancia polimérica con un potencial electrostático neto, que atrae a las partículas (Thomas y Col.,1996).

Luego los cubreobjetos se lavaron con una solución tampón de fosfato deshidratado con 25%, 50%, 75% y 80% y tres veces con una solución al 100% de acetona y finalmente secado a punto crítico (Polaron E3000 CPD, U.S.A.) con acetona y CO<sub>2</sub> como fluidos intermedios. Las muestras fueron cubiertas con oro usando un revestido de bombardeo iónico (Sputter Coater, Pelco 91000) y analizado mediante SEM (LEO, EVO 40, Cambridge, Eng.) a 10 KV voltaje de aceleración.

### **3.9 Análisis Estadístico**

Los puntos de datos, fueron presentados como la media de los valores medidos. La varianza fue analizada con el test Tukey con un nivel 0,05 de significancia.

El paquete estadístico MINITAB® software de estadística para Windows y Col., (2006) (Minitab Inc., USA) fue utilizado para el análisis de regresión y estimación de los coeficientes de las ecuaciones de regresión.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 Modificación de la Fuerza Iónica

Es conocido, que el punto isoeléctrico de las proteínas es afectado por el pH y la fuerza iónica, y que cambios en la fuerza iónica de la cerveza pueden afectar a la  $\tau_{AT}$ .

Por esta razón, se estimó la fuerza iónica de la cerveza utilizando una solución de KCl. La conductividad eléctrica de la cerveza fue de  $3,6 \pm 0,3$  mS, implicando una fuerza iónica de  $0,05 \pm 0,01$ M, basada en la concentración de KCl.

La concentración promedio de proteínas fue de  $0,08 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup>, por ese motivo se preparó la solución de gelatina con la misma concentración de proteínas totales de la cerveza y se fijó el pH y el contenido alcohólico. A ambas muestras de cerveza y gelatina se les varió la fuerza iónica con la solución de KCl.

La Fig 4.1, nos muestra, los efectos del KCl sobre la  $\tau_{AT}$ . En la cerveza, se observa que la turbiedad se mantiene estable, a pesar de las variaciones en la fuerza iónica, luego del agregado de AT. Mientras, que en la solución de Gelatina, la turbiedad es efectivamente reducida con los incrementos de KCl. Se presume entonces, que los componentes de la cerveza, actúan como un buffer con respecto a los cambios en la fuerza iónica. Este efecto buffer, no fue observado en la muestra preparada con gelatina. Por lo tanto, cuando se utiliza gelatina o cualquier otro clarificador de proteínas con el test de ácido tánico, el contenido de alcohol, el pH y la fuerza iónica, deben ser controlados. Sin embargo, cuando el ácido tánico es utilizado para formar turbidez en la cerveza, no es necesario controlar la fuerza iónica.

#### 4.2 Interacción entre los Polisacáridos Totales (PST) y las proteínas (P) naturales de la Cerveza

Como en estudios previos (Benítez y Col., 2013; Siebert, 2006; Siebert y Col., 1996) para efectuar las mediciones de turbidez de la cerveza, las muestras fueron diluidas para adecuarse al rango de medición del turbidímetro. La concentración inicial de proteínas fue de  $0,18 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup>, obtenida de una dilución 1:2 de cerveza en agua destilada.

En ambos casos, tanto en agua como en cerveza, se observó un incremento lineal de la turbidez, luego de añadir los PST (Fig 4.2), pero comenzando de una turbiedad inicial diferente. Comparada con el agua, la cerveza tiene una turbiedad residual ( $\tau_0 = 2$  NTU). Por lo tanto, la ecuación más apropiada para describir la turbiedad luego de la filtración, es:

$$\tau = \tau_0 + \tau_e \cdot C \quad 4.1$$

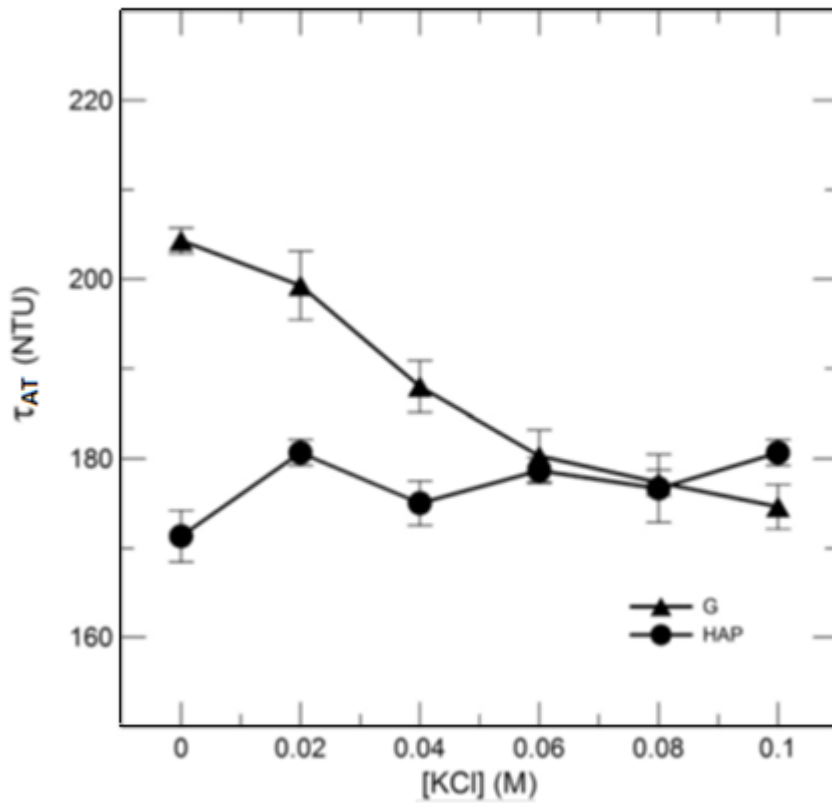


Fig 4.1: Efecto sobre la  $\tau_{AT}$  de una solución de cerveza con HA-proteínas y en una solución de Gelatina con diferentes fuerzas iónicas.

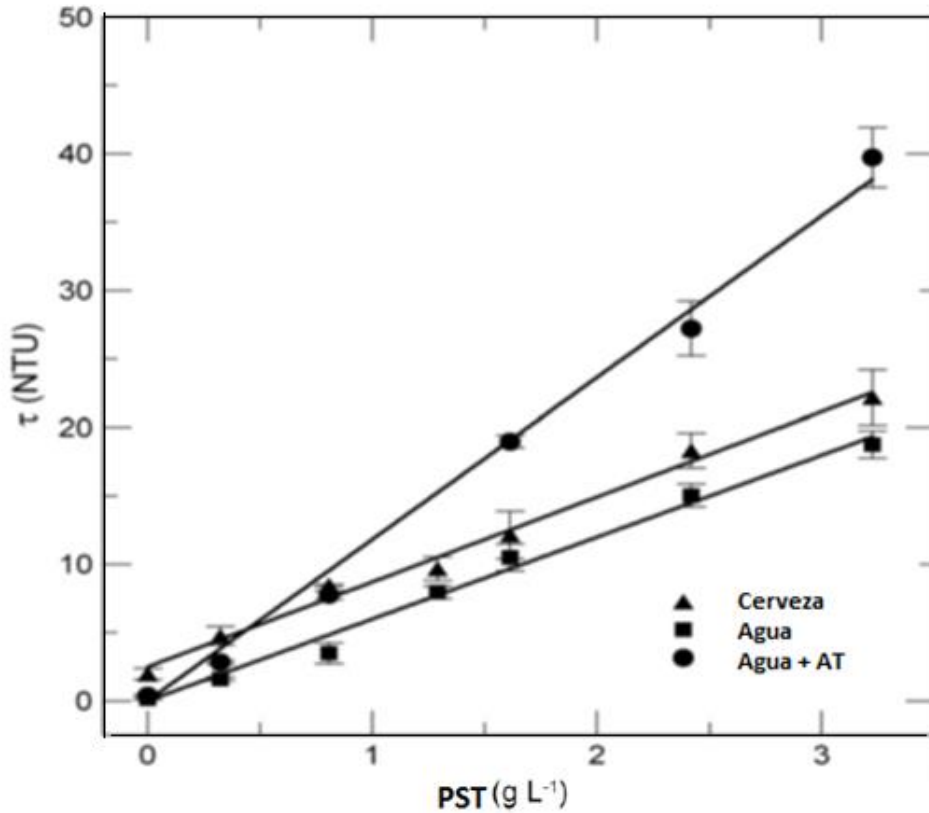


Fig 4.2: Efecto sobre la  $\tau$ , de la adición de PST a muestras de cerveza, agua, y agua con ácido tánico.

La turbiedad residual, puede ser atribuida a las partículas coloidales, como las hemos identificado a través del análisis SEM (Fig 4.3b), presentes también antes de la filtración de la cerveza (Fig 4.3a). Tal como se reportó en trabajos anteriores (Benítez y Col., 2013), el tamaño de las partículas individuales fue de  $0,06 \mu\text{m}$ .

De la ecuación (4.1), la concentración inicial calculada de partículas es  $C_0 = 5.15 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ , con  $Q_{av} = 0,35 \text{ NTU} \cdot \text{m}$  y  $\rho_m = 1,008 \pm 0,001 \text{ g mL}^{-1}$  obtenido de trabajos previos con este sistema coloidal (Benítez y Col., 2013). La composición de las partículas coloidales no retenidas por los filtros, está conformada mayoritariamente, por polisacáridos, representando el 97% y solo un porcentaje mínimo de proteínas (2%) y de polifenoles solo un 0,3% (Benítez y Col., 2013). También se debe tener en cuenta, que la concentración de los PST añadidos a las muestras de cerveza fue inferior a la concentración inicial de las partículas coloidales.

a



b

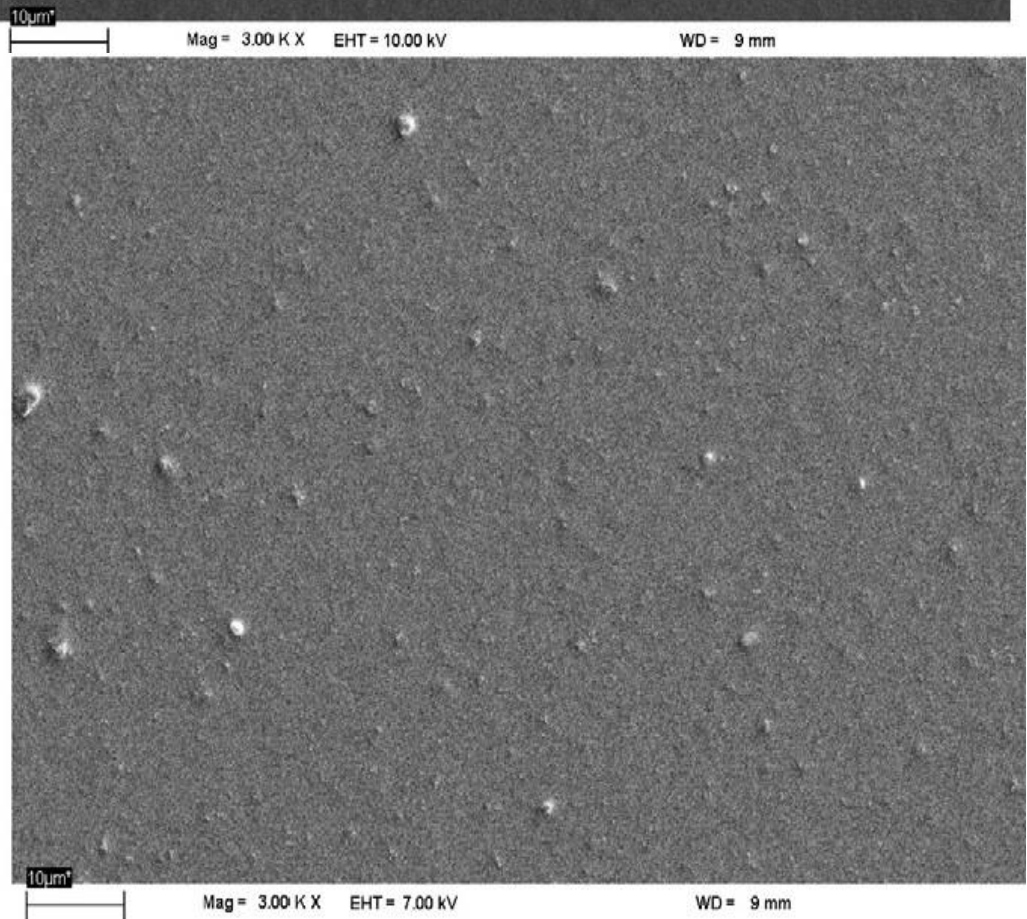


Fig 4.3: Micrografía SEM de partículas de: a) una muestra diluida de cerveza (1 mL de cerveza en 100 mL de agua) antes de la filtración y b) una muestra no diluida

de cerveza después de la filtración. Ampliación: 3000 ×. Barra de escala: 10 m = 100 píxeles.

Tal como se puede visualizar en la tabla 4.1 la turbidez específica ( $\tau_e$ ) de las muestras de agua y de cerveza con el incremento de la adición de polisacáridos presenta resultados estadísticos similares ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.1**

Parámetros de ajuste para la Ec. (4.1) Muestras con adición de PST y tratamiento con AT y Gelatina.

	$\tau_e$ (NTU L g <sup>-1</sup> )	$\tau_o$ (NTU)	$R^2$
Agua	0.60 ± 0,05a	0 ± 0.05a	0.989
Agua + AT	1.16 ± 0,04b	0 ± 0.05a	0.985
Cerveza	0.63 ± 0.05a	2.4 ± 0.2b	0.992
Agua + G	0.94 ± 0.04c	0 ± 0.04a	0.981
Cerveza + G	0.74 ± 0.06d	2.4 ± 0.03b	0.991

$\tau_e$  (N=5) y  $\tau_o$  (N=5) son valores medios de la desviación estándar. Los promedios en la misma columna, con diferentes letras, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

En el caso del agua, el incremento de la turbiedad fue de manera lineal y la respuesta turbidimétrica fue baja. La diferencia de turbiedad, en agua entre el pico más alto, antes y después de la adición de AT fue de  $21 \pm 1$  NTU. En los tres casos (cerveza, agua y agua + AT) analizados, la Eq. (4.1) fue aceptable, obteniendo una buena correlación (Fig 4.4).

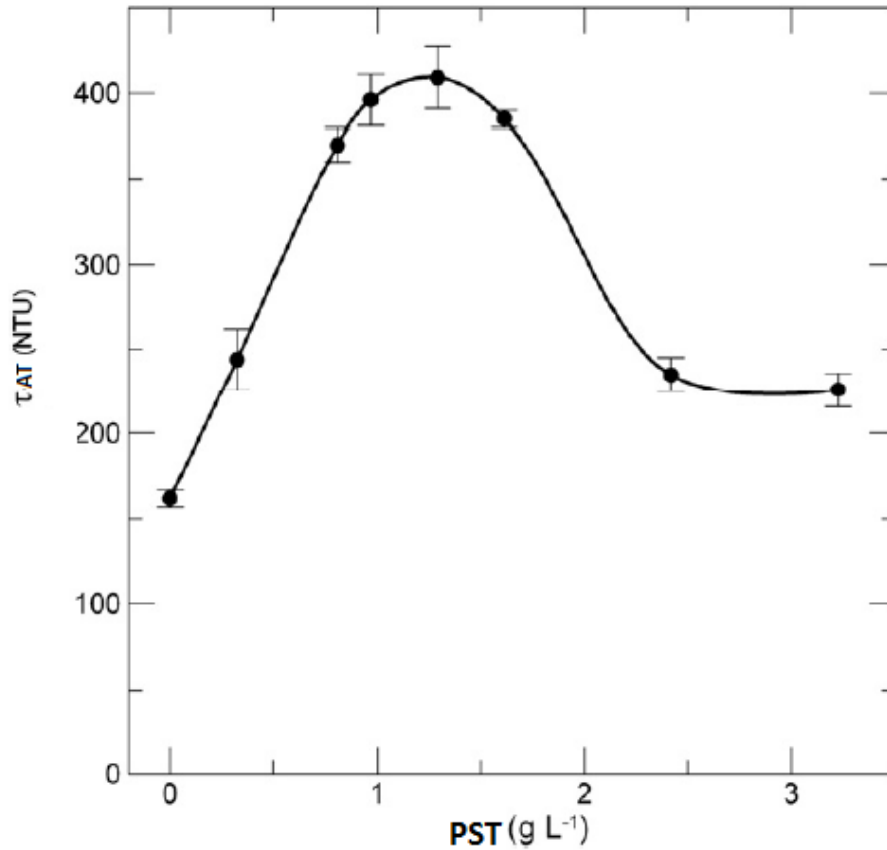


Fig 4.4: Efecto de la adición de los PST sobre la  $\tau_{AT}$  en muestras de cerveza

Un efecto significativo ocurrió, cuando el AT fue adicionado a las muestras de cerveza. Considerando que las interacciones entre Proteínas HA y los Polifenoles HA fueron removidas antes de la adición de AT. En las muestras de agua, el incremento lineal en la turbiedad puede ser atribuido a la interacción de los PST con el AT. En el caso de la cerveza, en las muestras con PST, la adición de AT produce un significativo incremento en la turbiedad, similar a lo hallado por Siebert (2006, 2009). Este incremento hallado por Siebert, es debido a la interacción entre las proteínas y los polifenoles, con un máximo  $\tau_{TA}$  en una concentración específica de PST. Se podría estimar que los polisacáridos y las proteínas de la cerveza, están organizados en una matriz, lo que aumenta significativamente la turbiedad al combinarse con AT. Esto se mantiene hasta que se alcanza el máximo de turbiedad, donde los sitios activos proteínas-polifenoles, se saturan y la turbiedad disminuye (Siebert, 2009).

Los resultados indican que la contribución de los polisacáridos a la formación de turbiedad, es actualmente, mayor, que la contribución del alcohol y del pH, estudiado



por Siebert (2006, 2009), lo que significa que los polisacáridos, no deberían ser ignorados. Por otro lado, en un trabajo previo (Benítez y Col., 2013) se encontró que solo el 20% de los PST, son retenidos a través de una filtración convencional. Se asumió que en ese caso, el incremento en el tamaño del agregado coloidal, no se encuentra contemplado por la ecuación (4.1), por lo cual se puede modificar sustancialmente  $Q_{av}$ . Por lo tanto, es necesario, considerar, otra metodología para identificar Proteínas HA y la influencia de los PST en la turbiedad.

#### 4.3 Interacción entre los Polisacáridos Totales (PST) y los Polifenoles (PP) naturales de la cerveza.

El efecto en la turbiedad luego de la adición de G en cerveza y en agua, fue menor al obtenido con la adición de AT (Fig 4.5).

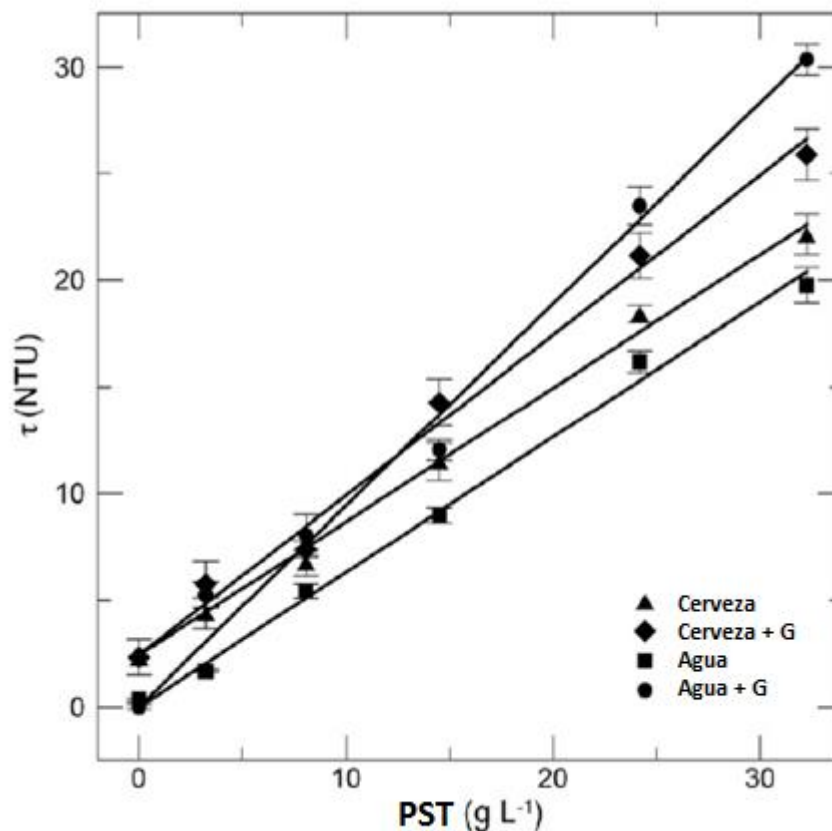


Fig 4.5: Efecto de la adición de los PST sobre la  $\tau$  en muestras de agua y cerveza con posterior adición de gelatina

Sin embargo la turbiedad específica, tuvo un mayor incremento en agua con gelatina, que en cerveza con gelatina (Tabla 4.1).

Este resultado podría indicar, que los polisacáridos adicionados en la cerveza, interaccionan con las proteínas naturales de la cerveza, bloqueando el acceso de la gelatina a los sitios activos de los polifenoles naturales y consecuentemente reduciendo la posibilidad de contribuir a la turbiedad. Por lo tanto, la interacción entre los polisacáridos y las proteínas nativas ha sido confirmada en este ensayo.

La gelatina, fue adicionada para identificar el efecto de los PST sobre los polifenoles, ya que la gelatina se uniría a los polifenoles naturales y se vería un aumento de turbidez. Sin embargo, la turbiedad fue menor en cerveza que en agua. Siebert (2009) consideraba que los polifenoles debían polimerizarse antes de que ellos interactúen con las proteínas. Por lo tanto, se puede asumir que polifenoles, no polimerizados son encontrados en la cerveza luego de la filtración (Benítez y Col., 2013).

#### 4.1.4 Interacción entre HA-proteínas y PST sobre la respuesta turbidimétrica del Ácido Tánico ( $\tau_{AT}$ )

**Tabla 4.2**

Matriz DCC de PST y P con valores experimentales de  $\tau$  luego de la interacción con AT.

Std. Orden	Orden de Corrida	Pt tipo	Bloques	PST (g L <sup>-1</sup> )	P (g L <sup>-1</sup> )	T <sub>AT</sub> (NTU)
4	1	1	1	2,2325	0,1798	496
8	2	-1	1	1,7860	0,1798	509,3
3	3	1	1	1,3395	0,1798	495,3
2	4	1	1	2,2325	0,1079	467,6
10	5	0	1	1,7860	0,1438	576,7
5	6	-1	1	1,3395	0,1438	555,7
9	7	0	1	1,7860	0,1438	576,7
7	8	-1	1	1,7860	0,1079	487,3
1	9	1	1	1,3395	0,1079	497,2
11	10	0	1	1,7860	0,1438	576,7
6	11	-1	1	2,2325	0,1438	534,7

(DCC) Diseño central compuesto: Factores,2 ; corridas,11 ; bloques,1 ; replicas,1 ; total de corridas,11; total de bloques,1. Factorial de dos niveles: factorial total: puntos del cubo,4; puntos centrales del cubo,3 ; puntos axiales,4 ; puntos centrales axiales,0. El análisis se realizo utilizando unidades codificadas.

(PST) Polisacáridos Totales

(P) Proteínas

(AT) Acido Tánico

La Tabla 4.2 enumera la matriz de PST y proteínas obtenida a través de la metodología CCD, y el valor experimental de  $\tau_{AT}$  luego de la interacción con AT. Los resultados muestran, que manteniendo constante, la concentración de proteínas ( $0,1438 \text{ g L}^{-1}$ ), los polisacáridos dan una turbidez máxima en el rango de concentraciones de  $1,34 - 2,23 \text{ g L}^{-1}$ .

La turbidez de la cerveza, varía significativamente, bajo estas condiciones experimentales.

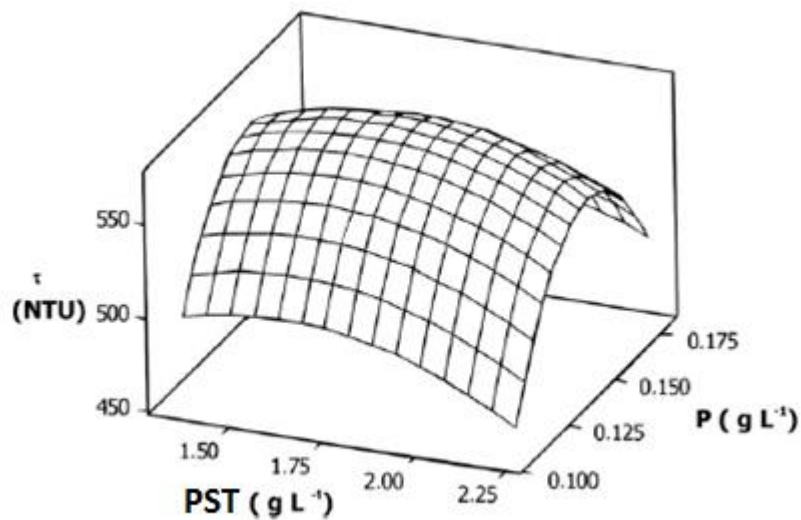


Fig. 4.6: Superficie de respuesta de  $\tau$  vs PST y Proteínas. Agente revelador de velo: Acido Tánico. Variables codificadas en Tabla 4.2.

La Fig.4.6 también nos muestra, un máximo, para ambas concentraciones variables de proteínas y PST. Sin embargo, el máximo obtenido, fue mayor, en el caso de las proteínas, en concordancia a lo observado en la superficie de respuesta de  $\tau_G$  versus PST y proteínas, donde se observa un mínimo (Fig.4.7), en el mismo lugar donde en la Fig 4.6, se aprecia un máximo.

Se han obtenido valores estimados de los coeficientes de regresión lineal para los PST, muy significativos ( $p = 0,046$ ) y coeficientes cuadráticos para PST, también significativos ( $p = 0,013$ ) y para proteínas ( $p = 0,000$ ).

Términos cuadráticos significativos, nos indican, que existe una relación de curvatura, entre la turbidez y los factores cuadráticos. Sin embargo, los coeficientes de regresión

cuadrática, para la interacción entre los PST y las proteínas no es significativa ( $p = 0,131$ ) (Tabla 4.3).

Un signo positivo de los coeficientes nos representa la existencia de un efecto sinérgico, mientras que un signo negativo, nos significa un efecto antagonista. Los coeficientes lineales con signo positivo, nos indican que un incremento de estos factores, provocaría un incremento de la turbidez. Sin embargo, el mayor valor negativo de los coeficientes de regresión, nos indican que en la zona en estudio, ambos factores poseen un efecto antagonista, causando una reducción del valor de  $\tau$ , luego de alcanzar el pico.

Utilizando los coeficientes, la ecuación de regresión se encuentra representada por:

$$T_{AT} = -689,9 + 268 PST + 14,222 P - 99,4 PST^2 - 51,590.4 P^2 + 471,3 PST*P \quad (4.2)$$

Donde  $\tau_{AT}$  es la respuesta de las variables al utilizar AT.

El bajo valor de la desviación estandar (8.380) entre las mediciones y las estimaciones, nos indican que la ecuación representa propiamente la relación entre la respuesta y las variables.

El valor elevado de  $R^2$  (97,87%) y  $R^2$  (adj) (95,75%) nos indica una dependencia elevada y una correlación entre los valores observados y los valores de respuesta predichos. Sin embargo, estos valores indican que el modelo puede explicar el 95,75% de todas las variaciones.

El valor  $F$  para todas las regresiones fue elevado (46,01, ver Tabla 4.4, vs  $F_{0.05;5.5} = 5,05$ ), de acuerdo a la distribución F, tablas para  $F_{0.05}$  (Montgomery,2003), indicando que la mayor parte de la variación en la respuesta puede ser explicada por la ecuación de regresión. Basado en los análisis ANOVA, los coeficientes para los términos lineales y cuadráticos, fueron significativos ( $p = 0,000$  en ambos casos), mientras que los efectos de interacción no han sido significativos ( $p = 0,131$ ).

Por lo tanto el modelo predictivo funciona, ya que no se ha encontrado error residual (ver Tabla 4.4), por lo que significa que el modelo, efectivamente, explica la variación en los datos de respuesta.

**Tabla 4.3**Coeficientes de regresión estimada para las variables PST y Proteínas (P) sobre  $\tau_{AT}$ 

Termino	Coeficiente	S.E Coeficiente	T	p
Constante	-689,9	120,8	-5712	0,002
PST(g/L)	268	101,8	2636	0,046
P (g/L)	14,222	1264,6	11,247,0	0
PST (g/L) x PST (g/L)	-99,4	26,4	-3762	0,013
P (g/L) x P (g/L)	-51,59	4073,3	-12,665	0
PST (g/L) x P (g/L)	471,3	261	1806	0,131

S = 8.380, PRESS = 2513.64, R2 = 97.87%, R2 (pred) = 84.77%, R2 (adj) = 95.75%.

**Tabla 4.4**Análisis de varianza para %  $\tau_{TA}$  vs PST (g L<sup>-1</sup>), proteínas (g L<sup>-1</sup>) en unidades codificadas

Fuente	DF	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	p
Regresión	5	16,157.80	16,157.80	3231,55	46,01	0
Linear	2	807,6	9845,2	4922,59	70,08	0
Cuadrática	2	15,121.10	15,121.10	7560,57	107,64	0
Interacción	1	229	229	229,02	3,26	0,131
Error Residual	5	351,2	351,2	70,24		
Falta de ajuste	3	351,2	351,2	117,06		
Error Puro	2	0	0	0		
Total	10	16,509,00				

Considerando la forma de la superficie y el hecho de la existencia de un decrecimiento debido a la saturación de los sitios activos, sería conveniente, utilizar la zona de crecimiento de la curva, para encontrar la concentración real de las proteínas-HA, basado en la turbiedad y en los PST. De este modo, es posible evaluar la cantidad de agente estabilizante que es necesario añadir a la cerveza.

#### 4.5 Interacción de las Proteínas-HA y los PST sobre la respuesta turbidimétrica de la Gelatina.

La experiencia con gelatina, fue utilizada para evaluar la saturación de los sitios activos por el agregado de AT, en la matriz de PST y proteínas. Las muestras interactuaron con AT por 24 h, y luego la solución de gelatina fue adicionada. La máxima depresión observada en la Fig.4.7 corresponde al pico observado en la Fig.4.6, a pesar de que se

observa una mayor depresión para los PST que para las proteínas. Esto puede ser explicado por el hecho que los PST interactúan tanto con las proteínas como con el AT y por lo tanto la variación de  $\tau_G$  es mayor (Tabla 4.5).

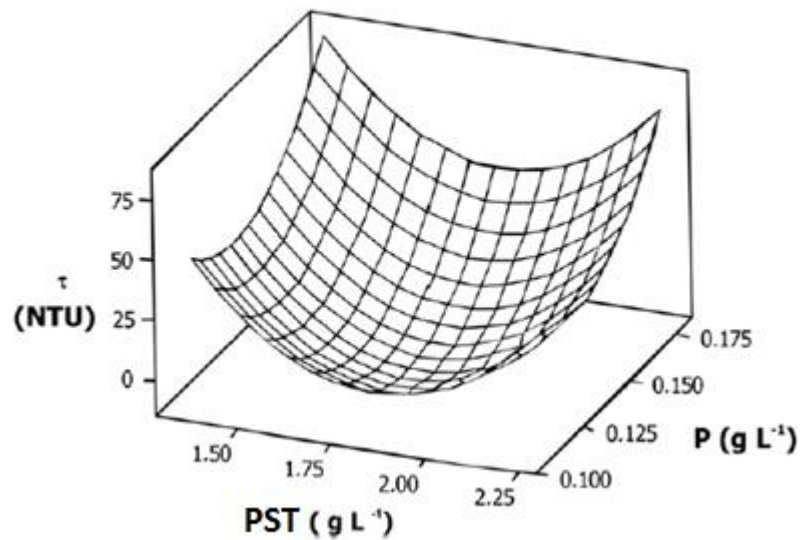


Fig 4.7: Superficie de Respuesta de  $\tau_G$  vs PST y P. Variables codificadas en Tabla 4.5.

**Tabla 4.5**

Matriz CCD de PST y P junto con  $\tau_G$  experimental

Std. Orden	Orden de Corrida	Pt tipo	Bloques	PST (g L <sup>-1</sup> )	P (g L <sup>-1</sup> )	$\tau_G$ (NTU)
1	1	1	1	1,3395	0,1079	45,3
8	2	-1	1	1,7860	0,1798	16,3
11	3	0	1	1,7860	0,1438	0
6	4	-1	1	2,2325	0,1438	21
7	5	-1	1	1,7860	0,1079	2,3
2	6	1	1	2,2325	0,1079	33,3
4	7	1	1	2,2325	0,1798	82,7
9	8	0	1	1,7860	0,1438	0
5	9	-1	1	1,3395	0,1438	24,7
3	10	1	1	1,3395	0,1798	94,7
10	11	0	1	1,7860	0,1438	0

Diseño central compuesto: Factores,2 ; corridas,11 ; bloques,1 ; replicas,1 ; total de corridas,11; total de bloques,1. Factorial de dos niveles: factorial total: puntos del cubo,4; puntos centrales del cubo,3 ; puntos axiales,4 ; puntos centrales axiales,0. El análisis se realizó utilizando unidades codificadas.

Valores muy significativos, de los coeficientes de regresión lineal estimados, fueron obtenidos para el PST ( $p = 0,010$ ), pero no para las proteínas ( $p = 0,063$ ).

Por otro lado, los coeficientes de regresión cuadrática para los PST ( $p = 0,008$ ) y para las proteínas ( $p = 0,037$ ) fueron significativos en ambos casos.

Sin embargo, el coeficiente de regresión cuadrática para la interacción entre PST y proteínas no fue significativa ( $p = 1,000$ ). Se puede observar, que se ha obtenido un valor positivo de la constante, y un valor negativo para ambos coeficientes de regresión lineal, sugiriendo un efecto antagonista sobre  $\tau_G$ . Los coeficientes de regresión cuadrática, positivos indican una sinergia sobre la zona estudiada, resultando en un aumento de  $\tau_G$  después del pico máximo. La ecuación de regresión basada en los coeficientes estudiados es la siguiente:

$$\tau_G = 987,3 - 719,6 \text{ PST} - 5279 \text{ P} + 198,6 \text{ PST}^2 + 20165,3 \text{ P}^2 - 0,1 \text{ PST} * \text{P} \quad (4.3)$$

Los valores elevados de  $R^2$  (90,15%) y  $R^2$  (adj) (80,30 %) indican una elevada dependencia y correlación entre los valores observados y los valores de respuesta predichos (Tabla 4.6).

Todos los valores F son altos (9,15) de acuerdo con las tablas de distribución F para  $F_{0,05}$  (Montgomery, 2003), indicando que la variación en la respuesta, se explica en gran medida por la ecuación de regresión. De acuerdo con los análisis ANOVA, ambos coeficientes, ya sean para los términos lineales como para los cuadráticos, son significativos ( $p = 0,012$  y  $p = 0,005$ , respectivamente), pero no para la interacción ( $p = 1,000$ ). El modelo predictivo puede ser aplicado. Debido a que no fue encontrado ningún error residual (ver Tabla 4.7), lo que significa que el modelo puede explicar la variación en la respuesta.

**Tabla 4.6**

Coefficientes de regresión estimada para las variables PST y P sobre  $\tau_G$

Termino	Coefficiente	S.E Coeficiente	T	p
Constante	987,3	211,82	4,661	0,006
<i>PST(g/L)</i>	-719,6	178,52	-4,031	0,01
<i>P (g/L)</i>	-5279	2217,9	-2,38	0,063
<i>PST (g/L) x PST(g/L)</i>	198,6	46,3	4,289	0,008
<i>P (g/L) x P (g/L)</i>	20,165.3	7142,43	2,823	0,037
<i>PST (g/L) x P (g/L)</i>	-0,1	457,66	0,000	1,000

$S = 124.6923$ ,  $PRESS = 8973.61$ ,  $R^2 = 90.15\%$ ,  $R^2$  (pred) = 81.09%,  $R^2$  (adj) = 80.30%.

**Tabla 4.7**Análisis de varianza para %  $\tau_{AT}$  vs PST ( $\text{g L}^{-1}$ ), proteínas ( $\text{g L}^{-1}$ ) en unidades codificadas

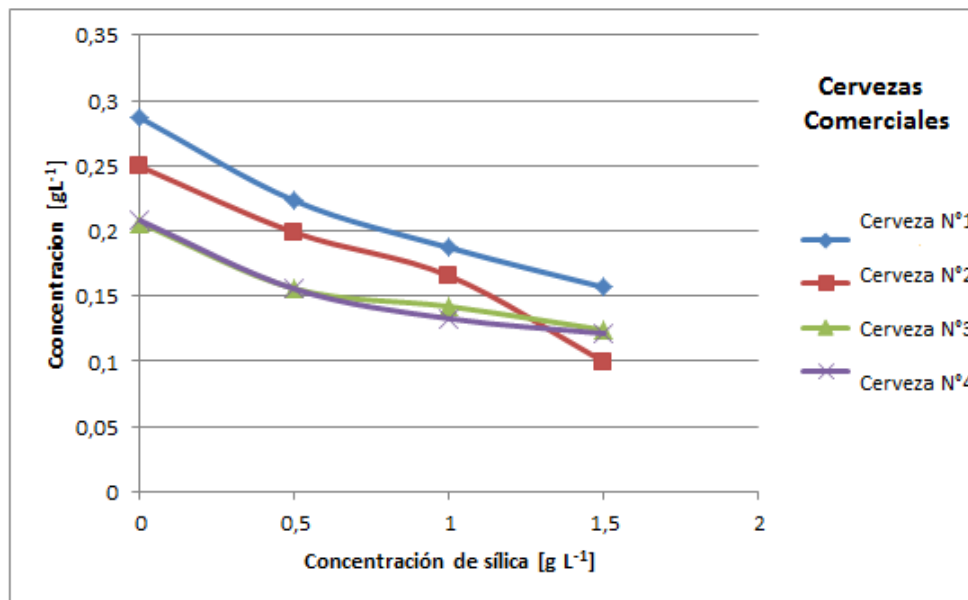
Fuente	DF	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	p
Regresión	5	16,157.80	16,157.80	3231,55	46,01	0
Linear	2	807,6	9845,2	4922,59	70,08	0
Cuadrática	2	15,121.10	15,121.10	7560,57	107,64	0
Interacción	1	229	229	229,02	3,26	0,131
Error Residual	5	351,2	351,2	70,24		
Falta de ajuste	3	351,2	351,2	117,06		
Error Puro	2	0	0	0		
Total	10	16,509,00				

#### 4.6 Estabilización de Cerveza por Tratamiento con SG: Efecto de los Polisacáridos

En Argentina, el tipo de cerveza más consumido es la Pilsen y comercialmente son tratadas con PVPP, eliminando de esta manera sólo los polifenoles y quedando por lo tanto en solución las proteínas formadoras de velo. Al ser éstas tratadas con SG, solamente las proteínas formadoras de velo deberían ser retenidas, lo cual se observa con las determinaciones de proteínas en solución, pre-tratamiento y post-tratamiento con sílica (Fig. 4.8 a y b).



**a**



**b**

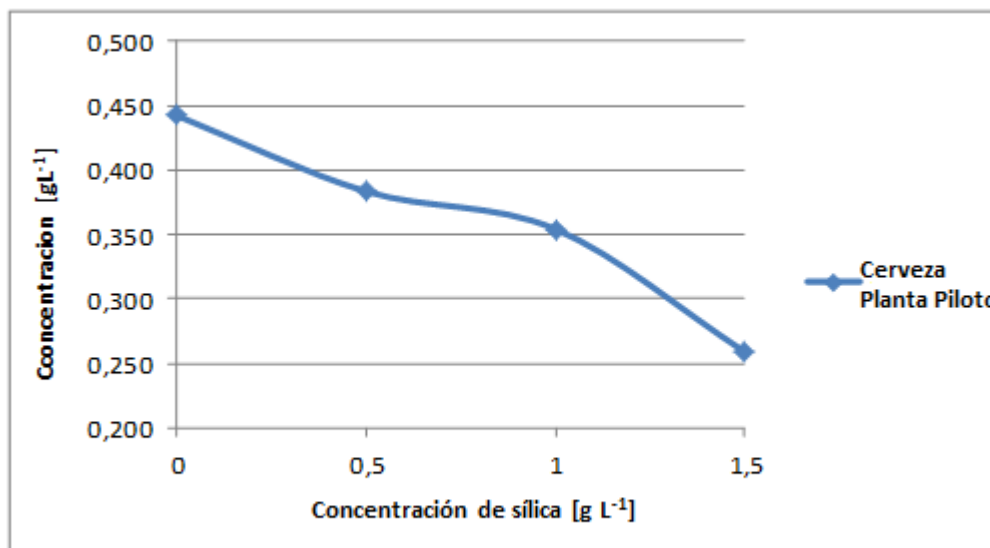
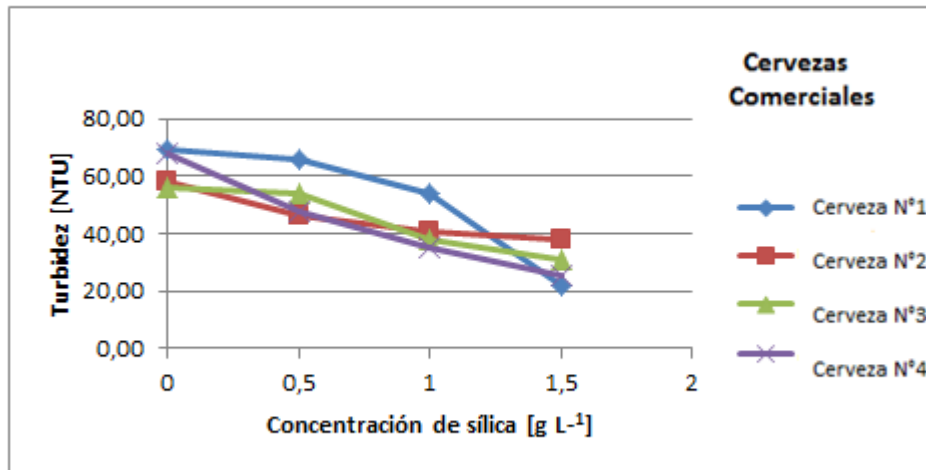


Fig 4.8: Efecto del tratamiento con sílica gel a diferentes concentraciones sobre la concentración de proteínas a) muestras comerciales b) obtenida en planta piloto.

Las interacciones entre proteínas y AT se determinan habitualmente por medición de la turbidez. En la (Fig. 4.9 a y b) se muestran los resultados de las determinaciones de

turbidez, pre y pos-tratamiento con sílica gel, usando AT como agente revelador, se puede apreciar la disminución de la turbidez de las muestras como consecuencia de la disminución de proteínas que fueron retenidas por la sílica, tanto para las cervezas comerciales como para la muestra obtenida en planta piloto.

a



b

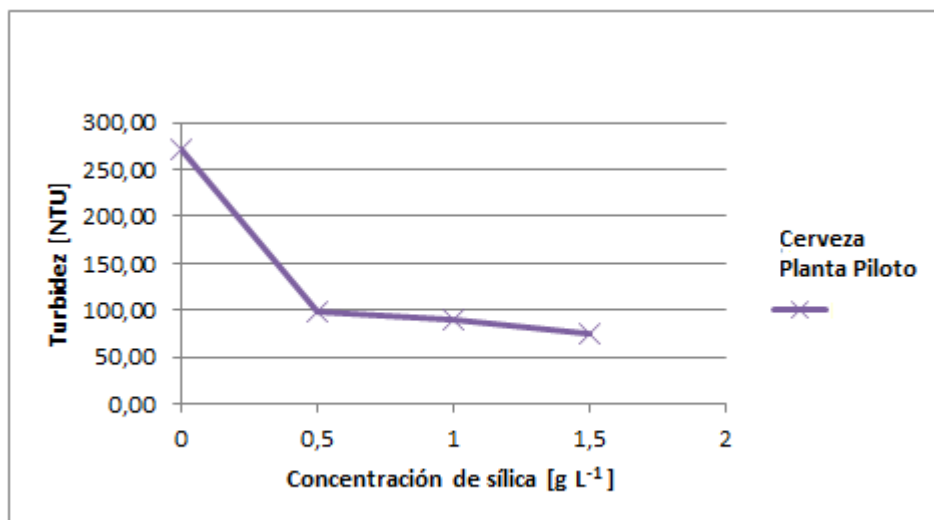


Fig 4.9: Efecto del tratamiento con sílica gel a diferentes concentraciones sobre la Turbiedad a) muestras comerciales b) obtenida en planta piloto.

En la Fig. 4.10 y 4.11 se muestra la disminución de la concentración de PST, en concordancia con los resultados previos publicados (Lataza Rovaletti y Col, 2014). Estos resultados apoyan la hipótesis previa de que los polisacáridos se encuentren unidos a las proteínas formadoras de velo. Sin embargo, como se menciona anteriormente, se debe tener en cuenta la posible interacción intrínseca de los PST con la SG, dado que una posibilidad es que la SG pueda arrastrar algo de polisacáridos. Para ello se realizó un estudio preliminar con una muestra modelo de dextrinas (polisacáridos) mediante la hidrólisis de almidón. Si bien no representa significativamente el contenido de polisacáridos de las cervezas, resulta una aproximación adecuada para obtener una estimación.

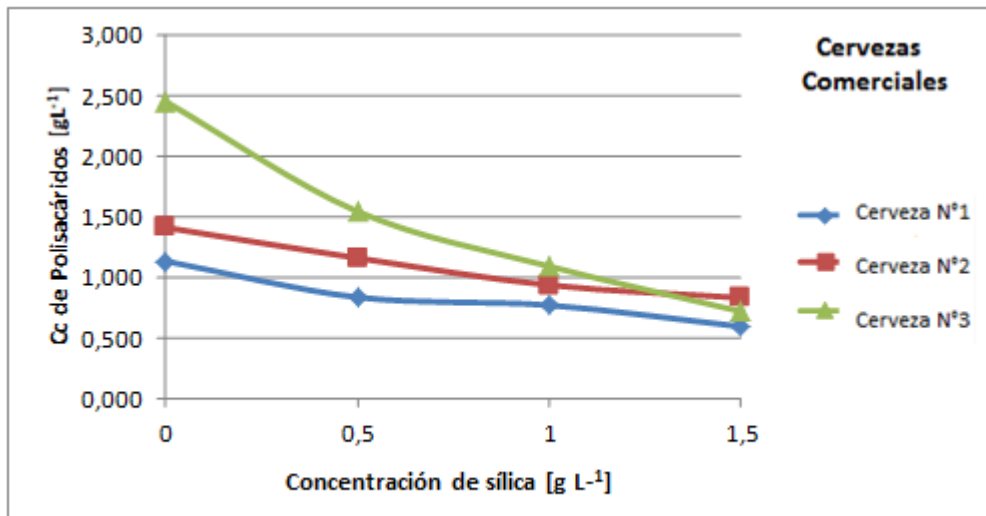


Fig. 4.10: Muestras comerciales, concentración de Polisacáridos pre y post tratamiento con diferentes concentraciones de Sílica Gel

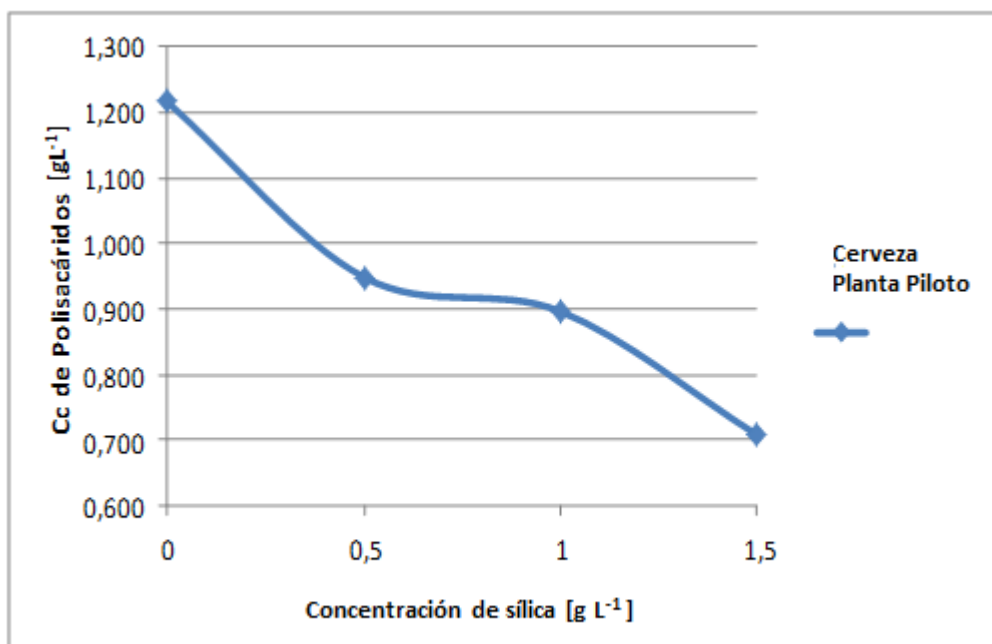


Fig 4.11: Cerveza obtenida en planta piloto, concentración de Polisacáridos pre y post tratamiento con diferentes concentraciones de Sílica Gel

Con respecto a la muestra con dextrina no pudo observarse diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento de SG a diferentes concentraciones. Este último resultado puede deberse a que el almidón utilizado para obtener la muestra de dextrina no representa adecuadamente a los PST presente en la cerveza. Por lo que se procedió a realizarse, nuevos estudios con los PST propios de la cerveza obtenidos por precipitación y posterior concentración como se mencionó en el capítulo III de esta tesis.

#### 4.7 Interacción de los Polisacáridos con la Sílica Gel

**Tabla 4.8** Medición de la turbidez y concentración de PST antes y después del tratamiento con SG

Muestras	$\tau$ NTU	PST g L <sup>-1</sup>
Sol Filtrada +AT	39,8	12.5 ± 1
Sol + SG Filtrada+ AT	12,4	11.7± 1
Soluc. de AT	9,6	

En la tabla 4.8, se puede apreciar como las mediciones de turbiedad han disminuido sustancialmente, luego de que las muestras han sido tratadas con SG y filtradas para separar la SG. A su vez se puede ver que la concentración de PST se ve disminuida, lo que indica que la SG interaccionaría con los PST en ausencia de proteínas. Sin embargo mayores estudios habría que realizar para verificar esta hipótesis.

## 5-CONCLUSIONES

Los resultados indican que la fuerza iónica de  $0,05 \pm 0,01M$ , basada en la concentración de KCl, no modifica la interacción entre los precursores de turbidez de la cerveza y el ácido tánico. Las proteínas y los polifenoles naturales de la cerveza, contribuyen sustancialmente a la formación del velo, aunque la contribución de los polisacáridos es también significativa. Los resultados muestran, que manteniendo constante, la concentración de proteínas ( $0,1438 \text{ g L}^{-1}$ ), los polisacáridos dan una turbidez máxima en el rango de concentraciones de  $1,34 - 2,23 \text{ g L}^{-1}$ . Se han obtenido valores estimados de los coeficientes de regresión lineal para los PST, muy significativos ( $p = 0,046$ ) y coeficientes cuadráticos para PST, ( $p = 0,013$ ) para proteínas ( $p = 0,000$ ), también significativos.

Términos cuadráticos significativos, nos indican, que existe una relación de curvatura, entre la turbidez y los factores cuadráticos

Los polisacáridos agregados no se combinan a los polifenoles, sino que contribuyen a la turbidez por unión a las proteínas naturales de la cerveza.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) fue útil; (i) para explicar la influencia de ambas variables (PST y P) y (ii) para sugerir un modelo de ajuste, más apropiado. El uso de ácido tánico como un indicador de la interacción entre polisacáridos y proteínas, podría conducir a errores considerables. Debido a que, no sólo la proteína sino también los polisacáridos reaccionan con el ácido tánico, causando un considerable aumento de la turbidez que se debe tener en cuenta.

Los PST son arrastrados por la SG, por lo que no solo contribuyen a la formación de velo, sino también, al interaccionar con ciertos estabilizantes, podrían aumentar el consumo de los mismos.

## CAPITULO V

### 5.1 Propuesta para futuros trabajos

Para evaluar el nivel de proteínas formadoras de velo que se desea remover se utiliza el ácido tánico (AT). Pero esta evaluación debe tener en cuenta la contribución por parte de los polisacáridos, cuyo comportamiento pudo ser observado, al hacer interaccionar AT, como agente revelador, con muestras que contenían polisacáridos, proteínas y polifenoles, produciéndose un aumento de turbidez similar al de las proteínas con el AT, indicando una gran influencia. A su vez en estos ensayos con cervezas modelos, en donde se ha estudiado la respuesta turbidimétrica a concentraciones variables de proteínas y polisacáridos, revelaron la existencia de una turbidez máxima lo que implica que existen dos valores distintos de proteínas para los cuales, existe el mismo valor de turbidez.

Esta respuesta puede estar asociada a la saturación de los sitios de unión de la proteína. Esta nueva influencia conlleva a errores en el cálculo del agente estabilizante a utilizar y por lo tanto un exceso y un costo mayor al previsto en los ensayos de laboratorio.

Se plantea estudiar, la turbidez en función de los polisacáridos y proteínas en cervezas comerciales sin estabilizar y cervezas obtenidas en planta piloto. El empleo de estas bebidas se debe a que no han sido estabilizadas es decir no se ha modificado el contenido de proteínas formadoras del velo. Los ensayos se realizaran a distintas diluciones. De esta manera se busca determinar hasta que dilución es posible encontrar una relación lineal entre la turbidez utilizando el AT y la concentración de proteínas. Esto permitiría encontrar la concentración real de proteínas formadoras del velo evitando así los errores asociados con la presencia de un pico de turbidez máxima.

Además, se procederá a realizar múltiples pruebas con PST nativos de la cerveza y diferentes concentraciones de SG, a los fines de evaluar la magnitud de las interacciones entre ambos y encontrar la relación óptima. Se buscara realizar un diseño experimental de superficie de respuesta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ablin, A. (2013). Análisis FODA de las Exportaciones de Cerveza.  
[www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/foda/FODA\\_cerveza.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/foda/FODA_cerveza.pdf)
- Ablin, A. (2014). El Mercado de la Cerveza.  
[www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/Informes/Cerveza\\_03\\_2014\\_04Abr.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/Informes/Cerveza_03_2014_04Abr.pdf)
- Atkinson, S. (2005). Beer clarification. *Membrane Technology*, 2005, 8–9.
- Bamforth, C. (2009). *Beer: A quality perspective* (1st ed.). New York: Academic Press.
- Benitez, E. I., Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2007a). Effect of pH and ionic strength on apple juice turbidity: Application of the extended DLVO theory. *Food Hydrocolloids*, 21, 100–109.
- Benitez, E. I., Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2007b). Scattering efficiency of a cloudy Apple juice: Effect of particles characteristics and serum composition. *Food Research International*, 40, 915–922.
- Benítez, E. I., & Lozano, J. E. (2007c). Effect of gelatin on apple juice turbidity. *Latin American Applied Research*, 37, 261–266.
- Benitez, E. I., Lozano, J. E., & Genovese, D. B. (2010). Fractal dimension and mechanism of aggregation of apple juice particles. *Food Science and Technology International*, 16, 179–186.
- Benítez, E., Martínez Amezaga, N., Sosa, G., Peruchena, N., & Lozano, J. (2013). Turbidimetric behavior of colloidal particles in beer before filtration process. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, 6, 1082–1090.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–554.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing science and practice*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Buiatti, S. (2009). Beer composition: An overview. In V. R. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention* (pp. 212–225). London: Academic Press.
- Buttrick, P. (2010). Choices, choices: beer processing and filtration. *Brewer and Distiller International* 6: 10–16.
- Buttrick, P. (2007). Filtrarion – the facts: a survey of systems and methods. *The Brewer and Distiller International*, Vol. 3, Issue 12, pp. 12-19.

- Dickinson, E. (1994). Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry*, 51, 343–347.
- Dobbins, R., & Jizmagian, G. (1966). Optical scattering cross sections for polydispersions of dielectric spheres. *Journal of the Optical Society of America*, 56, 1345–1350.
- Fillaudeau, L., Boissier, B., Moreau, A., Blanpain-avet, P., Ermolaev, S., Jitariouk, N. y Gourdon, A. (2007). Investigation of rotating and vibrating filtration for clarification of rough beer. *Journal of Food Engineering* 80: 206–217.
- Fleet, C., & Siebert, K. (2005). Effect of illumination intensity on visual perception of turbidity. *Food Quality and Preference*, 16, 536–544.
- Jaume Camps Rabadà (2015). Origen estimado del vino y la cerveza. Disponible en: [http://ddd.uab.cat/pub/estudis/2015/132464/jcampsapu\\_172.pdf](http://ddd.uab.cat/pub/estudis/2015/132464/jcampsapu_172.pdf). Capturado el 3/9/2015
- Grillo Trubba, D. (2004). Cervezas. Análisis de la Cadena Alimentaria. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/bebidas/cerveza\\_04/Cerveza.har](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/bebidas/cerveza_04/Cerveza.har), A., Prasad, B., & Mishra, I. M. (2008). Optimization of process parameter for acrylonitrile removal by low cost adsorbent using Box–Behnken design. *Journal of Hazardous Materials*, 150, 174–182.
- Lataza Rovalletti, M. Benitez, E. Martinez Amezaga, J. Peruchena N. Sosa, G. L & Lozano. (2014). Polysaccharides influence on the interaction between tannic acid and haze active proteins in beer. *Journal Elsevier. Food Research International* 62 (2014) 779–785.
- Leiper, K. Stewart, G. McKeown, P. (2003) Beer Polypeptides and Silica Gel. *Journal The institute & Guild of Brewing*.
- McClements, D. (2005). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*. London: CRC Press.
- McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J., & O'Rourke, T. (1999). Haze formation and shelflife prediction for lager beer. *Food Technology*, 53(1), 58–62.
- MINITAB® Release 15 Statistical Software for Windows, Minitab Inc., USA (2006).
- Mitchell, A., Hong, Y. -J., May, J. C., Wright, C., & Bamforth, C. (2005). A comparison of polyvinylpyrrolidone (PVPP), silica xerogel and a polyvinylpyrrolidone (PVP)– silica co-product for their ability to remove polyphenols from beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 111, 20–25.
- Montgomery, D. C. (2003). *Design and analysis of experiments*. New York:Wiley and Sons.



- Oh, H. I., Hoff, J. E., Armstrong, G. S., & Haff, L. A. (1980). Hydrophobic interaction in tannin–protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 394–398.
- Rangel E.W, Alvarado.J,& Justamond. C (2009). Tesis: Plan de marketing para la elaboración de la nueva marca de cerveza pilsener gold. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/1118>. Capturado el 3/9/2015
- Sadosky P., Schwarz P. B. y Horsley R. D. (2002), Effect of Arabinoxylans,  $\beta$ -Glucans, and Dextrins on the Viscosity and Membrane Filterability of a Beer Model Solution, *Journal of American Society of Brewing Chemistry*, 60 (4), pp. 153-162.
- Segara, I., Lao, E., López-Tamames, E., & De la Torre-Boronat, M. C. (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 564–570.
- Siebert, K. J. (1999). Effects of protein–polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353–362.
- Siebert, K. (2006). Haze formation in beverages. *Food Science and Technology*, 39, 987–994.
- Siebert, K. (2009). Haze formation in beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*, 57, 53–86.
- Siebert, K., Carrasco, A., & Lynn, P. (1996). Formation of protein–polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1997–2005.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Steiner, E., Becker, T., & Gastl, M. (2010). Turbidity and haze formation — Insights and overview. *Journal of the Institute of Brewing*, 116, 360–368.
- Thomas, N., Coakley, W., & Winters, C. (1996). Contact formation in polylysine-mediated membrane–glass interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 6, 139–147.
- Van Buren, J. P. (1989). Causes and prevention of turbidity in apple juice. In D. L. Downing (Ed.), *Processed apple products*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Van der Sman, R. G. M., Vollebregta, H. M., Mepschen, A., & Noordman, T. R. (2012). Review of hypotheses for fouling during beer clarification using membranes. *Journal of Membrane Science*, 396, 22–31.