



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Montevideo, Octubre  
2025

# Uso de método enzimático para la clarificación de cerveza

Tesis de grado para la obtención de  
título de Licenciado en Ciencias  
Biológicas

Autor: Joaquín García  
Tutora: Dra. María Carolina Villadoniga  
Co-tutora: Dra. Leticia Pérez

## **DEDICATORIA**

*Le dedico este trabajo a mis padres y mi hermano, quienes están igual de felices que yo con la finalización de esta etapa. A mis amigos, que me acompañaron durante estos años.*

*Arriba muchachada, Salute!*

## AGRADECIMIENTOS

A mi hermano y padres, a mi familia en general, gracias. A mis amigos de toda la vida que me acompañan. A mis compañeros de Facultad de Ciencias, con ellos fui conociendo la vocación por hacer ciencia.

A mis tutoras Carolina y Leticia. Ambas me tuvieron mucha paciencia, me ayudaron y me enseñaron mucho en este proceso. También a la Dra. Cecilia Ruibal, que colaboró en este proyecto desde otro rol. Al laboratorio de Biocatalizadores y sus aplicaciones (214), por contemplar mis tiempos de aprendizaje, en particular a el Dr. Diego Valles, quien también me colabro en diferentes momentos.

A la cervecería Chiripa y a todo su personal. En particular a su dueño Diego López, por poner a disposición las instalaciones de su fábrica, así como insumos y tiempo.

A Carolina De Marmol, del laboratorio de Química Inorgánica de Facultad de Química, que me facilitó el uso de instrumental de su laboratorio y me dedicó su tiempo ayudando con la medición de diferentes parámetros.

Al laboratorio Fertilab, por proporcionarme placas para ensayos microbiológicos en momentos claves de la tesina.

A la empresa Abastecimientos Group, por la donación de Collipullin 200 L (DSM) para los ensayos de actividad proteolítica y la aplicación misma de la enzima en las diferentes cervezas evaluadas.

A todos los funcionarios de Facultad de Ciencias que me colaboraron en días complicados de ensayos dentro de las instalaciones, así como en días de brindar con los resultados generados, literalmente.

A todos, gracias.

## RESUMEN

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida a nivel global y su calidad visual, en particular la turbidez, incide en la percepción del consumidor y en la eficiencia del proceso de elaboración. En este trabajo se evaluó la papaína (Collupulin 200 L, DSM), una proteasa de origen vegetal, como agente clarificante en dos contextos: (i) una Pilsener Lager elaborada a escala de laboratorio y (ii) una Blonde Ale producida en una planta artesanal local.

Primero se caracterizó el insumo enzimático evaluando concentración de proteínas totales y actividad específica promedio. Luego, se ensayó su aplicación en cerveza Pilsener Lager, comparando con un clarificante comercial y un control sin tratamiento. En las condiciones probadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la turbidez ni en atributos sensoriales frente al control. Por este motivo, se avanzó a evaluar cerveza Blonde Ale, estilo con mayor turbidez basal, probando tres concentraciones de papaína y dos temperaturas de maduración (6 °C y 16 °C), junto con isinglass y un control sin aditivos. La maduración redujo la turbidez en todos los casos. La papaína produjo una disminución significativa de la turbidez solo a 6 °C en la concentración más alta (5,8 TU/mL), mientras que a 16 °C no se detectaron diferencias frente al control. El isinglass no mejoró la claridad bajo las condiciones aplicadas, lo que sugiere que la dosis y/o el pH no fueron los óptimos para favorecer su acción floculante.

En conjunto, la papaína mostró actividad enzimática *in vitro* pero un efecto clarificante limitado en cerveza bajo las condiciones ensayadas, con mayor eficacia a baja temperatura y dosis elevadas. No se evidenciaron cambios sensoriales relevantes ni alteraciones microbiológicas atribuibles al tratamiento enzimático. Estos resultados proporcionan una base para optimizar parámetros de aplicación (dosis, momento de adición, pH y temperatura) y explorar la papaína como alternativa natural en esquemas combinados de clarificación.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Historia de la cerveza

La cerveza tiene una historia milenaria. En Egipto fue muy popular, pero en Grecia y Roma se la asoció con pueblos bárbaros y clases bajas (Domene, 2018). Durante la Edad Media los monjes desarrollaron recetas para distintos públicos. Hildegarda de Bingen fue la primera en usar lúpulo, lo que mejoró tanto la conservación como el sabor de esta bebida (Domene, 2018). En 1516, se promulgó la Ley de Pureza Alemana, que limitó sus ingredientes a agua, cebada y lúpulo (Domene, 2018).

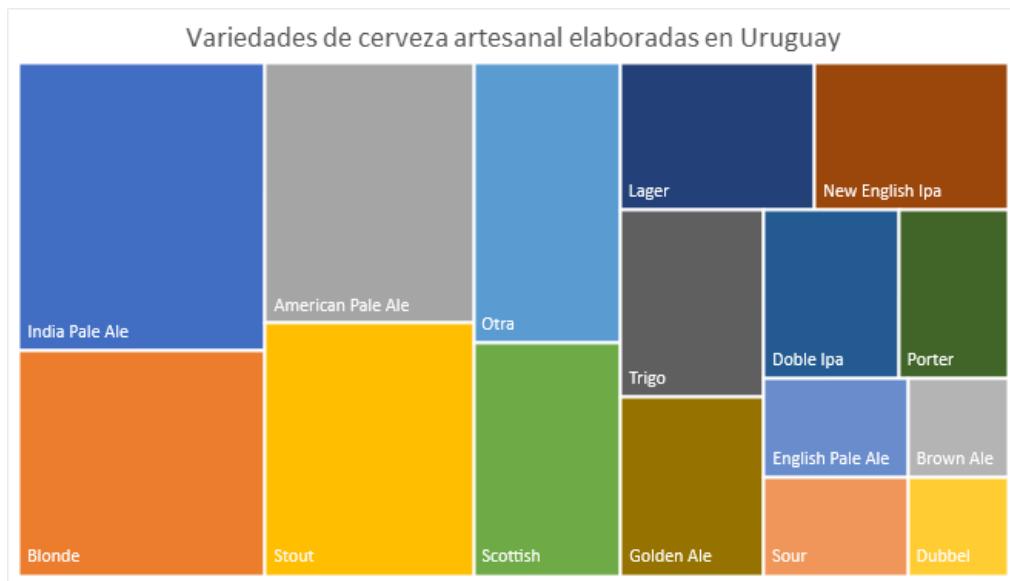
Durante la Revolución Industrial, las tecnologías como el termómetro y la máquina de vapor aumentaron la escala y calidad de producción (Domene, 2018). Luego, Pasteur identificó a las levaduras como responsables de la fermentación y desarrolló la pasteurización, estabilizando el producto (Domene, 2018).

Actualmente, la cerveza es la bebida alcohólica más consumida del mundo (Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional, 2023; WHO, 2018), con 144.000 millones de litros anuales en 167 países (Mendoza et al., 2022) y 23 millones de empleos directos, el 0,9% del empleo global (Oxford Economics, 2022). Ocho grupos cerveceros controlan dos tercios de la producción mundial.

Desde los años 80, crecieron las microcervecerías y brewpubs en EE.UU., lo que dió origen al auge artesanal. Se estima que en 2024 el mercado global artesanal superó los 6.520 millones de litros (Deloitte, 2024). En Uruguay, este sector surgió entre 2007 a 2008, con cervecerías como Cabesas, Davok y Mastra (Mazzolla, 2019). En 2020 la producción artesanal alcanzó 2 millones de litros (Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional, 2023), el 2% de la producción nacional. Entre los estilos más elaborados están las cervezas Indian Pale Ale (IPA, 77%), Blonde Ale (60%) y Blonde (58,5%) (Santa Cruz & Sosa, 2021).

El crecimiento artesanal, impulsado por consumidores exigentes, plantea nuevos desafíos productivos. Mejorar la calidad y reducir costos requiere innovar con insumos adecuados (Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional, 2023).

En Uruguay, dentro de los estilos producidos en el sector artesanal, se encuentran IPA y Blonde Ale como máximos exponentes. Esto se puede apreciar en la Figura 1.



**Figura 1.** Representación de los estilos de cerveza producidos por la industria artesanal en Uruguay. El tamaño del recuadro refleja su volumen de producción y consumo (AMAU, 2021).

## 1.2 Diferencias entre cerveza industrial y artesanal

La distinción entre cerveza artesanal e industrial puede ser subjetiva, pero basándonos en opiniones de maestros cerveceros y expertos, podemos identificar varias diferencias clave que se resumen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Diferencias entre la cerveza artesanal e industrial.

Item a comparar	Artesanal vs. industrial
Volumen de producción	La cerveza artesanal no debe superar los 6 millones de barriles anuales y debe ser independiente de empresas transnacionales (Brewers Association, 2018)
Estrategia de marketing	Los productores artesanales se enfocan en la calidad y la innovación, mientras que los industriales se distinguen por sus bajos costos y grandes inversiones publicitarias. Además, los artesanales suelen vender en brewpubs o ferias, mientras que los industriales se distribuyen a través de redes comerciales masivas (Domene, 2018; Mazzolla, 2019).
Ingredientes	Las cervezas artesanales respetan la ley de pureza alemana (Reinheitsgebot), usando solo agua, malta, lúpulo y levadura, aunque con espacio para la innovación. Las cervezas industriales incorporan ingredientes como arroz o conservantes para reducir costos y extender la vida útil del producto.
Diversidad de estilos producidos	Las cervezas artesanales ofrecen una mayor variedad de estilos, mientras que las industriales se concentran principalmente en el estilo Lager.
Análisis nutricional	La calidad y variedad de los ingredientes en las cervezas artesanales resultan en perfiles nutricionales distintos a los de las industriales. Por ejemplo, el contenido alcohólico varía más que en las industriales, impactando su composición (Mendoza et al., 2022).

### 1.3 Proceso de producción de cerveza

La cerveza se elabora a partir de cuatro ingredientes básicos: malta, agua, levadura y lúpulo. Su producción consta de seis etapas: molienda, maceración, cocción, fermentación, maduración y envasado. Las condiciones específicas de cada paso varían según el estilo de cerveza a producir (Domene, 2018).

En la molienda los granos se trituran para liberar azúcares fermentables y no fermentables. Durante la maceración, los granos molidos se mezclan con agua caliente, donde los almidones se convierten en azúcares, mediante la acción de alfa y beta amilasas, activadas por temperaturas y pH controlados (5,2 – 5,5). Las alfa amilasas generan azúcares no fermentables (cuerpo), y las beta amilasas, los fermentables (alcohol). Una vez finalizado el macerado, se extrae el líquido, se recircula y se realiza el “lavado de granos” con agua ácida para obtener un mosto con volumen y densidad adecuados. En la cocción, el mosto se hierve durante

aproximadamente una hora y se agregan los lúpulos, que aportan amargor, aroma y sabor. Luego, se realiza un *whirlpool* para precipitar sólidos (lúpulo, proteínas) y eliminar compuestos volátiles (Domene, 2018).

Durante la etapa de fermentación, las levaduras realizan principalmente fermentación alcohólica transformando los azúcares en etanol y CO<sub>2</sub>. La temperatura y tiempo de fermentación varían según el tipo de levadura y estilo. En la etapa de maduración, se disminuye la temperatura (0 a 3°C) con el objetivo de precipitar polifenoles, proteína y la levadura remanente que enturbian la cerveza. En esta etapa, que puede durar desde semanas a años, dependiendo del estilo, se afinan los aromas y sabores de la cerveza. Finalmente, la cerveza se embotella o se coloca en barriles. En algunos casos, se pasteuriza para asegurar la estabilidad microbiológica. Este paso es más frecuente en la industria que en la producción artesanal (Domene, 2018).

#### 1.4 Estilos de cerveza

La variedad de ingredientes, tiempos y temperaturas de maceración, cocción, fermentación y maduración, da lugar a los distintos estilos. Además de los ingredientes básicos pueden sumarse otros como frutas, especias o algas para lograr perfiles únicos.

El criterio principal de clasificación es el tipo de fermentación (Archana et al, 2024):

Fermentación alta (Ale): Se desarrolla entre 15–25 °C, con *Saccharomyces cerevisiae*, que actúa en la parte superior del mosto. Esta fermentación produce cervezas complejas y es típica en cervecerías artesanales. El proceso dura aproximadamente siete días.

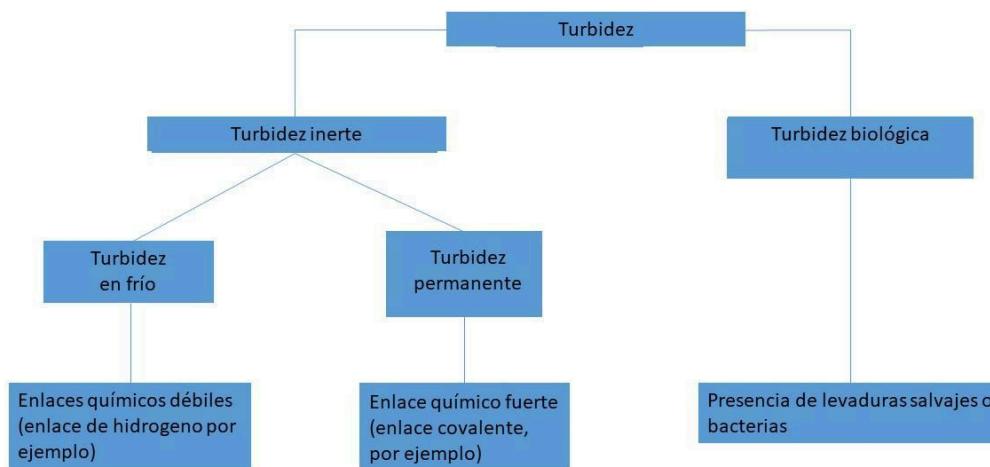
Fermentación baja (Lager): utiliza *Saccharomyces pastorianus*, levaduras que trabajan en el fondo del fermentador a una temperatura entre 7 y 14 °C, . Requiere entre una y tres semanas y predomina en la producción industrial.

Algunas cervecerías artesanales también utilizan fermentaciones espontáneas con levaduras salvajes presentes en el ambiente.

Como referencia para definir estilos, se usa el Beer Judge Certification Program (BJCP), que incluye criterios como: la impresión general, el tipo de levadura, el perfil sensorial (aroma, sabor, color y cuerpo), la historia y los ingredientes característicos, así como parámetros técnicos: ABV (alcohol por volumen), IBU (amargor), SRM/EBC (color), OG y FG (densidades inicial y final).

## 1.5 Turbidez en la cerveza

La turbidez está definida como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido (Acebo-Gonzalez & Hernandez-Garcia, 2013). En la cerveza la turbidez puede aparecer en diferentes momentos del proceso de producción y también en el producto final. Esta turbidez puede ser biológica, cuando es causada por presencia de células o levaduras, o inerte, cuando es causada por proteínas y polifenoles, como se puede ver en la Figura 2 (Wang & Ye, 2021; Steiner et al., 2012).



**Figura 2.** Esquema que representa los diferentes tipos de turbidez y su origen. La turbidez puede ser de dos tipos: biológico o inerte (Extraído y modificado de Wang & Ye, 2021)

### 1.5.1 Turbidez biológica

La turbidez biológica (TB) se origina por la contaminación del producto con bacterias o levaduras salvajes (Figura 2). En la actualidad, tanto en cervecerías industriales como artesanales, se controla mediante la optimización de las condiciones del mosto (pH, presencia de etanol, temperatura y falta de oxígeno), que favorecen el crecimiento de las levaduras deseadas y dificultan la proliferación de otros organismos. Sin embargo, las bacterias lácticas siguen siendo los contaminantes más comunes representando entre el 60 y 70% de los aislamientos bacterianos encontrados en cervezas (Salanta et. al., 2020). Con excepción de los estilos ácidos o “sour”, donde se busca la presencia del ácido láctico, la turbidez y el sabor (atribuidos al ácido láctico y al diacetilo) son considerados defectos sensoriales.

En general, esta turbidez ya no representa un problema desafiante para los productores industriales y artesanales. No obstante, en la producción a muy pequeña escala, donde las condiciones de asepsia son más limitadas, esta TB puede

presentarse con mayor frecuencia. Una de las estrategias más aplicadas por su practicidad es la maduración en frío (0°C), que sostenida en el tiempo, favorece la precipitación de compuestos al fondo del fermentador (Briggs, 2004).

### 1.5.2 Turbidez no-biológica

La turbidez no-biológica (TNB) es generada por partículas de diferentes orígenes y características que pueden aparecer en diferentes momentos del proceso cervecero. Por esta razón se clasifica principalmente como turbidez en frío y turbidez permanente (Leiper & Miedl, 2009).

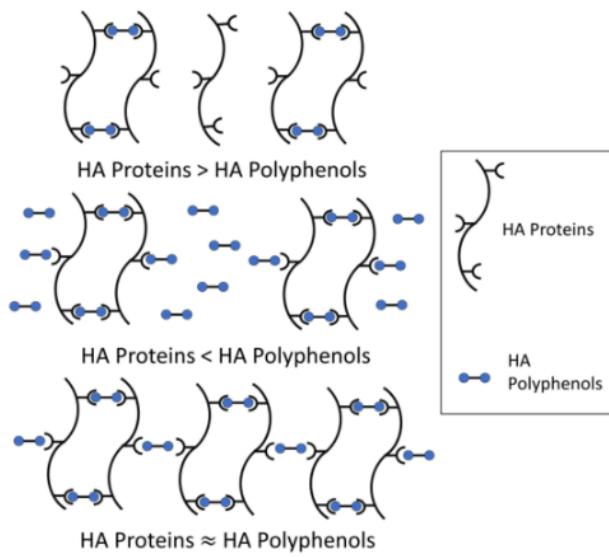
Dentro de las grandes moléculas que pueden originar la TNB se encuentran las dextrinas, β-glucanos, polifenoles y proteínas. Estas moléculas pueden interaccionar entre sí para generar las diferentes brumas.

La turbidez en frío (CH, “chill haze”), se genera a temperaturas cercanas a los 0°C por interacciones débiles, como enlaces de hidrógeno, entre proteínas y polifenoles. Este proceso es reversible si la cerveza se calienta a 20°C o más. Las partículas encargadas de generar la CH suelen tener un diámetro que oscila entre 0,1 y 1,0 µm (Bamforth, 1999).

En cambio, la turbidez permanente (PH, “permanent haze”) aparece a cualquier temperatura y es el resultado de interacciones fuertes (enlaces covalentes) entre agregados moleculares grandes. Los diámetros de las partículas en este caso se encuentran entre 1,0 y 10,0 µm (Bamforth, 1999).

En ambos casos la turbidez depende de las concentraciones de proteínas y polifenoles, en particular de aquellos que son activos para formar la bruma, conocidos como “Haze Active proteins” (del inglés «proteínas activas de turbidez», de aquí en adelante proteínas HA) o “Haze Active polyphenols ( del inglés «polifenoles activos de turbidez», de aquí en adelante polifenoles HA) (Mastanjević et., al. 2018).

Como se observa en la Figura 3, ambas moléculas tienen sitios activos de interacción. La turbidez dependerá de la concentración de estos en la cerveza lo que determinará el número de interacciones que se puedan formar. Mientras las concentraciones de proteínas HA y polifenoles HA sean diferentes, no habrá prácticamente turbidez ya que ambas moléculas no podrán generar grandes redes coloidales que desvíen la luz. En cambio, si las concentraciones de proteínas HA y polifenoles HA son similares, se generan redes de mayor tamaño que dispersan la luz provocando el efecto visual de turbidez. Diferentes estudios indican que las uniones entre proteínas HA y polifenoles HA suelen ser débiles, y cuando estas interacciones se estabilizan y se vuelven más fuertes, la turbidez en frío puede convertirse en turbidez permanente (Wang & Ye, 2021).



**Figura 3.** Representación de las diferentes formas de interacción según las distintas proporciones de polifenoles HA y proteínas HA que están presentes en la cerveza (Wang & Ye, 2021).

### 1.5.3 Proteínas precursoras de la turbidez cerevecera

Dentro del proceso de producción de la cerveza, el macerado es una etapa clave para la formación de la turbidez, ya que determina en gran medida la cantidad de proteínas presentes luego en el mosto y, por tanto, en la cerveza. Estas proteínas provienen del grano malteado que fue adicionado en el macerado. Se ha estimado que basta con una concentración de 2 mg/L de estas proteínas para generar 1 unidad EBC (European Brewery Convention) de turbidez.

Entre las proteínas más abundantes en la malta, se encuentra la hordeina, una proteína de reserva almacenada en el endosperma de las semillas. Esta es una de las principales responsables de la generación de turbidez en la cerveza, conteniendo prolina como principal sitio de unión con los polifenoles (Jongberg et., al. 2020).

Además, se han descrito otras proteínas asociadas a la formación de turbidez como la albúmina o globulina, aunque con una menor incidencia en la turbidez que la hordeina (Ye et., al. 2016).

Estas tres proteínas comparten ciertas características estructurales, especialmente en su contenido y secuencia de aminoácidos. La proporción de prolina (P) y glutamina (Q) en sus secuencias juega un rol clave en la formación de la bruma. En particular, la secuencia P-Q-Q-P ha demostrado una alta propensión a formar complejos con polifenoles, generando las redes moleculares responsables de la bruma. Se ha observado que los residuos de prolina tienen afinidad por los polifenoles

HA, pero esta afinidad se pierde cuando la prolina se encuentra de forma libre (Wang & Ye, 2021).

#### **1.5.4 Polifenoles precursoras de la turbidez cervecería**

Los polifenoles HA pueden provenir tanto de la maltas (80%) como de los lúpulos (20%) (Shopska et al., 2021). Estas moléculas son claves en la composición del sabor final del producto. También pueden prolongar su vida útil, actuando como captadores de radicales libres y agentes reductores. Los compuestos fenólicos más frecuentes en la cerveza son la catequina, la epicatequina, el ácido ferúlico, el ácido p-cumárico y el ácido vainílico. Estos compuestos fenólicos pueden transformarse rápidamente en compuestos volátiles que afectan la estabilidad y sabor de la cerveza (Habschied et., at. 2021).

Según su peso molecular (MW), los polifenoles se dividen en dos grupos: taninos y no-taninos. Los primeros, tienen un peso molecular de entre 500 - 3000 u (Da) y son los responsables del sabor final de la cerveza, además de ser los principales componentes de los polifenoles HA. Por otro lado, los no-taninos presentan un peso molecular menor a 500 u (Da) y mayor a 3000 u (Da). Cuando las partículas menores a 500 u (Da) se oxidan y polimerizan, contribuyen a la formación de la bruma. Por otra parte, las moléculas de peso molecular mayor a 3000 u (Da), tienden a precipitar y son removidas durante los procesos de seguimiento por parte de los cerveceros en los fermentadores.

En el mosto también se encuentran polifenoles monoméricos entre los que se destacan los flavonoides y los flavanoles, ambos con un peso molecular menor a 500 u (Da). Estos compuestos, mediante oxidación y polimerización, generan más sitios de unión con proteínas circundantes, formando polímeros que contribuyen a la formación de la bruma (Wang & Ye, 2021).

#### **1.5.5 Otros compuestos que otorgan turbidez a la cerveza**

Existen otros compuestos que pueden generar o colaborar a la formación de la bruma cervecera, entre ellos se encuentran distintos glucanos, material inorgánico y oxalato de calcio (Steiner et. al., 2010).

Los glucanos son polisacáridos formados por unidades de glucosas unidas por enlaces glucosídicos. Provienen de las maltas y son parte de los azúcares degradados durante el macerado. Si no se degradan adecuadamente, por un macerado demasiado corto o condiciones de temperatura incorrectas, pueden generar turbidez en el producto final. Además, si las condiciones de fermentación no son óptimas, las levaduras pueden estresarse y liberar glucógeno, un polisacárido de reserva similar al

almidón, que también contribuye a la turbidez. En particular los β-glucanos, presentes en las paredes de las células de las maltas pueden pasar a la cerveza y generar problemas en el filtrado al aumentar la viscosidad del líquido (Steiner et. al., 2010).

El oxalato de calcio, se forma a partir del ácido oxálico (proveniente de las maltas) y el calcio (presente en el agua). La correcta concentración de calcio es clave para que el oxalato precipite en forma de cristales y no permanezca en suspensión (Steiner et. al., 2010).

Finalmente, la materia orgánica proveniente de los ingredientes también puede generar turbidez no deseada en la cerveza (Steiner et. al., 2010).

## **1.6 Métodos de eliminación de la turbidez**

Para alcanzar la cristalinidad buscada en las cervezas, hay dos grandes métodos que pueden usarse en forma complementaria dentro del mismo esquema de producción, para alcanzar un producto final de calidad, en menos tiempo y a un costo reducido (Martinez Amezaga et al., 2016). Los dos métodos más usados son el filtrado (Domene, 2018) y el agregado de clarificantes (Tabla 2) . .

### **1.6.1 Filtrado**

El filtrado es una herramienta utilizada en la búsqueda de la clarificación deseada para el estilo en cuestión. El microfiltrado o el filtrado por tierra de diatomeas son los métodos de filtrado más utilizados en la industria (Martinez Amezaga et., al. 2016).

### **1.6.2 Clarificación**

La clarificación es el proceso por el cual se eliminan o precipitan las partículas en suspensión responsables de la turbidez de la cerveza, con el fin de mejorar su claridad y estabilidad. La clarificación no es un paso obligatorio ni debe realizarse en un momento fijo del proceso de elaboración. El grado de clarificación deseado dependerá del estilo de cerveza que se busca producir. Existen diversos métodos de clarificación, los cuales actúan sobre diferentes tipos de turbidez. Cada insumo empleado apunta a un origen específico de turbidez y se aplica en etapas definidas del proceso productivo. En la tabla 2 se resume el uso de los clarificantes más comunes tanto en la industria como en la producción artesanal. Es preciso resaltar que en ambos casos, la clarificación con aditivos suele combinarse con procesos de filtrado.

**Tabla 2:** Clasificación de diferentes clarificantes que se utilizan en la producción de cerveza. Se explicita su origen y cuál es su turbidez objetivo sobre la cual actuar. (Elaboración propia basado en Domene, 2018).

Clarificador	Origen	Turbidez a solucionar
Isinglass	Orgánico (colágeno animal)	Biológica principalmente (levaduras). También puede actuar sobre proteínas.
Gelatina	Orgánico (colágeno animal)	Biológica principalmente (levaduras). Puede actuar sobre la turbidez inorgánica también.
Irish Moss	Orgánico (alga)	Turbidez inorgánica
Gel de sílice	Inorgánico	Turbidez inorgánica
Polyclar	Inorgánico (polivinilpolipirrolidona)	Turbidez inorgánica

Otro método de clarificación se basa en el uso de enzimas proteolíticas o proteasas (Esti et. al., 2013). El grupo de Esti en 2013 comparó la actividad proteolítica de la papaína extraída del látex así como de la fruta madura, observando una mejor actividad frente a un sustrato peptídico para la enzima del látex. Esto la convierte en una alternativa interesante para su aplicación en la clarificación del vino.

## 1.7 Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas, también llamadas proteasas o peptidasas son un tipo de enzimas presentes en todos los dominios de la vida, que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas (Caffini et. al., 2009)

Las enzimas proteolíticas pueden clasificarse en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas son aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de la secuencia proteica. Las exopeptidasas actúan en los extremos N o C terminal de la cadena polipeptídica del sustrato, removiendo uno o más aminoácidos (Caffini et. al., 2009).

En 1960, Hartley propuso una clasificación de las peptidasas basada en las características de sus mecanismos catalíticos. De esta manera, distinguió cuatro grupos principales de proteasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. Las proteasas serínicas y las cisteínicas comparten la capacidad de formar complejos covalentes transitorios con el sustrato. En cambio, las proteasas aspárticas y las

metalopeptidasas actúan sin formar complejos covalentes, catalizando la hidrólisis mediante otros tipos de interacciones no covalentes, como la activación de moléculas de agua (Caffini et. al., 2009).

En las proteasas serínicas y cisteínicas, el nucleófilo que participa en la reacción de hidrólisis es un aminoácido catalítico de la enzima. En cambio, en las aspárticas y metalopeptidasas, el nucleófilo es una molécula de agua activada, que juega el rol esencial en el mecanismo (Caffini et. al., 2009).

La clasificación inicial propuesta por Hartley en 1960 sentó las bases para los dos grandes sistemas actuales de clasificación de peptidasas: la nomenclatura de la Comisión de Enzimas (EC) y el sistema MEROPS (Caffini et. al., 2009).

En el sistema EC, las proteasas se ubican en la clase 3, correspondiente a las hidrolasas. Dentro de esta, pertenecen a la subclase 4, que incluye enzimas que actúan sobre enlaces peptídicos. A su vez, se agrupan en distintas sub-subclases (11, 13–18, 21–24 o 99) según la posición del enlace que clivan en el sustrato y el tipo de mecanismo catalítico que emplean. El cuarto dígito del número EC se utiliza para identificar de manera específica a cada proteasa dentro de su sub-subclase correspondiente.

En 1993, Rawlings & Barrett propusieron un nuevo sistema de clasificación de peptidasas basado en la estructura molecular y las relaciones evolutivas entre enzimas. Con sucesivas actualizaciones, este trabajo decantó en la creación del sistema MEROPS. Este sistema organiza las peptidasas en dos niveles jerárquicos: familias y clanes (Caffini et. al., 2009).

Una familia agrupa peptidasas que tienen una similitud en su secuencia aminoacídica, especialmente en regiones clave para su actividad catalítica. Un clan, reúne familias que tienen un origen evolutivo común, es decir, derivan de un mismo ancestro.

En términos funcionales, la clasificación por familias resulta más útil, ya que se basa en similitudes estructurales directamente relacionadas con la actividad enzimática. En cambio, los clanes representan agrupamientos de orden filogenético, sin implicar necesariamente similitudes funcionales.

## 1.8 Aplicaciones industriales de las enzimas proteolíticas

Las proteasas están dentro de las enzimas más utilizadas de la industria, junto con las carbohidrasas (Mordor Intelligence, 2023).

Una de las primeras proteasas utilizadas en la industria fue la tripsina, aplicada en el procesamiento de cueros. En el ámbito cervecero, L. Wallerstein introdujo en

1911 el uso de las proteasas vegetales, como la papaína y la bromelaína. A éstas se les suma la ficina como las fitoproteasas más relevantes en términos industriales.

En el caso de la papaína, ya desde 1933 existía un centro de producción comercial ubicado en Ceilán (actual Sri Lanka). Por otro lado, la bromelaína comenzó a producirse con fines terapéuticos antiinflamatorios en la década de 1950, usos que mantiene en la actualidad. También se le atribuyen propiedades cicatrizantes, digestivas y supresoras del apetito (Illanes, 2009). El caso de la papaína se verá más en profundidad en secciones posteriores de este trabajo.

Las proteasas en general prometen ser un actor clave en el mercado de enzimas, proyectándose que para 2024-2025 representen el 60% de las enzimas comercializadas y el 40% de todas las ventas mundiales de enzimas (Mordor intelligence, 2023).

Otra proteasa con aplicaciones en la industria es la renina, destacada por su alta especificidad proteolítica y su eficiencia en el proceso de cuajado de la leche para producir quesos (Valles et. al., 2009).

## 1.9 La papaína

La papaína (EC 3.4.22.2) pertenece a la familia C1, dentro del clan CA según la clasificación MEROPS (Storer & Ménard. 2013). Es una proteasa cisteíncica, dado que un residuo de cisteína actúa como nucleófilo, atacando el enlace peptídico que se va a escindir (Rao et al., 1998).

Se extrae del látex de la papaya y luego de un proceso de secado se comercializa como papaína cruda. Este producto si bien contiene a la papaína, también presenta otras proteasas y compuestos contaminantes. Con el objetivo de obtener un producto con mayor concentración de papaína y eliminar otras enzimas no deseadas, se han puesto a punto diferentes métodos de purificación (Azarkan et. al., 2003).

Su rol biológico está relacionado con la defensa de la planta frente a ataques patógenos. Los daños físicos ocasionados por estos agentes externos inciden en la producción de proteínas y en las propiedades del látex de la papaya en sí (Azarkan et. al., 2006). Además, estas enzimas participan en procesos de cicatrización del tejido vegetal dañado, contribuyendo a la supervivencia de la planta en entornos hostiles. En particular, se ha demostrado que la papaína interactúa directamente con los organismos patógenos (Konno et al., 2004). También colabora en la correcta coagulación del látex lo cual actúa como una barrera física que impide la entrada de agentes perjudiciales para la planta (Silva et al., 1997).

Esta enzima es relativamente inespecífica, debido a que no muestra una estricta selectividad por la hidrólisis de enlaces entre residuos aminoacídicos determinados, más allá de su preferencia por un residuo hidrofóbico en la posición P2 del sustrato (el segundo residuo hacia el extremo N-terminal del sitio de corte) (Storer, 2013). Esta baja especificidad es una de las razones por las que la papaína tiene múltiples aplicaciones industriales, desde la ablandación de carnes hasta la clarificación de cervezas.

De modo natural, la papaína se produce como un zimógeno, también llamado proenzima o enzima inactiva, compuesta por 345 aminoácidos y con un peso molecular de 38.922 Da (*UniProt*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00784/entry>) (Figura 4). La forma catalíticamente activa de la enzima es una proteína de 212 aminoácidos, con un peso molecular de 23.406 Da, y presenta tres puentes disulfuro que contribuyen a su estabilidad estructural. La papaína es estable en un amplio rango de pH (entre 3 y 9) y a temperaturas de hasta 80°C (Amri & Mamboya, 2012). Sus condiciones óptimas dependen del sustrato y de las condiciones experimentales, por ejemplo cuando se usa caseína como sustrato se ha reportado un pH óptimo en el rango de 5,8–7,0 y una temperatura óptima de 50–57 °C (Grzonka et., al. 2007). Esta robustez frente al pH y la temperatura la convierte en una herramienta útil en procesos industriales donde otras enzimas perderían actividad.



**Figura 4.** Estructura de la propapaína generada por AlphaFold. Imagen extraída de UniProt.

La estructura cristalográfica de la papaína está bien caracterizada (pdb 9PAP). Al igual que otras enzimas del clan CA presenta un dominio L (N-terminal), formado principalmente por un haz de  $\alpha$ -hélices, y un dominio R (C-terminal) con plegamiento de barril  $\beta$ . El sitio activo, con su diáda catalítica Cys-His, se ubica en la hendidura entre ambos dominios.

La papaína se ha utilizado en varios productos dentro de diferentes industrias. Los casos más destacados corresponden a la industria farmacéutica y la alimentaria.

En la industria farmacéutica, esta enzima ha sido utilizada en la formulación de cosméticos, medicamentos antiinflamatorios y preparados con funciones digestivas como suplementos para tratar dispepsias o facilitar la digestión de proteínas. También se ha investigado su potencial en el tratamiento de heridas, debido a su capacidad para desbridar tejido necrótico sin dañar el tejido sano (Valles et. al., 2009).

En la industria alimentaria, su aplicación es muy variada. Un ejemplo de este uso es en la industria carnica como ablandamiento de carne. Este tratamiento se da mediante la ruptura de proteínas miofibrilares y colágeno con estas proteasas. Este uso es particularmente común en productos cárnicos procesados o marinados (Ashie et. al., 2002).

En la industria de las bebidas, se ha destacado por su capacidad para clarificado de jugos, al degradar proteínas responsables de la turbidez. También se han registrado aplicaciones en la elaboración de vinos y en la clarificación de cervezas, donde actúa romriendo complejos proteicos responsables de la formación de la turbidez fría (Valles et. al., 2009).

Cómo se mencionó anteriormente, la turbidez en frío en la cerveza es generada, en parte, por complejos formados entre polipéptidos y polifenoles. Esta turbidez puede reducirse mediante la degradación de estos complejos y/o de sus precursores (Nelson & Young, 1987). Uno de los métodos más antiguos para enfrentar este problema es la adición de papaína, ya sea en el tanque de frío (luego de la fermentación primaria) o luego del proceso de filtrado. La concentración óptima de la enzima depende del momento en que se aplique durante el proceso productivo (Gerber, 2024). Diferentes ensayos han demostrado que la adición de papaína no genera cambios perceptibles en el sabor del producto final.

La incorporación de esta proteasa no solo contribuye a la clarificación, sino que también mejora la eficiencia del proceso de filtración en contextos de producción industrial, donde es habitual el uso combinado de varias estrategias para lograr un producto final visualmente limpio (Martinez Amezaga et. al., 2016).

La correcta estabilidad en frío, como se ha venido desarrollando, permite evitar que el producto se enturbie a bajas temperaturas. A temperatura ambiente, los complejos de proteínas y polifenoles (como los taninos) son solubles, pero se vuelven insolubles en frío, lo que causa precipitación y turbidez. La aplicación de proteasas como la papaína ayuda a reducir esta problemática, mejorando así la estabilidad coloidal del producto (He et. al., 2006). Esto resulta especialmente importante en

cervezas destinadas a exportación o almacenamiento prolongado, donde las variaciones de temperatura pueden afectar la apariencia y aceptabilidad del producto.

## 2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la papaína como una alternativa para la clarificación de cervezas de mayor interés comercial, tanto para producción industrial como artesanal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la actividad proteolítica de una papaína comercial de grado alimenticio.
- Elaborar cerveza del estilo Pilsener Lager a escala de laboratorio.
- Clarificar la cerveza Pilsener Lager usando un tratamiento enzimático con papaina y un tratamiento con clarificante no enzimático de referencia.
- Realizar una evaluación sensorial de la cerveza Lager tratada con ambos métodos.
- Evaluar la turbidez de la cerveza Lager tratada con ambos métodos.
- Clarificar una cerveza estilo Blonde Ale producida por una fábrica artesanal local usando un tratamiento enzimático con papaina y un tratamiento con clarificante no enzimático de referencia.
- Comparar la turbidez, viscosidad, pH, densidad, carga microbiana y el contenido de etanol, de la cerveza clarificada con ambos métodos.
- Evaluar los cambios en el perfil proteico de las cervezas clarificadas con papaína mediante SDS-PAGE.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**3.1 Materiales:** Collupulin 200 L (DSM), donada por la empresa Abastecimientos Group. Para la cocción de la cerveza lager se utilizaron: 3 kg Pilsen 640 g Munich 320 g Cara Clair 1 pack Diamond Lager 11 g 100 g Saaz (3,9% AA) (adquirido en un proveedor local, Almacén Cervecería). 15 botellas de 500 mL de cerveza Blonde Ale donada por una cervecería artesanal nacional (Chiripa). Cerveza industrial Patricia de la FNC. Placas para el cultivo de microorganismos con los medios correspondientes (Tryptic Soy Agar (TSA) y Sabouraud (SBD)) donadas por el laboratorio Fertilab. Isinglass adquirido en un proveedor local (Almacén Cervecería).

A efectos prácticos cabe destacar que, a partir de este punto, siempre que se refiere a ensayos con papaína se podrán encontrar los términos “papaína” y “Collupulin”. Ambos términos se refieren a la proteasa comercial que se utilizó en todo este trabajo. Exactamente lo mismo pasa con los términos “clarificante inorgánico”, “clarificante comercial” e “isinglass”.

### **3.2 Caracterización de la papaína comercial**

#### **3.2.1 Cuantificación de proteínas totales**

La concentración de proteínas totales de la solución de papaína comercial (Collupulin), se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de concentración de 0,1 a 1,0 mg/mL.

En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 5 µL de muestra, solución estándar o agua Milli-Q (blanco) por pocillo y se agregaron 195 µL de reactivo de Bradford. La placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas Infinite 200 Pro (Tecan). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **3.2.2 Determinación de la actividad proteolítica**

Brevemente, se incubaron 0,5 mL de caseína 1% (p/v), en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0), con 0,2 mL de la enzima en diferentes diluciones, preparadas en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0, con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 38 mM y cisteína 35 mM), a 40 °C durante 60 minutos. La reacción se detuvo agregando 0,3 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v). Luego de 30 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g por 10 min (centrífuga Sigma 3-16KL, rotor número 12349). La absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm. Las muestras se ensayaron por triplicado y se prepararon los blancos correspondientes, preparados agregando TCA antes de agregar la enzima a la solución de caseína.

Una unidad de enzima (TU) se definió como la cantidad de enzima que libera el equivalente a 1 µg de tirosina por minuto de reacción, bajo las condiciones del ensayo. Para calcular las TU se realizó una curva estándar de tirosina en el rango de 25 a 100 µg/mL.

La actividad por mL de enzima (TU/mL) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{TU/mL} = \frac{(A_{280\text{ R}} - A_{280\text{ bl}}) \times FD \times \text{volumen reacción (ml)}}{60 \text{ min} \times \text{volumen enzima (ml)}} \times \frac{1}{\text{pendiente (\mu g/ml)} - 1}$$

A<sub>280</sub> R: Absorbancia a 280 nm de la muestra

A<sub>280</sub> Bl: absorbancia a 280 nm del blanco

FD: factor de dilución de la enzima

Volumen de reacción: volumen total (en mL) del ensayo

Volumen de enzima: volumen (en mL) de enzima usado en el ensayo

60 min: tiempo de reacción

Pendiente: pendiente de la curva de calibración de tirosina

### 3.3 Producción de cerveza Pilsener Lager

La producción se llevó a cabo según protocolos establecidos (Mazzolla, 2019. Domene, 2018), utilizando una receta estandarizada del estilo Pilsener Lager (Almacen Cervecería, ver apéndice 2).

Se utilizó una mezcla de cereales compuesta por: 3 kg de malta Pilsen, 640 g de malta Munich y 320 g de malta Cara Clair que se maceraron en 11,9 L (3 L de agua /kg de malta) de agua a 55 °C. El pH del macerado fue ajustado entre 5,2 y 5,5 mediante adición de ácido fosfórico 85 %.

Una vez corregido el valor de pH, el macerado fue llevado a 66 °C y se mantuvo esa temperatura durante 1 hora, luego se realizó la prueba de yodo para confirmar la conversión del almidón. A continuación se llevó la temperatura a 77 °C y se mantuvo 15 minutos para inactivar las amilasas. El mosto se recirculó durante 15 minutos manteniendo la temperatura en el entorno de 80 °C.

Paralelamente a la cocción, se prepararon 13,1 L de agua a 80 °C (pH entre 5,2 y 5,8) para el lavado de los granos, alcanzando un volumen total de 25 L de mosto. El final del lavado está marcado por la separación de la fase sólida (granos de malta) y la fase líquida (mosto).

La fase líquida se llevó a hervor durante una hora. Se agregaron los lúpulos correspondientes detalladas en la receta (ver apéndice 2) y la cerveza se enfrió a 20 °C y se inoculó con levaduras.

El lote total de Pilsener Lager fue fraccionado en seis fermentadores de 3 L para aplicar diferentes tratamientos de clarificación. Los fermentadores se mantuvieron en una cámara con temperatura controlada a 16 °C durante 14 días. Uno de los

fermentadores fue tratado con el clarificante no enzimático comercial (Isinglass, ver apéndice 3).

La papaína (Collupulin 200 L®) fue agregada el día 7 de fermentación a los fermentadores correspondientes (#3 a 6) utilizando diferentes concentraciones y el restante se utilizó como control sin clarificantes como se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3.** Tratamientos de clarificación de la cerveza Pilsener Lager. \*Concentración final del clarificante en el fermentador expresada como miligramos de sólido por mililitro de cerveza para Isinglass o en unidades de tirosina por mililitro de cerveza (TU/mL) para la papaina.

Fermentador #	Tratamiento	Concentración final*
1	Control sin clarificante	-
2	Isinglass	0,3 mg/mL
3	Collupulin 200L	0,029 TU/mL
4		0,043 TU/mL
5		0,058 TU/mL
6		0,290 TU/mL

Finalizada la fermentación, el contenido de cada fermentador fue embotellado en botellas de vidrio de 500 mL.

### 3.4 Tratamiento enzimático de la cerveza Blonde Ale

Este segundo ensayo de clarificación se realizó utilizando una cerveza estilo Blonde Ale producida por la cervecería artesanal local (Chiripa). A diferencia del ensayo anterior, en este caso no se elaboró la cerveza en el laboratorio. Las muestras fueron tomadas directamente del fermentador de la fábrica, una vez finalizado el proceso de fermentación, y antes del filtrado del producto final. Para cada tratamiento de clarificación se utilizaron botellas con 500 mL de cerveza. Se probaron tres concentraciones finales diferentes de Collupulin 200 L: 0,29 TU/mL, 2,90 TU/mL de cerveza y 5,80 TU/mL de cerveza. Como controles se incluyeron una muestra tratada con Isinglass (0,3 mg/mL) y una muestra madurada sin aditivos. El ensayo fue diseñado como se representa en la tabla 4. Posteriormente, las cervezas tratadas fueron maduradas a dos temperaturas diferentes: 6 y 16 °C.

**Tabla 4.** Diseño del ensayo de tratamiento enzimático de la cerveza Blonde Ale. Cada tratamiento fue realizado en botellas con 500 mL de cerveza y hecho por triplicado. A cada tratamiento le fue asignado una letra como se describe a continuación: A: Control sin tratar // B: Tratada con Isinglass 0,3 mg/mL// C, D y E: Tratada con Collupulin 200 L 0,29 2,90 y 580 TU/mL de cerveza, respectivamente.

	Control sin tratamiento	Isinglass 0,3 mg/mL	Collupulin 200L		
			0,29 TU/mL	2,9 TU/mL	5,8 TU/mL
Réplicas	A1	B1	C1	D1	E1
	A2	B2	C2	D2	E2
	A3	B3	C3	D3	E3

### 3.5 Análisis de turbidez

La turbidez de la cerveza se evaluó midiendo la densidad óptica a 595 nm, utilizando el espectrofotómetro Shimadzu Spectrophotometer UV-1800. Para cada tratamiento de la cerveza y condición experimental ensayada se calcularon los valores promedio de turbidez y el error estándar de al menos cinco medidas independientes. Los resultados fueron analizados mediante test ANOVA de una vía para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

### 3.6 Análisis sensorial

Para evaluar las propiedades organolépticas de la cerveza Blonde Ale sometida a los diferentes tratamientos de clarificación, se realizó una cata sensorial con un panel de doce participantes no entrenados. Se evaluaron siete muestras de cerveza, la primera correspondió a una cerveza comercial industrial de referencia (Cerveza Patricia, Fábrica Nacional de Cerveza, FNC), mientras que las seis opciones restantes son sublotes de la cerveza Pilsener Lager producido en el laboratorio que fueron tratadas como se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla 5.** Cata de cerveza Blonde Ale. Los números representan la cerveza a evaluar. Los participantes solo podían ver el número del vaso que estaban evaluando. En base a los números y sus evaluaciones comparan números y no tipos de cervezas.

Nº de cerveza en la cata	Origen	Tratamiento
1	Industrial	—
2	Producido en FCien	Sin tratar
3	Producido en FCien	Con clarificante comercial
4	Producido en FCien	0,029 TU/mL
5	Producido en FCien	0,043 TU/mL
6	Producido en FCien	0,058 TU/mL
7	Producido en FCien	0,29 TU/mL

Inicialmente, se realizó una evaluación visual comparativa de las cervezas para evaluar el cuerpo, espuma y turbidez de las muestras. Se colocaron alícuotas de 50 mL de cerveza en tubos de ensayo de vidrio colocados en una gradilla.

Posteriormente se realizó la cata sensorial a ciegas, en la que cada muestra fue servida en vasos de plástico descartables idénticos (numerados de acuerdo a lo descrito en la Tabla 5), conteniendo aproximadamente 150 mL de cada cerveza.

Los participantes completaron un cuestionario (ver apéndice 4) para registrar sus apreciaciones durante las dos etapas de la evaluación. Todas las preguntas se formularon con el objetivo de comparar los seis tratamientos realizados en el marco de este trabajo con el producto comercial de FNC. Para mayor facilidad en el procesamiento de datos, las preguntas del formulario se respondieron mediante una escala numérica del 1 al 5 cuyos valores y significado se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6.** Relación entre respuesta y calificación otorgada a cada cerveza por parte de los catadores en función de las preguntas que se les planteaba.

Respuesta	Calificación
1	Mucho
2	Bastante
3	Más o menos
4	Diferente
5	Muy diferente

### 3.7 Análisis de viscosidad

La viscosidad dinámica de las muestras de cerveza fue determinada utilizando un viscosímetro digital Brookfield DV-I Prime, provisto por el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química. Para las mediciones se empleó el eje cónico CPE-40 (código S40) con un volumen de muestra de 0,5 mL y velocidad de rotación de 60 rpm, a temperatura ambiente. Se registraron los valores de viscosidad (cP), temperatura (°C), velocidad de giro (rpm) y torque (%). Las mediciones se consideraron válidas si el torque se encontraba entre 10 % y 100 %. Cada muestra fue medida por duplicado.

### 3.8 Análisis de densidad

La densidad de las muestras de cerveza se determinó a partir de la medición de la masa utilizando una balanza analítica. Para cada tratamiento se presentan cinco réplicas. Las medidas se realizaron utilizando 20 µL de cerveza, utilizando una micropipeta P20 (Gilson). En base a los resultados tomados por la balanza, se utilizó la fórmula de densidad  $m/V = \rho$ . Para cada tratamiento y condición experimental se calcularon los valores promedio de densidad y su error estándar. Los resultados fueron analizados mediante test ANOVA de una vía para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

### 3.9 Medición de SRM (Standard Reference Method)

El color de las muestras de cerveza se determinó por el método SRM, basado en la medición de la absorbancia a 430 nm. Para cada uno de los seis tratamientos realizados a la cerveza Blonde Ale se tomaron cinco mediciones de absorbancia. Los valores obtenidos se multiplicaron por 12,7, según lo descrito por Hasnul Hadi y col.

(Hasnul Hadi et., al. 2021) para calcular el valor SRM. La escala de SRM se puede ver en el anexo 9.

### **3.10 Medición de pH**

Se realizaron medidas para cada tratamiento con el pHmetro Bioblock Scientific, modelo 93313. Para cada tratamiento y condición experimental se calcularon los valores promedio de pH y el error estándar de al menos 5 medidas independientes. Los resultados fueron analizados mediante test ANOVA de una vía para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

### **3.11 Evaluación de espectros FTIR - ATR**

El contenido de etanol de la cerveza se evaluó cualitativamente mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Para esto se utilizó un especlrómetro IRSpirit (Shimadzu), que cuenta con un accesorio de ATR modelo QATR-S (Shimadzu) que permite estudiar el compuesto puro sin diluir. El equipo presenta un rango de número de onda de entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ . Esto corresponde a una longitud de onda de 2500 nm y 25000 nm.

Se generaron los espectros de las cervezas tratadas con clarificante comercial y con las diferentes concentraciones de papaína así como de la cerveza sin tratar. Se usaron 20 microlitros de cerveza sin diluir de cada tratamiento para generar el espectro correspondiente. Se realizó una réplica por tratamiento.

Una vez obtenidos los espectros de cada muestra, se analizó la región del espectro relacionada con el contenido de etanol (Meza-Marquez et. al., 2024 & Rexhepi, Puşcaş, & Gjinovci, 2025) para evaluar cualitativamente cambios en el contenido de etanol.

### **3.12 Evaluación de carga microbiana**

El recuento microbiológico en cerveza se realizó en muestras clarificadas y sin clarificar mediante el método de siembra en placa para cuantificar microorganismos viables presentes en la muestra. Se realizaron diluciones seriadas y se sembró 100 microlitros de cerveza en medio TSA, para promover el crecimiento de bacterias y en agar Saboureaud para el crecimiento de levaduras y hongos. Se incubó a 30 y  $37^{\circ}\text{C}$  respectivamente durante 24- 48 horas para determinar el número de colonias formadas.

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) para cada caso, teniendo en cuenta el factor de dilución de cada muestra.

### **3.13 Análisis de proteínas por SDS-SAGE**

Para evaluar el perfil de proteínas de la cerveza Blonde Ale, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), como lo describe Laemmli (1970). Se usó un gel de poliacrilamida compuesto por un concentrador al 4 % y un gel separador al 12 %

Las muestras de cerveza fueron concentradas previamente utilizando un evaporador centrífugo al vacío (SpeedVac SPD2010, Savant). Luego se trajeron con buffer de muestra reductor y desnaturizante, que contenía SDS. Las muestras fueron calentadas a 95 °C durante 10 minutos para asegurar la desnaturización completa. Se sembraron 9 µg de cerveza sin tratar, cerveza o tratada con 5,80 TU/ml de papaína por carril.

Como marcador de peso molecular se utilizó Maestrogen The AccuRuler RGB prestained protein ladder (Maestrogen). La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA durante los primeros 10 minutos y luego a 20 mA durante 90 minutos adicionales.

Las bandas proteicas fueron reveladas mediante tinción con Azul de Coomassie R-250, seguida de un proceso de decoloración con una solución de etanol y ácido acético hasta lograr un fondo claro y bandas definidas.

## **4 RESULTADOS y DISCUSIÓN**

En este trabajo se utilizó papaína comercial (Collupulin), un extracto enzimático obtenido del látex de *Carica papaya*, parcialmente purificado y que, por tanto, contiene otras proteínas contaminantes derivadas del proceso de extracción. Para caracterizar adecuadamente el insumo utilizado, en una primera etapa se determinó la concentración de proteínas totales y la actividad enzimática de la papaína comercial.

En una segunda etapa, se elaboró cerveza a escala de laboratorio y se evaluó el efecto del clarificado enzimático sobre la turbidez y las propiedades sensoriales. Se incluyó un tratamiento con un clarificante comercial y una cerveza sin ningún tratamiento como controles. La evaluación sensorial comparó las cervezas de laboratorio (con los diferentes tratamientos y sin tratar) con una cerveza industrial. Finalmente, en la tercera parte, se aplicó el tratamiento enzimático a una cerveza producida en una planta artesanal local, seleccionada por presentar un estilo donde la turbidez es un atributo sensorial importante. En esta sección se evaluaron distintas propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas para determinar el impacto del tratamiento clarificante en condiciones reales de producción.

### **4. 1 Cuantificación de la papaína comercial (Collupulin)**

#### **4.1.1 Proteínas totales**

Dado que la papaína utilizada en este trabajo es un extracto enzimático parcialmente purificado (Collupulin), se realizó una primera caracterización para conocer su composición proteica global. La cuantificación de proteínas totales permite estimar la carga proteica del preparado, que incluye tanto a la papaína activa como a otras proteínas contaminantes provenientes del látex de *Carica papaya*. Esta información es necesaria para calcular posteriormente la actividad específica de la enzima y para diseñar tratamientos comparables entre ensayos.

Para la cuantificación de proteínas totales se usó el método de Bradford. Esta técnica se basa en el cambio del máximo de absorción de luz del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al interaccionar con las proteínas, lo cual permite estimar la concentración proteica mediante comparación con una curva estándar (ver Apéndice 5). Se analizaron múltiples diluciones independientes de la preparación enzimática. Se obtuvo un valor de concentración de proteínas totales en la Collupulin 200 L (DSM) de  $22,68 \pm 2,88$  mg/mL.

#### 4.1.2 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de la papaína comercial utilizada en este trabajo se determinó mediante su capacidad para hidrolizar caseína durante 60 min a pH 6,0 y 40 °C. Se ensayaron diluciones 1/4000, 1/6000 y 1/10000 de la enzima, preparadas en buffer fosfato 50 mM (pH 6,0) con EDTA y cisteína como agentes quelante y reductor, respectivamente. Una vez finalizada la reacción, la caseína que no fue hidrolizada se precipitó utilizando ácido tricloroacético y se separa por centrifugación. La fracción conteniendo los péptidos solubles resultante de la hidrólisis fue determinada por absorbancia a 280 nm, y corregida con blancos específicos para cada dilución.

Para estimar la cantidad de tirosina liberada se construyó una curva estándar en el rango de 25 a 100 µg/mL. La pendiente obtenida fue de 0,0059 ( $\mu\text{g/mL}$ )<sup>-1</sup> con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9992$ , lo que aseguró la relación lineal entre la concentración de tirosina y la A 280 nm en el rango ensayado. La actividad enzimática se calculó como se especificó en la sección 3.2.2.

Las actividades específicas obtenidas fueron:

**Tabla 7.** Actividad enzimática (TU/mL) y actividad específica (TU/mg) de Collupulina determinada por el método de hidrólisis de caseína.

Factor de dilución	Actividad (TU/mL)	Actividad específica (TU/mg)
4000	46,9	2,07
6000	51,1	2,25
10000	57,9	2,55

En la Tabla 7 se muestran los valores de actividad (TU/mL), que ya están corregidos según el factor de dilución aplicado. A partir de estos datos se determinó un valor promedio de actividad  $51,97 \pm 5,55$  TU/mL y una actividad específica de  $2,29 \pm 0,24$  TU/mg. Si bien la Collupulin presenta actividad proteolítica, esta es menor a la reportada por el fabricante (>200 TU/mg). Vale mencionar que en la ficha técnica del producto (anexo 1) no se especifican los métodos empleados para determinar la concentración de proteínas ni la actividad de la misma.

## **4.2 Elaboración de cerveza Pilsener Lager, análisis sensorial y evaluación de la turbidez**

### **4.2.1 Análisis sensorial**

Con el objetivo de evaluar el impacto de los distintos tratamientos clarificantes en las propiedades organolépticas de las cervezas producidas, se realizó un análisis sensorial comparativo. Las muestras incluyeron cervezas sin clarificar, tratadas con clarificador comercial y con tres concentraciones (TU/mL de cerveza) diferentes de papaína, además de una cerveza comercial de referencia (FNC). Se evaluaron atributos como aroma, sabor, cuerpo y gasificación mediante una cata realizada por un panel no entrenado en dependencias de la Facultad de Ciencias. Los resultados fueron registrados en un formulario previamente diseñado (apéndice 4).

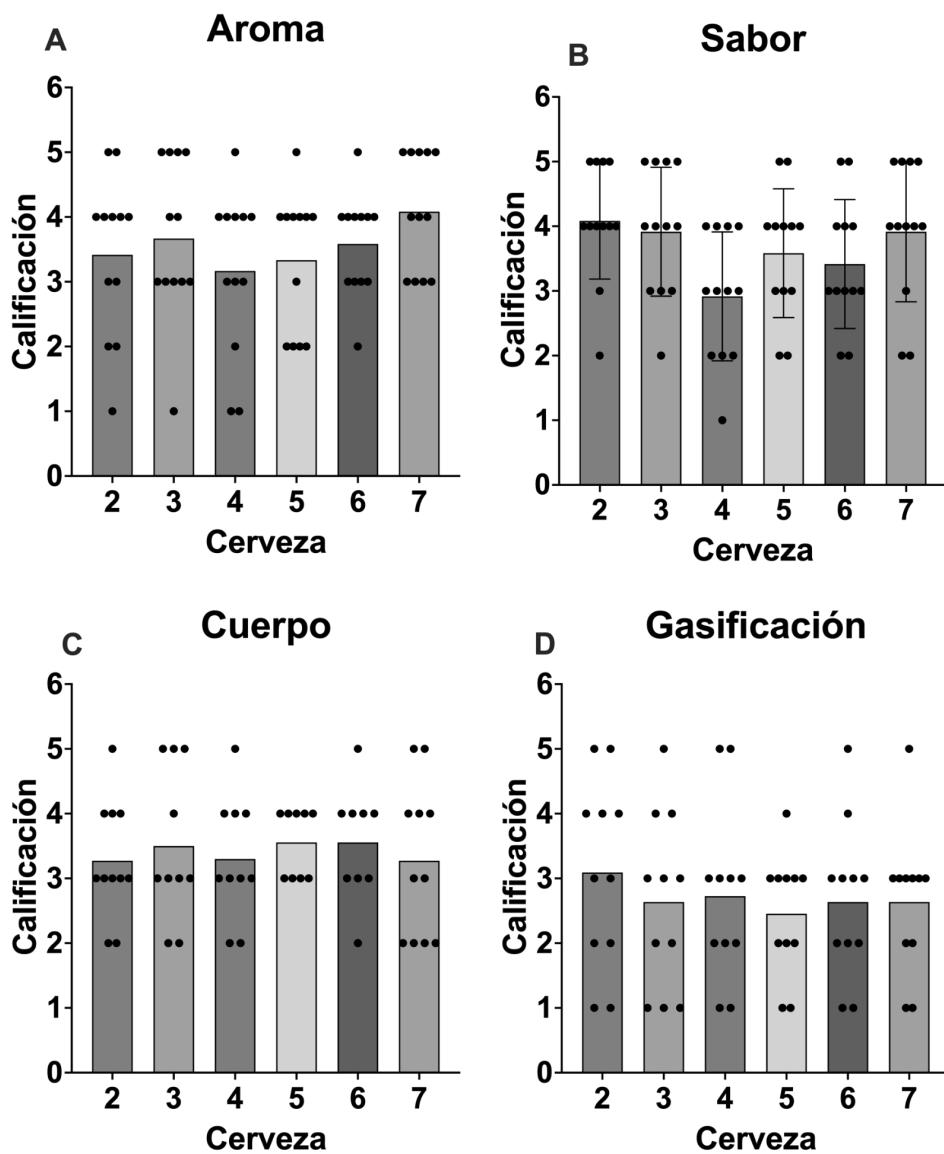


**Figura 5.** Muestras de cerveza Pilsener Lager cocinadas y fermentadas en Facultad de Ciencias. Las mismas fueron embotelladas y catadas en dicha institución en días posteriores (luego de maduración en botella).

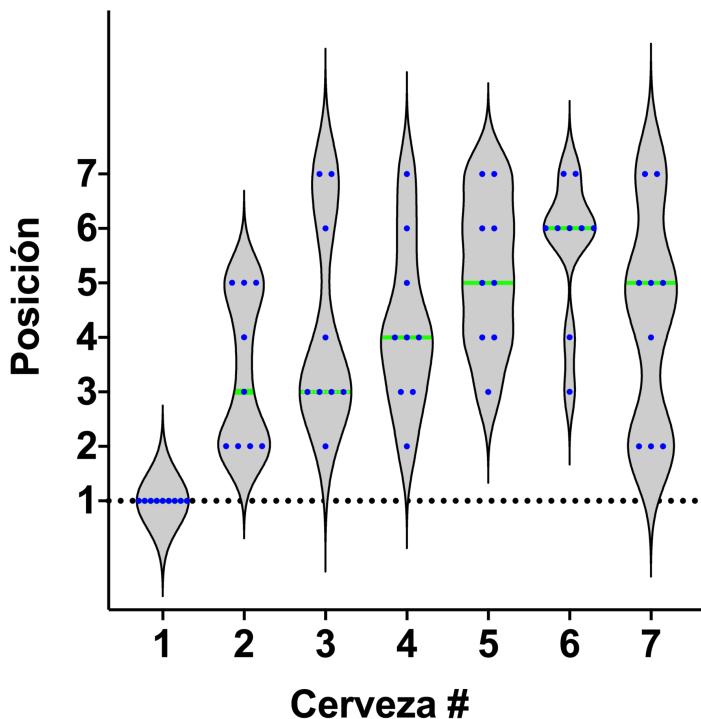
Si bien en la evaluación sensorial se observaron ligeras variaciones, los resultados globales del análisis no evidenciaron diferencias significativas entre las cervezas producidas en la Facultad de Ciencias a nivel organoléptico. A su vez, la comparación con la cerveza de referencia comercial no mostró similitudes destacables ni permitió identificar un tratamiento que lograra una mayor aproximación sensorial al producto comercial de referencia (cerveza 1).

En términos generales, las cervezas experimentales (muestras 2 a 7) fueron percibidas como diferentes de la cerveza comercial, pero no se logró establecer diferencias consistentes entre ellas. Los hallazgos fueron especialmente llamativos, ya que, incluso la cerveza sin tratamiento clarificador (muestra 2) no presentó mayor turbidez ni fue calificada como sensorialmente distinta respecto a las demás. Esto llevó a considerar la posibilidad de que las concentraciones de papaína empleadas fueran insuficientes para generar un efecto detectable, y que el clarificador comercial seleccionado no fuera el más adecuado para el tipo de cerveza producido. Sin

embargo, este último se mantuvo en los ensayos posteriores por razones metodológicas. Los resultados de este ensayo con respecto a los atributos de aroma, sabor, cuerpo y gasificación se pueden ver en la Figura 6.



**Figura 6.** Se muestran resultados de análisis de sabor aroma, cuerpo y gasificación de las diferentes muestras analizadas (preguntas 1 a 4 del cuestionario, ver apéndice 4): 2 cerveza sin tratar, 3 cerveza tratada con clarificador comercial, 4 cerveza clarificada con 0,029 TU/mL de papaína, 5 cerveza clarificada con 0,043 TU/mL, 6 cerveza clarificada con 0,058 TU/mL de papaína y 7 cerveza clarificada con 0,29 TU/mL de papaína. Los participantes solo podían ver el número del vaso que estaban evaluando. Gráficos con las distribuciones de las evaluaciones de cada catador para cada atributo analizado. Las columnas representan las evaluaciones promedio que recibió cada tratamiento. Cada punto representa cada voto de los participantes para cada cerveza en cada atributo evaluado.



**Figura 7.** Distribución de las respuestas de los participantes del análisis sensorial. En la Figura se ve como las diferentes cervezas que participaron de la cata fueron ordenadas de menor a mayor grado de turbidez. Los puntos azules representan cada voto que presentó ese tipo de cerveza en la posición correspondiente. A su vez, las líneas verdes representan los promedios dentro de las posiciones en las que fueron encasilladas cada muestra la numeración sigue la siguiente sistema de referencia: 1 es la cerveza industrial Patricia de FNC; 2 cerveza sin tratar; 3 cerveza tratada con clarificador comercial; 4 cerveza clarificada con 0,029 TU/mL de papaína; 5 cerveza clarificada con 0,043 TU/mL; 6 cerveza clarificada con 0,058 TU/mL de papaína y 7 cerveza clarificada con 0,29 TU/mL de papaína.

Dentro del análisis sensorial que se desarrolló, los participantes ordenaron de menor a mayor grado de turbidez las siete cervezas diferentes que se evaluaban. En esta etapa del ensayo, los participantes indican una clara diferencia entre la cerveza 1 y el resto de las cervezas (Figura 7). Todos los participantes calificaron a la cerveza industrial como la menos turbia.

Luego, a la hora de ordenar el resto de las cervezas, los participantes no siguieron un patrón del todo claro. El orden que se estableció a partir de las respuestas de los participantes fue el siguiente, de menor a mayor turbidez: 1 - 2 - (3 y 4) - 7 - 5 - 6. En el caso de las cervezas 3 y 4, no se pudo marcar diferencias ya que fueron ubicadas en las mismas posiciones. Si bien se alcanzó un orden general (como se ve en la Figura 7), la distribución de las respuestas fue tan dispersa que no se lograron alcanzar conclusiones contundentes a partir de esta parte del ensayo.

#### **4.2.2 Análisis de la turbidez**

En las cervezas elaboradas en estilo Pilsener Lager se evaluó la turbidez a través de medidas de densidad óptica a 595 nm. Para cada uno de los tratamientos (cerveza sin tratar, tratada con clarificante comercial y tratada con cuatro concentraciones crecientes de papaína), se realizaron cinco mediciones independientes.

Los resultados obtenidos fueron concordantes con lo observado en el análisis sensorial: no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Ninguna de las muestras tratadas, ya sea con papaína o con clarificante comercial, presentó valores de turbidez significativamente distintos respecto a la muestra sin tratamiento. Este resultado fue particularmente llamativo, dado que se esperaba observar, al menos, una mayor turbidez en la cerveza control (sin clarificar).

Ante esta situación, se consideraron diversas hipótesis. Una posibilidad es que el clarificante comercial no haya sido aplicado en el momento óptimo del proceso, a pesar de que el fabricante recomienda su adición durante la fermentación. Otra hipótesis plausible es que la cerveza Pilsener Lager, por sus características fisicoquímicas, presenta naturalmente baja turbidez. Este estilo se caracteriza por contener bajas concentraciones de proteínas y polifenoles, compuestos responsables de las interacciones coloidales que generan turbidez (BJCP, 2021). Estas condiciones limitarían la posibilidad de detectar efectos clarificantes, incluso en presencia de tratamientos efectivos. Además cabe destacar que el producto industrial utilizado para la comparación fue filtrado en el proceso de su producción, a diferencia de la cerveza preparada en el laboratorio. Esto sumado a lo antes mencionado explica la gran diferencia en el aspecto con el resto de muestras analizadas.

Dado lo anterior, se resolvió modificar la estrategia experimental. Se seleccionó un estilo de mayor turbidez basal y menor estabilidad coloidal: la cerveza Blonde Ale, ampliamente preferida por los consumidores de cerveza artesanal en Uruguay. El objetivo fue evaluar la eficacia de la papaína en condiciones más exigentes desde el punto de vista del contenido proteico y fenólico. Además, se aumentó la concentración de enzima utilizada para maximizar el potencial efecto clarificante.

Para llevar a cabo esta nueva etapa, se contactó con una planta cervecera artesanal local, Cervecería Chiripa, que nos facilitó muestras sin filtrar de su cerveza Blonde Ale. A partir de este punto, todos los análisis posteriores se realizaron empleando este estilo de cerveza, producido en condiciones reales de elaboración artesanal.

## **4.3. Tratamiento de clarificación de cerveza estilo Blonde Ale y caracterización fisicoquímica**

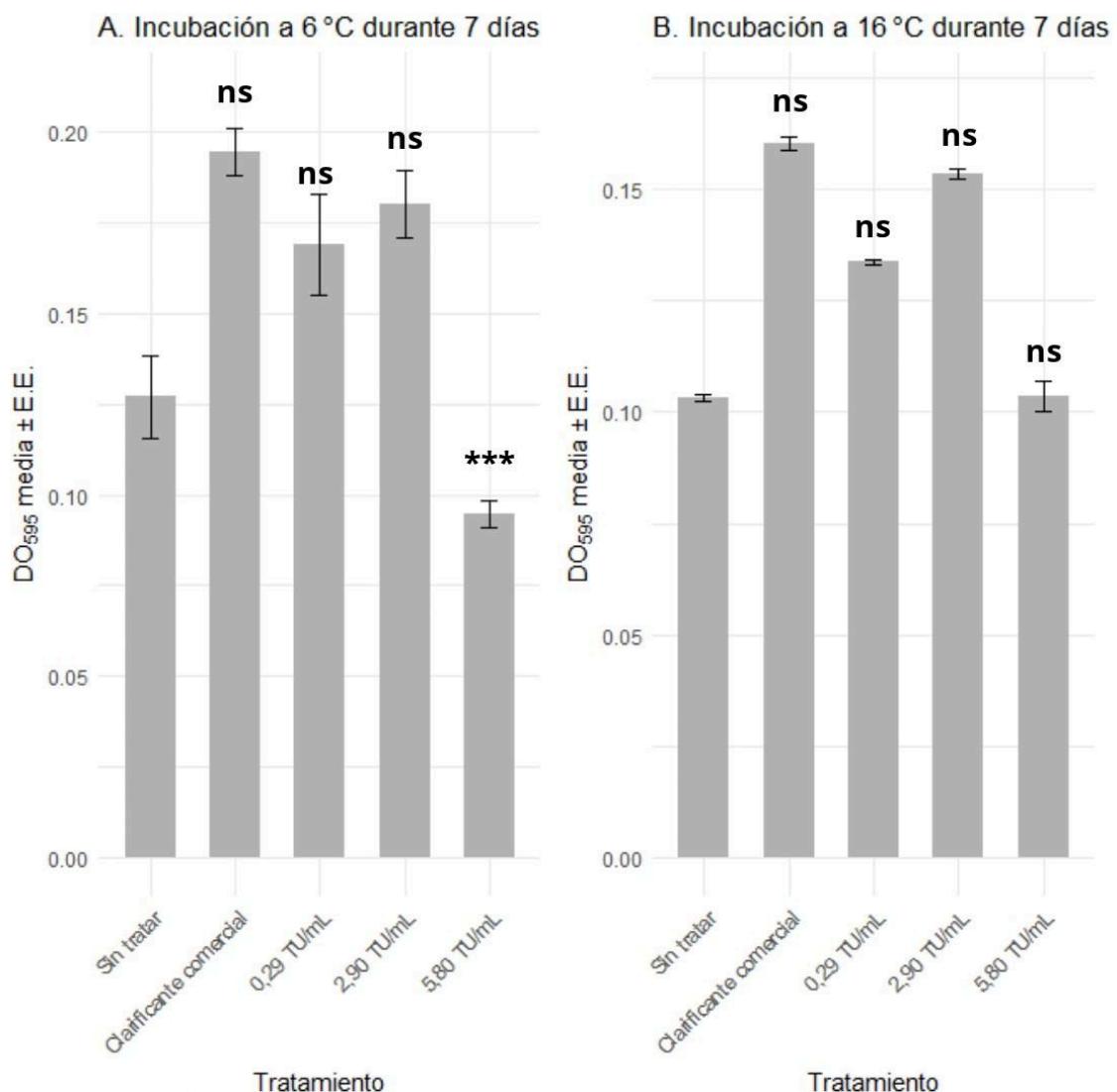
### **4.3.1 Análisis de la turbidez**

En base a los resultados obtenidos se resolvió analizar el efecto de la papaína en un estilo que por definición presenta mayor turbidez. Se tomaron muestras en la planta de la cervecería Chiripa antes y después del proceso de filtrado aplicado a ese lote de producción. Las mediciones de turbidez a 595 nm correspondientes a las muestras sin filtrar y sin tratar fueron utilizadas como control experimental o “tiempo cero”, permitiendo establecer un control adecuado de la cerveza en su estado original. Luego de cinco mediciones para tres réplicas biológicas se determinó una turbidez promedio a 595 nm de  $0,41 \pm 0,01$ .

Para evaluar el efecto clarificante de la papaína se incubó la cerveza a 6 °C o a 16 °C durante 7 días utilizando tres concentraciones finales de enzima (0,29 TU/mL; 2,9 TU/mL y 5,8 TU/mL). Como controles se empleó una muestra sin tratar (control negativo) y el clarificante comercial (control positivo). Pasado el tiempo de maduración se midió la turbidez a 595 nm.

La turbidez de la cerveza antes de madurar (extraída del fermentador de la planta de Chiripa) fue mayor que la de las cervezas maduradas con papaína o isinglass, así como que la del control sin aditivos, tanto a 6 °C como a 16 °C (Figura 8). Este resultado es esperable, ya que durante la maduración se produce la sedimentación natural de levaduras, proteínas y otros compuestos en suspensión. Este resultado confirma que el proceso de maduración, con o sin adición de clarificantes, contribuye de manera efectiva a la clarificación de la cerveza.

En cuanto al efecto clarificante de la papaína durante la maduración, los resultados sugieren que el tratamiento a 6 °C solo logró una disminución significativa de la turbidez en comparación con la muestra sin tratar cuando se aplicó la concentración más alta de papaína (5,8 TU/mL) (Figura 8A). Para las cervezas tratadas con las mismas concentraciones de papaína pero incubadas a 16°C no se registró una disminución significativa en la turbidez (Figura 8B).



**Figura 8.** Efecto de diferentes tratamientos clarificantes sobre la turbidez de cerveza Blonde Ale tras una semana de incubación. Se presenta la turbidez medida a 595 nm (media ± error estándar, n = 9) para cinco tratamientos: sin tratar (control negativo), clarificante comercia (control positivo), y tres tratamientos con papaína (0,29 TU/mL; 2,9 TU/mL y 5,80 TU/mL). (A) muestras incubadas a 6 °C durante 7 días; (B) muestras incubadas a 16 °C durante 7 días. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. Se marcaron con asteriscos los tratamientos que difieren significativamente del control sin tratar (\*P < 0,1; \*\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,01). Las gráficas fueron generadas en R (v4.3.2) utilizando los paquetes ggplot2 y dplyr, el script completo se detalla en Anexo 2.

Llamativamente, la muestra sin tratar presentó valores de turbidez incluso menores que el tratamiento con clarificante comercial, un resultado inesperado que podría deberse a que la dosis de Isinglass no fuera la adecuada Chlup et al. (2006).

El clarificante comercial (Isinglass) es un colágeno de origen animal derivado del pescado. Se utiliza como agente floculante al absorber proteínas, levaduras y complejos proteína-polifenol, formándose flóculos que sedimentan y luego se filtran. El

tratamiento realizado con este clarificante tampoco resultó efectivo para clarificar la cerveza. En este caso, podría deberse a que el pH de la cerveza no fuera lo suficientemente ácido para que el Isinglass tenga una carga neta positiva que permita absorber a los agentes causantes de la turbidez de la cerveza (Ward, s.f.). El efecto del Isinglass es dosis dependiente, esto se evidencia en el estudio de Chlup et al. (2006), quienes evaluaron tres dosis distintas dentro del rango recomendado por el fabricante y observaron que la concentración más alta produjo la clarificación más efectiva. Si la concentración fuera muy baja no habría suficiente colágeno para neutralizar las cargas negativas de las partículas en suspensión, lo que generaría flóculos pequeños o incompletos que permanecieron dispersos y podrían aumentar la turbidez.

Por otra parte, la papaína en dosis bajas (0,29 y 2,9 TU/mL) también aumentó la turbidez de la cerveza. En este caso, el aumento de la turbidez observado podría deberse a la combinación de una baja concentración de enzima en condiciones de temperatura que se encuentran por debajo del rango óptimo para la acción de la papaína. En estas condiciones, la enzima podría haber generando una hidrólisis parcial, produciendo fragmentos peptídicos solubles y una posible desestabilización de complejos proteína-polifenol, promoviendo la formación de partículas coloidales adicionales que aumentan la turbidez del producto final.

#### **4.3.2 Análisis de viscosidad**

La viscosidad describe la resistencia del líquido a fluir, relacionándose directamente con la composición y estructura de la cerveza. La presencia de beta-glucanos y proteínas provenientes de las maltas utilizadas influyen en el valor de dicho parámetro. A nivel organoléptico, la variación en este valor se valora en el cuerpo de la cerveza. Una cerveza con mayor viscosidad se presenta como más cremosa y un cuerpo más formado, mientras que bajas viscosidades hacen del producto una cerveza muy liviana o falta de estructura. El correcto valor de viscosidad para cada estilo es clave para lograr el producto final buscado. A nivel de producción, la viscosidad influirá en el filtrado, haciendo que esta etapa del proceso en plantas industriales sea más eficiente con viscosidades más bajas.

En particular para estilos como Blonde Ale, es clave controlar la viscosidad, dado que se busca una cerveza fácil de beber y con cuerpo liviano o ligero.

Se analizó si el tratamiento con papaína generaba cambios en la viscosidad de la cerveza. Las cervezas Blonde Ale de Chiripa tratadas con papaína o con el

clarificante comercial fueron comparadas con la misma cerveza sin tratar con clarificante. La viscosidad dinámica se determinó en los tratamientos realizados a 6 y a 16 °C, usando un viscosímetro Brookfield DV-I Prime.

En primer lugar, se analizaron muestras de cerveza sin tratamiento con agente clarificante filtrada y sin filtrar, obteniéndose valores de 3,83 cP y 3,94 cP, respectivamente. Los porcentajes de torque registrados fueron de 74,9 % para la cerveza filtrada y 77,2 % para la sin filtrar, dentro del rango operativo recomendado por el fabricante (10–90 %), lo que sugiere confiabilidad en las mediciones. Si bien, la diferencia entre tratamientos fue leve, se observó una viscosidad ligeramente mayor en la cerveza sin filtrar, lo que es coherente con una mayor presencia de sólidos en suspensión. Estos resultados confirman la hipótesis de que el proceso de filtrado reduce levemente la viscosidad de la cerveza.

En el caso de las cervezas tratadas con clarificante enzimático y comercial, en el tratamiento a 6 °C durante 7 días, todas las muestras tratadas (clarificante comercial y papaína en concentración 0,29 2,90 y 5,80 TU/mL) presentaron valores de viscosidad menores que la muestra antes de madurar sin filtrar (3,94 cP) y filtrada (3,83 cP) así como para la madurada sin papaína (1.93 cP). Las cervezas tratadas con papaína mostraron viscosidades similares entre sí (entre 1,52 y 1,55 cP), incluso levemente inferiores a la muestra tratada con clarificante comercial (1,54 cP). Aunque las diferencias fueron pequeñas, el patrón sugiere que todos los tratamientos contribuyeron a reducir levemente la viscosidad respecto al control. En cambio, en las muestras incubadas a 16 °C se observó una tendencia contraria: la cerveza sin tratar presentó la menor viscosidad (2,95 cP), y los valores aumentaron progresivamente con las concentraciones de papaína. La muestra tratada con papaína 5,80 TU/mL alcanzó el mayor valor (4,15 cP), seguida por papaína 2,90 TU/mL (3,50 cP), 0,29 TU/mL (3,45 cP). Por otro lado, la cerveza tratada con el clarificante comercial mostró una viscosidad similar en comparación con las muestras tratadas con el método enzimático (3,65 cP). Estos resultados sugieren que el efecto de la temperatura podría ser el principal factor que influyó en la viscosidad. Los valores de viscosidad de la cerveza madurada a 16 °C fueron similares a los observados en la cerveza antes de la maduración (3,94 cP) y en el caso de la cerveza tratada con la mayor concentración de papaína, levemente mayor (4,15 cP). La maduración a 16 °C no aportó un cambio sustancial respecto a las condiciones de fermentación, que se desarrolló a 19 °C, lo que podría haber limitado el efecto del proceso de maduración sobre la viscosidad y la estabilidad coloidal del producto.

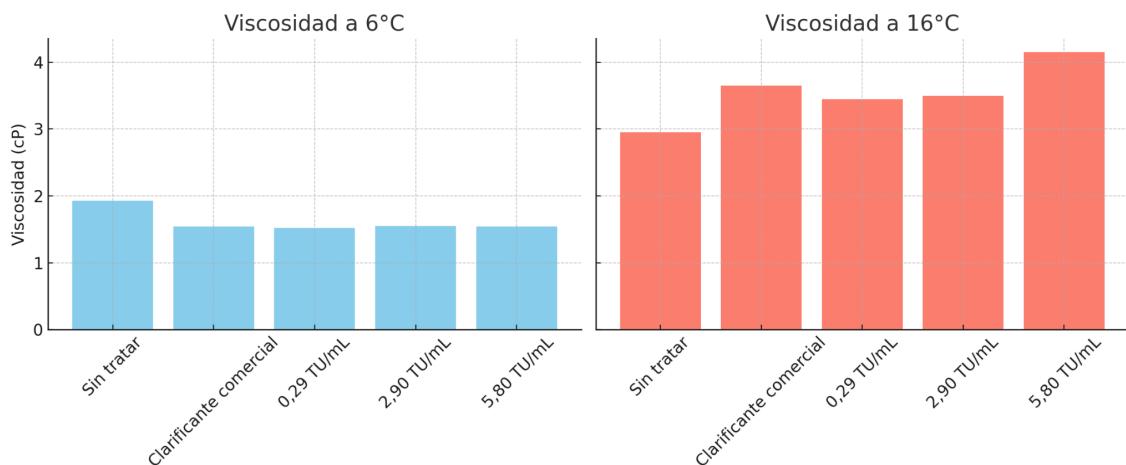
En conjunto, los datos sugieren que el tratamiento a 6 °C fue más efectivo para reducir la viscosidad, en especial en las muestras con papaína. Esto podría ser el

resultado de la precipitación de diferentes partículas en suspensión debido a la temperatura más reducida. A 16 °C, la viscosidad fue mayor en todos los tratamientos, siendo más notoria la diferencia en las muestras tratadas con papaína (Figura 9). Estos datos sugieren un posible efecto combinado del tratamiento enzimático y la temperatura sobre la viscosidad de la cerveza. La incubación de las muestras a diferentes temperaturas podrían tener efectos en la sedimentación de diferentes partículas presentes en la cerveza. Las viscosidades pueden presentar valores diferentes entre las temperaturas, dado que a menor temperatura, la precipitación y sedimentación en el fondo del envase puede verse favorecida. Esto puede contribuir a los valores de viscosidad mostrados por las muestras incubadas a 6°C, los cuales fueron menores que los presentados por las botellas incubadas a 16°C.

Estos resultados indican que la eficiencia de los clarificantes puede estar influenciada por la temperatura de incubación, y que la papaína a altas concentraciones y temperaturas podría generar interacciones o efectos coloidales no deseados (Figura 9). No se observaron diferencias entre el tratamiento con clarificador comercial y las diferentes concentraciones de enzima a 6 y a 16°C.

Analizando las cinco muestras de ambas temperaturas, no podemos sostener que haya grandes diferencias entre tratamientos para cada temperatura. Lo que sí se puede sugerir es el efecto de la temperatura de maduración en la viscosidad de las muestras, ya que las 5 muestras de 16°C presentan mayor viscosidad que sus semejantes incubadas a 6°C.

Cabe señalar que, si bien se planificó la realización de un número adecuado de réplicas por tratamiento para permitir un análisis estadístico robusto, por razones de disponibilidad limitada del viscosímetro no fue posible concretarlo. En consecuencia, los resultados deben interpretarse con cautela: si bien sugieren tendencias interesantes, deben considerarse como observaciones preliminares y no como conclusiones definitivas. Será necesario repetir estas mediciones en futuras etapas para confirmar y validar los patrones observados.



**Figura 9.** Viscosidad de las cervezas medidas a 6 °C (izquierda) y 16 °C (derecha) tras siete días de incubación con distintos tratamientos clarificantes. Se presentan los valores de viscosidad (en centipoise, cP) determinados mediante un viscosímetro Brookfield DV-I Prime para cinco condiciones: sin tratar, clarificante comercial, y tres concentraciones crecientes de papaína (0,29 TU/mL; 2,90 TU/mL y 5,80 TU/mL). El gráfico fue elaborado utilizando Python (versión 3.10) y la librería matplotlib.pyplot. El script se detalla en Anexo 4.

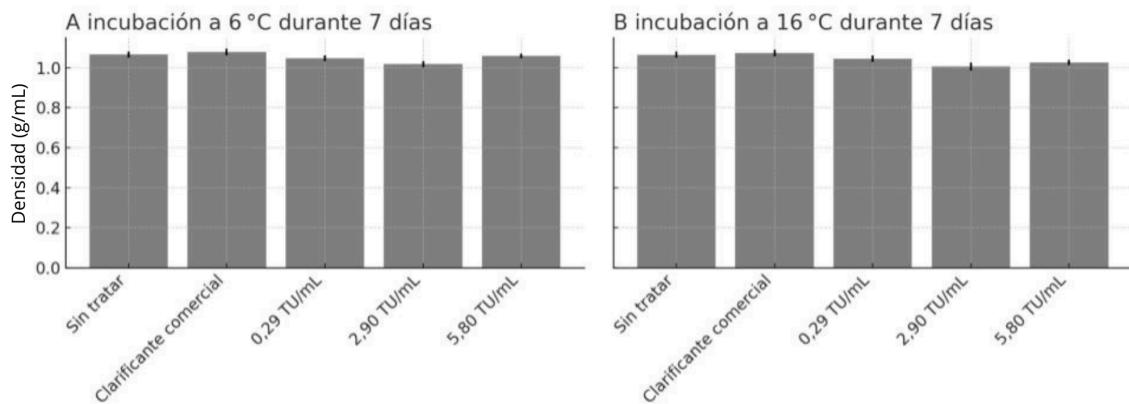
#### 4.3.3 Análisis de densidad

La densidad de la cerveza es un parámetro para controlar la calidad y consistencia del producto. La densidad se va controlando tanto durante el proceso como en el producto ya finalizado. La densidad inicial (DI) es un parámetro que se utiliza al final de la cocción para saber el potencial alcohólico y estimar diferentes propiedades organolépticas de la futura cerveza. Esta densidad nos habla de la presencia de azúcares fermentables y no fermentables que se presentan en el mosto una vez finalizada la cocción. Durante el proceso de fermentado también sirve para hacerle un seguimiento a que las levaduras están haciendo un correcto proceso de fermentación. Por último, la densidad final (DF) será un factor a utilizar para describir el cuerpo, viscosidad, sabor y otras propiedades del producto.

Con el objetivo de evaluar si los tratamientos con clarificantes enzimáticos afectan la densidad de la cerveza. Se evaluó la densidad de cervezas incubadas durante 7 días a dos temperaturas distintas (6 °C y 16 °C), tratadas con clarificante comercial y con papaína en concentraciones de 0,29; 2,90 y 5,80 TU/mL. En todos los casos, se analizaron diez muestras por tratamiento. Los resultados se presentan en la Figura 10.

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, tanto en las muestras incubadas a 6 °C ( $P = 0,34$ ) como en aquellas incubadas a 16 °C ( $P = 0,54$ ). Estos resultados

indican que ninguno de los tratamientos clarificantes empleados modificó de forma significativa la densidad de la cerveza bajo las condiciones experimentales evaluadas.



**Figura 10.** Densidad media de cerveza (g/mL) tras tratamientos con clarificantes en dos condiciones de incubación. Se muestran los valores promedio ± error estándar ( $n = 10$ ) para cinco tratamientos: sin tratar, clarificador comercial, y papaína en concentraciones de 0,29, 2,90 y 5,80 TU/mL). Las cervezas fueron incubadas durante 7 días a 6 °C (panel izquierdo) y a 16 °C (panel derecho). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, con la densidad como variable dependiente y el tratamiento clarificante como factor. En ambos casos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (6 °C:  $P = 0,34$ ; 16 °C:  $P = 0,54$ ), indicando que ninguno de los clarificantes utilizados modificó significativamente la densidad de la cerveza bajo estas condiciones experimentales. El gráfico fue generado utilizando el lenguaje de programación Python (v3.10) y la biblioteca de visualización Matplotlib (v3.8.0), el script detallado con los datos se muestra en Anexo 5. Se graficaron los valores promedio de densidad de cerveza (mg/mL) ± error estándar ( $n = 10$ ) para cinco tratamientos diferentes bajo dos condiciones de incubación (6 °C y 16 °C durante 7 días). Los datos fueron representados mediante gráficos de barras agrupadas con etiquetas descriptivas.

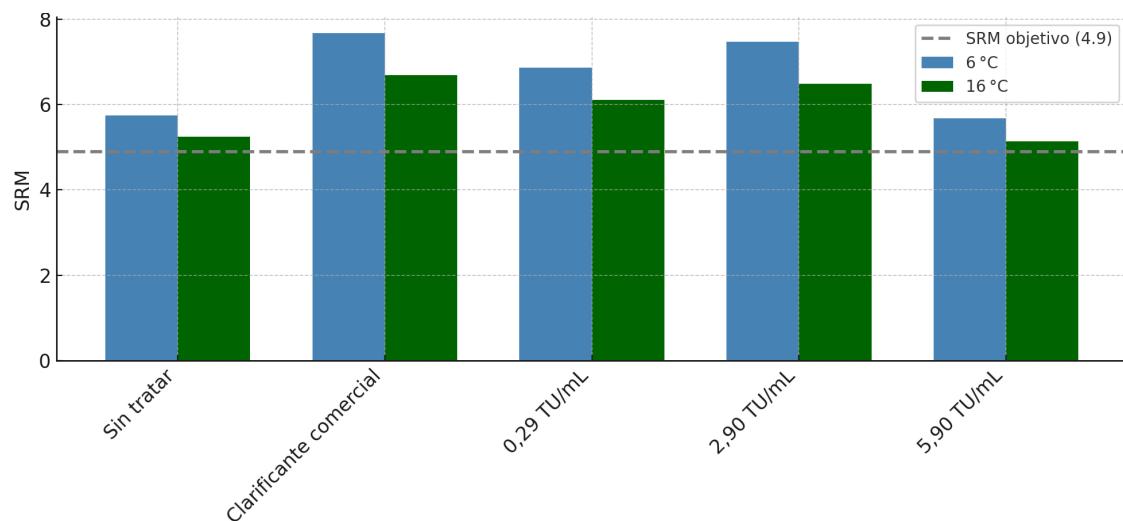
#### 4.3.4 Medición de SRM

El Standard Reference Method (SRM) es una escala utilizada internacionalmente para cuantificar el color de la cerveza. Este valor se calcula a partir de la absorbancia de la muestra a 430 nm y se expresa en unidades SRM, las cuales reflejan la intensidad del color de la bebida: a menor valor, más clara es la cerveza. En estilos como la Blonde Ale, se espera un color amarillo pálido con tonalidades doradas, lo cual corresponde aproximadamente a un valor SRM que debe encontrarse entre 3,0 y 6,0 (Medina, K., et al., 2023). Sin embargo, para la receta particular de la

Fábrica Chiripa, el valor de SRM calculado y esperado es más específico, es igual a 4,9.

Es importante recalcar que la turbidez y el color de la cerveza no tienen porqué estar relacionados. Hay estilos con alta turbidez que presentan un valor de SRM bajo, como pueden ser las cervezas de trigo; mientras que también existen ejemplos de cervezas con altos SRM que presentan un cuerpo cristalino. Ejemplos de esto último pueden ser algunas cervezas scottish.

Para evaluar si los tratamientos clarificantes afectan esta característica sensorial, se midió el SRM en cinco réplicas por tratamiento en las muestras incubadas a 6 °C y 16°C durante 7 días (Figura 11) . Los tratamientos incluyeron la muestra sin tratar, la muestra tratada con clarificante comercial, y los tres tratamientos con papaína en concentraciones de 0,29; 2,90 y 5,80 TU/mL, tal como en las evaluaciones antes mencionadas.



**Figura 11.** Valor promedio de SRM (Standard Reference Method) de cervezas tratadas con diferentes clarificantes tras una semana de incubación a 6 °C y 16 °C. Se graficaron los valores promedio de SRM para cinco tratamientos: sin tratar, clarificante comercial, y papaína en concentraciones de 0,29; 2,90 y 5,80 TU/mL en dos condiciones de incubación (6 °C y 16 °C durante 7 días). La línea punteada gris indica el valor objetivo de SRM (4,9) definido por la receta de la Blonde Ale de referencia. Se observa que los tratamientos con papaína a 16 °C presentan valores más cercanos al objetivo, mientras que a 6 °C los valores son mayores. En ambas condiciones, el tratamiento con papaína 5,80 TU/mL mantiene un SRM comparable al de la muestra sin tratar. La gráfica fue generada en Python (v3.10) utilizando la biblioteca Matplotlib (v3.8.0). El script usado se detalla en Anexo 6

En las muestras incubadas a 6 °C, los valores promedio de SRM fueron superiores al esperado de acuerdo a la receta, con un promedio general más elevado y una mayor dispersión. En cambio, en las muestras incubadas a 16 °C, los valores de

SRM fueron más cercanos al objetivo buscado (4,9), mostrando una tendencia a colores más claros.

Para ambas condiciones de incubación se observó un patrón consistente en la magnitud de los valores SRM entre tratamientos. El orden de menor a mayor fue papaína 5,80 TU/mL, sin tratar, papaína 0,29 TU/mL, papaína 2,90 TU/mL y clarificante comercial. Este patrón sugiere que, en ambos escenarios, el tratamiento con mayor concentración de papaína no aumenta el color de la cerveza, lo cual es deseable para mantener la identidad visual del estilo. Por el contrario, el tratamiento con clarificante comercial fue el que generó las cervezas más oscuras, desplazándose aún más del SRM objetivo.

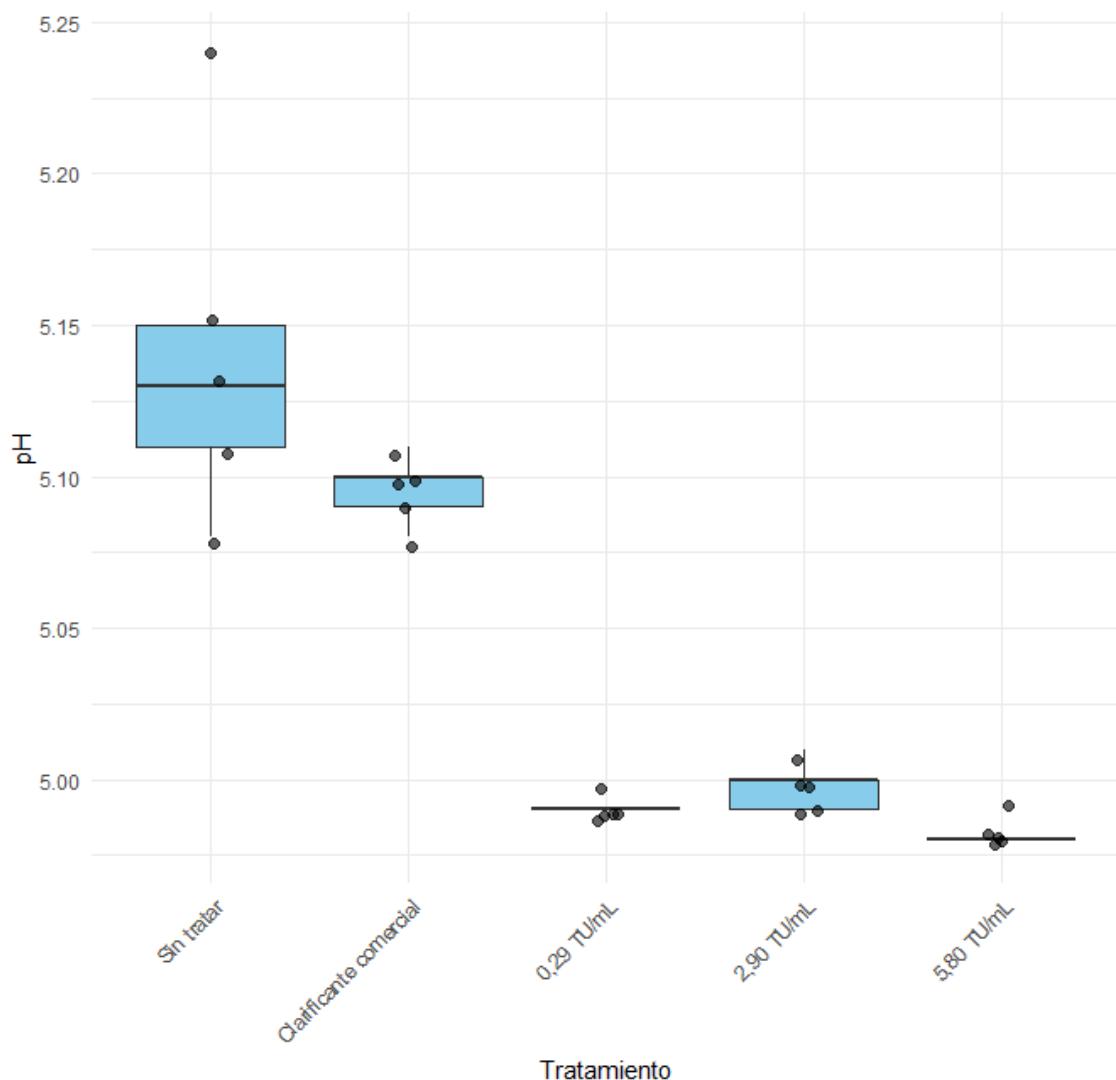
Este comportamiento es relevante ya que indica que la aplicación de papaína, incluso en concentraciones altas, no altera negativamente el color final de la cerveza. En particular, el tratamiento con papaína 5,80 TU/mL mantuvo el SRM dentro de los valores aceptables y similares a la muestra sin tratar. Esto refuerza la idea de que la enzima puede utilizarse como clarificante sin comprometer atributos visuales clave del producto final.

Por otro lado, hay autores que proponen que la turbidez de las cervezas y las mediciones de sus valores de SRM pueden estar interrelacionadas. Estos protocolos sugieren que para tener una correcta medida de los SRM es necesario una centrifugación de las muestras a medir. De esta manera, se puede pensar que la turbidez presentada en las muestras está generando mediciones erróneas de los SRM, por lo que centrifugar las mismas previo a las mediciones en espectrofotómetro puede ser por demás atinado.

#### **4.3.5 Medición de pH**

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento con clarificantes sobre el pH de la cerveza, se realizaron mediciones en muestras de cerveza tratadas con clarificante comercial y clarificante enzimático en concentraciones 0,29; 2,90 y 5,80 TU/mL durante 7 días a 6 y 16 °C. El pH final esperado para el estilo Blonde Ale es de 4,2 (Liguori et al., 2020).

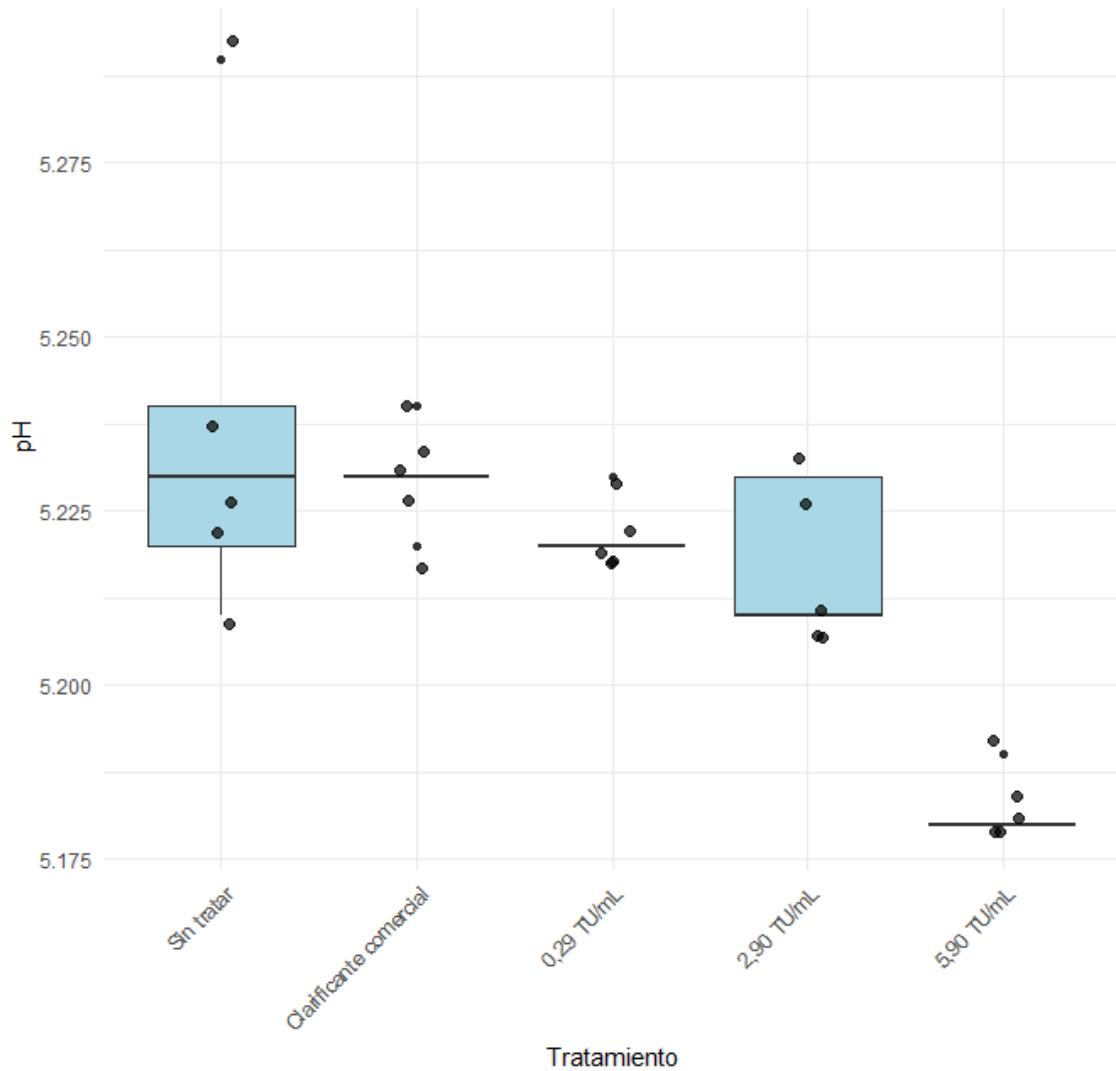
En la maduración realizada a 6 °C, los tratamientos con papaína en sus tres concentraciones mostraron una disminución significativa del pH en comparación con la muestra sin tratar (Figura 12). El análisis estadístico, realizado mediante ANOVA de una vía ( $P < 0,001$ ), seguido de un test post-hoc de Tukey, reveló diferencias significativas entre los tratamientos con papaína y el control, mientras que el tratamiento con clarificante comercial no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a la muestra sin tratar.



**Figura 12.** Efecto de distintos tratamientos clarificantes sobre el pH de la cerveza luego de una semana de almacenamiento a 6°C. Se presentan diagramas de caja (*boxplots*) con los valores individuales de cinco réplicas técnicas por tratamiento ( $n = 5$ ). Los tratamientos evaluados fueron: cerveza sin tratar, cerveza tratada con clarificador comercial y cerveza tratada con papaína en tres concentraciones crecientes (0,29; 2,90 y 5,80 TU/mL). La línea horizontal en cada caja indica la mediana, los límites de la caja corresponden al primer y tercer cuartil, y las líneas (*whiskers*) representan el rango sin valores atípicos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía ( $P < 0,001$ ), seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los tratamientos con papaína mostraron una reducción significativa del pH respecto al control ( $P < 0,05$ ), mientras que el clarificador comercial no difirió significativamente del control. La gráfica fue elaborada en R con el paquete ggplot2 , utilizando geom\_boxplot() para las cajas y geom\_jitter() para los puntos individuales; el código completo se muestra en el Anexo 7.

En la maduración realizada a 16 °C, la tendencia fue menos marcada, siendo el tratamiento con 5,80 TU/mL de papaína el que mostró una reducción significativa del

pH en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 13). Nuevamente, se aplicó un ANOVA de una vía con test de Tukey como post-hoc, arrojando un valor de P < 0,001.



**Figura 13.** Efecto de distintos tratamientos clarificantes sobre el pH de la cerveza luego de una semana de almacenamiento a 16 °C. Se presentan diagramas de caja (boxplots) con los valores individuales de cinco réplicas técnicas por tratamiento ( $n = 5$ ). Los tratamientos evaluados fueron: cerveza sin tratar, cerveza tratada con clarificante comercial y cerveza tratada con papaína en tres concentraciones crecientes (0,29, 2,90 y 5,80 TU/mL). La línea horizontal en cada caja indica la mediana, los límites de la caja corresponden al primer y tercer cuartil, y las líneas (whiskers) representan el rango sin valores atípicos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía ( $P < 0,001$ ), seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis reveló que únicamente el tratamiento con papaína 5,80 TU/mL produjo una reducción significativa del pH en comparación con los demás tratamientos ( $P < 0,05$ ). La gráfica fue elaborada en R con el paquete ggplot2 , utilizando geom\_boxplot() para las cajas y geom\_jitter() para los puntos individuales; el código completo se muestra en el Anexo 8.

Estos resultados sugieren que el uso de papaína puede influir levemente en la reducción del pH de la cerveza, lo cual podría representar una ventaja en términos de estabilidad microbiológica, dado que un entorno ligeramente más ácido puede dificultar el desarrollo de bacterias contaminantes. En particular para este estilo, la aplicación de papaína redujo levemente el pH a un valor más cercano al esperado de 4,2, considerado óptimo para este estilo de cerveza. Sin embargo, cabe destacar que todas las muestras evaluadas se mantuvieron dentro de rangos de pH compatibles con el crecimiento bacteriano.

En conclusión, aunque se observaron pequeñas reducciones del pH asociadas a la aplicación de papaína, especialmente a temperatura más baja, se debería confirmar la reproducibilidad de esta tendencia y su relevancia tecnológica.

#### **4.3.6 Evaluación de carga microbiana**

La cerveza artesanal, muchas veces es elaborada sin filtración ni pasteurización. Aunque se considera microbiológicamente segura debido a su bajo pH, presencia de alcohol, compuestos del lúpulo y condiciones adversas para el crecimiento microbiano, ciertos microorganismos pueden adaptarse y causar deterioro, afectando la calidad y la vida útil del producto (Rodríguez-Saavedra et al., 2021).

Dado que la aplicación de clarificantes, especialmente enzimáticos como la papaína, mostró una ligera reducción del pH de la cerveza, se consideró pertinente evaluar si este cambio podría tener un efecto sobre la carga microbiana del producto final.

Además, la papaína, al ser una proteasa, podría ejercer un efecto directo sobre ciertas bacterias sensibles, contribuyendo potencialmente a reducir la carga microbiana a través de mecanismos distintos al simple descenso del pH. Existen reportes de actividad antimicrobiana de la papaína, así como de otras proteasas. Por ejemplo, el extracto de semilla de *Carica papaya* y la papaína demostraron ser alternativas naturales eficaces para inhibir hongos responsables de la podredumbre de la papaya (Nwinyi & Anthonia, 2010). Asimismo, se ha demostrado que la papaína inmovilizada en polímeros utilizados en el envasado de alimentos presenta un efecto anti biofilm contra *Acinetobacter* sp. y *Staphylococcus aureus*, al dañar la membrana celular (Manohar et. al., 2015).

Por lo tanto, se realizó un análisis microbiológico con el objetivo de determinar si los distintos tratamientos clarificantes influyen en la carga microbiana presente luego del período de maduración.

Se realizó la siembra en placa de las muestras en dos medios de cultivo diferentes: TSA, un medio general utilizado para el crecimiento de bacterias aerobias

mesófilas, y medio SBD, específico para favorecer el crecimiento de levaduras y mohos.

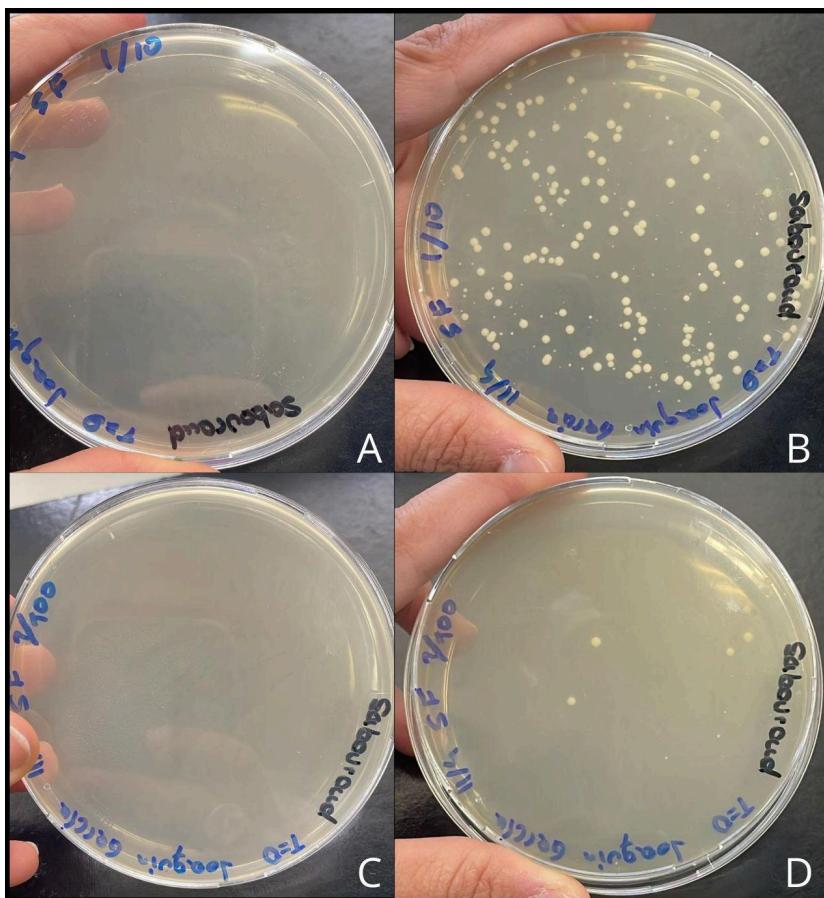
El medio TSA es un medio nutritivo que permite cultivar y aislar una gran variedad de bacterias, además de microorganismos que son más difíciles de crecer. Por otro lado, el medio SBD, debido a su pH ácido y alta concentración de glucosa, es un medio de enriquecimiento para hongos (levaduras o mohos).

Las placas fueron incubadas a diferentes temperaturas (TSA a 37°C y SBD a 30°C) y evaluadas a las 24 y 48 horas.

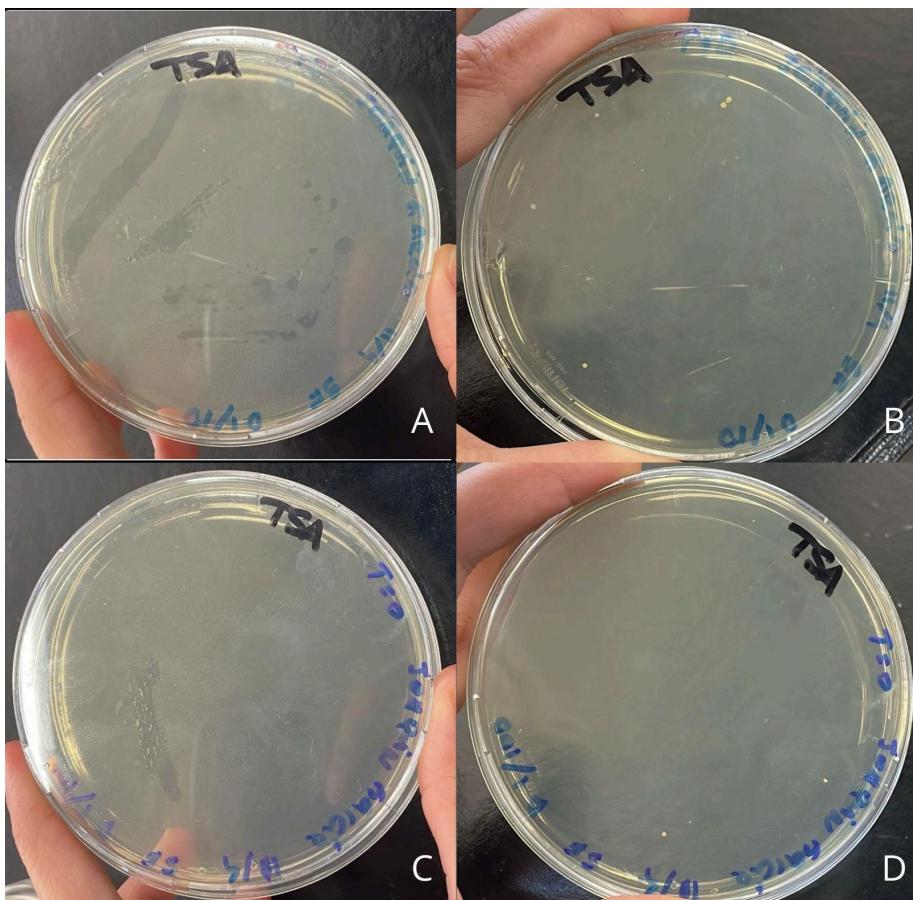
En el caso de cerveza Blonde Ale sin filtrar ni madurar, no se observó crecimiento visible a las 24 h en ninguno de los medios. Sin embargo, transcurridas 48 h el recuento en medio TSA (diluciones 1/10 y 1/100) fue menor a 30 UFC, lo que indica una baja carga microbiana (Figura 15). En estudios previos, Kim et al (2015) reportaron recuento de aerobios mesófilos en cerveza artesanal, utilizando un medio equivalente Plate Count Agar (PCA), elaborada en tres fábricas distintas con valores de 199 UFC/mL en la fermentación, 1000 UFC/mL en la maduración y 794 UFC/mL en el producto final (Kim et. al., 2015). Estos resultados son aún más altos que los obtenidos en este trabajo.

Es importante considerar que el medio TSA no es el más adecuado para detectar de forma sensible la presencia de bacterias ácido-lácticas, que constituyen los principales microorganismos responsables del deterioro microbiológico en cerveza artesanal. Si bien algunas cepas facultativas, como *Lactobacillus brevis* o *Pediococcus damnosus*, pueden crecer en TSA incubado a 37 °C en condiciones aerobias, la mayoría de las bacterias ácido-lácticas requieren medios más específicos y enriquecidos, así como condiciones anaerobias o microaerófilas para un crecimiento eficiente (Oldham & Held, 2023). Por ello, los recuentos en TSA podrían subestimar la carga real de bacterias ácido-lácticas presentes, limitando su utilidad como único indicador de contaminación microbiana en este tipo de productos.

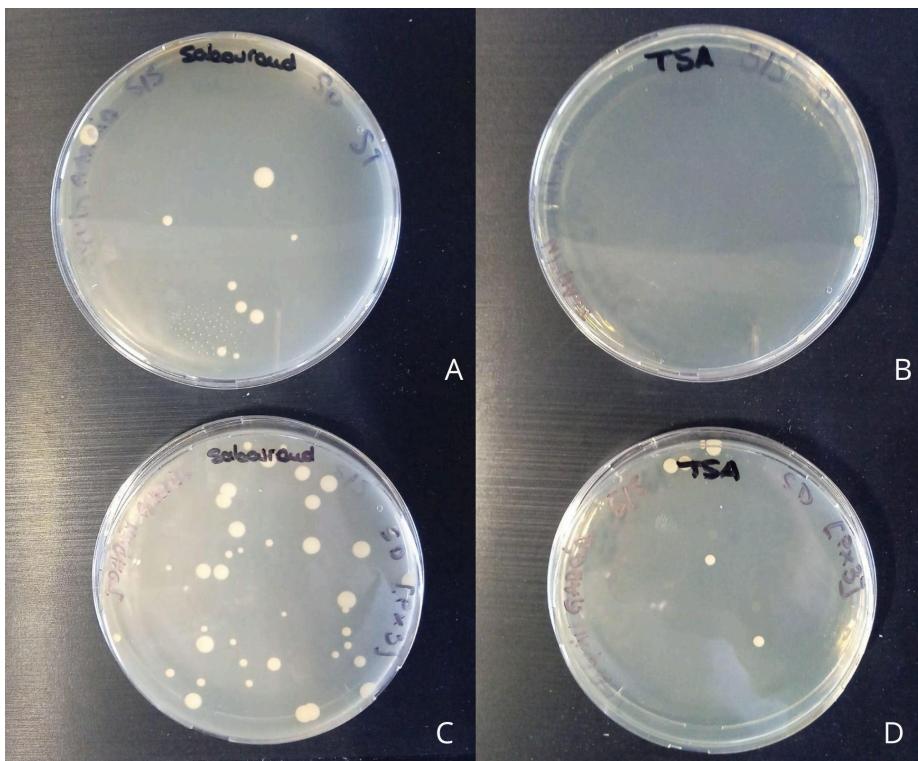
En medio SBD se obtuvieron recuentos de  $1,7 \times 10^4$  (dilución 1/10) y de  $7,0 \times 10^3$  (dilución 1/100) (Figura 14). Las colonias presentaron características macroscópicas típicas de *Saccharomyces cerevisiae* (blancas, cremosas, de morfología uniforme). Esto es consistente con la presencia de levadura residual viable, lo cual es esperable en cervezas artesanales no pasteurizadas ni filtradas.



**Figura 14.** Crecimiento de microorganismos en placas con medio SBD inoculadas con la cerveza Blonde Ale sin filtrar y sin tratar, incubadas a 30 °C. Las imágenes A y C fueron tomadas a las 24 h de incubación, mientras que B y D muestran el crecimiento a las 48 h. Las placas A y B fueron inoculadas con una dilución 1/10 de la cerveza y, C y D con una dilución 1/100.



**Figura 15.** Crecimiento bacteriano en placas con medio TSA inoculadas con la cerveza Blond Ale sin filtrar y sin tratar, incubadas a 37 °C. Las imágenes A y C fueron tomadas a las 24 h de incubación, mientras que C y D muestran el crecimiento a las 48 h. Las placas A y B fueron inoculadas con una dilución 1/10 de la cerveza y, C y D con una dilución 1/100.



**Figura 16.** Crecimiento microbiano en placas con medio SBD (A y C) y TSA (B y D), inoculadas con cerveza Blonde Ale sin diluir, madurada a 6 °C durante una semana tratada con papaína (5,80 TU/mL, a 6°C) (C y D) y sin tratar con papaína (A y B). Las imágenes fueron tomadas 96 horas de incubación a 30 °C para SBD (A y C) y a 37 °C para TSA (B y D). Antes de este tiempo, los crecimientos no fueron representativos.

Luego de la maduración (a 6 o 16 °C durante una semana), se comparó la carga microbiana de la muestra tratada con la mayor concentración de papaína empleada en este trabajo (5,80 TU/mL) con el control sin agregado de la enzima.

Para las cervezas maduradas a 6°C, la cerveza sin tratar con papaína, cultivada en medio SBD se registró un crecimiento de 90 UFC/mL (Figura 16 A), mientras que la cerveza tratada con 5,80 TU/mL de papaína mostró un aumento significativo, alcanzando 410 UFC/mL (Figura 16 C). En medio TSA, se observaron 10 UFC/mL en la cerveza sin tratar (Figura 16 B) y 40 UFC/mL en la muestra tratada con papaína (Figura 16 D).

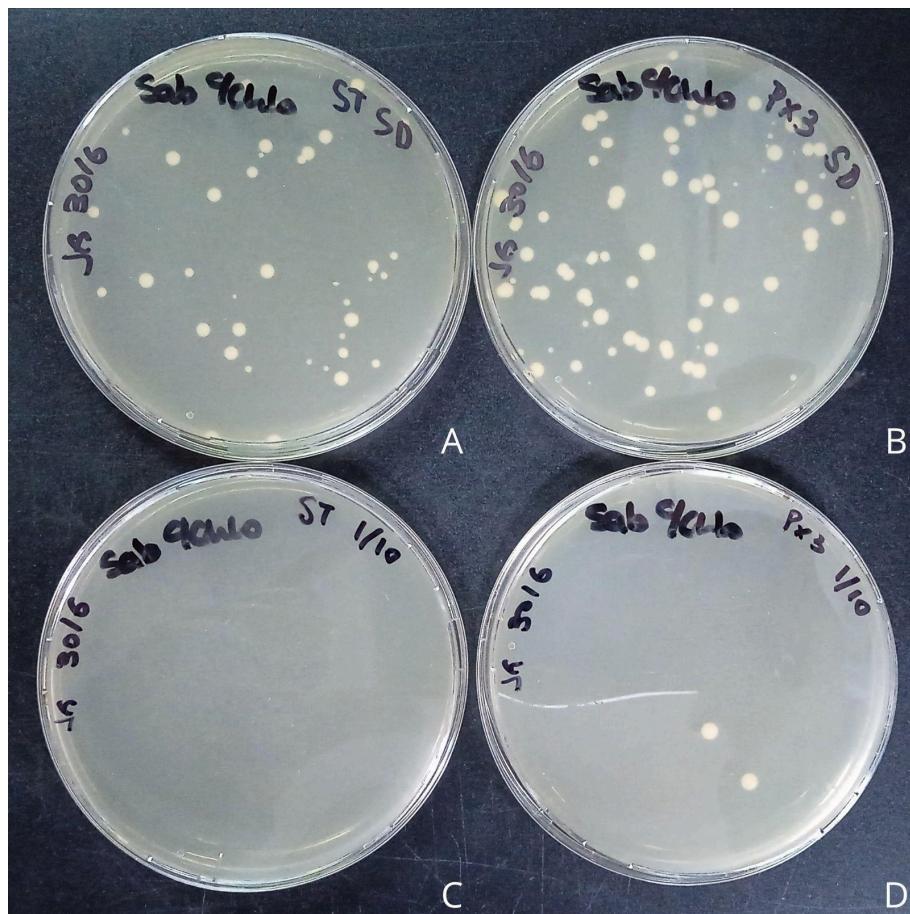
Comparando estos resultados con los valores obtenidos para la cerveza antes de madurar ( $5 \times 10^2$  UFC/mL en TSA y  $10^4$  UFC/mL en SBD), se evidencia que la maduración a 6 °C durante una semana tuvo un efecto reductor en la carga microbiana general, tanto en la muestra tratada como no tratada con papaína. Esta disminución es esperable, ya que el almacenamiento en frío inhibe la actividad de muchos microorganismos mesófilos y favorece la sedimentación de la levadura residual, lo que reduce la cantidad de células viables en suspensión.

Sin embargo, la cerveza tratada con papaína mostró una mayor proliferación de microorganismos en ambos medios respecto a la muestra sin tratar. Esto sugiere que, bajo estas condiciones, la aplicación de papaína podría haber favorecido el crecimiento microbiano, posiblemente al liberar nutrientes o alterar las propiedades del medio de cultivo. Estos hallazgos contrastan con la hipótesis inicial de que la papaína, como proteasa, podría degradar componentes microbianos y reducir la carga microbiana.

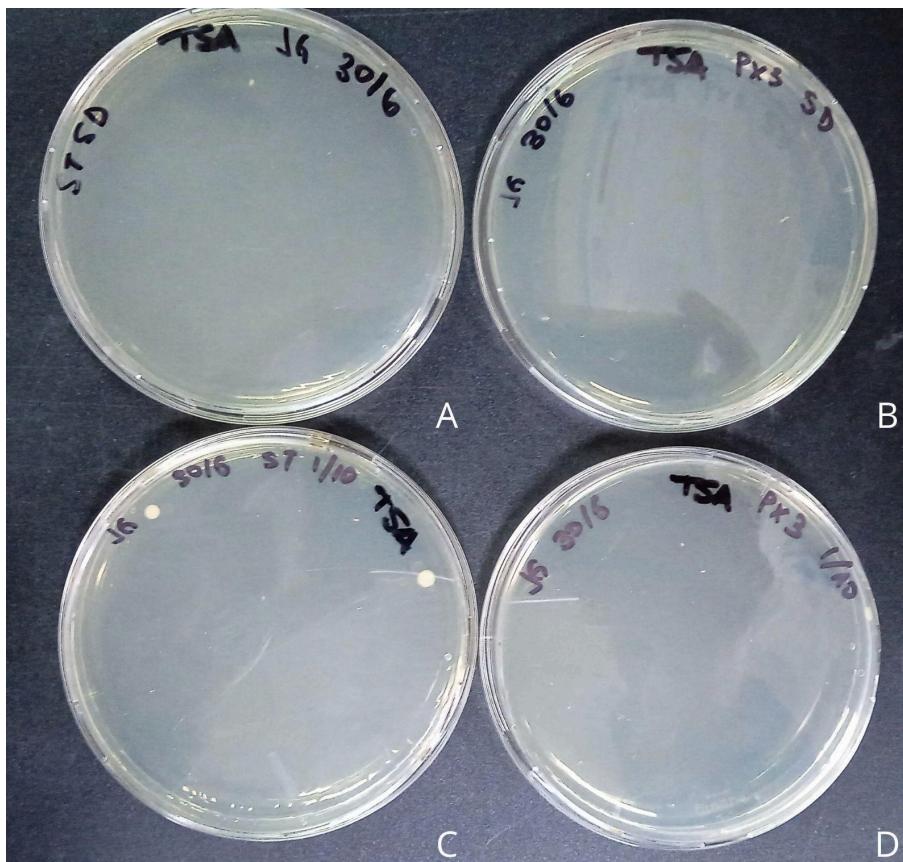
En la cerveza madurada a 16 °C (Figuras 17 y 18), también se observó mayor crecimiento microbiano en medio SBD en las muestras tratadas con papaína, en comparación con las no tratadas. En la muestra sin diluir, la cerveza sin papaína presentó 330 UFC/mL (Figura 17A), mientras que la tratada con 5,80 TU/mL alcanzó 590 UFC/mL (Figura 17B). En la dilución 1/10, no se observaron colonias en la muestra sin tratar (Figura 17C), mientras que la muestra con papaína mostró 200 UFC/mL (Figura 17D).

En el análisis del crecimiento bacteriano en medio TSA, tanto para las cervezas sin tratar como para la cerveza tratada con la mayor cantidad de papaína, no se observó crecimiento bacteriano a las 96 h (Figura 18), con excepción de la placa sin tratar diluida 1/10 donde se vio 200 UFC/mL.

Si bien la maduración y el almacenamiento en frío a 6 °C demostraron ser efectivos para reducir la carga microbiana general en la cerveza, los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de papaína podría favorecer, en ciertos casos, la proliferación microbiana, especialmente a temperaturas más elevadas como 16 °C. Esto podría estar relacionado con la liberación de nutrientes por la acción proteolítica de la enzima o con cambios en las propiedades físico-químicas del medio.



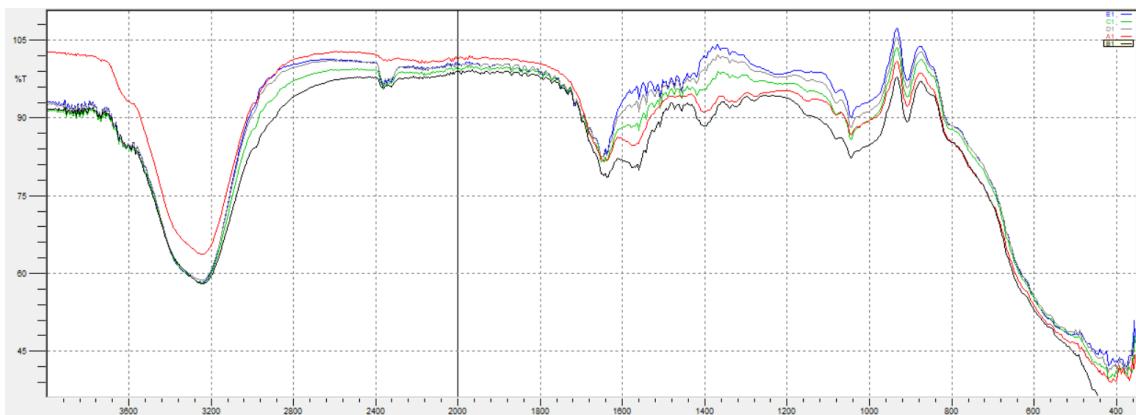
**Figura 17.** Placas con medio SBD sembradas con cerveza Blonde Ale madurada a 16 °C durante una semana. Las imágenes registran el crecimiento a 30°C y 96 horas después de inocular. A: cerveza sin tratar con papaína. B: cerveza tratada con papaína (5,80 TU/mL). C: cerveza sin tratar diluida 1/10. D: cerveza tratada con papaína (5,80 TU/mL) diluída 1/10.



**Figura 18.** Placas con medio TSA inoculadas con cerveza Blonde Ale madurada a 16°C. Las imágenes registran el crecimiento microbiano a 37°C a las 96 horas después del plaqueo. A: cerveza madurada sin tratar con papaína B: cerveza madurada con papaína (5,80 TU/mL) C: cerveza madurada sin papaína diluida 1/10. D: cerveza madurada con papaína (5,80 TU/mL) diluida 1/10.

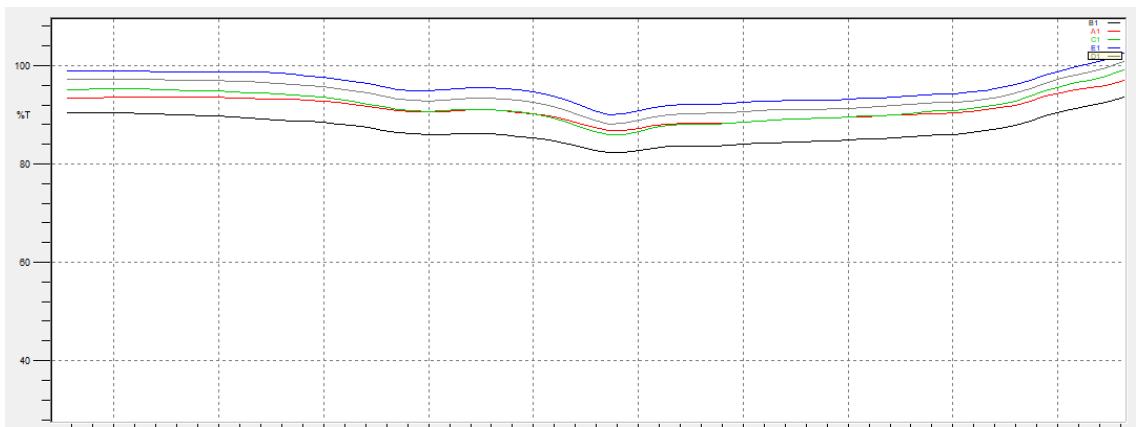
#### 4.3.7 Evaluación del espectro IR y comparación entre tratamientos

Uno de los parámetros fisicoquímicos de gran importancia para reportar la calidad de la cerveza es su porcentaje de alcohol. Este parámetro repercute directamente en el sabor del producto. Existen diferentes métodos que se utilizan para determinar el contenido de etanol en la cerveza, como la destilación y medida de la densidad, cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama y espectrometría infrarroja FTIR (Debebe et al., 2017).



**Figura 19.** Medida del contenido de etanol por espectroscopía en el infrarrojo (FTIR). El recuadro en rojo delimita la zona de interés para analizar el contenido de etanol en el espectro. Se graficó la transmitancia en función del número de onda.

Referencias de colores de las curvas: En rojo: cerveza sin agregado de clarificador (sin tratar). En negro: cerveza tratada con clarificador comercial. En verde: cerveza tratada con papaína (0,29 TU/mL). En gris: cerveza tratada con papaína (2,90 TU/mL). En azul: cerveza tratada con papaína (5,80 TU/mL).



**Figura 20.** Espectro de las diferentes muestras de cerveza en el rango de número de onda de interés para comparación del contenido de etanol de los distintos tratamientos (950 a 1150 cm<sup>-1</sup>) (zoom del recuadro señalado en rojo en la Figura 19).

Referencias de colores de las curvas: En rojo: cerveza sin agregado de clarificador (sin tratar). En negro: cerveza tratada con clarificador comercial. En verde: cerveza tratada con papaína (0,29 TU/mL). En gris: cerveza tratada con papaína (2,90 TU/mL). En azul: cerveza tratada con papaína (5,80 TU/mL).

Debido a su importancia, se analizó si el contenido de etanol se vió alterado en los diferentes tratamientos aplicados durante la maduración a 6°C en comparación con la muestra sin tratar. Para ello se comparó la zona del espectro IR asociada a la señal emitida por los enlaces oxígeno-hidrógeno (O-H) del etanol presente en las muestras.

En el gráfico de la Figura 19 se puede ver el porcentaje de transmitancia en función del número de onda de los diferentes tratamientos en el rango de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Cada banda del espectro corresponde a la vibración de enlaces específicos de

distintos grupos funcionales y, el porcentaje de transmitancia indica la cantidad de radiación IR que pasa a través de la muestra a ese número de onda. De esta manera, el porcentaje de transmitancia refleja la concentración de enlaces vibrando en ese número de onda. Cuanto menor el porcentaje de transmitancia, mayor es la absorción de radiación y mayor la concentración del grupo funcional correspondiente.

Basándonos en estudios previos (Rexhepi et al., 2025), en los que se analizó el contenido de etanol en cervezas artesanales con esta técnica, se ha propuesto que la región comprendida entre 950 y 1150 cm<sup>-1</sup> es especialmente útil para su cuantificación. Esta zona del espectro presenta una banda intensa atribuida principalmente al estiramiento del enlace carbono-oxígeno (C–O) del grupo alcohol. Al ofrecer picos claros y específicos, permite una cuantificación más precisa del contenido de etanol, minimizando las interferencias de otros compuestos presentes en la cerveza. En la Figura 20, se muestra una imagen ampliada del espectro, de la zona comprendida entre 950 y 1150 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la sección recuadrada en rojo del espectro completo mostrado en la Figura 19.

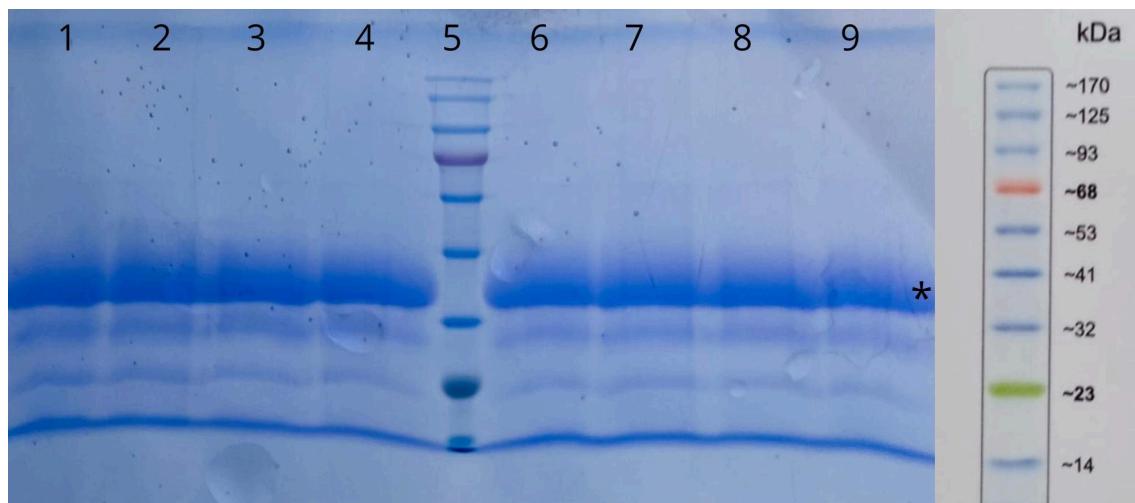
Teniendo en cuenta que el contenido de alcohol calculado por el fabricante (Cervecería Chiripa) de la cerveza Blonde Ale, (muestra A sin tratar, curva roja) es de 4,5 ABV%, se desprende del espectro en el rango característico para el etanol que la cerveza tratada con papaína a 0,29 TU/mL (muestra C, curva verde) muestra un comportamiento similar, sugiriendo que este tratamiento no afectó el contenido de etanol. Las muestras tratadas con concentraciones más altas de papaína (2,90 TU/mL y 5,80 TU/mL, curvas gris y azul) presentan mayor transmitancia, lo que indicaría una menor concentración de etanol. En cambio, la muestra tratada con clarificador comercial (curva negra) muestra la menor transmitancia de todas, incluso menor que la de la muestra sin tratar, lo que indicaría una mayor concentración de etanol o menor pérdida de este durante la maduración.

Es importante señalar que, debido a la disponibilidad limitada del equipo, no se pudieron realizar réplicas de cada medición ni se corrieron estándares de etanol, por lo que no fue posible calcular el contenido de etanol (ABV %) mediante una curva de calibración. Por lo tanto, no se pudo establecer diferencias significativas entre los tratamientos, aunque los resultados permiten sugerir posibles variaciones entre las muestras.

#### **4.3.8 Evaluación del perfil proteico de la cerveza**

Con el objetivo de evaluar el efecto proteolítico de la papaína en las proteínas de la cerveza, se analizó el perfil proteico de muestras sin tratar y tratadas con 5,80 TU/mL de enzima, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones

desnaturalizantes (SDS-PAGE). Esta técnica permitió comparar el patrón de bandas proteicas entre los dos tratamientos. Además, fue posible estimar el peso molecular de las proteínas presentes utilizando un marcador de peso molecular, como se muestra en la Figura 21. Si la papaína hubiera hidrolizado las proteínas de la muestra, se esperaría observar diferencias en la intensidad y el tamaño de las bandas entre los carriles correspondientes a cada tratamiento. Para el caso de las cervezas sin tratar, se esperaría que presenten bandas características de las proteínas que se encuentran en mayor concentración como puede ser la hordeina, con un peso molecular en el entorno de 32 kDa. Se espera una intensidad grande en esta banda ya que dicha proteína se encuentra en gran cantidad dentro del grano de cebada. Para los carriles donde se corrieron muestras tratadas con papaína esperaríamos ver bandas menos pesadas (en la parte inferior del gel). Además deberíamos ver bandas menos intensas o tal vez no ver bandas en el peso de las proteínas características de las maltas, como el caso que se mencionó anteriormente de la hordeina.



**Figura 21.** Gel SDS-PAGE. Carriles 1, 3, 6 y 8: cerveza sin tratar. Carriles 2, 4, 7 y 9: cerveza tratada con 5,80 TU/ml de papaína. Para todas las muestras de cerveza se cargó 9 µg de proteína por pocillo. Carril 5: Marcador de peso molecular. A la derecha de la Figura se puede ver el peso de cada banda del marcador de peso molecular. Esta imagen es proporcionada por el fabricante.

Los resultados obtenidos indican que la papaína no ejerció una actividad proteolítica evidente o significativa sobre las muestras tratadas, ya que el patrón de bandas observado en el gel de poliacrilamida es muy similar entre las muestras control y aquellas tratadas con 5,80 TU/mL de enzima. Esta ausencia de diferencias notorias sugiere que las proteínas presentes en la cerveza no fueron degradadas de forma sustancial tras la adición de papaína, lo cual concuerda con los ensayos previos que

no evidenciaron grandes diferencias en la turbidez de las cervezas maduradas con el agregado de papaína y el control sin papaína. Como consecuencia, dichas proteínas permanecerán intactas y con capacidad de interactuar con polifenoles, favoreciendo la formación de complejos responsables de la turbidez en la bebida. No obstante, como se explicó anteriormente, no todas las proteínas presentes en la cerveza participan en estas interacciones que generan turbidez. Si bien el uso de un marcador de peso molecular permite estimar el tamaño de las proteínas separadas en el gel, no es posible identificar a una proteína en particular. A pesar de ello, puede realizarse una aproximación razonable a partir de su peso molecular. Según la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06470/entry>), la hordeína, una de las proteínas más abundantes en la cebada y principal precursora de la turbidez en la cerveza, presenta un peso molecular estimado de 33.422 Da. Al observar el patrón del marcador de peso molecular provisto por el fabricante, observamos una banda intensa que migró ligeramente menos que la banda del marcador de 32 kDa, señalada con un asterisco en el extremo derecho del gel, que podría corresponder a la hordeína. Dado que esta proteína es una de las principales proteínas responsables de generar turbidez por interacción con polifenoles, cabría esperar que dicha banda se atenuará en las muestras tratadas con papaína, si es que buscamos una reducción en la turbidez de las muestras. Sin embargo, no se observan diferencias apreciables entre tratamientos, lo que sugiere que esta proteína no fue hidrolizada por la enzima.

En todas las muestras se observa una banda tenue a la altura del de la banda de peso molecular correspondiente a la enzima catalíticamente activa (23,4 kDa., por lo que es poco probable que corresponda únicamente a la enzima. Aun si estuviera presente, la baja concentración utilizada en el tratamiento podría no ser suficiente como para generar cambios detectables en el patrón de bandas del gel.

Estos resultados sugieren que la papaína no tuvo una actividad proteolítica efectiva sobre las proteínas responsables de la turbidez en la cerveza bajo las condiciones ensayadas, por lo que sería necesario evaluar otras condiciones de tiempo o temperatura para favorecer su acción.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo evaluó la aplicación industrial de la papaína como agente clarificante en la elaboración cervecería artesanal. Para ello, se caracterizó inicialmente la papaína comercial utilizada (Collupulin L 200), un extracto parcialmente purificado con alta actividad proteolítica (116 TU/mg), adecuada para ensayos posteriores.

En línea con estudios de mercado citados en la Introducción, el primer lote de cerveza se elaboró en estilo Pilsener Lager, dada su amplia aceptación a nivel nacional e internacional. Luego de la fermentación, la cerveza fue madurada en frío con el agregado de papaína, Isinglass y un control sin aditivos. Sin embargo, los resultados de la evaluación sensorial y análisis físico-químicos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, posiblemente por la baja turbidez propia del estilo o la limitada eficacia del clarificante comercial utilizado como control y la baja concentración de papaína utilizada. En este punto vale la pena remarcar que el clarificante comercial utilizado puede variar en su composición lote a lote, por lo que el rendimiento puede variar entre cocciones. Esto puede generarle un problema para el esquema de negocio del fabricante de cerveza, ya que resulta difícil disponer de un producto estandarizado mediante esta herramienta. Esta característica del Isinglass hace que la papaína pueda ser una mejor opción ya que la composición de la proteína es más estandarizada, por lo que su rendimiento podría ser más previsible.

Por ello, se continuó este trabajo con cerveza Blonde Ale sin filtrar provista por Cervecería Chiripa, de mayor turbidez basal (el valor basal fue cuantificado por absorbancia a 595 nm y dio un resultado de  $0,41 \pm 0,01$ ). En este contexto, el tratamiento con papaína (particularmente a 5,80 TU/mL) logró reducir la turbidez en mayor medida que el clarificante comercial, sin afectar negativamente el color ni la densidad. Además, se observaron efectos dependientes de la temperatura de maduración en la viscosidad y el pH, con posibles implicancias en la estabilidad microbiológica.

Estos resultados indican que el tratamiento con papaína es efectivo para reducir la turbidez, pero su desempeño depende, entre otras variantes, del tipo de cerveza en el que se aplica. Si bien la reducción de la turbidez entre la cerveza sin tratar y la tratada con 5,80 TU/mL es apreciable, los resultados vistos en el gel de SDS PAGE nos muestran que el perfil proteico de la cerveza sin tratar es muy similar a la tratada con papaína.

En consonancia con los resultados expuestos también se puede ver una cierta variación generada por la aplicación de la papaína en el ABV% del producto. En particular los dos tratamientos con mayor cantidad de papaína generaron cambios en

este parámetro físico químico, haciendo que este último descienda cuanto mayor presencia de la proteasa haya en la cerveza. Este resultado podría ir en contraposición con lo visto en los análisis microbiológicos pero teniendo en cuenta que la adición de la proteasa fue en el proceso de madurado del producto (ya habiendo pasado la fermentación primaria), este resultado no debería llamarnos la atención ni ser contrapuesto al aumento del desarrollo de las levaduras en presencia de la mayor concentración de papaína en las muestras. El hecho que las muestras analizadas en este trabajo no hayan sido pasteurizadas puede generar que las levaduras viables residuales hayan refermentado en las cervezas más allá del proceso de fermentación en los fermentadores mismos. Es posible pensar que la papaína, que al parecer promovió el crecimiento microbiológico, ayudó a aumentar el rendimiento de la fermentación, generando un pH más bajo. El pH más bajo puede darle más estabilidad a la cerveza y prevenir contaminaciones, pero podría influir en el sabor de la cerveza, generando una sensación de acidez en boca. Habría sido interesante complementar estos resultados con una cata con las muestras de chiripa para ver si las diferencias en el pH se reflejan en el sabor percibido de estas.

Aunque los resultados sugieren que la papaína puede ser una alternativa natural y efectiva, su aplicación óptima depende del estilo de cerveza, la dosis y las condiciones del proceso. Será necesario seguir evaluando otros parámetros tecnológicos y afinando las condiciones de clarificado enzimático, como temperatura, tiempo y punto de aplicación, para maximizar su eficacia sin comprometer la calidad sensorial.

Un posible ensayo interesante sería producir diferentes lotes de cerveza donde se le aplique a cada lote distintas concentraciones de papaína. En lugar de adicionar la enzima en el fermentador, se agrega la misma en un escalón de temperatura más bajo, el cual esté más cercano a la temperatura óptima para la actividad de la proteína (50°C). Suponiendo una receta clásica de Blonde Ale donde se presentan dos escalones de temperatura (primer escalón de 62°C durante 30 minutos y segundo escalón de 67°C durante una hora), la adición de la papaína debería ser luego de los mismos. Sabiendo que estos escalones son para generar el correcto trabajo enzimático de las enzimas alfa y beta amilasas, la adición de la proteasa podría comprometer en cierto punto la actividad enzimática propia del macerado, degradando a estas proteínas encargadas de hidrolizar las cadenas de almidón. Lo que podría presentarse como solución a este desafío es que, luego de comprobar con el test con tintura de iodo que el trabajo enzimático ha concluido, generar un “tercer escalón” con la temperatura óptima para la papaína y en ese punto adicionar a esta en el macerado.

Para evaluar si esta estrategia resulta efectiva, sería útil realizar una electroforesis SDS-PAGE para poder ver si la banda que corresponde a la hordeina (33,4 kDa) está presente y en qué intensidad, y por lo tanto evaluar si la papaína actuó de manera más eficiente.

Habría que tener en cuenta también que el pH óptimo para la proteasa es 4, bastante inferior a lo que se encuentra en el macerado. Esto era algo que teníamos a favor en el fermentador y una de las razones que nos hizo elegir esta etapa de la producción para la aplicación de la proteína. Para este ítem se podría analizar la posibilidad de hacer un macerado con pH cercano a 5, así la actividad enzimática de las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas no se ve comprometida y a su vez puede ser un valor de pH más cercano al óptimo para la papaína.

Sería deseable ensayar una papaína pura, pero su producción recombinante en bacterias ha sido limitada por la necesidad de modificaciones postraduccionales complejas. En este sentido, desarrollar un sistema de expresión vegetal, como *Physcomitrium patens*, podría representar una vía promisoria para obtener papaína activa y soluble a escala, con aplicaciones potenciales tanto en la industria cervecera como en otros sectores alimentarios.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acebo-Gonzalez, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(1). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226886003>
- Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional. (2023). *Investigación de mercado: Uruguay. Producto: cerveza artesanal.* <https://docs.inversionycomercio.ar/biblioteca/utbT2vM4Vnn3TIPDTr7mrZrc0GMrQu8J.pdf>
- Amri, E., & Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8, 99–104.
- Archana, G., Gaurav, S., Shruti, M., Sarita, M., Anuradha, S., & Kumar, D. M. (2024). Beer production by fermentation process: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 13(4). <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9532>
- Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L., & Nielsen, P. M. (2002). Effects of papain and microbial enzyme on meat proteins and meat tenderness. *Journal of Food Science*, 67(6), 2138–2142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09517.x>
- Azarkan, M., El Moussaoui, A., Van Wuytswinkel, D., Dehon, G., & Looze, Y. (2003). Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B*, 790, 229–238.
- Azarkan, M., Ndimba, B. K., Boucau, M.-C., Looze, Y., & Goormaghtigh, E. (2006). Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(3–5), 216–224.
- Bamforth, C. W. (1999). Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(3), 81–90.
- Biozym. (2017, October 17). Biozym's object is production of enzymes and biological products. <https://web.archive.org/web/20171017165359/https://biozym.de/datasheets/papain.php>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brewers Association. (2018). Craft brewer definition. <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing science and practice* (pp. 555–561, 567–581, 897–902). Woodhead Publishing.

- Caffini, N. O., Natalucci, C. L., & Salas Bravo, C. E. (2009). Tipos de proteasas, distribución y rol de vegetales. En O. E. (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones industriales* (pp. 3–12). Editorial CYTED.
- Carrera, J. E. (2003). *Producción y aplicación de enzimas industriales*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán.
- Chlup, P. H., Leiper, K. A., & Stewart, G. G. (2006). A method of detection for residual isinglass in filtered and cask-conditioned beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(1), 3–8. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00699.x>
- Deloitte S-Latam, S.C. (2024). *La cerveza artesanal: Una experiencia multisensorial* (2<sup>a</sup> ed.). Deloitte.
- Debebe, A., Redi-Abshiro, M., & Chandravanshi, B. S. (2017). Non-destructive determination of ethanol levels in fermented alcoholic beverages using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Chemistry Central Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0257-5>
- Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Linurdi, K., & Garzillo, A. M. V. (2013). Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer of wine application. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 595–598.
- FAO. (2006). *Combined compendium of food additive specifications* (Vol. 4, pp. 152–154). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gerber, G. (2024). *Principles of beer production and enzymes in mashing* (2nd ed., p. 99). University of Alfenas.
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wiczek, W. (2007). Cysteine proteases. En J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.), *Industrial enzymes* (pp. 181–195). Springer. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11)
- Habschied, K., Košir, I. J., Krstanović, V., Kumrić, G., & Mastanjević, K. (2021). Beer polyphenols—Bitterness, astringency, and off-flavors. *Beverages*, 7, 38. <https://doi.org/10.3390/beverages7020038>
- Hasnul Hadi, M. H., Ker, P. J., Thiviyananthan, V. A., Tang, S. G. H., Leong, Y. S., Lee, H. J., Hannan, M. A., Jamaludin, M. Z., & Mahdi, M. A. (2021). The amber-colored liquid: A review on the color standards, methods of detection, issues and recommendations. *Sensors*, 21, 6866. <https://doi.org/10.3390/s21206866>
- He, G.-O., Wang, Z.-Y., Liu, Z.-S., Chen, Q.-H., Hui, R., & Schwarz, P. B. (2006). Relationship of the proteinase activity, foam proteins, and head retention in pasteurized beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 33–38.

- Illanes, A. (2009). Aplicaciones convencionales en reacciones de hidrólisis. En O. C. (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones industriales* (pp. 187–200). Editorial CYTED.
- Kim, S. A., Jeon, S. H., Kim, N. H., Kim, H. W., Lee, N. Y., Cho, T. J., Jung, Y. M., Lee, S. H., Hwang, I. G., & Rhee, M. S. (2015). Changes in the microbial composition of microbrewed beer during the process in the actual manufacturing line. *Journal of Food Protection*, 78(12), 2233–2239.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-261>
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., & Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal*, 37, 370–378.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Leiper, K. A., & Miedl, M. (2009). Colloidal stability of beer. In C. W. Bamforth (Ed.), *Beer: A quality perspective, Handbook of Alcoholic Beverages* (pp. 111–130). Academic Press.
- Liguori, L., De Francesco, G., Perretti, G., & Albanese, D. (2020). Characterization of the main physico-chemical parameters in three styles of craft beer. *2020 IEEE International Workshop on Metrology for Agriculture and Forestry, MetroAgriFor 2020 - Proceedings*.
- Martinez Amezaga, N. M. J., Benitez, E. I., Peruchena, N. M., Sosa, G. L., & Lozano, J. E. (2016). Evaluación del proceso de filtración de cerveza. En *III Congreso Argentino de Ingeniería* (pp. 2964–2972). Resistencia, Argentina.
- Mazzolla, M. (2019). La revolución de la cerveza artesanal en Uruguay.
- Medina, K., Giannone, N., Dellacassa, E., Schinca, C., Carrau, F., & Boido, E. (2023). Commercial craft beers produced in Uruguay: Volatile profile and physicochemical composition. *Food Research International*, 164, 112349.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112349>
- Mendoza Balcázar, J. M., Pihuave Calderón, L. F., & Velásquez Campozano, M. R. (2022). Análisis comparativo del valor nutricional de la cerveza artesanal y la cerveza industrial. *Revista Ciencia UNEMI*, 15(38), 61–72.
- Manohar, C. M., Prabhawathi, V., Sivakumar, P. M., & Doble, M. (2015). Design of a papain immobilized antimicrobial food package with curcumin as a crosslinker. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121665>
- Mordor Intelligence. (2023). *Tamaño del mercado de proteasa y análisis de participación tendencias de crecimiento y pronósticos (2024-2029)*.  
<https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/proteases-market>

- Nwinyi, O. C., & Anthonia, A. B. (2010). Antifungal effects of pawpaw seed extracts and papain on postharvest *Carica papaya* L. fruit rot. *African Journal of Agricultural Research*, 5(12), 1443–1450.
- Oxford Economics. (2022, February 10). *Beer's global economic footprint*.  
<https://www.oxfordeconomics.com/resource/beers-global-economic-footprint-2022/>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.
- Rawlings, N., & Barrett, A. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290, 205–218.
- Rexhepi, F., Puşcas, A., & Gjinovci, V. (2025). Determination of ethanol content of fermented alcoholic beverages with FTIR spectroscopy and multivariate calibration. *Revue Roumaine de Chimie*, 70(1–2), 111–118.  
<https://doi.org/10.33224/rrch.2025.70.1-2.11>
- Rodríguez-Saavedra, M., Pérez-Revelo, K., Valero, A., Moreno-Arribas, M. V., & González de Llano, D. (2021). A binary logistic regression model as a tool to predict craft beer susceptibility to microbial spoilage. *Foods*, 10(8), 1926.  
<https://doi.org/10.3390/foods10081926>
- Salanta, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Rodica, C., Tofana, M., Mudura, E., Borsa, A., Pasqualone, A., & Zhao, H. (2020). Non-alcoholic and craft beer production and challenges. *Process Journal*.
- Santa Cruz, E., & Sosa, A. (2021). Estudio diagnóstico sobre el sector cervecero artesanal en Uruguay. Asociación de Microcervecerías Artesanales del Uruguay (AMAU).
- Shopska, V., Denkova-Kostova, R., Dzhivoderova-Zarcheva, M., Teneva, D., Denev, P., & Kostov, G. (2021). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity of different malt types. *Antioxidants*, 10, 1124.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10071124>
- Sisse Jongberg, M. L., Andersen, M. L., & Lund, M. N. (2020). Covalent protein-polyphenol bonding as initial steps of haze formation in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*.  
<https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1705045>
- Steiner, E., Becker, T., & Gastl, M. (2010). Turbidity and haze formation in beer: Insights and overview. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 332–488.
- Storer, A. C., & Ménard, R. (2013). Papain. En N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes* (3rd ed., pp. 1858–1861). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00418-X>

Valles, D., Furtado, S., Hernandez, M., Salas Bravo, C. E., & Cantera, M. A. B. (2009). Potenciales tecnológicos y perspectivas de aplicación. En O. C. (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones industriales* (pp. 221–240). Editorial CYTED.

Wang, Y., & Ye, L. (2021). Haze in beer: Its formation and alleviating strategies, from a protein–polyphenol complex angle. *Foods*, 10, 3114.  
<https://doi.org/10.3390/foods10123114>

Ward, I. L. (s.f.). *Wort & beer clarification manual*.

WHO. (2018). *Global status report on alcohol and health*.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>

Ye, L., Huang, Y., Li, M., Li, C., & Zhang, G. (2016). The chemical components in malt associated with haze formation in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122, 524–529. <https://doi.org/10.1002/jib.353>

## ANEXOS

### Anexo 1: Especificaciones del fabricante Collipullin® 200L DSM



#### Product Specification Sheet

#### COLLUPULIN® 200 L

Last revision: 23 July 2020

#### Product Information

Description	Enzyme preparation for food use containing endopeptidase (protease) derived from <i>Carica papaya</i>
Application market	Beer: Prevents hazing of beer kept in cool storage
Appearance	Light brown to brown liquid (product color may vary from batch to batch).
Status	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kosher approved</li><li>• Halal approved</li><li>• The Carica Papaya used in the process and all formulating agents (such as carriers or diluents) are of non-GM origin.</li><li>• Allergen statement available on request</li><li>• Suitable for vegans</li><li>• Suitable for vegetarians</li></ul>

## **Physical & Chemical specifications**

Standardised activity	$\geq 200$ TU/mg	Arsenic	$\leq 3$ ppm
pH	4.8 - 6.2	Mercury	$\leq 0.5$ ppm
Heavy metals	$\leq 30$ ppm (as Pb)	Cadmium	$\leq 0.5$ ppm
Lead	$\leq 5$ ppm		

## **Microbiological specifications**

Total plate count	$\leq 10000$ CFU/g	<i>Salmonella</i>	absent in 25 g
Coliforms	$\leq 30$ CFU/g	<i>Staphylococcus aureus</i>	absent in 1 g
Anaer. sulphite reducing bacteria	$\leq 30$ CFU/g	<i>Escherichia coli</i>	absent in 25 g

## Composition

<b>Ingredients</b>	<b>Typical values</b>
Glycerol	54 %
Enzyme solution	45 %
Sodium metabisulfite	1 %

#### **Regulatory information**

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

## Packaging & Storage

Packaging	Product number 9815: 1000 kg - container (120 x 100 x 117 cm)
Storage conditions	<ul style="list-style-type: none"><li>• Store in the original packing in a cool (&lt;20°C), dark, and dry place.</li><li>• When stored in recommended condition, the activity loss will be less than 5% within 12 months</li></ul>



#### Safety & Handling

Please refer to the Safety Data Sheet, available on request.

**Head Office:** A. Fleminglaan 1 | P.O. Box 1 | 2600 MA Delft | The Netherlands | tel. +31 15 279 9111  
For further information, additional addresses and our customer portal visit [www.dsm.com/food-specialties](http://www.dsm.com/food-specialties)

## **Anexo 2: Script de R donde se generaron las gráficas de la Figura 8 Efecto de diferentes tratamientos clarificantes sobre la turbidez de cerveza Blonde Ale**

```
# Cargar librerías necesarias
```

```
library(ggplot2)
```

```
library(dplyr)
```

```
library(patchwork) # Para combinar gráficos
```

```
# Función general para análisis y gráficos
```

```

crear_grafico <- function(absorbancias, titulo) {
  datos <- data.frame(
    Tratamiento = rep(c("Sin tratar", "Clarificante comercial", "0,29 TU/mL", "2,90
TU/mL", "5,80 TU/mL"), each = 9),
    Absorbancia = absorbancias
  )

  datos$Tratamiento <- factor(datos$Tratamiento,
                                levels = c("Sin tratar", "Clarificante comercial",
"0,29 TU/mL", "2,90 TU/mL", "5,80 TU/mL"))

  modelo <- aov(Absorbancia ~ Tratamiento, data = datos)
  tukey_df <- as.data.frame(TukeyHSD(modelo)$Tratamiento)
  tukey_df$comparacion <- rownames(tukey_df)

  comparaciones <- tukey_df %>%
    filter(grepl("^Sin tratar-", comparacion)) %>%
    mutate(Tratamiento = gsub("Sin tratar-", "", comparacion),
          simbolo = case_when(
            `p adj` < 0.01 ~ "***",
            `p adj` < 0.05 ~ "**",
            `p adj` < 0.1 ~ "*",
            TRUE ~ "ns"
          ))
}

comparaciones <- rbind(data.frame(Tratamiento = "Sin tratar", simbolo = ""),
comparaciones[, c("Tratamiento", "simbolo")])

resumen <- datos %>%
  group_by(Tratamiento) %>%
  summarise(media = mean(Absorbancia),
            se = sd(Absorbancia)/sqrt(n()))

resumen <- left_join(resumen, comparaciones, by = "Tratamiento")
resumen$Tratamiento <- factor(resumen$Tratamiento,
                                levels = c("Sin tratar", "Clarificante comercial",
"0,29 TU/mL", "2,90 TU/mL", "5,80 TU/mL"))
resumen$pos <- resumen$media + resumen$se + 0.01

ggplot(resumen, aes(x = Tratamiento, y = media)) +
  geom_col(fill = "gray70", width = 0.6) +
  geom_errorbar(aes(ymin = media - se, ymax = media + se), width = 0.2) +
  geom_text(aes(label = simbolo, y = pos), size = 5, na.rm = TRUE) +
  theme_minimal() +
  labs(title = titulo,
       x = "Tratamiento",
       y = expression("DO"[595]*" media ± E.E.")) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))
}

# Datos 6 °C
abs_6 <- c(
  0.132, 0.108, 0.113, 0.152, 0.123, 0.105, 0.206, 0.103, 0.101,
  0.195, 0.196, 0.184, 0.208, 0.225, 0.168, 0.175, 0.219, 0.179,
  0.145, 0.152, 0.155, 0.235, 0.144, 0.150, 0.248, 0.145, 0.145,
  0.164, 0.159, 0.199, 0.216, 0.156, 0.186, 0.159, 0.226, 0.156,
  0.113, 0.095, 0.087, 0.110, 0.083, 0.094, 0.099, 0.085, 0.086
)

# Datos 16 °C
abs_16 <- c(
  0.102, 0.102, 0.101, 0.101, 0.103, 0.104, 0.103, 0.104, 0.109,
  0.163, 0.156, 0.159, 0.156, 0.159, 0.157, 0.171, 0.158, 0.163,
  0.130, 0.137, 0.132, 0.135, 0.134, 0.134, 0.134, 0.133, 0.134,
  0.153, 0.146, 0.153, 0.156, 0.156, 0.157, 0.156, 0.154, 0.150,
  0.110, 0.087, 0.125, 0.100, 0.101, 0.104, 0.103, 0.101, 0.101
)

```

```

# Crear los gráficos
g1 <- crear_grafico(abs_6, "A. Incubación a 6 °C durante 7 días")
g2 <- crear_grafico(abs_16, "B. Incubación a 16 °C durante 7 días")

# Unir en una sola figura
g1 + g2

```

### Anexo 3: Script de R donde se generó la Figura 8

```

# ----- librerías -----
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(patchwork)

# ----- función de análisis + gráfico -----
grafico_turbidez <- function(valores, titulo){
  df <- data.frame(
    Tratamiento = rep(c("Clarificador comercial",
                        "0,29 TU/mL", "2,90 TU/mL", "5,80 TU/mL"), each = 9),
    DO595 = valores)

  df$Tratamiento <- factor(df$Tratamiento,
                            levels = c("Clarificador comercial",
                                      "0,29 TU/mL", "2,90 TU/mL", "5,80 TU/mL"))

  mod   <- aov(DO595 ~ Tratamiento, data = df)
  tuk   <- TukeyHSD(mod)$Tratamiento |> as.data.frame()
  tuk$comparacion <- rownames(tuk)

  # Comparaciones contra Clarificador comercial
  sig <- tuk |>
    filter(grepl("Clarificador comercial-", comparacion) | grepl("-Clarificador
comercial", comparacion)) |>
    mutate(
      Tratamiento = ifelse(grepl("^Clarificador comercial-", comparacion),
                            sub("Clarificador comercial-", "", comparacion),
                            sub("-Clarificador comercial", "", comparacion)),
      simbolo = case_when(
        `p adj` < 0.001 ~ "***",
        `p adj` < 0.01  ~ "**",
        `p adj` < 0.05  ~ "*",
        TRUE           ~ "ns"
      )
    ) |>
    select(Tratamiento, simbolo) |>
    bind_rows(tibble(Tratamiento = "Clarificador comercial", simbolo = ""))
  resumen <- df |>
    group_by(Tratamiento) |>
    summarise(media = mean(DO595),
              se = sd(DO595)/sqrt(n())),
              .groups = "drop") |>
    left_join(sig, by = "Tratamiento") |>
    mutate(pos = media + se + 0.005)

  # Asegurar el orden del factor luego del left_join
  resumen$Tratamiento <- factor(resumen$Tratamiento,
                                 levels = c("Clarificador comercial",
                                           "0,29 TU/mL", "2,90 TU/mL", "5,80 TU/mL"))

  ggplot(resumen, aes(Tratamiento, media)) +
    geom_col(fill = "gray70", width = 0.6) +
    geom_errorbar(aes(ymin = media - se, ymax = media + se), width = 0.2) +
    geom_text(aes(y = pos, label = simbolo), size = 5, na.rm = TRUE) +

```

```

theme_minimal(base_size = 12) +
theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1)) +
labs(title = titulo,
x = "Tratamiento",
y = expression("DO"[595]*" media ± E.E."))
}

# ----- datos 6 °C y 16 °C -----
valores_6 <- c(0.195,0.196,0.184,0.208,0.225,0.168,0.175,0.219,0.179,
0.145,0.152,0.155,0.235,0.144,0.150,0.248,0.145,0.145,
0.164,0.159,0.199,0.216,0.156,0.186,0.159,0.226,0.156,
0.113,0.095,0.087,0.110,0.083,0.094,0.099,0.085,0.086)

valores_16 <- c(0.163,0.156,0.159,0.156,0.159,0.157,0.171,0.158,0.163,
0.130,0.137,0.132,0.135,0.134,0.134,0.134,0.133,0.134,
0.153,0.146,0.153,0.156,0.156,0.157,0.156,0.154,0.150,
0.110,0.087,0.125,0.100,0.101,0.104,0.103,0.101,0.101)

# ----- generar figura combinada -----
fig <- grafico_turbidez(valores_6, "A. Incubación a 6°C durante 7 días") +
grafico_turbidez(valores_16, "B. Incubación a 16°C durante 7 días")

# ----- mostrar figura -----
print(fig)

# ----- guardar figura -----
ggsave("turbidez_6C_16C_sinControl.png", fig,
width = 13, height = 6, dpi = 300)

```

## Anexo 4. Script en Python para generar Figura 9

```

import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

# Datos de viscosidad (promedios)
tratamientos = ['Sin tratar', 'Clarificador comercial', '0,29 TU/mL', '2,90 TU/mL', '5,80 TU/mL']
viscosidad_6C = [1.93, 1.54, 1.52, 1.55, 1.54]
viscosidad_16C = [2.95, 3.65, 3.45, 3.5, 4.15]

# Crear figura y subplots
fig, axs = plt.subplots(1, 2, figsize=(12, 5), sharey=True)

# Gráfico para 6°C
axs[0].bar(tratamientos, viscosidad_6C, color='skyblue')
axs[0].set_title('Viscosidad a 6°C')
axs[0].set_ylabel('Viscosidad (cP)')
axs[0].tick_params(axis='x', rotation=45)

# Gráfico para 16°C
axs[1].bar(tratamientos, viscosidad_16C, color='salmon')
axs[1].set_title('Viscosidad a 16°C')
axs[1].tick_params(axis='x', rotation=45)

# Ajustes finales
plt.tight_layout()
plt.show()

```

## Anexo 5. Script en Python para generar Figura 10

```

import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

```

```

# Datos
tratamientos = ['Sin tratar', 'Clarificante comercial', '0,29 TU/mL', '2,90 TU/mL', '5,80 TU/mL']

# Promedios y EE para cada condición
medias_6 = [1.0652, 1.0782, 1.0477, 1.0179, 1.0587]
error_6 = [0.0145, 0.0177, 0.0144, 0.0160, 0.0127]

medias_16 = [1.0643, 1.0739, 1.0448, 1.0063, 1.0264]
error_16 = [0.0153, 0.0171, 0.0158, 0.0203, 0.0125]

x = np.arange(len(tratamientos))

# Crear figura y ejes
fig, (ax1, ax2) = plt.subplots(1, 2, figsize=(12, 5), sharey=True)

# Gráfico para 6°C
ax1.bar(x, medias_6, yerr=error_6, capsize=4, color='gray')
ax1.set_xticks(x)
ax1.set_xticklabels(tratamientos, rotation=45, ha='right')
ax1.set_title('A incubación a 6 °C durante 7 días', loc='left')
ax1.set_ylabel('Densidad (mg/mL)')

# Gráfico para 16°C
ax2.bar(x, medias_16, yerr=error_16, capsize=4, color='gray')
ax2.set_xticks(x)
ax2.set_xticklabels(tratamientos, rotation=45, ha='right')
ax2.set_title('B incubación a 16 °C durante 7 días', loc='left')

# Título general
fig.suptitle('Densidad media de cerveza (mg/mL) tras tratamientos con clarificantes',
             fontsize=14)

plt.tight_layout(rect=[0, 0, 1, 0.95])
plt.show()

```

## Anexo 6. Script en Python para generar Figura 11

```

import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

# Tratamientos y SRM promedio por condición
tratamientos = ['Sin tratar', 'Clarificante comercial', '0,29 TU/mL', '2,90 TU/mL', '5,90 TU/mL']
srm_6C = [5.75, 7.67, 6.86, 7.47, 5.68]
srm_16C = [5.25, 6.69, 6.11, 6.48, 5.14]
srm_objetivo = 4.9

x = np.arange(len(tratamientos))
width = 0.35

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 5))

# Barras para cada condición
barras1 = ax.bar(x - width/2, srm_6C, width, label='6 °C', color='steelblue')
barras2 = ax.bar(x + width/2, srm_16C, width, label='16 °C', color='darkgreen')

# Línea de SRM objetivo
ax.axhline(srm_objetivo, color='gray', linestyle='--', linewidth=2, label='SRM objetivo (4.9)')

# Etiquetas
ax.set_ylabel('SRM')

```

```

ax.set_title('Valor promedio de SRM en función del tratamiento clarificante')
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(tratamientos, rotation=45, ha='right')
ax.legend()

plt.tight_layout()
plt.show()

```

## Anexo 7: Script de R para generar Figura 12

```

# Requiere ggplot2 y dplyr
# install.packages("ggplot2")
# install.packages("dplyr")

library(ggplot2)
library(dplyr)

# Datos
datos <- data.frame(
  Muestra = rep(c("A", "B", "C", "D", "E"), each = 5),
  Réplica = rep(1:5, times = 5),
  pH      = c(5.24, 5.15, 5.13, 5.11, 5.08,
             5.11, 5.10, 5.10, 5.09, 5.08,
             4.99, 4.99, 5.00, 4.99, 4.99,
             5.00, 4.99, 4.99, 5.01, 5.00,
             4.98, 4.98, 4.98, 4.99, 4.98)
)
}

# Etiquetas descriptivas (actualizadas)
datos$Tratamiento <- factor(
  datos$Muestra,
  levels = c("A", "B", "C", "D", "E"),
  labels = c("Sin tratar",
            "Clarificador comercial",
            "0,29 TU/mL",
            "2,90 TU/mL",
            "5,80 TU/mL")
)

# Gráfico
grafico <- ggplot(datos, aes(x = Tratamiento, y = pH)) +
  geom_boxplot(fill = "skyblue", outlier.shape = NA) +    # cajitas celestes
  geom_jitter(width = 0.1, size = 2, alpha = 0.6) +
  theme_minimal() +
  labs(title = "Efecto de los diferentes clarificantes en el pH de la cerveza",
       x = "Tratamiento",
       y = "pH") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))

print(grafico)

# Guardar en alta resolución
ggsave("boxplot_pH_cerveza_actualizado.png",
       plot   = grafico,
       width  = 8,
       height = 5,
       dpi    = 300)

```

## Anexo 8: Script de R para generar Figura 13

```
# Instalar si no tenés ggplot2
```

```

# install.packages("ggplot2")

library(ggplot2)

# Crear el data frame en formato largo
datos <- data.frame(
  Muestra = rep(c("A", "B", "C", "D", "E"), each = 5),
  Réplica = rep(1:5, times = 5),
  pH      = c(5.29, 5.24, 5.21, 5.22, 5.23,
             5.24, 5.23, 5.23, 5.22, 5.22,
             5.22, 5.22, 5.23, 5.22, 5.22,
             5.23, 5.23, 5.21, 5.21, 5.21,
             5.19, 5.18, 5.18, 5.18)
)

# Etiquetas descriptivas actualizadas
datos$Tratamiento <- factor(
  datos$Muestra,
  levels = c("A", "B", "C", "D", "E"),
  labels = c("Sin tratar",
            "Clarificador comercial",
            "0,29 TU/mL",
            "2,90 TU/mL",
            "5,90 TU/mL")
)

# Gráfico
ggplot(datos, aes(x = Tratamiento, y = pH)) +
  geom_boxplot(fill = "lightblue") +
  geom_jitter(width = 0.1, size = 2, alpha = 0.7) +
  theme_minimal() +
  labs(title = "pH de cervezas tratadas con diferentes clarificantes",
       x = "Tratamiento",
       y = "pH") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))

```

## Anexo 9: Escala SRM de cerveza

Beer Color														
SRM	2	3	4	6	8	10	13	17	20	24	29	35	40+	
EBC	4	6	8	12	16	20	26	33	39	47	57	69	79	

**Figura 22:** Valores de SRM y EBC para cada color de cerveza. Imagen extraída de Hasnul Hadi et., al. 2021.

## APÉNDICES

### Apéndice 1: Tabla del ensayo FAO

**Tabla 8.** Adaptación del ensayo de FAO para la cuantificación de la actividad proteolítica de la Collipullin (papaína comercial.)

Tubo	Caseina 1 % (mL)	Incubar	Enzima (mL)	Incubar	TCA 30% (mL)	Enzima (mL)	Incubar
Blanco 1-3	5,0	5 min a 40°C	-	60 min a 40°C	3,0	2,0	30 min a RT
Test 1-3	5,0		2,0		3,0	-	
Sda 1-3	5,0		2,0		3,0	-	
Sdb 1-3	5,0		2,0		3,0	-	
Sdc 1-3	5,0		2,0		3,0	-	
Sdd 1-3	5,0		2,0		3,0	-	

### Apéndice 2: Receta de almacen cervecero para la cocción de Pilsen Lager

#### Pilsner

*20 Litros*  
 Densidad Inicial: 1.047 ° Densidad Final: 1.010  
 ABV: 5.1% IBU: 28 10 EBC

#### Ingredientes

3 Kg Pilsen

Hacer Whirlpool, dejar reposar y enfriar rápidamente hasta una temperatura a 10 °C en el fermentador.

640 g Munich

Fermentación

Añadir la levadura según instrucciones y promover la oxigenación inicial.

320 g Cara Clair

Fermentación primaria a 10 °C por 2 días y eleve progresivamente a 14°C hasta completar attenuación (min 2 semanas). Bajar la temperatura a 8 °C por 1 día y purgar la levadura. Llevar a frío a 2°C y reposar por 10 días.

1 pack Diamond Lager 11 g

#### Maceración

Embotellado

100 g Saaz (3.9% AA)

Embotellar con 6 g de azúcar ó 7 g de Dextrosa por litro y levadura Safale F-2.

3 g Irish Moss

Refermentation a 15 °C durante 7 días mínimo, una vez alcanzado carbonatado óptimo mantener refrigerado bajo 10 °C.

#### Maceración

Macerar el grano en una proporción de 3 litros de agua por kilo a 66 °C durante 60 min. Mashout a 77 °C por 5 min (recomendable).

Recircular. Lavado del grano a 78 °C teniendo como objetivo 25 litros de mosto antes del hervido ó densidad pre-hervido 1.040 aprox. (ajustar a pérdida de volumen del equipo).

### Hervido

Hervir vigorosamente y añadir el lúpulo en las siguientes proporciones y tiempos (en cuenta regresiva).

15 g Saaz 60'  
20 g Saaz 30'  
10 g Saaz 15' (+ Irish Moss)  
10 g Saaz 0' (Final)  
Añadir 3 g de Irish Moss en los últimos 15 min, pre-diluido en frío. Verificar densidad inicial al final del hervido (1.050), volumen 21 L.

## Apendice 3: Ficha tecnica de Isinglass



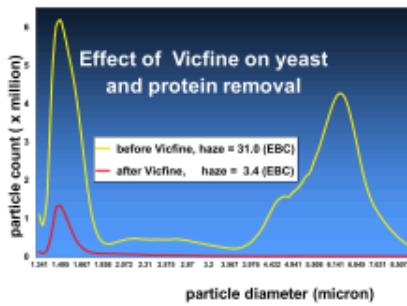
The logo features the word "abvickers" in a stylized font where the "a" and "b" are blue and the "vickers" part is orange. To the right, the product name "VICFINE (FFV 161) BEER CLARIFICATION" is written in large, bold, white capital letters on a dark background.

Vicfine is purified isinglass in convenient powder form. It is added to beer at the end of fermentation to speed maturation and improve filtration by removing yeasts and protein particles. For ease of use Vicfine in its standard form includes the necessary acid and preservative already blended.



### PRINCIPLE

The active component of Vicfine is isinglass (collagen). It is derived from the swim bladder of fish. Processing into finished form involves a regime of rigorous washing and sterilization, followed by drying and milling. The precise nature of the action of collagen on yeast and proteins is not fully understood, and many suggestions have been promoted. Collagen exists in solution as tightly bound triple helix strands which possess both positive and negative charged sites along their length. It is clear that the amino acid make-up of collagen, and specifically the high proportion of proline and hydroxyproline contributes to its remarkable ability to remove both yeasts and proteins so effectively. In a typical application greater than 95% of yeast and 90% of protein particles are removed.



### BENEFITS

Reduced cold storage time.  
Fewer vessels.  
Lower energy use.  
Reduced beer loss.  
Improved filtration.  
Faster throughput.  
Reduced powder use.  
Improved beer haze and stability.  
Less re-work.

Vicfine has a moderate effect on sensitive protein reduction. Whilst not a beer stabilizer in its own right it contributes to the action of silica gel and compliments PVPP. During settlement of flocculated solids, foam negative factors can be entrained. Brewers regularly notice that Vicfine treated beers have improved foam stability.

#### REGULATORY

The active component of Vicfine is isinglass. FDA  
Isinglass is listed as Generally Recognized as Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA) under 27 CFR 24 subpart L – 24.246.

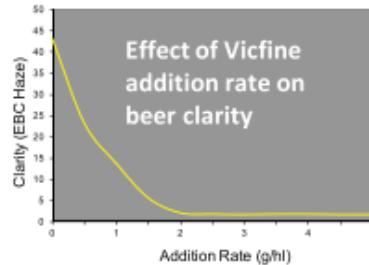
#### Australia and New Zealand

Approved for use as a clarifying agent in beer under section 1.33. of the Food Standards Code (Schedule 18).



## TREATMENT RATES

Vicfine is typically added at between 1 and 3 gm/hL. For both performance and commercial considerations it is advisable to identify the correct addition rate. This will vary from beer to beer (a simple optimisation test is detailed later).



### UK & EC

Commission Directive 2007/68/EC exempts glass from having to be mentioned on labels when used to clarify beer or wine. Vicfine can be used as a processing aid as it meets the requirements of EU General Food Law (Regulation (EC) No 178/2002 (as amended)).

### CONTACT US

For more information, please visit us at  
[www.lallemandbrewing.com](http://www.lallemandbrewing.com)

For any questions, you can also reach us at  
[abvickers@lallemand.com](mailto:abvickers@lallemand.com)

TECH  
DATA  
SHEET

PROCESS  
AIDS

## VICFINE (FFV 161) BEER CLARIFICATIONS



PROCESS AID - TECHNICAL DATA SHEET

## VICFINE (FFV 161) BEER CLARIFICATION



### APPLICATION

Vicfine is added via a solution to beer at the end of fermentation and chilling, or if centrifuges are used immediately after centrifugation. It is fully compatible with silica gel, but all other processing aids at this stage should be added separately (methods of solution preparation are detailed later). For maximum benefit the Vicfine solution should be added in-line to the beer during transfer. If added prior to the chiller satisfactory incorporation will occur. A static inline mixer is advisable otherwise.

Some beers react very quickly with Vicfine - flocculation can occur within minutes of addition. In these cases Vicfine addition should take place throughout the whole period of beer transfer. If this is not possible additions should be made during the latter part of the transfer, or to the filled vessel.

Unitank operation presents a special set of circumstances. The beer should be chilled conventionally.

Typical cold storage times for Vicfine treated beers (cylindroconical)

Immediately before addition of Vicfine the sedimented yeast should be fully removed. The Vicfine solution can be pumped into the bottom of the vessel and mixed with CO<sub>2</sub>. The design and size of the cold storage vessel, and the filterability requirements of the beer, will dictate the length of time required for settlement.

In all instances care should be taken in removing all the settled solids prior to filtration.



### IDENTIFICATION OF OPTIMUM ADDITION RATE

Prepare a 0.5% w/v solution by first dispersing 2.5 gm Vicfine in 500 ml cold water. After a 30 minute hydration period dissolve the Vicfine by mixing vigorously for 2 to 3 minutes. This is best achieved with a hand held domestic food blender. Note: if the Vicfine powder is allowed to stand overnight a satisfactory solution can be prepared with a simple laboratory magnetic mixer.

Take samples of beer at end of fermentation, either from the transfer line or directly from fermentation vessel. Cool to 0°C and remove yeast if necessary. Fill clear glass bottles or laboratory measuring cylinders and dose with Vicfine solution at rates of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 gm/hL.

Store the treated beers at 0°C overnight and assess clarity both visually and by haze measurement.

The optimum rate is determined as the point at which further additions of Vicfine give little or no clarity improvement. In the example shown in Table 2 this is 2 gm/hL.



### VICFINE SOLUTION PREPARATION - PLANT SCALE

The exact method will depend on the equipment available and external constraints, for example time. Certain basic requirements should, however, be met.



## BREWING PRACTICE

Isinglass has long been used in the clarification of traditional British cask ale. In this role it's effectiveness has never been rivalled, although many attempts have been made to find alternatives over the years. The same ability to remove yeast, and more importantly, proteins makes it an ideal partner in the cost effective production of filtered beers. New generation centrifuges are being introduced into the brewing process. This has seen interest in Vicfine increase, as the action of the centrifuge on large particulate solids and Vicfine on the more troublesome smaller particles results in beers with excellent filtration characteristics.



## IN PRACTICE

Vicfine contains the necessary acids for solution preparation. If phosphoric acid is readily available this can be added once the Vicfine powder has been added to the water in order to speed up the rate of dissolving. An addition rate of 100 ml per hectolitre (85% phosphoric) is sufficient.

The dissolving action of the mixer can be supplemented by re-circulating the solution via a centrifugal or similar pump

Storage conditions for Vicfine

Portable water at a temperature of less than 10°C, ideally aerated.

Vessels and pipework made of stainless steel or other inert materials, e.g. polypropylene

High speed mixer capable of maintaining a vigorous stirring action in a Vicfine solution with typical viscosity of 2,000 centipoise.

The isinglass component of Vicfine is sensitive to heat damage as soon as it is dissolved. A Vicfine solution is stable for up to 1 week if maintained at a temperature below 15°C. In cases where this is not possible the solution should be used within 24 hours.

Run approximately half of the required water volume into the mixing vessel. With the mixer stirring slowly add the Vicfine powder to avoid formation of lumps. Leave the mixer stirring for minimum 30 minutes but ideally 2 hours. As the Vicfine dissolves the viscosity of the solution increases. Add extra water as necessary until the final volume is achieved.

LALLEMAND BREWING

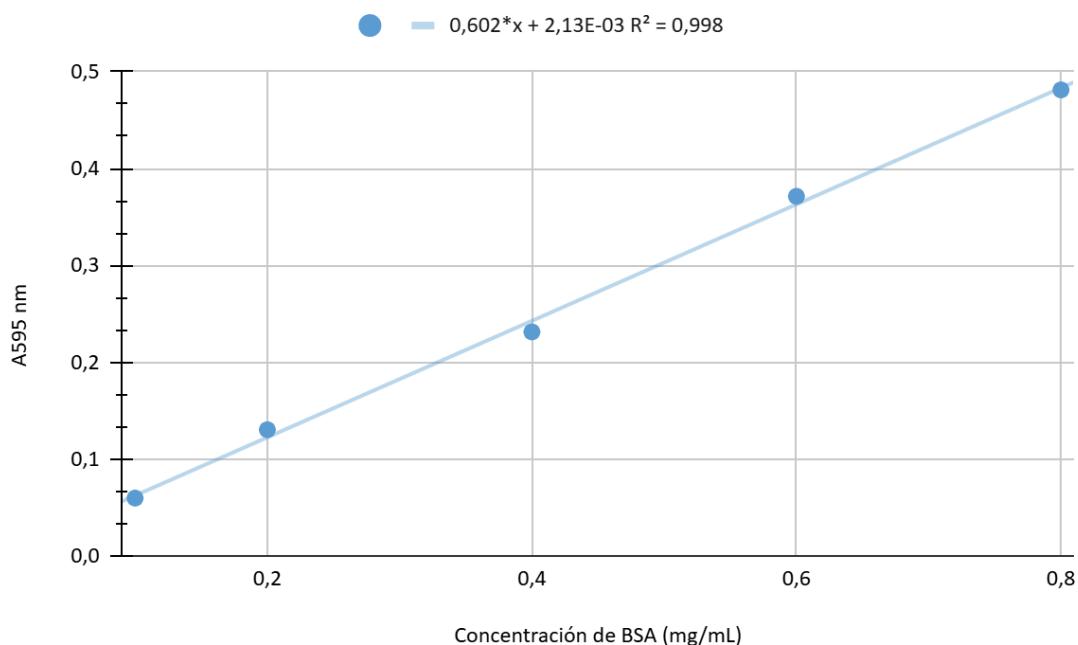
[www.lallemandbrewing.com](http://www.lallemandbrewing.com)

LALLEMAND

## Apéndice 4: Cuestionario para los participantes de la cata de cerveza lager

- 1) En comparación con la cerveza 1 (industrial), ¿Cuánto se parecen en aroma las siguientes cervezas? (1= mucho / 2= bastante / 3= más o menos / 4= diferente / 5= muy diferente)
- 2) En comparación con la cerveza 1 (industrial) ¿Cuánto se parecen en sabor las siguientes cervezas? (1= mucho / 2= bastante / 3= más o menos / 4= diferente / 5= muy diferente)
- 3) En comparación con la cerveza 1 (industrial) ¿Cuánto se parecen en cuerpo a las siguientes cervezas? (1= mucho / 2= bastante / 3= más o menos / 4= diferente / 5= muy diferente)
- 4) En comparación con la cerveza 1 (industrial) ¿Cuánto se parecen en gasificación las siguientes cervezas? (1= mucho / 2= bastante / 3= más o menos / 4= diferente / 5= muy diferente)
- 5) Ordene de menor a mayor, en grado de turbidez, las cervezas expuestas
- 6) ¿Qué cerveza le parece más translúcida?

**Apéndice 5: Curva estándar con BSA del método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales de Collupulin.**



**Figura 23.** Curva de calibración generada en base a diferentes diluciones de BSA. La misma fue utilizada para cuantificar la cantidad de proteínas totales en la muestra de Collupulin utilizada en los ensayos de este trabajo.