

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 981**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12C 7/00 (2006.01)

G01N 33/14 (2006.01)

G01N 21/3577 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015** **PCT/EP2015/057887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015** **WO15155353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015** **E 15718464 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 3129460**

54 Título: **Método para la supervisión en línea de procesos de maceración usando espectroscopía infrarroja**

30 Prioridad:

11.04.2014 DK 201470208

06.03.2015 DK 201570129

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

10.04.2018

73 Titular/es:

SPECSHELL APS (100.0%)

Tempovej 14

2750 Ballerup, DK

72 Inventor/es:

HOFFMANN-PETERSEN, ERIK y

KUNOV-KRUSE, ANDREAS JONAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 662 981 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la supervisión en línea de procesos de maceración usando espectroscopía infrarroja

La invención se refiere a un método y a un sistema para el control de un proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo un proceso de maceración. Esto permite la determinación precisa de las moléculas de azúcar presentes en una solución y la longitud promedio de las cadenas de azúcar en tiempo real durante el proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo un proceso de maceración. Adicionalmente, puede obtenerse también información sobre, por ejemplo, la concentración de carbohidratos disueltos, tales como por ejemplo proteínas y aminoácidos libres, simultáneamente con la información sobre la longitud promedio de las cadenas de azúcar.

Antecedentes

Cuando se fabrica por ejemplo una cerveza, antes de la fermentación microbiológica de los carbohidratos presentes de modo natural en un amplio intervalo de cereales y otros productos agrícolas que contienen almidones y di- y polisacáridos, los carbohidratos presentes de modo natural requieren frecuentemente un pretratamiento enzimático. Este pretratamiento enzimático es conocido como *maceración*. Ejemplos de cereales y otros productos agrícolas que pueden necesitar someterse a este procedimiento de maceración son cebada, trigo, centeno, avena, arroz, maíz, madera o patatas.

En algunos casos los cereales se maltean previamente a la maceración. Durante el proceso de malteado, se desarrollan enzimas naturales dentro de los productos agrícolas. En otros casos las enzimas se añaden a los cereales o productos agrícolas antes de que comience la maceración. Durante el proceso de maceración, se añade agua al producto agrícola y se eleva y mantiene la temperatura a ciertas temperaturas en las que las enzimas añadidas o presentes de modo natural son más activas. Una maceración incluye normalmente varias etapas de temperatura para estimular las diferentes enzimas.

Durante un proceso de maceración, se desarrollan diferentes tipos de compuestos de azúcar mono-, di- y poliméricos debido a la transformación enzimática del almidón presente de modo natural. Las unidades de azúcar más pequeñas (tales como por ejemplo la maltosa) se convierten en etanol durante la fermentación mientras que las cadenas ligeramente más largas (tales como por ejemplo maltodextrinas) se mantienen a todo lo largo de la fermentación y añaden preferentemente un tono de sabor dulce a la cerveza final.

Después de que se complete el proceso de maceración, la relación de azúcares de cadena corta y azúcares de cadena larga debe estar dentro de un intervalo muy estrecho para obtener la clase de cerveza deseada. El "exceso de maceración", en la que todo el almidón se convierte totalmente en maltosa, conducirá a una cerveza con un alto contenido de alcohol pero con un aroma plano y desagradable o amargo. Por otro lado, la "escasez de maceración", en la que solo una mínima parte del almidón se convierte en maltosa, da como resultado una cerveza muy dulce con un bajo contenido de alcohol. Para la mayor parte de tipos de cervezas se prefiere un proceso de maceración que lleve al mosto a algún punto entre estos dos extremos. Sin embargo, el control del proceso de maceración es muy exigente y no hay disponibles buenos métodos en línea para medir la relación entre compuestos de azúcar de cadena corta y cadena larga.

Otro importante proceso enzimático incluye la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas del producto agrícola. El contenido de proteína hidrolizada también afecta a las características de la cerveza final y es por lo tanto un importante factor a controlar en el proceso de maceración. El grado de hidrólisis de la proteína también es dificultoso de controlar.

El proceso global de elaboración de la cerveza está muy bien entendido desde un punto de vista científico — especialmente los procesos de fermentación se estudian en detalle y preparan frecuentemente como un proceso bioquímico sofisticado y ampliamente diseñado—.

Por el contrario, la maceración es una de las pocas "cajas negras" que se mantienen en la industria de la cerveza y la maceración se realiza todavía fundamentalmente mediante el uso de "recetas" y planteamientos de prueba y error. Esto es sin embargo problemático en muchos sentidos. Una preocupación es que dado que cada lote de malta puede tener diferentes composiciones con relación tanto a los sustratos de azúcar y de proteínas como de amilasa activa y enzimas de proteasa, el procedimiento de maceración óptimo nunca es exactamente el mismo.

La razón de la carencia de entendimiento y control del proceso de maceración es debido a que no hay disponibles tecnologías analíticas, que ofrezcan supervisión en línea de la maceración. Puede usarse HPLC ("High performance Liquid Chromatography" o Cromatografía líquida de alta eficacia) o GPC ("gel permeation chromatography" o cromatografía por permeación de gel) para analizar los compuestos de azúcar en el mosto, pero solamente el tiempo de ejecución de una muestra es más largo que la escala de tiempo de cada etapa de temperatura en la maceración en sí, por ello es inútil para supervisión en línea. El uso de análisis FT-MIR para el control de un proceso enzimático se ha descrito en el documento WO-A-2009121423.

Por ello, se necesitan nuevas tecnologías analíticas para optimizar y permitir una mejor comprensión de este importante tipo de proceso bioquímico.

Descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención divulgada en el presente documento es un método para el control de un proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo un proceso de maceración. El método comprende las acciones de:

- a) proporcionar una muestra a un sistema con un tanque;
- b) obtener una mezcla de muestra mediante:

- añadir una o más enzimas a la muestra si la muestra no contiene ya una o más enzimas, o
- añadir posiblemente una o más enzimas a la muestra que ya contiene una o más enzimas;

- c) exponer continuamente una parte de la mezcla de muestra a un espectrómetro de infrarrojos (IR);
- d) medir continuamente los espectros de IR de reflectancia total atenuada (ATR) de la mezcla de muestra con el espectrómetro de IR en tiempo real en longitudes de onda entre $400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ durante el proceso de pretratamiento enzimático, y
- e) suministrar los espectros de IR medidos a una unidad de cálculo que:

- calcula la información con relación a las especies específicas presentes en la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático basándose en los espectros de IR, en el que la información con relación a las especies específicas presentes en las mezclas de muestra es:
 - la relación entre las diferentes especies específicas, y/o
 - la concentración de una o más de las especies específicas, y/o
 - el grado de polimerización de una o más de las especies específicas; y
- realimenta la información con relación a las especies específicas en la mezcla de muestra al usuario y/o a un sistema de control del tanque conectado al tanque.

Se divulga en el presente documento en un segundo aspecto de la invención un sistema para el control de un proceso de pretratamiento enzimático. El sistema comprende un tanque adaptado para contener una mezcla de muestra que comprende una muestra a ser retratada enzimáticamente y posiblemente una o más enzimas añadidas a la muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático.

El sistema comprende adicionalmente una unidad de análisis conectada a un espectrómetro de IR, estando adaptada la unidad de análisis para llevar a la mezcla de muestra a contacto directo con el espectrómetro de IR para medición de los espectros de IR de reflectancia total atenuada (ATR) de la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático.

El sistema comprende también una unidad de cálculo conectada con el espectrómetro de IR, estando adaptada la unidad de cálculo para el cálculo de:

- la relación entre especies específicas en la mezcla de muestra basándose en los espectros de IR de la muestra, y/o
- la concentración de una o más especies específicas basándose en los espectros de IR de la muestra, y/o
- el grado de polimerización de una o más de las especies específicas basándose en los espectros de IR de la muestra.

Mediante el primer y segundo aspectos de la invención se obtiene de ese modo un método y sistema que puede determinar con precisión las moléculas de azúcar específicas presentes en la solución y la longitud promedio de las cadenas de azúcar en tiempo real durante, por ejemplo, un proceso de maceración. Además puede obtenerse simultáneamente información sobre, por ejemplo, la concentración de proteínas disueltas y aminoácidos libres.

El pretratamiento de productos agrícolas previamente a su fermentación en el proceso de realización de etanol de grado comercial, por ejemplo para el uso como combustible, disolvente o aditivo, es un proceso virtualmente idéntico al proceso de maceración usado en la producción de bebidas o licores destilados para consumo humano tal como se ha descrito anteriormente.

La materia prima para el proceso de fermentación para la realización de etanol puede incluir los mismos productos agrícolas que contienen almidón tal como se ha mencionado anteriormente para el proceso de maceración, pero también productos agrícolas no comestibles o residuos agrícolas. Unos pocos ejemplos no limitativos serían, mimbres, madera, bagazo o rastrojos de maíz. En estos tipos de productos agrícolas, la celulosa es una parte significativa de los compuestos de azúcar. La celulosa es un compuesto con una estructura química casi idéntica al almidón, en la que la conformación de los enlaces 1,4-glucosídicos, que unen la glucosa, se orienta de modo

ligeramente diferente, dando a la celulosa disuelta, a los oligómeros de celulosa y al dímero análogo de celobiosa propiedades químicas y espectroscópicas casi iguales. Por ello, el término “*maceración*” se ha de entender también como incluyendo el pretratamiento enzimático similar de una materia prima que contiene almidón o lignocelulosa para fermentación en la producción de etanol de grado comercial.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1, 2, 3a-b y 6a muestran realizaciones de la unidad de maceración integrada con un espectrómetro de IR y un ordenador.

Las figuras 4 y 5 muestran un espectrómetro de IR desde el exterior y el interior (figura 4 y figura 5, respectivamente).

Las figuras 6b-d muestran realizaciones de la unidad de maceración.

Las figuras 7a-d muestran realizaciones de la sonda de extracción y/o reciclado.

Las figuras 8a-b muestran una unidad espectroscópica, en la que la figura 8b es una vista en despiece.

Las figuras 9a-c muestran una ampliación de un espectrómetro y una unidad de ATR (reflectancia total atenuada).

Las figuras 10a-b muestran una ampliación de un espectrómetro y una unidad de ATR y la figura 10c muestra una ampliación de un espectrómetro combinado solamente con un cristal.

Las figuras 11a-b muestran una primera realización en la que la unidad espectroscópica de las figuras 8a-b se conecta con un tanque y las figuras 11c-d muestran una segunda realización en la que la unidad espectroscópica de las figuras 8a-b se conecta con un tanque.

La figura 12 muestra los espectros de IR de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina.

La figura 13 muestra las vibraciones características del enlace glucosídico y el grupo acetal en los di- y polímeros de glucosa relacionados con el almidón, así como los modos relacionados en el análogo de glucosa monomérico.

La figura 14 muestra la absorbancia integrada de la banda a 1026 cm^{-1} en función de los enlaces glucosídicos por unidad de glucosa para los espectros de IR de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina.

La figura 15 muestra los espectros de IR medidos durante el proceso de maceración del almidón.

La figura 16 muestra la relación de la absorción de IR integrada desde $1260\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ y el Brix % durante la maceración de cebada malteada.

La figura 17 muestra los espectros de IR de la misma muestra alícuota durante la maceración, con y sin filtración.

La figura 18 muestra el mecanismo detrás de este fenómeno observado en la figura 17.

La figura 19 ilustra la hidrólisis del enlace peptídico.

La figura 20 muestra la hidrólisis de amilo-almidón.

La **figura 21a** muestra la conversión de la forma de α -glucopiranososa anomérica pura en la mezcla racémica a temperatura ambiente.

La **figura 21b** muestra la comparación de la α -D-glucopiranososa disuelta pura con la mezcla racémica de las formas α y β -D-glucopiranososa en equilibrio.

La **figura 22** muestra los espectros de IR a continuación de la conversión in situ de α -glucopiranososa.

La figura 23 muestra los espectros de cuatro carbohidratos diferentes y la desconvolución de cada espectro.

La figura 24 muestra el trazado de varias áreas de banda desconvolucionadas de la figura 23 contra los valores RDP obtenidos a partir de los valores de DE desde el Cu(II)-Cu(I)- 2,2-biquinolina-carboxilato Vis espectroscópico.

La **figura 25** muestra los espectros de diferentes enlaces α -(1,4) glucosídico que contienen compuestos.

La figura 26 muestra los espectros de IR de un conjunto de calibración.

Las figuras 27-28 muestran correlaciones entre las áreas de banda desconvolucionadas de los espectros de la figura 26 y el grado relativo de polimerización a diferentes longitudes de onda.

La figura 29 muestra los espectros de IR de la glucosa y la maltodextrina.

Las figuras 30-33 muestran correlaciones entre las áreas de bandas desconvolucionadas de los espectros de la figura 29 y el grado relativo de polimerización a diferentes longitudes de onda.

La figura 34 muestra los espectros de ATR-IR de las diferentes muestras.

La figura 35 muestra análisis de los espectros de IR medidos en tiempo real durante un proceso de maceración.

Descripción de realizaciones preferidas

La presente invención usa espectrómetros en el infrarrojo medio (MIR). Estos instrumentos funcionan en la zona del IR medio que se define normalmente como desde 400 hasta 4000 cm^{-1} . Las absorciones del infrarrojo medio llevan al enlace molecular en la muestra irradiada a vibrar por medio de deformaciones o bien de flexión o bien de estiramiento. Cada tipo de vibración corresponde a la absorción de luz infrarroja de una longitud de onda específica. La suma de todas estas vibraciones y las absorciones correspondientes de los fotones del infrarrojo medio en la longitud de onda respectiva da como resultado un espectro en el infrarrojo medio.

La posición e intensidad de cada absorción de fotón y la vibración correspondiente obedecen a las reglas de la mecánica cuántica, y pueden predecirse y teorizarse por lo tanto usando diferentes aproximaciones y modelos. Debido a estos mecanismos detrás de la espectroscopía del infrarrojo medio, ninguna vibración supera en la práctica los 4000 cm^{-1} . También, para las finalidades de la invención la parte interesante de los espectros se dispone claramente por debajo de 3600 cm^{-1} .

Los verdaderos espectrómetros de infrarrojo usados en la presente invención se confunden frecuentemente con los espectrómetros del infrarrojo cercano, que a pesar del nombre similar son muy diferentes. Los espectrómetros NIR del infrarrojo cercano funcionan por encima de los números de onda del MIR, normalmente hasta aproximadamente 10000 cm^{-1} , o en algunos espectrómetros recorriendo todas las longitudes de onda hasta las visibles o del UV. Ninguna de las "verdaderas" vibraciones primarias se encuentra en los espectros del infrarrojo cercano, solo armónicos y bandas de combinación de las vibraciones reales. Los armónicos normalmente se confunden y son mucho más difíciles de usar analíticamente y muy frecuentemente se aplican diferentes tecnologías para los espectrómetros en comparación con el MIR.

En la siguiente descripción de la invención, el término IR se refiere exclusivamente a la espectroscopía del IR medio. Y no debería confundirse con la espectroscopía del IR cercano. Es muy importante para la presente invención que se aplique solamente a MIR y no a NIR, es decir no han de confundirse los dos tipos de espectroscopía de infrarrojos.

La posibilidad de usar espectroscopía de infrarrojos para analizar muestras relacionadas con la elaboración de cerveza se han evaluado en trabajos previos para un entorno de laboratorio para MIR es así como para NIR (J. Tehnhunen et ál., J. Inst Brew. Volumen 100 (1994) páginas 11-15). El artículo mide muestras de glucosa, maltosa y maltotriosa y halla que especialmente el ATR-FTIR es inadecuado para su uso en el análisis de maceración/elaboración real. Por ello, el artículo se enfoca en el NIR y en la transmisión FTIR. Los resultados de los trabajos muestran claramente que el NIR no es útil en la discriminación de componentes en sus muestras, y los errores son de magnitud significativamente mayor que los factores que los autores tratan de identificar en las muestras. La transmisión MIR no es técnicamente relevante en el proceso dado que los materiales de ventana altamente tóxicos que permiten la transmisión en la región de huella, en la celda de transmisión se disolverán en el líquido de muestra. Adicionalmente, la celda usada tiene una longitud de trayectoria tan estrecha que sería técnicamente imposible usar en un proceso de elaboración real de la cerveza.

En el documento US4913914, se propone un método para supervisar la "maceración maromi" (por ejemplo producción de salsa de soja). La "maceración Maromi" es un largo proceso de fermentación de la soja y arroz que dura desde meses a aproximadamente un año, usando koji-mold y bacterias ácidas lácticas. A pesar de la similitud lingüística, el proceso de fermentación del "maceración maromi" es muy diferente de los procesos de maceración descritos en la presente invención; dado el relativamente rápido pretratamiento enzimático. La patente describe el uso de un espectrómetro en el infrarrojo cercano y un sistema de auto-muestreo para supervisar el proceso de fermentación del mosto; no un auténtico analizador en línea. El espectrómetro NIR definido trabaja en una longitud de onda totalmente diferente, en donde no puede encontrarse ninguna de las vibraciones moleculares descritas en la presente invención. Como se describe en los antecedentes sobre MIR y NIR, es esencial entender la diferencia entre espectroscopía MIR y NIR. La discriminación de mono- di- y polisacáridos, que es esencial en la presente invención, no se menciona.

El documento DE4002108 (A1) divulga una automatización de un bien conocido método destructivo en análisis de almidón, en el que puede identificarse la estructura helicoidal del almidón por adición de yodo. El complejo morado entre la hélice de amilasa y el yodo pueden cuantificarse entonces usando un espectrómetro NIR-VIS. El proceso consume yodo y la muestra no puede devolverse a la unidad de maceración. Describe básicamente la automatización de un análisis bien conocido, aplicando espectroscopía VIS-NIR en otro intervalo de longitudes de onda que en la presente invención.

El documento WO2009/074650 divulga un método en el que se usan los cereales no malteados en combinación con enzimas añadidas, principalmente amilasas, como sustitución de la cebada malteada y cereales malteados en la elaboración de cerveza. La invención describe mecanismos de la maceración o elaboración de cerveza que son bien conocidos para cualquier experto en la materia de la elaboración de cerveza pero no describe, en ningún término, como usar la espectroscopía de infrarrojos para supervisar el proceso.

El documento EP0851027A1 describe un método que usa espectroscopía ATR-FTIR para controlar las bacterias de ácido láctico en procesos de fermentación. La invención describe cómo controlar las bacterias de ácido láctico, por medio de la supervisión de dos formas de ácido láctico (protonado y desprotonado) y cómo pueden cuantificarse usando ATR, haciendo al método útil para diferentes valores de pH. El proceso también describe cómo controlar las bacterias de ácido láctico a través de la intensidad de "señales alcohólicas" de la glucosa. Sin embargo, no se menciona la discriminación de mono- y polisacáridos. La cuantificación de la glucosa usando solamente ATR-FTIR es directa y no sorprendente en sí misma. El método no describe un aparato para el análisis en línea, o el uso de ATR-FTIR para controlar el pretratamiento enzimático.

La presente invención comprende una metodología en la que se aplica espectroscopía de infrarrojos (IR) de reflectancia total atenuada (ATR) en tiempo real para supervisar procesos de pretratamiento enzimático tales como por ejemplo procesos de maceración. Mediante espectroscopía ATR-IR se quiere indicar espectroscopía en la que se mide los espectros de IR entre 400-3500 cm^{-1} . Simultáneamente a las mediciones de los espectros de IR, un ordenador calcula una composición precisa de los componentes en la solución, es decir el mosto, y devuelve valores claves bioquímicos al operador o a un sistema de control, que globalmente permiten un mejor control y optimización del proceso de maceración. Ejemplos de dichos importantes valores clave son la relación entre compuestos de azúcares mono, diméricos y poliméricos, la concentración total de azúcares disueltos, y la concentración de proteínas o de importantes compuestos aromatizantes. Pueden supervisarse también parámetros adicionales.

En una o más realizaciones el método comprende la etapa de detener el proceso de pretratamiento enzimático cuando se obtiene una relación predeterminada entre especies específicas en la mezcla de muestra, y/o la concentración de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado y/o el grado de polimerización de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado. El proceso de pretratamiento enzimático puede detenerse tanto manualmente por un usuario como automáticamente por el sistema basándose en la información proporcionada desde la unidad de cálculo.

En una o más realizaciones, la mezcla de muestra se agita durante al menos parte del proceso de pretratamiento enzimático.

En una o más realizaciones, se añade agua a la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo junto con la posible adición de las una o más enzimas.

En una o más realizaciones, la temperatura en la muestra y/o la mezcla de muestra se incrementa y/o se disminuye tanto previamente al comienzo del proceso de pretratamiento enzimático, como durante el proceso de pretratamiento enzimático, y/o para detener el proceso de pretratamiento enzimático.

En una o más realizaciones, el proceso de pretratamiento enzimático se detiene por la apertura automáticamente por parte del sistema del tanque, o alternativamente mediante la eliminación de la mezcla de muestra del tanque. También, el pretratamiento enzimático puede detenerse incrementando la temperatura en el tanque. El proceso de pretratamiento enzimático se detiene normalmente cuando se obtiene la relación predeterminada entre especies específicas en la mezcla de muestra, y/o cuando la concentración de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado, y/o cuando el grado de polimerización de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado.

En una o más realizaciones, la muestra se selecciona de entre carbohidratos presentes de modo natural en por ejemplo cereales y otros productos agrícolas que contienen almidón y di y polisacáridos tales como por ejemplo, cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, patatas, paja, madera, almidón y rastrojos de maíz.

En una o más realizaciones, el proceso de pretratamiento enzimático es un proceso de maceración realizado previamente a un proceso de fermentación tal como elaboración de la cerveza.

En una o más realizaciones, se añaden múltiples enzimas a la mezcla de muestra o bien al mismo tiempo o bien en tiempos diferentes y en los que la temperatura de la mezcla de muestra se ajusta durante el proceso de

pretratamiento para tener en cuenta los diferentes niveles de temperatura en los que cada una de la multitud enzimas es más activa.

En una o más realizaciones, los espectros de IR se miden a longitudes de onda entre 400-3000 cm^{-1} , entre 400-2000 cm^{-1} , entre 500-1500 cm^{-1} , entre 700-1400 cm^{-1} , o entre 800-1300 cm^{-1} .

En una o más realizaciones, la unidad de análisis es una celda ATR-IR adaptada para contener una pequeña parte de la mezcla de muestra durante las mediciones de los espectros ATR-IR de la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático, en el que la celda ATR-IR se monta de modo estanco en una placa ATR-IR que comprende un cristal, siendo la placa de ATR-IR parte de un espectrómetro de ATR-IR, en el que el montaje estanco se obtiene por medio de una abrazadera sobre el espectrómetro ATR-IR y una junta tórica posicionada entre la placa de ATR-IR y la unidad de análisis.

En una o más realizaciones, el sistema comprende adicionalmente una unidad de conexión que conecta el tanque y la unidad de análisis, estando adaptada la unidad de conexión para guiar una pequeña parte de la mezcla de muestra desde el tanque a la unidad de análisis mediante lo que se miden los espectros ATR-IR de la mezcla de muestra por el espectrómetro ATR-IR.

En una o más realizaciones, el sistema comprende una sonda de extracción que sobresale en el interior del tanque para extraer una pequeña parte de muestra para la medición de los espectros de IR en una posición determinada por el usuario dentro del tanque.

En una o más realizaciones, la unidad de análisis es una unidad espectroscópica que comprende una unidad ATR-IR, un espectrómetro para la medición de los espectros de IR, y un ordenador, en el que la unidad ATR-IR comprende una placa ATR-IR con un cristal.

En una o más realizaciones, la unidad espectroscópica se fija directamente a una pared del tanque.

En una o más realizaciones, la unidad espectroscópica se conecta a la pared del tanque por medios de conexión, por ejemplo en la forma de un conjunto de mangueras.

En una o más realizaciones, la placa ATR puede girarse hasta 90 grados alrededor de su propio eje.

La figura 1 muestra una configuración que comprende una unidad de maceración 100 con una solución 102 que contiene productos a ser macerados y posiblemente la solución/compuestos enzimáticos que han de añadirse dentro de los productos como materia prima. En la realización mostrada en la figura 1, una sonda ATR-FTIR (infrarrojo de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada) usando un principio de guía de ondas 106, se inserta directamente dentro de la unidad de maceración 100. Los espectros de IR se recogen y envían a una unidad de ordenador 110, que desconvoluciona cada espectro de IR. Puede extraerse a partir de los espectros el área de bandas características del contenido de azúcar/almidón total así como las bandas específicas de los compuestos de azúcar poliméricos. Las áreas de banda relevantes se usan entonces para calcular la concentración de los compuestos de azúcar poliméricos individuales y una relación entre compuestos de azúcar monoméricos y poliméricos usando curvas de calibración prefabricadas. Los valores adicionales como contenido de proteína, y contenido de aminoácidos libres pueden también notificarse simultáneamente.

La unidad de maceración 100 comprende también una unidad de agitación 104, que puede ser un propulsor o similar como se ilustra en la figura 1. Se acopla un aparato de medición de espectroscopía infrarroja (IR) 200, por ejemplo un espectrómetro de IR de reflectancia total atenuada (ATR), directamente a la unidad de maceración 100 a través de una trayectoria de conexión óptica 106, por ejemplo una configuración que comprende espejos o componentes ópticos similares para el guiado de la luz IR desde el espectrómetro de IR 200 a la muestra 102 y para el guiado de la luz retro-reflejada desde la muestra 102 y hacia el espectrómetro de IR 200.

El espectrómetro de IR 200 se conecta a su vez a un ordenador 110 o a un dispositivo de procesamiento de datos similar, que calcula los compuestos de azúcar individuales y la relación entre compuestos de azúcar monoméricos y poliméricos —posiblemente junto con el contenido de proteínas y/o aminoácidos libres— en tiempo real.

En otra realización tal como se muestra en la figura 2, se inserta una sonda FTIR óptica 114 con fibra 116 dentro de un canal lateral 108 del tanque de maceración 100 en donde recogen los espectros de IR continuamente. En una variación de esta realización, el ordenador 110 se integra en la cabina del espectrómetro 200, que realiza análisis de datos multivariantes en cada espectro y muestra los valores relevantes directamente en una pantalla 112 sobre el espectrómetro 200.

En una realización similar a la mostrada en la figura 1, un espectrómetro FTIR 200 está equipado con una celda de ATR que se monta directamente sobre el tanque de maceración 100. En esta forma, el producto 102 que está siendo macerado y un cristal de ATR en la celda de ATR interactúan íntimamente a través de un orificio 118 en el tanque 100. La posición del espectrómetro de IR 200 sobre el tanque 100 puede ser o bien sobre el lateral o bien en el

fondo del tanque tal como se muestra en la figura 3a y en la figura 3b, respectivamente.

Puede usarse una válvula para permitir la extracción de la muestra 102, es decir del mosto, desde el tanque de maceración 100. Mediante el uso de o bien una unidad de bombeo, la presión en el interior de la unidad de maceración 100, o bien la gravedad, puede enviarse una muestra al espectrómetro de IR 200, por ejemplo un espectrómetro de IR de transformada de Fourier (FT), situado adyacente al tanque de maceración 100. El espectrómetro FTIR equipado con una unidad de ATR personalizada puede medir y registrar de ese modo los espectros de IR de la solución 102 que está siendo macerada. Dicha extracción de muestras puede accionarse o bien como un flujo continuo, o pueden extraerse muestras alícuotas en momentos preferidos durante el proceso de maceración. Una realización específica de dicha unidad de ATR personalizada que utiliza una célula de ATR y una cámara de análisis añadida especial se muestra en las figuras 4 y 5.

La figura 4 muestra el espectrómetro de IR 200 visto desde el "exterior" y la figura 5 muestra una vista de la parte "interior" del espectrómetro 200 y de una cámara de análisis 300 a la que se conduce la muestra. El espectrómetro de IR comprende una caja 202 en la que se produce luz IR y una unidad ATR-IR 203. La luz IR incidente 204 es guiada a través de un conjunto de componentes ópticos 206, por ejemplo espejos, a un cristal 207 para la obtención de un contacto íntimo con la muestra en el interior de la cámara de análisis 300. La luz IR reflejada 210 es guiada de la misma forma fuera del cristal 207 a una unidad en el interior del espectrómetro 200 para el análisis de los espectros.

La cámara de análisis 300 puede ser por ejemplo, una celda de ATR-IR que es posiblemente un dispositivo añadido y se sujeta normalmente al espectrómetro 200 mediante una abrazadera 208 que es normalmente una parte integral del espectrómetro 200. Se obtiene normalmente un sellado estanco entre la cámara de análisis 300 y el espectrómetro 200 mediante el uso de una junta tórica 210, que asegura que la muestra líquida permanece en el interior de la cámara de análisis 300. La muestra es guiada al interior de la cámara de análisis 300 mediante un conector de entrada 302 y guiada fuera de nuevo mediante un conector de salida 304. Los conectores de entrada y salida 302, 304 pueden conectarse de modo extraíble a la cámara de análisis 300.

En una o más realizaciones, se construye una cámara de análisis 300 permanentemente junto con la unidad ATR 203 por el fabricante. En otras realizaciones, la unidad ATR 203, la cámara de análisis 300 y el espectrómetro 200 se integran totalmente en una unidad combinada.

Después de la medición de cada espectro de IR por el espectrómetro 200, la muestra en la cámara de análisis 300 se desecha como residuo o se devuelve al tanque de maceración 100.

Los espectros de IR se analizan mediante un software personalizado que extrae áreas de banda a partir de los espectros recogidos y los convierte en valores relevantes, tales como contenido de azúcar, longitud promedio de los polímeros de azúcar, contenido de proteína disuelta y grado de hidrólisis, concentración de compuestos aromatizantes tales como compuestos de diacetil, éster o compuestos amargos, etc.

Una ventaja del espectrómetro 200 combinado con la cámara de análisis 300 descrita anteriormente es que puede calibrarse independientemente de la operación del tanque de maceración 100.

En la figura 6a se ilustra que el tanque 100 puede tener válvulas de extracción y de recirculación 120 en la pared interior del tanque de maceración 100 y de un tanque de residuos 122 para a través de una válvula desechar muestras después de que se haya medido el espectro de IR de la muestra. La configuración puede estar equipada también con una unidad de bomba 124 para reciclado de la muestra 102.

En una o más realizaciones, las sondas de extracción 126 y/o de recirculación 127 pueden situarse próximas a o en conexión con las válvulas 120 tal como se ilustra en las figuras 6b-6d. Algunos ejemplos no limitativos de las sondas de extracción 126 se muestran en las figuras 7a-d.

En una o más realizaciones, puede usarse un sistema de limpieza automático para limpiar la cámara de análisis 300 cuando no está en operación el tanque de maceración 200. El sistema de limpieza automática puede funcionar mediante el bombeo de un flujo de agentes de limpieza o químicos tales como bases, ácidos o disolventes orgánicos a través de la cámara de análisis 300, y enjuagando con agua. Los normalizados de calibración pueden bombearse además automáticamente dentro de la cámara de análisis 300 cuando el tanque de maceración 200 no está operando para ejecutar un programa de calibración.

La entrada 128 (y posiblemente la salida 130 como se muestra en la figura 7a) en las sondas de extracción 126 se dimensiona para permitir que fluyan libremente grandes partículas a través de la sonda 126 sin atascar el sistema. En una o más realizaciones la sonda de extracción 126 está equipada con un filtro 132 para limitar partículas demasiado grandes para el resto del sistema. En otra variación, la sonda se diseña con un filtro extraíble de modo que pueda cambiarse el tamaño de la mascarilla. También puede omitirse un filtro como se muestra en la figura 7c.

En una o más realizaciones, una parte 134 de la sonda de extracción 126 se extiende dentro de la unidad de maceración 100 para extraer la muestra líquida desde una localización deseada en el tanque de maceración 100. La sonda de extracción 126 se conecta normalmente al tanque 100 mediante un montaje de recipiente 136.

- 5 En una o más realizaciones, la sonda de extracción 126 puede actuar como una válvula sobre la pared interior del tanque de maceración (se muestra un ejemplo no limitativo en la figura 7d).

La sonda de extracción 126 mostrada en diferentes versiones en las figuras 7a-c puede extraer muestras de diferentes localizaciones en el tanque de maceración 100. Esto puede realizarse mediante el uso de una serie de
10 válvulas conectadas a un tubo dentro del tanque de maceración 100. En otra variación más la sonda de extracción 126 puede usar motores para extender y cambiar la localización dentro del tanque de maceración 100.

Como se muestra en la figura 7a, la sonda puede constar de dos sondas individuales: una sonda de extracción 126 y una sonda de recirculación 127, en la que una es para la entrada 128 de la muestra y otra para la salida 130 para permitir el flujo de retorno al interior del tanque de maceración 100. Mediante el uso de una bomba aplicada al sistema, puede cambiarse la dirección del flujo en el sistema para impedir acumulaciones en los filtros. En esta
15 forma, las dos sondas individuales (sonda de extracción y sonda de recirculación) pueden combinarse en una doble sonda que maneja tanto la entrada como la salida.

La sonda de extracción 126 puede insertarse dentro del tanque de maceración 100 usando un montaje dentro del tanque de maceración 100. El montaje del tanque de maceración permite una fácil instalación y mantenimiento de la sonda 126. El montaje puede utilizar conexiones TriClamp para conectar un sello estanco entre la sonda 126 y el tanque de maceración 100.

25 El sello de montaje puede crearse también mediante el uso de un vacío entre la sonda 126 y el tanque de maceración 100. Alternativamente, el montaje puede soldarse sobre la pared del tanque de maceración 100.

La figura 8a muestra una unidad espectroscópica de IR/unidad de análisis 400 de acuerdo con la invención y la figura 8b muestra la unidad espectroscópica 400 en una vista en despiece. La unidad espectroscópica 400
30 comprende un recinto espectroscópico 402 con una placa 404 en la que se monta un cristal 407. El cristal 407 debe estar en contacto con el medio para que la unidad espectroscópica 400 realice mediciones de IR. Se usa una constelación espectroscópica de IR para dirigir la luz infrarroja a través del cristal 407. En la realización mostrada en las figuras 8a-b esto se realiza mediante el uso de una unidad espectroscópica 400 con un espectrofotómetro 406 y una unidad ATR-IR 403 que consiste tanto en espejos como en óptica para dirigir la luz desde un emisor en el espectrofotómetro 406 a través del cristal 407 y de vuelta a un receptor en el espectrofotómetro 406.

El emisor puede recibir luz IR desde una fuente de luz externa por medio de óptica de guiado y/o espejos o fibras. Alternativamente, el espectrofotómetro 406 puede contener una matriz de diodos que emiten luz IR en el interior del espectrofotómetro 406. El receptor puede guiar de la misma forma la luz retro-reflejada a un espectrómetro externo o
40 contener por sí mismo diodos receptores.

En una realización, el cristal 407 solo provocará que la luz rebote a través del medio una vez (rebote simple) como se muestra en la figura 10a, mientras que en otra realización el cristal 407 provocará varios rebotes a través del medio (rebote múltiple) como se muestra en la figura 10b.

45 En otra realización de la unidad ATR 406 es desatendida y el emisor y receptor están en ángulo hacia el cristal 407 creando una trayectoria directa a y desde el cristal 407 tal como se muestra en la figura 10c.

En otra realización el receptor es sustituido por un fotosensor y filtro.

50 La unidad espectroscópica 400 comprende adicionalmente un ordenador 408 conectado al espectrofotómetro 406 para realizar el procesamiento de datos necesario antes que los datos se envíen de vuelta al usuario o a un sistema de control central como por ejemplo un sistema de control del tanque conectado al tanque. El ordenador 408 puede conectarse a una antena 410 para comunicación inalámbrica. Alternativamente o como suplemento, el ordenador 408 puede conectarse a una pantalla 409 para interfaz directa con el usuario. La unidad espectroscópica 400 comprende también una cubierta 411.

Para realizar mediciones espectroscópicas sobre el medio, el cristal espectroscópico 407 debe estar en contacto con el medio. Esto puede realizarse por ejemplo como medición en línea, en la que la unidad espectroscópica 400 se
60 monta directamente sobre un tanque, recipiente o tubería.

Las figuras 11a-b muestran una realización de un sistema en línea que comprende un tanque, por ejemplo una unidad de maceración 100 con la unidad espectroscópica de IR 400 fijada directamente al lateral de la unidad de maceración 100. La unidad espectroscópica 400 se monta en el tanque de maceración 100 usando una unidad de montaje sellado 401 para mantener el cristal 407 en contacto con el medio mientras impide cualquier fuga. La unidad de montaje sellado 401 comprende un montaje al tanque 412, una abrazadera 416 para hacer estanca la conexión
65

entre la unidad espectroscópica 400 y el montaje del tanque 412 y un sello 414 para el sellado de la conexión entre la unidad espectroscópica 400 y el montaje del tanque 412.

El montaje 412 puede colocarse sobre el lateral de un recipiente/tanque 100 como se muestra en la figura 11a, en el fondo o en la parte superior del recipiente/tanque 100.

Cuando el residuo de muestra se deja sobre el cristal 407 cuando la unidad espectroscópica 400 no está en uso, el residuo solidifica y la unidad de ATR 403 debe limpiarse previamente a nuevas mediciones. En una realización mostrada en las figuras 9a-c, la superficie, en la que está embebido el cristal 407, se inclina para permitir que la muestra drene fuera del cristal 407. En las figuras 9a-c, se muestra una inclinación de 45 grados en la figura 9b en comparación con la figura 9a y se muestra una inclinación de 90 grados en la figura 9c.

En una realización, toda la unidad espectroscópica se drena para permitir el drenaje. En otra realización, se implementa una base de inclinación entre el espectrómetro y la unidad de ATR para permitir que la unidad de ATR se incline a lo largo del eje del haz de IR. En una realización, la base inclinable es ajustable para inclinarse hasta un grado deseado. En una realización la base de inclinación se motoriza permitiéndola inclinarse adicionalmente entre mediciones.

Otro método de mantener el cristal 407 en contacto con el medio es el uso de una configuración en línea como se muestra en las figuras 11c-d. En esta realización, la unidad espectroscópica 400 se monta en una unidad de bombeo 500 y se conecta a una unidad de filtrado montada en el tanque 100 a través de mangueras 602. Las dos mangueras 602 pueden sustituirse por tuberías.

La unidad de filtrado 600 puede ser una malla de filtrado simple. Alternativamente, la unidad de filtrado 600 puede sustituirse por un montaje de tanque 412 como se muestra en las figuras 11a-b. Más alternativamente, la unidad de filtrado 600 puede consistir en sondas que se sitúan dentro del tanque o recipiente 100.

La unidad de bombeo 500 comprende un sistema de bombeo peristáltico con una carcasa 501, un motor 502, un cabezal de bomba 504 que utiliza medios de desplazamiento para mover los medios a y desde el recipiente 100, y una celda de flujo 506 para dirigir el medio a través del cristal 407. La celda de flujo 506 se conecta a la bomba 504 para asegurar el flujo apropiado a través de la superficie del cristal 407. La unidad de bombeo 500 también comprende un sello 414 y abrazadera 416 para obtener un sellado estanco entre la unidad espectroscópica 400 y la unidad de bombeo 500.

En una realización, la unidad de bombeo 500 se coloca sobre el suelo. En otra realización de la unidad de bombeo 500 se monta en una pared o en el recipiente en sí.

La invención puede explicarse a través de los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Se prepararon soluciones acuosas de respectivamente el 5 % en peso de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina y se registraron los espectros de IR de todas las soluciones. Estos espectros pueden encontrarse en la figura 12. La línea inferior de la figura 12 muestra los espectros de agua pura para comparación. Los espectros de IR se originan a partir de los modos de vibración en cada compuesto. El cambio relativamente grande en los espectros infrarrojos de los cuatro compuestos que son químicamente casi idénticos, muestra que los cambios se originan principalmente en el enlace polimérico 1,4-glucosídico. Las figuras 23 y 25 muestran mediciones adicionales en las mismas especies que las mostradas en la figura 12.

El enlace glucosídico en sí tiene un modo de estiramiento C-O-C antisimétrico característico que da una banda alrededor de 1160 cm^{-1} . Sin embargo debido al solapamiento del estiramiento C4-O en la glucosa y de los grupos C4-OH terminales en los polímeros, no es adecuado para distinguir entre especies monoméricas y poliméricas.

Sin embargo el grupo acetal, que es una consecuencia del enlace glucosídico, induce una diferencia más significativa en los espectros visto por la disminución pronunciada de intensidad en la banda en 1026 cm^{-1} tras la despolimerización —véase la ilustración de este proceso en la figura 13—. Por ello la desaparición de la banda de 1026 cm^{-1} es un buen indicador para la despolimerización.

Como en otras formas de espectroscopía de transmisión, se aplica la ley de Lambert Beer a los espectros ATR-FTIR, leyéndose la ley:

$$A = \varepsilon * I_{\text{penetración}} * c \quad [1]$$

en la que A es la absorción, ε es el coeficiente de extinción, $I_{\text{penetración}}$ es la profundidad de penetración del haz infrarrojo, y c es la concentración del compuesto que provoca la absorción.

La profundidad de penetración es constante cuando se usa ATR-FTIR para muestras con similar índice de refracción, lo que significa que la altura o el área de cada banda es proporcional a la concentración del compuesto que provoca la banda.

Las vibraciones características del grupo acetal son tan características para la banda polimérica, que pueden usarse para cuantificación precisa de las bandas glucosídicas totales por unidad de glucosa en la mezcla de diferentes longitudes de azúcar. Una forma de medir la absorción podría justamente restar el espectro de agua pura de cada espectro y leer la altura del pico a alrededor de $1020\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$, en la que son observables las vibraciones del grupo acetal. Sin embargo debido al solapamiento de bandas contiguas un análisis de datos multivariante mejora la precisión del método significativamente.

El área de la banda de 1026 cm^{-1} se extrae por lo tanto usando desconvolución gaussiana. Como alternativa, podrían haberse usado también variaciones de análisis de datos multivariante. Mostrando los resultados la absorbancia integrada a 1026 cm^{-1} en función de los enlaces glucosídicos por unidad de glucosa y trazados en la figura 14 para los cuatro espectros mostrados en la figura 12. La figura 14 demuestra claramente cómo es de preciso el método para discriminar e identificar los enlaces glucosídicos, incluso en bajas concentraciones.

Ejemplo 2

Se preparó un lodo del 3,5 % en peso de polvo de almidón en agua y se calentó a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos dando como resultado una solución homogénea similar a un gel. La solución se inyectó entonces en un recipiente de 5 ml que se fijó directamente a la parte superior de la placa de ATR, el recipiente se diseñó de tal manera que el cristal de ATR y la solución tenían contacto íntimo. Entonces se agitó la solución mediante un dispositivo de agitación externo a temperatura ambiente, mientras se registraba continuamente los espectros. Para simular un proceso de maceración, se añadió una solución de α -amilasa a la solución. Posteriormente se incrementó la absorción total por los compuestos de azúcar, debido a la mejor solubilidad de las moléculas de almidón de cadena corta, pero se estabilizó la intensidad en pocos minutos. Los espectros en la región de $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ comenzaron a cambiar significativamente, y la intensidad de las bandas en las bandas de $1030\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ disminuyó significativamente a lo largo del tiempo, indicando despolimerización del almidón, véase los espectros de la figura 15, en los que las líneas oscuras representan el tiempo inicial y las líneas grises representan los espectros después de un tiempo más y más largo cuando las líneas se hacen más y más grises. La línea discontinua del fondo de la figura 15 muestra el espectro del agua pura para comparación.

Después de alrededor de 30 minutos, no hubo cambios adicionales en los espectros indicando que el proceso enzimático casi se había detenido. Comparando el espectro (gris claro) con el de la maltosa y la maltotriosa de la figura 12, es claro que la solución consistía ahora en una mezcla de maltosa y maltotriosa.

Ejemplo 3

Se mezclaron 0,1 g de proteína extraída de cebada con un gramo de agua y se calentó suavemente a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. El lodo resultante se agitó en un pequeño recipiente en la parte superior de una unidad ATR-FTIR. Esto permitió un contacto íntimo entre el lodo y el diamante de la unidad ATR, mientras que se registraba los espectros de IR continuamente. Los espectros muestran una absorción característica (ligera solapada) de los grupos amida de 1690 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} , respectivamente, la banda de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ y la banda de flexión N-H . Después de algún tiempo se añadió una solución de 0,1 ml que contenía enzima proteasa dentro del recipiente. Después de la inyección de la enzima, la banda de 1690 cm^{-1} se desplazó hacia arriba a aproximadamente 1705 cm^{-1} . Mientras que la banda a 1690 cm^{-1} es característica para el estiramiento carbonilo en el enlace peptídico en el grupo proteína, la banda de 1705 cm^{-1} es característica para los dímeros de aminoácidos libres o un grupo aminoácido terminal correspondiente en un fragmento de proteína corta. El área individual de las bandas de 1690 y 1705 cm^{-1} puede resolverse claramente usando desconvolución de los espectros y se usan para calcular una relación dinámica de (proteína disuelta)/(aminoácidos libres) a todo lo largo del tratamiento de proteasa.

Ejemplo 4

Se cargaron 60 kg de cebada malteada gruesamente molida y 200 l de agua en un contenedor de acero inoxidable de 250 l equipado con una unidad de caldera para calentamiento y un dispositivo de agitación mecánica. En el fondo del tanque, se conectó una válvula electrónicamente controlada para extracción de muestras. Antes de la válvula había un filtro grueso para impedir que pasaran partículas grandes a través de la válvula. Durante la operación, se abrió la válvula de modo que una bomba peristáltica pudiera extraer muestras del tanque a través de la válvula.

El líquido de muestra se bombeó a una cámara fijada a la parte superior de una unidad ATR de diamante Golden Gate (véase el dibujo en la figura 4-5). Se registró constantemente los espectros de IR con intervalos de 30 segundos. Se calentó inicialmente la cebada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo a esta temperatura durante 20 minutos. Posteriormente se llevó al mosto a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, y a continuación a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 minutos.

Primero, la señal total de los azúcares se incrementó debido a la disolución de la malta en el mosto, pero a temperaturas elevadas las áreas de intensidad de las bandas en la región de $1030\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ comenzaron a disminuir significativamente. Los espectros se desconvolucionaron simultáneamente con el registro en tiempo real de los espectros y basándose en las áreas de bandas características en los espectros desconvolucionados y curvas de calibración previamente obtenidas, se obtuvo una relación entre los azúcares fermentables y maltodextrinas. Cuando el mosto contenía la relación preferida entre azúcares fermentables, la temperatura se elevó rápidamente a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ desnaturalizando las amilasas y deteniendo de ese modo la maceración en la composición óptima.

Ejemplo 5

Se cargó un reactor con 1000 kg de peladuras de patatas y 2000 l de agua. Entonces la mezcla resultante se calentó a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y se enfrió a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. A esta temperatura, se abrieron las válvulas en el fondo y en la parte superior del tanque y se permitió que la mezcla circulara a través de un canal lateral 108 en el reactor creando un bucle similar al mostrado en la figura 2.

Entre otras sondas, una sonda de diamante ATR-FTIR basado en fibra se localizó en este canal lateral. La sonda se conectó a una unidad FTIR adyacente, que en ese momento comenzó a registrar los espectros del líquido que pasaba través del canal lateral. La temperatura se mantuvo a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió polvo de amilosa en grado comercial al reactor/tanque de maceración 100.

Inicialmente los espectros mostraron rasgos característicos de almidón y maltodextrinas de cadena larga. Pero a lo largo del transcurso de una hora, la intensidad de la región de $1020\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ se incrementó mientras que se observó un incremento general de la señal de la parte restante de la región de $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

El cambio espectroscópico indicó que el almidón de patata se hidrolizó mientras que se incrementaron los compuestos de azúcar en la solución debido a la más elevada solubilidad de los compuestos derivados del almidón de cadena corta respecto a los compuestos de almidón de cadena larga. Simultáneamente con el registro en tiempo real de los espectros, se desconvolucionó cada espectro. Se usó la intensidad de todas las bandas en la región de $1160\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ para calcular la concentración total de compuesto derivado del almidón en la solución. La banda en $1030\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ se usó para calcular el grado promedio de despolimerización. Tan pronto como se alcanzó la composición óptima, se bombeó el contenido del reactor adicionalmente sobre una unidad de fermentación.

Ejemplo 6

En una planta de producción de aditivos de combustible bio-etanol de segunda generación, se pretrató inicialmente la materia prima que contenía paja y rastrojos de maíz a temperaturas y presiones elevadas con una solución de ácido sulfúrico diluido. Durante este tratamiento, se enfrió el lodo, y las fibras de celulosa cristalina se convirtieron todas en celulosa amorfa. Se extrajo la lignocelulosa amorfa, se lavó y se añadió agua con agente tampón. A continuación se añadió celulosa de grado comercial en polvo y se ajustó y mantuvo la temperatura a aproximadamente $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El proceso se supervisó mediante el análisis de la parte líquida del lodo que se envió a un instrumento 200, 300 de ATR-FTIR adyacente a la unidad de maceración 100. La muestra se extrajo continuamente mediante filtrado de las partículas mayores para impedir atascos. El lodo filtrado se transfirió a una cámara de diseño especial en la unidad ATR del instrumento FTIR.

Durante el primer período de operación de la maceración, la señal se incrementó significativamente en la región de $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ indicando la disolución de los oligómeros de celulosa a partir de las partículas de lignocelulosa amorfa en el lodo. Posteriormente, comenzó a estabilizarse la señal en la región mientras se observó una disminución marcada en la región de $1020\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ debido a la hidrólisis de los oligómeros en la celulosa. Cuando el cambio por minuto en la región de $1020\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ pasó por debajo de un cierto valor límite de umbral, se envió automáticamente un mensaje de activación de realimentación desde el analizador ATR-FTIR a un sistema de control del proceso. En este umbral la actividad de la enzima disminuyó, y el lodo consistió fundamentalmente en partículas de lignito y glucosa y una menor parte de celobi- y tri-osa y oligómeros de longitud de cadena mayor. El mensaje de activación enviado al sistema de control del proceso activó una bomba con unidad de filtrado, y el filtrado se bombeó a una unidad de fermentación.

Ejemplo 7

Se realizó un mosto a microescala mezclando 225 g de cebada molida, malteada con 1 l de agua a $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un matraz cónico durante agitación magnética. Se ajustó el pH mediante la adición de 0,25 g de ácido cítrico. La temperatura se mantuvo a $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. A continuación se elevó la temperatura a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, y finalmente a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos. Durante las tres etapas de temperatura, se extrajeron partes alícuotas de unos pocos mililitros usando una pipeta durante la maceración, y se transfirió a un tubo de ensayo en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización de las enzimas. A continuación el precipitado se retiró por centrifugado, y se obtuvo un espectro de ATR-IR sobre la fase líquida clara restante, y se

determinó el índice de refracción en Brix % usando un refractómetro. La escala Brix se usa frecuentemente en la industria de alimentación y elaboración de cerveza, y es una forma conveniente para describir los índices refractivos de modo que se relacionen directamente con la cantidad total de carbohidratos disueltos en la solución.

5 Todos los espectros se corrigieron por ATR suponiendo un índice de refracción de 1,36 usando software Thermofisher OMNIC y se restó un espectro de agua pura de cada espectro del mosto. A continuación se determinó la absorbancia integrada desde 950 cm^{-1} a 1260 cm^{-1} y se trazó en función del valor de Brix % de la misma muestra. El trazado se muestra la figura 16.

10 La relación entre los dos muestra que la absorción de IR integrada sumada en la diferencia muestra una relación muy precisa con la cantidad total de carbohidratos disueltos durante la maceración. Por ello, puede supervisarse con precisión en tiempo real la cantidad total de carbohidratos disueltos durante la maceración usando espectroscopía de ATR-IR.

15 **Ejemplo 8**

En la bibliografía, se ha descrito que las partículas de la maceración provocarían problemas en la aplicación de espectroscopía ATR-IR, dado que los granos de almidón y partículas de cascarilla afectarían a los espectros de la fase de solución. Esto parece ser una percepción común entre los científicos expertos en el campo.

20 Aunque se observó que era parcialmente verdad en los momentos iniciales del experimento en los que algunos de los gránulos de almidón ultra pequeños realmente parecieron contribuir ligeramente a los espectros, esto tuvo muy poca influencia técnica sobre la invención. Dado que se encontró que las partículas de estado sólido solo influyen en la supervisión en las etapas muy tempranas del experimento; es decir los gránulos no tienen efecto durante las etapas interesantes de la maceración (después de los primeros pocos minutos).

En el laboratorio se realizó una maceración de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 7 previo. Alrededor de 20 minutos dentro de la maceración de una muestra de aproximadamente 2 ml se transfirió a un tubo de ensayo en un baño de hielo para apagar la reacción de hidrólisis enzimática.

30 La muestra en este punto era muy lodosa y aparecía lechosa y opaca debido a los finos gránulos de almidón y las finas partículas de cascarilla. A continuación parte del lodo amarillento se transfirió con una piqueta a un espectrómetro FTIR con un dispositivo ATR de diamante, y se registró un espectro de IR mientras la muestra se mantenía constantemente en movimiento usando una piqueta, es decir agitada con una piqueta. Se tomaron los espectros de la muestra estática sin mantenerla en movimiento. Finalmente el cristal se limpió completamente con un tejido húmedo y algo más de la misma muestra se transfirió al cristal de ATR.

40 En el último momento la muestra se transfirió al cristal de ATR usando una jeringa equipada con un filtro de jeringa de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. El espectro de este líquido claro fue idéntico al espectro previo de la muestra de lodo, demostrando que las partículas en el mosto no influyen en los espectros registrados. Se comparan los tres espectros en la figura 17 mostrando la misma muestra alícuota durante la maceración, con y sin filtrado. En el caso de la muestra sin filtrar, se investigó el efecto de la agitación de la muestra mientras se registraba.

45 La ilustración de la figura 18 muestra el mecanismo detrás del fenómeno observado en la figura 17. Siempre que las partículas en el lodo sean significativamente mayores que la penetración, profundidad de la onda evanescente, su contribución es despreciable al espectro registrado. Es decir el espectro registrado es en la práctica independiente de las partículas y solamente se registra siempre la parte disuelta del lodo. La onda evanescente enfocada solo penetrará en una película muy delgada del líquido. La profundidad de penetración de la onda evanescente es magnitudes más pequeñas que los gránulos de almidón y partículas de cascarilla típicos en el lodo, excluyendo en la práctica los gránulos de los espectros, y obteniendo un espectro de líquido puro.

50 **Ejemplo 9**

55 Un modelo quimiométrico basado en los espectros de IR en el modelo de la región de huella debe confiar en todos los posibles detalles para discriminar entre compuestos muy similares con precisión razonable, especialmente con respecto a la presente invención en la que pequeños cambios en la estructura de las biomoléculas han de ser cuantificados usando ATR-FTIR. En primer lugar merece la pena considerar naturalmente los cambios espectroscópicos debidos a cambios de la estructura primaria. En una hidrólisis enzimática de un biopolímero, estos serían cambios directamente relacionados con la rotura de los enlaces poliméricos. En este caso el cambio espectroscópico directo se relacionaría con la desaparición de las bandas de frecuencia del grupo primario de o bien enlaces peptídicos en proteínas o bien enlaces glucosídicos en carbohidratos respectivamente.

65 Sin embargo puede ser crucial considerar nuevas características espectrales debido a la estructura secundaria. Los cambios en la estructura secundaria deberían entenderse como cambios que tienen lugar o se hacen posibles como consecuencia indirecta del cambio en la estructura primaria, por ejemplo la rotura de un enlace glucosídico o peptídico durante la maceración.

Este ejemplo muestra cómo la presente invención confía en un método más sofisticado, del que se usa normalmente en la quimiometría basada en espectroscopía que frecuentemente confía solamente en el análisis estadístico ciego. En este método es importante: 1) identificar, 2) entender y a continuación 3) cuantificar racionalmente y aprovechar los cambios de la estructura secundaria que se hacen posibles súbitamente o se inducen indirectamente por el proceso enzimático primario. La rotura de por ejemplo un enlace peptídico no solo daría como resultado la pérdida de los modos de vibración característicos del enlace peptídico sino también como resultado la creación de tanto un grupo amina como un ácido carboxílico.

En dichos casos los discriminadores más importantes son más probablemente estos cambios secundarios. En este ejemplo especialmente, el aspecto de modos significativamente diferentes debido a los dramáticos cambios en la simetría, especialmente si el producto es iónico, es al menos tan útil como el cambio en la estructura primaria. Esto se ilustra en la figura 19 que muestra la hidrólisis de un enlace peptídico que permite que se desarrollen varias nuevas especies, con muy diferentes propiedades simétricas y espectroscópicas. Sin embargo, el uso estadístico unilateral de las nuevas firmas espectroscópicas ilustradas requeriría un conjunto de calibración muy grande. Pero eso haría adicionalmente a este planteamiento muy limitado en un sentido técnico, en el que sería solo válido en un intervalo de pH muy estrecho. El planteamiento presentado de aquí en adelante aplica una interpretación cualitativa junto con una cuantificación y da como resultado un modelo que es mucho más rico y versátil en sus predicciones.

Como se muestra en la figura 20, la hidrólisis del amilo-almidón facilita un cambio de estructura secundaria, dado que el extremo de reducción no permanecerá en la forma de α -piranosa sino que entrará en un equilibrio con la forma beta. En solución acuosa, existe D-glucosa como un equilibrio entre las formas α - y β - de glucopiranosa, en una relación de aproximadamente 34 %: 66 % respectivamente. Este equilibrio es muy dinámico y las dos formas son intercambiables a través de mutarrotación.

En la forma original del fragmento de amilosa todos los grupos C-O anoméricos están en la configuración α (véase el círculo de puntos en (a)). Durante la hidrólisis se realiza un "extremo de reducción". En el extremo de reducción el carbohidrato puede transformarse en el anómero beta, que es ligeramente más estable que el anómero α . Lo mismo es verdad para el extremo de reducción de los di-, tri-, oligo- y polisacáridos que también se someten a mutarrotación.

Hay una diferencia significativa entre la firma espectroscópica de la α - y β - glucopiranosa como se demuestra la figura 21a y en la figura 21b.

La figura 21a muestra la conversión de la forma α -glucopiranosa anomérica pura en la mezcla racémica a temperatura ambiente. La línea discontinua muestra la forma α pura. Tonos más ligeros en los espectros corresponden a marcas de tiempo anteriores en el experimento mientras que las más oscuras corresponden a las últimas marcas de tiempo.

La figura 21b muestra la comparación de la α -D-glucopiranosa disuelta pura con mezcla racémica de las formas α y β de D-glucopiranosa en equilibrio.

Los espectros se obtienen mediante la disolución rápidamente de 12,5 en peso/volumen de α -D-glucopiranosa cristalina pura (Sigma-Aldrich) en agua y registrando continuamente los espectros de la solución usando una celda de ATR de germanio a temperatura ambiente durante 90 minutos (primeros espectros registrados en menos de 1 minuto desde el comienzo de la mezcla). A continuación se cubre la muestra para evitar la evaporación. Durante el experimento, el cambio de la forma α -D-glucopiranosa pura de glucosa a la mezcla de ambas formas α y β puede observarse *in situ*. Después de 90 minutos no se observan cambios en las características espectrales, por ello las formas α y β han alcanzado el equilibrio.

Los espectros son idénticos a muestras almacenadas durante más de 24 horas. Dos indicadores espectroscópicos significativos son que la intensidad de la banda a 1080 cm^{-1} es mucho más fuerte en la forma β , mientras que las bandas de 1055 cm^{-1} y 1150 cm^{-1} son mucho más intensas en la forma α . Dado que los modos activos de IR en el área de la huella en la mayor parte de los casos tienen un origen muy complejo y mezclado comprendiendo cada uno varios modos de flexión OH y CH combinados con varios modos de estiramiento C-O la reorientación de un único grupo C-O puede hacer que cambien varios modos espectroscópicos.

Esto es, además de la medición de las vibraciones del grupo del enlace glucosídico en sí, también una buena medida de la hidrólisis, dado que permite que se cuantifique la concentración de "extremos de reducción".

Sin embargo, el uso en tiempo real de las características espectrales de la forma beta como una medida de hidrólisis, requeriría que la tasa de mutarrotación fuera significativamente más rápida que la tasa de hidrólisis del almidón. Si la cinética en el equilibrio anomérico fuera más lenta que la tasa de hidrólisis, esto convertiría en muy exigente el modelizado quimiométrico en tiempo real del proceso.

La cinética en el equilibrio es, tal como se muestra en la figura 20, relativamente lenta a temperatura ambiente. No es posible realmente para un experto en la materia en general llegar a un juicio final sobre cómo es la cinética del

equilibrio respecto a la hidrólisis a temperaturas de proceso elevadas y más realistas.

Por lo tanto, la mutarrotación *in situ* se realiza a 60 °C que es más típico para la mayor parte de los procesos de hidrólisis enzimática, por ejemplo maceración de cereales malteados, dado que esta temperatura es próxima a la temperatura de gelificación del almidón. El calentamiento se introduce en un dispositivo de calentamiento eléctrico casero colocado en la parte superior del dispositivo de ATR de germanio que puede mantener condiciones isotérmicas. La temperatura se supervisa adicionalmente, mediante un termopar muy próximo al cristal de germanio. A continuación se mezcla la α -D-glucopiranososa con agua a temperatura ambiente y a continuación se transfiere rápidamente al cristal de germanio caliente a 60 °C cubierto con el bloque de calentamiento mientras se registra continuamente los espectros de IR. Los espectros de IR se muestran en la figura 22 mostrando la conversión *in situ* de α -glucopiranososa, es decir la mezcla racémica de las formas α y β a 60 °C. La línea discontinua es el espectro de la forma α pura a $t=0$. Los tonos más ligeros en los espectros corresponden a las marcas de tiempo más tempranas en el experimento mientras que las más oscuras corresponden a las marcas de tiempo últimas.

El experimento demuestra claramente que la cinética es muy rápida en condiciones de maceración típicas, y las bandas asociadas con la cantidad incrementada de la forma β -glucopiranososa en cadenas de oligosacáridos más cortas es una buena medida alternativa de la hidrólisis global del almidón.

El experimento se realiza tanto con como sin el 0,25 % en peso/volumen de ácido cítrico añadido al agua previamente a la disolución de la α -glucopiranososa, y la tasa de mutarrotación se observa que es independiente de la presencia de las pequeñas cantidades de ácido cítrico. El ejemplo demuestra claramente la importancia de este indicador espectroscópico inesperado e indirecto durante la hidrólisis. Análogamente esto se aplicaría a los sistemas relacionados. Un ejemplo es el caso de la hidrólisis de la celulosa (β -(poli-(1,4)-glucopiranososa), en el que la forma de hidrólisis daría como resultado una cantidad más alta de la α -glucopiranososa debido al mecanismo descrito anteriormente.

Ejemplo 10

Hay disponibles comercialmente varios tipos de maltodextrinas, todas caracterizadas por su poder reductor en equivalente de dextrosa (DE). El número DE se mide por la capacidad de los azúcares para reducir Cu(II) a Cu(I), y que ha sido la forma estándar de la industria para medir los valores de DE para carbohidratos. En los que la glucosa pura se define como DE=100 mientras la maltosa y la maltotriosa, por ejemplo, tienen valores de DE de 50 y 33 respectivamente, una maltodextrina de un grado de polimerización promedio (ADP) de 8 tendría un número de DE de:

$$DE = 1/8 = 12,5 \quad [2]$$

Para oligosacáridos derivados del algodón, el grado promedio de polimerización es el valor recíproco de DE.

$$DE = 1 / (\text{ADP}) \quad [3]$$

La reducción se realiza en un gran excedente de Cu(II). Dado que el Cu(II) está mucho más coloreado que el verde azulado ligeramente pálido del Cu(I), el método tradicional de determinación de la concentración de Cu(I) tras la reducción ha sido la titulación de Lane-Eynon, o mediante métodos gravimétricos, que son métodos bastante laboriosos. Adicionalmente, estos métodos son inherentemente imposibles de realizar en tiempo real.

Aquí se adapta un método más nuevo y bien establecido, que permite que se determine la concentración de Cu(I) colorimétricamente como un complejo morado fuerte cuando se añaden aniones 2,2-biquinolina-carboxilato. Adicionalmente se determina gravimétricamente el contenido de humedad de todas las maltodextrinas mediante calentamiento de todos los azúcares a 105 °C durante 1 a 2 horas, y se calculan los valores de DE y ADP con respecto a la fracción seca de las maltodextrinas.

El uso de esta bien conocida técnica ortogonal se ha descubierto que es una buena forma de validar la precisión del método aplicado por la invención actual. Se prepararon reactivos de acuerdo con (Zhang, Y.-H. P.; Lynd, L. R. Biomacromolecules 2005, 6, 1510-1515.). El tiempo de reacción a 75 °C se incrementó desde 30 minutos a exactamente 60 minutos. Se usaron 5 diluciones diferentes para cada carbohidrato y se midió la concentración del complejo 2,2-biquinolina-carboxilato-Cu(I) a través de la absorbancia a 560 nm. El valor de DE se determinó a partir de la pendiente mediante regresión lineal, con todos los valores de R^2 mayores de 0,999, por comparación con una glucosa estándar. Los valores de DE se dan en la Tabla 1.

Tabla 1

Valores de ADP para productos de hidrólisis de almidón comercial, obtenidos mediante el uso de la determinación colorimétrica del poder reductor de los azúcares de Cu(II) con respecto a la glucosa estándar.				
Carbohidrato	Mono hidrato de maltosa (sigma-aldrich)	Hidrato de maltotriosa (Sigma-Aldrich)	"Maltodextrina DE=16,5-19,5" (Sigma-Aldrich)	Glucidex12
ADP (de la reducción del Cu(II))	2,01	3,02	5,54	10,5
RDP correspondiente	0,502	0,669	0,819	0,905

Dado que la espectroscopía ATR-IR es una forma de realizar espectroscopía de IR por transmisión, y la profundidad de penetración a una cierta longitud de onda siempre será constante para muestras con índices de refracción similares, es directamente aplicable la ley Lambert Beer tal como se ha presentado en la ecuación 1.

Para realizar adicionalmente el análisis de los valores de ADP genéricos para todas las concentraciones de sustrato durante la maceración se introduce un término indicado por el grado relativo de polimerización (RDP, del inglés "Relative Degree of Polymerisation"). En el caso general de un sintético o bio-polímero, el valor de RDP sería:

$$\text{RDP} = n_{\text{enlaces_poliméricos}} / n_{\text{total_unidades_monoméricas}} \quad [4]$$

En los casos especiales los productos de hidrólisis tanto de almidón como de celulosa el RDP se define:

$$\text{RDP} = n_{\text{enlacesglucosídicos}} / n_{\text{total unidades glucosa}} = (n_{\text{total unidades glucosa}} - 1) / n_{\text{total unidades glucosa}} \quad [5]$$

Por ejemplo, el monómero tendrá un valor de RDP igual a cero, el dímero tendrá un valor de 0,5, mientras que en el heptámero de 6/7 y así sucesivamente. Con este concepto presentado del RDP, se hace posible crear calibraciones universales para determinar el grado promedio de polimerización independientemente de la concentración absoluta de carbohidratos.

Se prepararon soluciones del 15 % en peso de carbohidratos, de cada uno de los carbohidratos presentados en la tabla 1. Se registraron espectros de todas las muestras mostrados en la figura 23 usando un dispositivo de ATR de diamante a 45°. El modelo usado para desconvolucionar los espectros se indicó en los espectros.

Todos los espectros de la figura 23 se analizaron de la siguiente manera: los espectros se corrigieron por ATR para aproximar a los espectros de transmisión verdaderos correspondientes, a continuación se restó un fondo de agua para cada espectro. Finalmente cada uno de los espectros diferencia corregidos por ATR se desconvolucionaron usando un modelo que comprendía funciones pseudo-voigt. Durante la desconvolución, se restringió la posición y ancho de banda de las curvas de distribución y solamente se optimizó la amplitud, para asegurar que las bandas no migraban aleatoriamente durante la desconvolución. Para adoptar alguna flexibilidad debido al ligero desplazamiento de las bandas, en algunos casos algunas bandas se dividieron en dos bandas con posiciones muy próximas entre sí. Por ejemplo las bandas a aproximadamente 1080 y 1152 cm⁻¹ se representaron respectivamente por la suma de las bandas a 1078 + 1081 cm⁻¹ y 1148 + 1154 cm⁻¹. Cada una de las áreas de las bandas obtenidas se normalizó dividiendo por la suma de todas las bandas desde la desconvolución. Dividir el área total es equivalente a normalizarla con la concentración total de carbohidratos disueltos. Esta es claramente una muy buena aproximación como se demostró en el ejemplo 8 que mostró claramente que la concentración total de carbohidratos disueltos es proporcional al área integrada de todas estas bandas.

Trazando varias de las áreas de las bandas desconvolucionadas contra los valores de RDP obtenidos a partir de los valores de DE desde el Vis espectroscópico Cu(II)-Cu(I)- 2,2-biquinolina-carboxilato, como se muestra la figura 24, se muestra que mediante la aplicación del nuevo método, pueden obtenerse los mismos valores a partir de IR en tiempo real, sin tener que añadir reactivos. Esto tiene unas ventajas enormes tanto en términos de simplicidad del método como de facilidad con la que puede llevarse a cabo y también en términos de costes.

La figura 24 muestra las áreas de la banda integradas a partir de las desconvoluciones de los cuatro espectros mostrados en la figura 23, que muestran unas muy buenas correlaciones estadísticas con los valores de RDP de los carbohidratos.

El ejemplo 8 muestra que los espectros de IR pueden usarse para establecer buenos valores para la cantidad total de carbohidratos disueltos durante la maceración. Además de esto el presente ejemplo 10 muestra que la presente invención puede usarse para determinar con precisión el grado promedio de polimerización de los azúcares totales disueltos, que es un valor que no puede obtenerse rápidamente por cualquier otro medio.

Ejemplo 11

Como se ha explicado anteriormente en el Ejemplo 10, las maltodextrinas se caracterizan frecuentemente a través de sus valores de DE. Sin embargo, el número de DE en solitario no describe la maltodextrina completamente, dado que la relación de los enlaces α -(1-4) y α -(1-6) glucosídicos puede variar independientemente del número de DE. La maltodextrina usada en por ejemplo estudios de calibración debe tener una distribución realista tanto del enlace glucosídico α -(1-4) como del α -(1-6).

El almidón está compuesto principalmente de glucosa enlazada con enlaces α -(1-4) glucosídicos, que realizan la mayoría de los enlaces glucosídicos del tipo α -(1-4). Sin embargo especialmente la parte de amilopectina del almidón se ramifica debido a una cantidad más pequeña de enlaces α -(1-6) glucosídicos. Debido a esta ramificación grosso modo aproximadamente el 5 % del enlace glucosídico en almidón típico es α -(1-6) mientras que el resto es α -(1-4). Como la mayor parte de las amilasas solo pueden hidrolizar el α -(1-4) glucosídico, la mayoría de los enlaces α -(1-6) glucosídicos nativos en el almidón permanecen intactas durante el proceso de hidrólisis, dado que son mucho más resistentes a la mayor parte de los ataques de la amilasa. Por lo tanto la cantidad de enlace α -(1-6) glucosídico de residuo en la hidrólisis final de la mayor parte de los almidones, contribuye significativamente a los enlaces glucosídicos de los oligosacáridos no hidrolizados, y no puede ignorarse desde un punto de vista espectroscópico.

Así una solución de iso-maltotriosa (α -D-glucopiranos-(1,6)- α -D-glucopiranos-(1,6)-D-glucosa, Sigma-Aldrich) se usa como una referencia para las características espectrales puras del enlace α -1,6-glucosídico. Adicionalmente, se compra el α -(1,6)-glucosa-oligosacárido VitaFiber comercial y alimentariamente aprobado de diferentes distribuidores. Aunque el VitaFiber se compone principalmente de α -(1,6)-glucosa-oligosacáridos con una pequeña fracción de α -(1,6)/ α -(1,4) glucosa-oligosacáridos mezclados. Estos dos compuestos α -(1,6) glucosídicos se comparan a continuación con una maltodextrina comercial (ADP=5,54, sigma) y maltotriosa pura.

La figura 25 muestra los espectros de una solución del 12,5% peso/volumen de ISO-maltotriosa, oligosacárido VitaFiber, maltodextrina Sigma-Aldrich, maltotriosa y agua. La diferencia en la absorción a alrededor de 1000-1030 cm^{-1} muestra una diferencia sorprendente entre las características espectroscópicas de los enlaces α -(1,4) glucosídicos y α -(1,6).

Es bastante evidente que los enlaces α -(1,6) aisladas son bastante diferentes, y la α -(1,4)-maltotriosa e iso-maltotriosa mostraron diferencias significativas. Especialmente a aproximadamente 1025 cm^{-1} la absorción de los modos de vibración acetal es significativamente más fuerte en los isómeros α -(1,6). Adicionalmente, el modo 1155 cm^{-1} del modo de estiramiento CO-C glucosídica antisimétrico se desplaza ligeramente hasta aproximadamente 1160 cm^{-1} .

El VitaFiber y la maltodextrina comercial corta se encuentran ambas entre las dos muestras puras (iso-maltotriosa y maltotriosa), mostrando que ambas contenían una cantidad significativa de ambos tipos de enlaces glucosídicos. Especialmente dado que la maltodextrina se fabrica por medio de hidrólisis parcial del almidón natural, es un modelo muy realista para el desarrollo de la maltodextrina durante los procesos de maceración real. Por lo tanto se concluye que la maltodextrina de baja ADP comprada en Sigma-Aldrich serviría como un modelo realista con una reacción realista de los enlaces glucosídicos α -(1,6)/ α -(1,4). Adicionalmente este ejemplo muestra que la presente invención, bajo las circunstancias correctas, es capaz de discriminar y cuantificar diferentes tipos de glucósidos en mezclas. Tomando especialmente el ejemplo 9 en cuenta, los resultados anteriores, en combinación con un análisis de desconvolución y/o estadístico, puede usarse para elaborar un modelo multivariante que pueda discriminar y cuantificar los tipos de enlace glucosídico además del valor de ADP en tiempo real durante un proceso de maceración.

Ejemplo 12

Durante los últimos 50 años se ha discutido ampliamente la localización exacta de la vibración glucosídica en carbohidratos poliméricos. Se han presentado varias controversias a todo lo largo de los años basándose en argumentos e índices, sin ninguna prueba sólida solo a partir de experimentos, sobre dónde localizar las frecuencias características del enlace glucosídico. Por lo tanto, parece aparentemente imposible realizar un análisis en profundidad de la región de huella de los espectros de IR de los carbohidratos, incluso para una persona simultáneamente experta en las materias de espectroscopía y química. Esto es especialmente verdadero para las características que se relacionan con el grado de polimerización.

Ejemplos previos en la biografía han fracasado en el uso de análisis estadísticos tales como análisis parcial de mínimos cuadrados (PLS), para discriminar di- y trisacáridos similares como maltosa y maltotriosa basándose en datos de IR experimentales. Cuando por otro lado técnicas estadísticas bien demostradas en estudios previos para discriminar mezclas muy simples de carbohidratos, han fallado, esto ha conducido a la suposición de que no es posible usar los IR para discriminar los tipos de azúcar y su grado de polimerización.

A partir de la estructura electrónica, pueden calcularse los modos normales de mecánica cuántica de la molécula, así como una buena estimación del dipolo oscilante en función del modo normal. Esto significa que puede generarse un espectro en infrarrojo muy realista a partir de la estructura electrónica. Esto permite una interpretación mucho

más cualificada de los espectros experimentales, dado que cada banda en los espectros experimentales puede asignarse a un modo normal bien descrito en mecánica cuántica.

Se estudiaron los modos normales de la amilosa bajo la mecánica cuántica usando teoría funcional de densidad en la glucosa, maltosa y maltotetraosa. Primero se minimizó la energía de la estructura electrónica de cada carbohidrato mediante el uso de B3LYP funcional y del conjunto base 6-31 G(d) usando un paquete de software comercialmente disponible. A continuación se calcularon los espectros de IR, y el espectro calculado se corrigió para desarmar con un factor de escala de 0,98 de acuerdo con la práctica común en la bibliografía.

El espectro teórico está en buena concordancia con las bandas experimentales, y revela que el enlace glucosídico está implicado en varios modos de vibración característicos. La banda intensa media a 1155 cm^{-1} se asigna a la vibración CO-C antisimétrica de la banda glucosídica. Aunque la glucosa y los extremos no reductores también tienen absorciones en la misma región, debido al estiramiento C4-O, estas vibraciones tienen lugar con números de onda ligeramente más bajos y con intensidades significativamente más bajas. Las bandas fuertes a alrededor de $1035\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ pueden relacionarse con modos que comprenden vibraciones fuertes de los modos de estiramiento O-C-O alrededor de los grupos acetal de los anillos de glucopiranososa. Los enlaces α -(1,4) glucosídicos dieron lugar a una absorción fuerte media mientras que el modo similar en el caso de los enlaces α -(1,6) glucosídicos tuvieron incluso una absorción más fuerte, lo que explica de nuevo la diferencia del espectro presentado para maltotriosa e ISO-maltotriosa mostrado en la figura 25.

Ejemplo 13

Se prepararon tres soluciones raíz: 15 % en peso/volumen de glucosa (anhidro, contenido de agua < 1 %), maltosa (15 % en peso/volumen con respecto a la masa del monohidrato de maltosa, Sigma-Aldrich) y maltodextrina (ADP=5,54, comprada en Sigma-Aldrich). A continuación se produjeron mezclas de estas, de acuerdo con la tabla 2, mediante la mezcla de alta precisión con auto pipeta. Se registró un espectro FTIR de cada una de las 21 normas de calibración usando una celda de ATR de germanio a 45° por reflexión horizontal 10 y un espectrómetro Nicolet iS5. Todos los espectros se corrigieron por ATR usando un índice de refracción de 1,36, para todas las muestras. Se realizó un análisis de desconvolución de todas las 21 muestras análogo al método descrito en el ejemplo 10, pero con parámetros ligeramente ajustados. Adicionalmente, la base de agua usada para generar el espectro diferencia es una aproximación analítica mediante un polinomio de grado más alto. Adicionalmente se aplicó un algoritmo que corrigió el espectro respecto a deriva, mediante el análisis de varias absorciones con longitudes de onda más altas y más bajas en las que la absorción global de las características carbohidrato es más baja.

Tabla 2

entrada	Glucosa	Maltosa	maltodextrina	RDP
21	30 %	70 %	0 %	0,350
20	25 %	70 %	5 %	0,391
19	20 %	70 %	10 %	0,432
18	15 %	70 %	15 %	0,473
17	10 %	70 %	20 %	0,514
16	5 %	70 %	25 %	0,555
15	0 %	70 %	30 %	0,596
14	0 %	65 %	35 %	0,613
13	0 %	70 %	30 %	0,596
12	0 %	75 %	25 %	0,580
11	0 %	90 %	10 %	0,532
10	0 %	95 %	5 %	0,516
9	0 %	98 %	2 %	0,506
8	0 %	100 %	0 %	0,500
7	15 %	50 %	35 %	0,538
6	15 %	55 %	30 %	0,521
5	15 %	60 %	25 %	0,505
4	15 %	75 %	10 %	0,457
3	15 %	80 %	5 %	0,441
2	15 %	83 %	2 %	0,431
1	15 %	85 %	0 %	0,425

En el ejemplo 10, se muestra que los IR pueden determinar los valores de ADP de di- y oligosacáridos puros, sin embargo en la mayor parte de los casos técnicos de maceración las diferencias en los valores de ADP son de lejos más pequeños.

- 5 En las figuras 27 y 28, se presentan diez bandas o combinaciones de áreas de bandas en función del RDP de las mezclas.

10 Las figuras 27-28 muestran correlaciones entre las áreas de banda desconvolucionadas del espectro de la figura 26 y el grado relativo de polimerización a diferentes longitudes de onda. Los diferentes trazados de regresión comparan todo el conjunto de datos en los que se eliminan respectivamente las muestras que contienen o bien glucosa o bien maltodextrina.

15 Los trazados presentados se eligen dado que todos ellos muestran una clara buena correlación con el valor RDP, mientras que no se muestran los trazados que solo muestran una muy pobre correlación estadística. Especialmente para los trazados que muestran la correlación entre el RDP y las áreas de bandas sumadas $1078+1081\text{ cm}^{-1}$, 1110 cm^{-1} y $1078+1081+1110+1130\text{ cm}^{-1}$ respectivamente todas muestran muy buena correlación; todas con valores de R^2 próximos a o por encima de 0,98. Estas bandas se mostraron, en el ejemplo 9, para correlacionarlas con el estiramiento C-O + flexión OH/CH específica para tanto la cadena principal de α o β -D-glucopiranososa. Estas bandas parecen las globalmente preferidas de un descriptor universal en este caso para determinar el RDP durante la maceración en un cierto momento, independientemente de la composición de carbohidrato específica. La banda a 1036 cm^{-1} presenta también en este ejemplo muy buena correlación con el RDP, pero se mostrará posteriormente que esto es solo verdadero para casos específicos. Posteriormente se mostrará cómo la banda de 1036 cm^{-1} puede aprovecharse para suministrar información específica del compuesto adicional sobre la composición de la muestra.

25 Se usaron diferentes partes del conjunto de datos para análisis estadístico para realizar una comparación con diferentes correlaciones del compuesto con los valores el RDP. La correlación entre el RDP y las bandas anteriormente mencionadas ($1078+1081\text{ cm}^{-1}$, 1110 cm^{-1} , $1078+1081+1110+1130\text{ cm}^{-1}$ y 1036 cm^{-1}) no mostraron cambios significativos tras la variación de las muestras que se incluyeron en el conjunto de datos. Esto muestra adicionalmente que, en caso de mezclas de glucosa, maltosa y maltodextrina, son buenos descriptores universales para el RDP independientemente de la composición específica de la muestra.

30 Sin embargo, incrementa ampliamente la utilidad de la presente invención que la tendencia universal anterior no se aplique a todas las bandas integradas y correlaciones del RDP. Para los casos de correlación del RDP y áreas de banda para las bandas de 1003 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} así como la suma de ambas, la correlación global en principio parece pobre y con ruido en comparación con las bandas anteriormente descritas ($1078+1081\text{ cm}^{-1}$, 1110 cm^{-1} , $1078+1081+1110+1130\text{ cm}^{-1}$ y 1036 cm^{-1}).

35 Sin embargo, cuando se tuvieron en cuenta solamente partes del conjunto de datos la imagen fue muy diferente. Especialmente en los casos en los que se eliminaron todas las muestras que contenían glucosa antes de la regresión, la relación se convirtió en significativamente mejor (R^2 se incrementó desde 0,85 a aproximadamente 0,975) y la ecuación que describe la correlación cambió con una pendiente marcadamente diferente. De modo similar, la correlación mejoró cuando se eliminaron todas las muestras que contenían maltodextrina. Esto muestra claramente que la dispersión de datos aparente para estas bandas, no es ruido. Estas bandas son, además de correlacionarse de alguna forma con el RDP global, muy dependientes de la composición específica de carbohidrato de la muestra. A partir de este análisis representado es obvio que estas bandas juegan un papel especial en la calibración multivariante durante la maceración de almidón que contiene materia prima, en lo que parece especialmente poderoso en la estimación de la concentración de glucosa, por encima del grado promedio de polimerización sin más.

40 Un ejemplo del aprovechamiento de la información específica del compuesto embebida en las bandas de 1003 cm^{-1} y 1022 cm^{-1} en una calibración multivariante, podría ser comparar la divergencia de los valores del RDP obtenidos con las bandas de $1003-1022\text{ cm}^{-1}$ y las bandas de $1078-1130\text{ cm}^{-1}$ usadas anteriormente. Las bandas de $1078-1130\text{ cm}^{-1}$ parecen ser mucho más universales en su predictibilidad de los valores del RDP en la maceración del almidón.

45 Aunque la glucosa y la maltosa son ambos azúcares fermentables, la glucosa está presente en el mosto final en grandes concentraciones (10-30 % de los carbohidratos totales), y es normalmente el 2º carbohidrato más abundante en el mosto, después de la maltosa. Una relación de glucosa a maltosa baja dará como resultado un valor del RDP relativamente alto, sin la presencia de gran cantidad de maltodextrina y viceversa. Los principios anteriormente demostrados para modelizado multivariante que harían posible estimar la concentración de glucosa en la mezcla, son por lo tanto de gran importancia técnica en los procesos de maceración, especialmente en la industria de la elaboración de cerveza. Un valor preciso del RDP así como una buena estimación de la concentración de glucosa facilitará el cálculo en tiempo real del grado real de fermentabilidad durante la maceración, que es de gran valor técnico para el cervecero.

Finalmente, todas las muestras se diluyeron hasta el 11 % en peso/volumen y 7 % en peso/volumen respectivamente, y todas las muestras se registraron en sus estados diluidos. Los datos se procesaron en la misma forma que se ha descrito anteriormente, y se descubrió que las estadísticas eran de próximas a idénticas a la correlación anteriormente presentada, lo que mostró que el método de calibración del RDP realmente proporciona calibraciones independientes de la concentración.

Ejemplo 14

El ejemplo 13 previo muestra cómo la invención puede dar estimaciones para el valor del RDP así como la concentración de glucosa, lo que puede usarse para estimar el grado de fermentabilidad. Surge un desafío relacionado a partir de la aparición de la maltotriosa, que, desde un punto de vista espectroscópico, es similar a la maltosa. En la mayor parte de los procesos de maceración de almidón basado en materia prima, se produce una cantidad significativa de maltotriosa como subproducto (hasta el 5-20 % del carbohidrato total). Especialmente en el caso de procesos de maceración para la industria de elaboración de cerveza, sería de gran importancia técnica estimar las concentraciones de maltotriosa. Esto es especialmente relevante dado que no es fermentable por la mayor parte de tipos de levaduras, y por ello contribuye con residuos en el producto final, y que se hace referencia a ella frecuentemente en la industria de elaboración de cerveza justamente como una maltodextrina general.

Por ello se realiza otro conjunto de calibración de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 13, incluyendo esta vez maltotriosa en varias concentraciones, haciendo a los cuatro carbohidratos mezclados un sistema de modelo muy realista para la maceración de almidón real. La composición de la muestra puede verse en la tabla 3 y los espectros registrados se muestran en la figura 29.

Tabla 3

Entrada	glucosa	maltosa	maltotriosa	maltodextrina
1	0 %	95 %	0 %	5 %
2	0 %	85 %	10 %	5 %
3	5 %	85 %	5 %	5 %
4	10 %	85 %	0 %	5 %
5	5 %	75 %	15 %	5 %
6	10 %	75 %	10 %	5 %
7	15 %	75 %	5 %	5 %
8	20 %	75 %	0 %	5 %
9	5 %	65 %	25 %	5 %
10	10 %	65 %	20 %	5 %
11	15 %	65 %	15 %	5 %
12	20 %	65 %	10 %	5 %
13	5 %	55 %	35 %	5 %
14	10 %	55 %	30 %	5 %
15	15 %	55 %	25 %	5 %
16	20 %	55 %	20 %	5 %
17	0 %	75 %	10 %	15 %
18	10 %	75 %	0 %	15 %
19	0 %	65 %	20 %	15 %
20	15 %	65 %	5 %	15 %
21	20 %	65 %	0 %	15 %
22	0 %	55 %	30 %	15 %
23	5 %	55 %	25 %	15 %
24	10 %	55 %	20 %	15 %
25	15 %	55 %	15 %	15 %
26	10 %	55 %	20 %	15 %
27	5 %	55 %	25 %	15 %
28	0 %	75 %	0 %	25 %
29	5 %	65 %	5 %	25 %
30	10 %	65 %	0 %	25 %
31	0 %	65 %	10 %	25 %

32	20 %	55 %	0 %	25 %
33	15 %	55 %	5 %	25 %
34	10 %	55 %	10 %	25 %
35	5 %	55 %	15 %	25 %
36	0 %	55 %	20 %	25 %
37	0 %	45 %	30 %	25 %
38	10 %	45 %	20 %	25 %
39	20 %	45 %	10 %	25 %
40	30 %	45 %	0 %	25 %
41	0 %	60 %	0 %	40 %
42	5 %	50 %	5 %	40 %
43	10 %	50 %	0 %	40 %
44	0 %	50 %	10 %	40 %
45	10 %	40 %	10 %	40 %
46	0 %	30 %	30 %	40 %
47	10 %	30 %	20 %	40 %
48	5 %	30 %	25 %	40 %
49	0 %	0 %	0 %	100 %

Se realizó el mismo análisis estadístico en todas las áreas de bandas desconvolucionadas y normalizadas como en el ejemplo 13. El resultado del análisis de regresión puede verse en las figuras 30-33. Las figuras 30-31 son similares a los datos presentados en las figuras 27-28 y muestran las correlaciones de diferentes áreas de bandas con el RDP, con la exclusión de muestras que contenían glucosa, maltodextrina y maltotriosa respectivamente. Los parámetros del modelo de desconvolución se ajustaron ligeramente con respecto a los presentados previamente. Este es también el caso para el algoritmo de corrección de deriva así como para el procedimiento de resta del agua, que ahora usan una base experimental en lugar de la aproximación analítica.

Las tendencias estadísticas presentadas en el ejemplo previo se reproducen muy bien con el nuevo conjunto de datos. La tendencia puede verse en las figuras 30-31, con relación a la correlación entre las bandas de $1078+1081\text{ cm}^{-1}$, 1110 cm^{-1} y $1078+1081+1110+1130\text{ cm}^{-1}$, esta vez con muy buena evidencia estadística debido al mayor tamaño del conjunto de datos. Todas estas correlaciones son muy buenas, y las ecuaciones resultantes son casi idénticas cuando se compara el conjunto de datos global con casos en los que se excluyeron partes del conjunto de datos. La banda de $1148+1153\text{ cm}^{-1}$ también se comporta como en el ejemplo previo, y aun parece como un buen descriptor para el RDP aunque es ligeramente más ruidoso. También parece que el conjunto de datos revela que esta banda puede incluir algunos detalles más específicos del compuesto, con alguna variación en la ecuación resultante, sin embargo el número de muestras analizadas es demasiado pequeño para que el análisis sea conclusivo con relación a la banda de $1148+1153\text{ cm}^{-1}$.

El análisis de la correlación de las bandas de 1003 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} y $1003+1022\text{ cm}^{-1}$ con el RDP muestra una reproducción muy precisa de los resultados presentados en el ejemplo 13, y confirma que estas bandas son muy útiles en la discriminación de glucosa en las muestras. Sin embargo, es interesante hacer notar que la exclusión de la maltotriosa, da como resultado ecuaciones casi idénticas a las de la totalidad del conjunto de datos para la correlación de las bandas de 1003 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} y $1003+1022\text{ cm}^{-1}$ con RDP.

La correlación del área de la banda de 1036 cm^{-1} con el RDP es muy diferente del estudio libre de la maltotriosa presentado en el ejemplo previo. En el ejemplo previo el área de la banda de 1036 cm^{-1} se correlaciona muy bien con el RDP, para la totalidad del conjunto de datos, así como en los dos casos de exclusión de glucosa y maltodextrina, en este caso la correlación para la totalidad del conjunto de datos parece globalmente pobre y ruidoso en primer lugar, con $R^2=0,82$. Sin embargo, mediante la exclusión de ejemplos ricos en maltotriosa (punto de ajuste en el 5 %) la tendencia cambia significativamente; se reduce el ruido aparente, y el resto de los datos se correlacionan ahora bien con RDP con $R^2=0,943$.

Para investigar la influencia de la maltotriosa sobre el conjunto de datos en detalle, se investigaron con detalle adicional las muestras ricas en maltotriosa investigando también la correlación del área de la banda con el RDP, mediante la exclusión de las muestras pobres en maltotriosa. Estos trazados se muestran en las figuras 32 y 33.

La correlación de las áreas de las bandas 992 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , $1003+1022\text{ cm}^{-1}$, $1078+1081\text{ cm}^{-1}$, 1110 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , $(1078+1081+1110+1130\text{ cm}^{-1})$, $1148+1153\text{ cm}^{-1}$ fue constante, independientemente de si el conjunto de datos comprendía todas las muestras, muestras pobres en maltotriosa, o muestras ricas en maltotriosa. Sin embargo la correlación del área de la banda de 1036 cm^{-1} con el RDP muestra que es muy sensible a la

concentración de maltotriosa. Incluso incluyendo todas las muestras que contienen hasta el 10 y 15 % de maltotriosa, de la cantidad total de carbohidratos, mostró mejorar las estadísticas de la correlación así como el cambio de la pendiente de la ecuación resultante.

- 5 Las figuras 32-33 muestran correlaciones entre las áreas de las bandas desconvolucionadas del espectro en la tabla 3 y el grado relativo de polimerización. Los diferentes trazados de regresión comparan todas las áreas de bandas del conjunto de datos respecto al RDP, áreas de banda donde solo se incluyen muestras ricas en maltotriosa.

Ejemplo 15

10 En este ejemplo, se usaron 150 muestras de mezcla acuosa al 12 % en volumen/peso de soluciones de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina. La finalidad de los experimentos fue mejorar la precisión de la calibración multivariante que permite una mejor estimación de cada compuesto de carbohidrato específico. Las muestras se mezclaron en una forma tal que permitió un intervalo de diferentes valores de RDP. El conjunto de calibración
15 comprendió 5 subconjuntos de cada una de 30 muestras; conteniendo el primer subconjunto los cuatro componentes carbohidrato (glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina). En los cuatro subconjuntos posteriores, solo se incluyeron tres compuestos en cada subconjunto, excluyendo el último componente de carbohidrato, es decir el subconjunto 5 incluyó 30 muestras con un intervalo de diferentes combinaciones de los compuestos individuales conduciendo a un intervalo de valores del RDP:

- 20
25
- 1) Glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina
 - 2) Maltosa, maltotriosa y maltodextrina
 - 3) Glucosa, maltotriosa y maltodextrina
 - 4) Glucosa, maltosa y maltodextrina
 - 5) Glucosa, maltosa y maltotriosa

30 Se obtuvo para cada muestra un espectro ATR-IR, y se trató y desconvolucionó su espectro diferencia corregido por ATR de acuerdo con el ejemplo 14. Sin embargo, a diferencia de los ejemplos 13 y 14 se realizó regresión de mínimos cuadrados parcial (PLS) en lugar del análisis por regresión lineal comparativo manual. Con las estadísticas mejoradas del PLS es posible establecer un modelo multivariante que puede aplicarse a supervisión sobre la línea/en línea durante la maceración de diversos almidones. El modelo multivariante se aplica al líquido en maceración en tiempo real para suministrar estimaciones precisas del carbohidrato total disuelto y del RDP así como estimaciones de los cuatro carbohidratos anteriores (glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina). Estos valores se usan adicionalmente para calcular una estimación en tiempo real precisa del grado de fermentabilidad del mosto.

Ejemplo 16

40 Se produjo otra calibración que comprendía 280 soluciones de muestra de acuerdo con el procedimiento de los ejemplos 13-15. Sin embargo, se añadió maltotetraosa como un quinto componente, así como una maltodextrina de cadena larga (bajo valor de DE) como el sexto componente. La maltotetraosa se obtuvo a partir de jarabe de maíz alto en maltotetraosa comercial que tiene muy alto contenido de maltotetraosa, con fracciones menores de maltotriosa y maltopentatosa y sin casi glucosa ni maltosa. Usando el certificado HPLC suministrado por el fabricante puede calcularse la cantidad exacta de maltotetraosa y maltotriosa en cada muestra. El conjunto de calibración se dividió en siete subconjuntos, comprendiendo cada uno 40 muestras individuales con diferentes
45 mezclas de los seis componentes:

- 50
- 1) Glucosa, maltosa, maltotriosa, jarabe alto en maltotriosa, maltodextrina (DE=18) y maltodextrina (DE=5)
 - 2) Maltosa, maltotriosa, jarabe alto en maltotriosa, maltodextrina (DE=18) y maltodextrina (DE=5)
 - 3) Glucosa, maltotriosa, jarabe alto en maltotriosa, maltodextrina (DE=18) y maltodextrina (DE=5)
 - 4) Glucosa, maltosa, jarabe alto en maltotriosa, maltodextrina (DE=18) y maltodextrina (DE=5)
 - 5) Glucosa, maltosa, maltotriosa, maltodextrina (DE=18) y maltodextrina (DE=5)
 - 6) Glucosa, maltosa, maltotriosa, jarabe alto en maltotriosa, y maltodextrina (DE=5)
 - 7) Glucosa, maltosa, maltotriosa, jarabe alto en maltotriosa, maltodextrina (DE=18)

55 De nuevo los datos del espectro se desconvolucionaron y se realizó análisis PLS, para elaborar un modelo multivariante. El modelo multivariante puede aplicarse de nuevo en tiempo real para suministrar estimaciones precisas del carbohidrato disuelto total y del RDP así como estimaciones de los cuatro carbohidratos individuales anteriores (glucosa, maltosa, maltotriosa y maltodextrina). Estos valores se usan adicionalmente para calcular una estimación en tiempo real precisa del grado de fermentabilidad del mosto. Adicionalmente este modelo multivariante
60 puede realizar algunas estimaciones justificadas de las fracciones de las maltodextrinas. La longitud de la maltodextrina es frecuentemente importante en la industria de la elaboración de cerveza dado que las maltodextrinas cortas como la maltotriosa y la maltotetraosa son significativamente más dulces que aquellas con un grado más alto de polimerización.

65

Ejemplo 17

Se prepararon soluciones del 10,0 % en peso/volumen de fructosa, glucosa, sacarosa y una mezcla 1:1 de glucosa-fructosa y se le permitió que equilibrara. Se registró el espectro ATR-IR de las muestras, usando un dispositivo de ATR Golden Gate y se muestran en la figura 34. Los espectros de los 3 azúcares muestran características espectroscópicas muy diferentes. Es interesante que la mezcla 1:1 de glucosa - fructosa es marcadamente diferente de la sacarosa. Este ejemplo, en combinación con los ejemplos mencionados anteriormente, demuestra claramente cómo la presente invención puede aplicarse claramente para supervisar la hidrólisis de la sacarosa en la producción de jarabes invertidos, o en la producción enzimática de jarabes de fructosa a partir de jarabes de glucosa.

Ejemplo 18

Se construyó una versión del analizador de maceración similar al mostrado en la figura 11c. El analizador de maceración se conectó a un tanque de maceración de tamaño realista. A través de un bucle, el líquido de lodo en la unidad de maceración se bombeó continuamente sobre la unidad espectroscópica ATR-IR embebida en el analizador registrando un espectro cada minuto. La celda de ATR en la unidad de ATR_IR se inclinó en un ángulo suficientemente grande para permitir que el área de la muestra se drenara automáticamente por gravedad durante la no operación. El tanque de maceración se llenó con agua, se ajustó el pH añadiendo alrededor de 0,25 % en peso de ácido cítrico y el agua se calentó entonces a 57 °C. Se añadió cebada malteada al agua calentada en el tanque de maceración bajo agitación mecánica. Se analizó el espectro de IR en tiempo real de acuerdo con la metodología y calibraciones descritas en previos ejemplos. A partir del análisis de ADP y del azúcar total en Brix que se dan en tiempo real como se muestra en la figura 35, en la que los triángulos muestran los carbohidratos totales desarrollados durante la maceración obtenidos a partir del espectro de IR (escala del lado derecho) y los círculos muestran el valor de ADP basado en el análisis de las bandas de IR (escala del lado izquierdo). La línea discontinua ilustra el perfil de temperatura usado en la maceración.

Referencias

100	unidad de maceración
102	solución / mosto
104	unidad de agitación
106	guía de ondas / trayectoria de conexión óptica
108	canal lateral en el tanque de maceración
110	ordenador
112	pantalla
114	sonda óptica
116	fibra conectada la sonda óptica
118	orificio en el tanque
120	válvula de extracción y/o de recirculación
122	tanque de residuos
124	unidad de bombeo (opcional)
126	sonda de extracción
127	sonda de recirculación
128	entrada
130	salida
132	filtro
134	parte de la sonda de extracción
136	montaje de recipiente
200	espectrómetro de IR
202	caja
203	unidad de ATR-IR
204	luz de IR incidente
206	componente óptico / espejo
207	cristal en una placa de ATR-IR
208	abrazadera
210	luz de IR retro-reflejada
212	junta tórica
300	cámara de análisis / celda de ATR-IR
302	conector de entrada
304	conector de salida
400	unidad espectroscópica
401	unidad de montaje sellado
402	recinto espectroscópico
403	unidad de ATR-IR
404	placa
406	espectrofotómetro

	407	cristal
	409	pantalla
	408	ordenador
	410	antena
5	411	cubierta
	412	montaje de tanque
	414	sello
	416	abrazadera
	500	unidad de bombeo
10	501	carcasa
	502	motor
	504	cabezal de bomba
	506	celda de flujo
	600	unidad de filtrado
15	602	manguera

REIVINDICACIONES

1. Un método para el control de un proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo un proceso de maceración, en donde el método comprende las acciones de:

- a) proporcionar una muestra a un sistema con un tanque;
- b) obtener una mezcla de muestra:

- añadiendo una o más enzimas a la muestra si la muestra no contiene ya una o más enzimas o
- añadiendo posiblemente una o más enzimas a la muestra que ya contiene una o más enzimas;

- c) exponer continuamente una parte de la mezcla de muestra a un espectrómetro de infrarrojos (IR);
- d) medir continuamente los espectros de IR de reflectancia total atenuada (ATR) de la mezcla de muestra con el espectrómetro de IR en tiempo real en longitudes de onda entre $400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ durante el proceso de pretratamiento enzimático y
- e) suministrar los espectros de IR medidos a una unidad de cálculo que:

- calcula la información con relación a las especies específicas presentes en la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático basándose en los espectros de IR, en donde la información con relación a las especies específicas presentes en las mezclas de muestra es:

- la relación entre las diferentes especies específicas y/o
- la concentración de una o más de las especies específicas y/o
- el grado de polimerización de una o más de las especies específicas; y

- realimenta la información con relación a las especies específicas en la mezcla de muestra al usuario y/o a un sistema de control del tanque conectado al tanque.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de:

- f) detener el proceso de pretratamiento enzimático cuando:

- se obtiene una relación predeterminada entre las especies específicas en la mezcla de muestra y/o
- la concentración de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado y/o
- el grado de polimerización de una o más de las especies específicas alcanza un nivel predeterminado,

en el que el proceso de pretratamiento enzimático lo detienen tanto manualmente el usuario como automáticamente el sistema basándose en la información proporcionada desde la unidad de cálculo.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de agitar la mezcla de muestra durante al menos parte del proceso de pretratamiento enzimático.

4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se añade agua a la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático, por ejemplo junto con la posible adición de una o más enzimas en la etapa b).

5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende adicionalmente la acción de incrementar o disminuir la temperatura en la muestra y/o la mezcla de muestra:

- previamente al inicio del proceso de pretratamiento enzimático y/o
- durante el proceso de pretratamiento enzimático y/o
- para detener el proceso de pretratamiento enzimático.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5 anteriores en el que el proceso de pretratamiento enzimático se detiene mediante:

- la apertura del tanque automáticamente por el sistema;
- retirada de la mezcla de muestra del tanque o
- incremento de la temperatura en el tanque.

7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la muestra se selecciona de entre carbohidratos presentes de modo natural en, por ejemplo, cereales y otros productos agrícolas que contienen almidón y di- y polisacáridos tales como, por ejemplo, cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, patatas, paja, madera, almidón y rastrojos de maíz.

8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el proceso de pretratamiento enzimático es un proceso de maceración realizado previamente a un proceso de fermentación tal como una elaboración de cerveza.
- 5 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que se añaden múltiples enzimas a la mezcla de muestra bien al mismo tiempo o bien en momentos diferentes y en el que la temperatura de la mezcla de muestra se ajusta durante el proceso de pretratamiento para tener en cuenta las diferencias en la temperatura en las que cada una de las múltiples enzimas son más activas.
- 10 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se miden los espectros de IR en longitudes de onda entre $400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, entre $400\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, entre $500\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, entre $700\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ o entre $800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.
- 15 11. Un sistema para el control de un proceso de pretratamiento enzimático, comprendiendo el sistema:
- un tanque adaptado para contener una mezcla de muestra que comprende una muestra a ser enzimáticamente pretratada y posiblemente una o más enzimas añadidas a la muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático;
 - una unidad de análisis conectada a un espectrómetro de IR, estando adaptada la unidad de análisis para llevar a la mezcla de muestra a un contacto directo con el espectrómetro de IR para la medición de los espectros de IR de reflectancia total atenuada (ATR) de la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático y
 - una unidad de cálculo conectada al espectrómetro de IR, estando adaptada la unidad de cálculo para el cálculo de:
- 20
- la relación entre especies específicas en la mezcla de muestra basándose en los espectros de IR de la muestra y/o
 - la concentración de una o más especies específicas basándose en los espectros de IR de la muestra y/o
 - el grado de polimerización de una o más especies específicas basándose en los espectros de IR de la muestra.
- 25
- 30 12. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la unidad de análisis es una celda de ATR-IR adaptada para contener una pequeña parte de la mezcla de muestra durante las mediciones de los espectros de ATR-IR de la mezcla de muestra durante el proceso de pretratamiento enzimático, en donde la celda de ATR-IR está montada de modo estanco en una placa de ATR-IR que comprende un cristal, siendo la placa de ATR-IR parte de un
- 35 espectrómetro de ATR-IR, en donde el montaje estanco se obtiene por medio de una abrazadera sobre el espectrómetro de ATR-IR y una junta tórica posicionada entre la placa de ATR-IR y la unidad de análisis.
- 40 13. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende adicionalmente una unidad de conexión que conecta el tanque y la unidad de análisis, estando adaptada la unidad de conexión para guiar la pequeña parte de la mezcla de muestra desde el tanque y a la unidad de análisis mediante lo cual se miden los espectros de ATR-IR de la mezcla de muestra mediante el espectrómetro de ATR-IR.
- 45 14. Un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 que comprende adicionalmente una sonda de extracción que sobresale al interior del tanque para la extracción de la pequeña parte de muestra para la medición de los espectros de ATR-IR en una posición determinada por el usuario dentro del tanque.
- 50 15. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la unidad de análisis es una unidad espectroscópica que comprende una unidad de ART-IR, un espectrofotómetro para la medición de los espectros de IR y/o un ordenador, en donde la unidad de ART-IR comprende una placa de ATR-IR con un cristal.
- 55 16. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la unidad espectroscópica está fijada directamente a una pared del tanque.
17. Sistema de acuerdo con la reivindicación 16 en el que la unidad espectroscópica está conectada a la pared del tanque por medios de conexión por ejemplo en la forma de un conjunto de mangueras.
18. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-17 en el que la placa de ATR puede girarse hasta 90 grados alrededor de su propio eje.

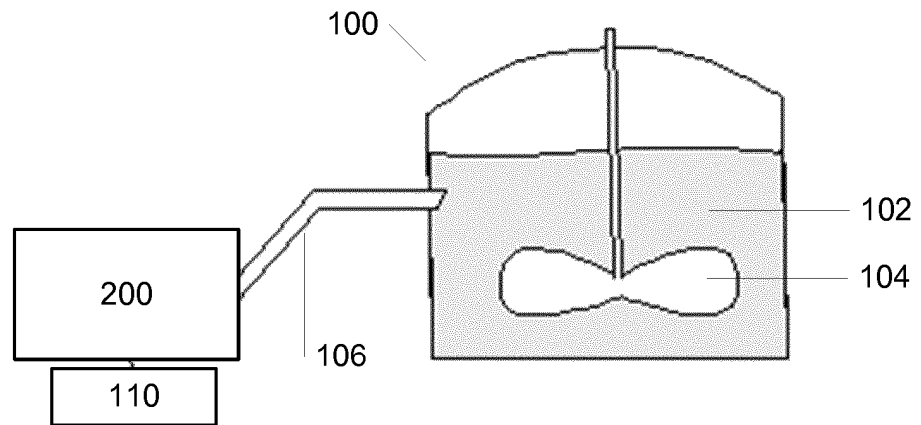


Fig. 1

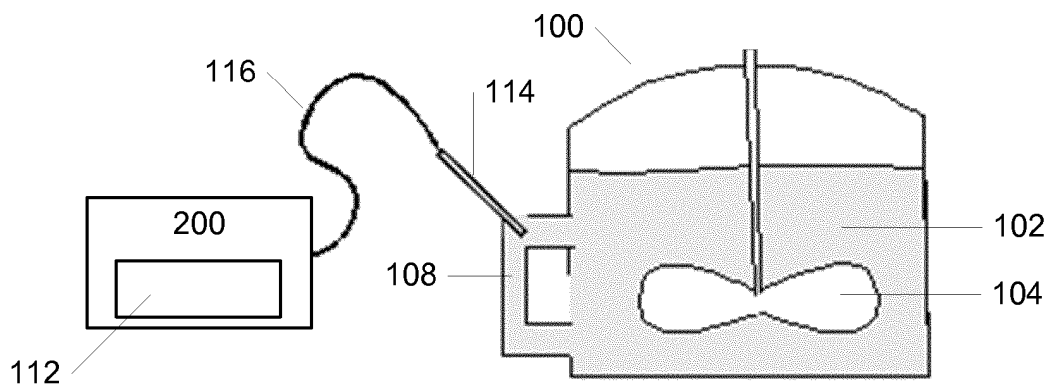


Fig. 2

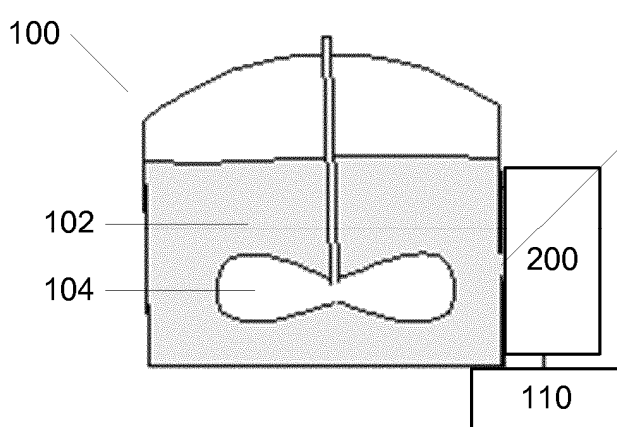


Fig. 3a

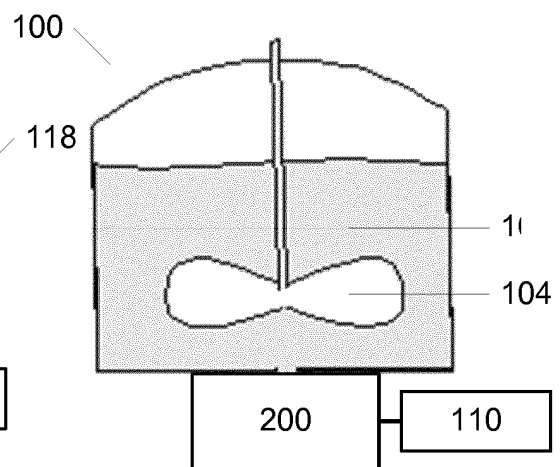


Fig. 3b

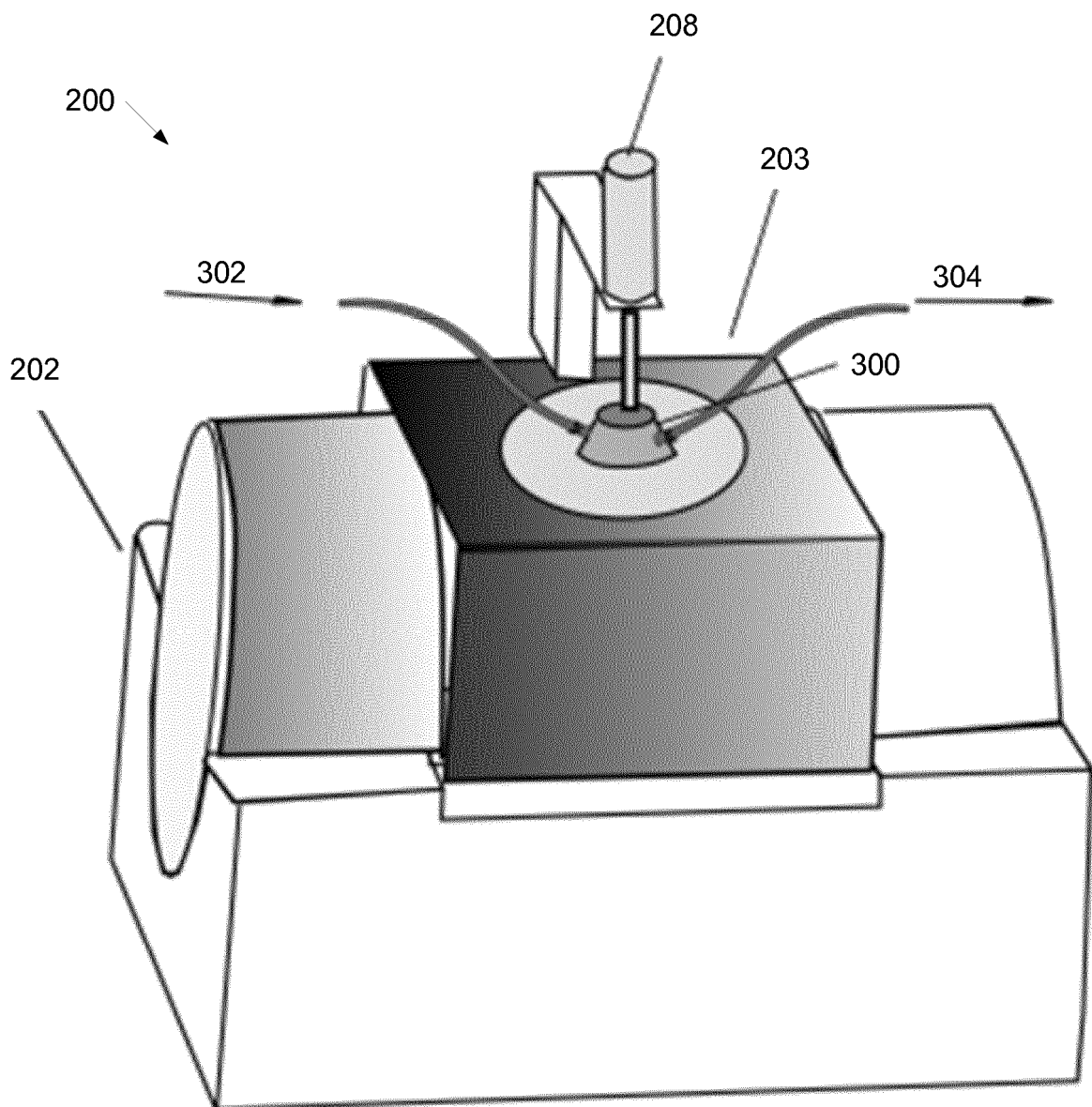


Fig. 4

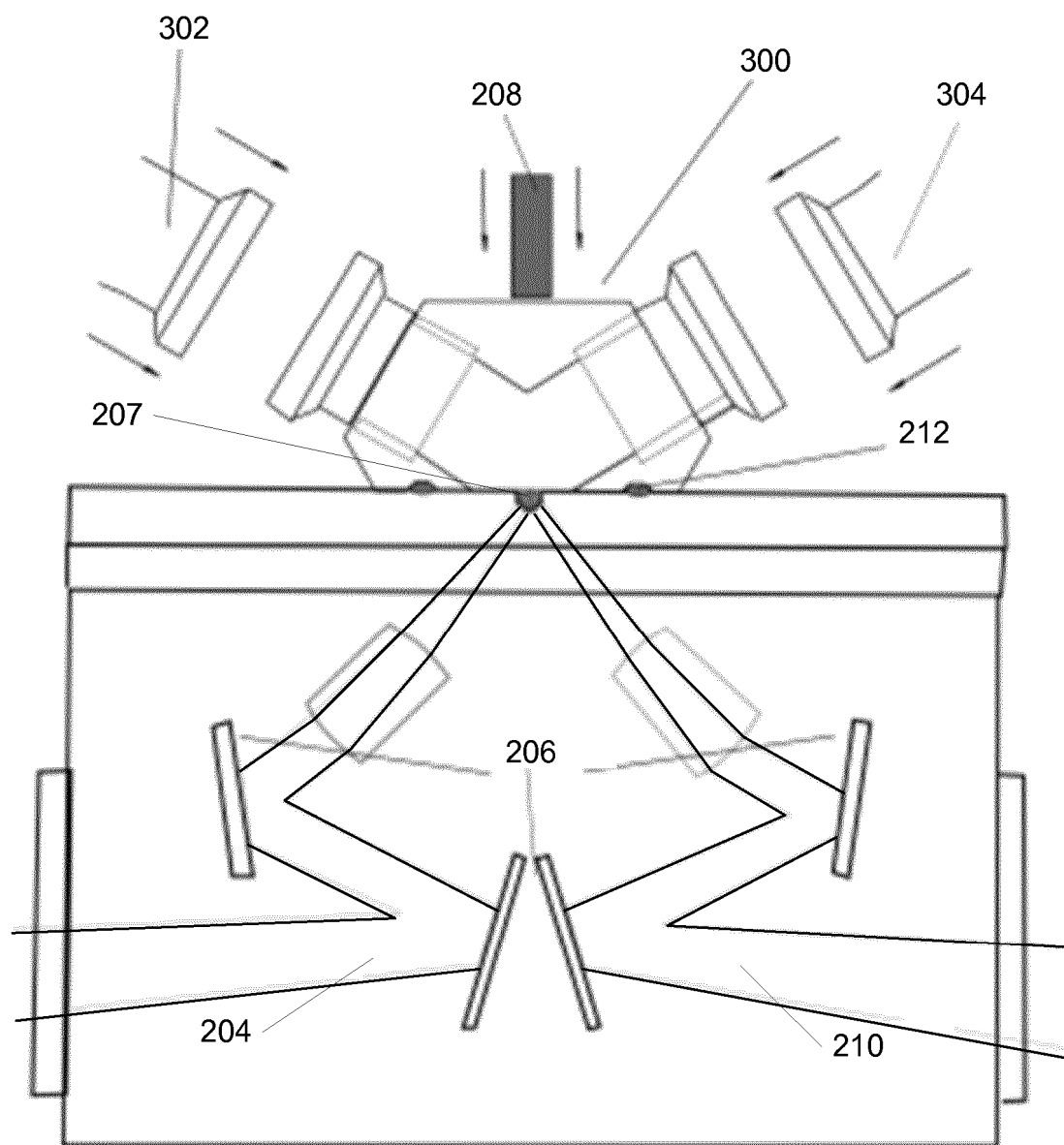


Fig. 5

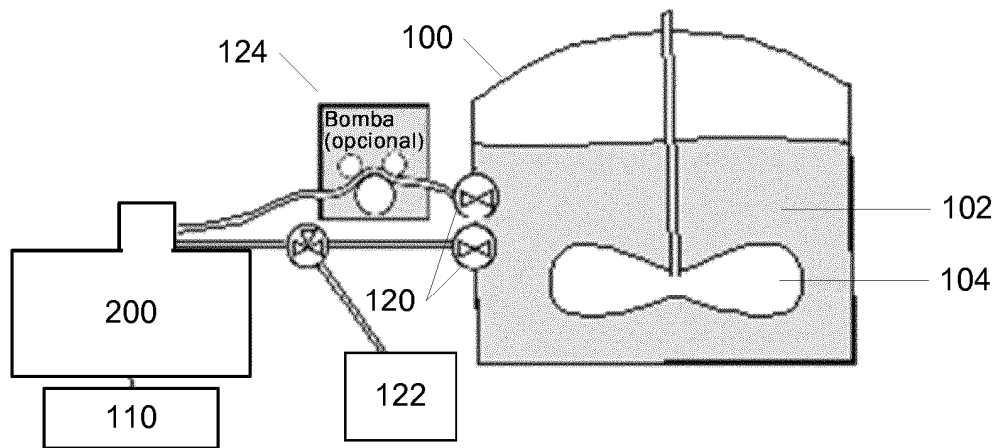


Fig. 6a

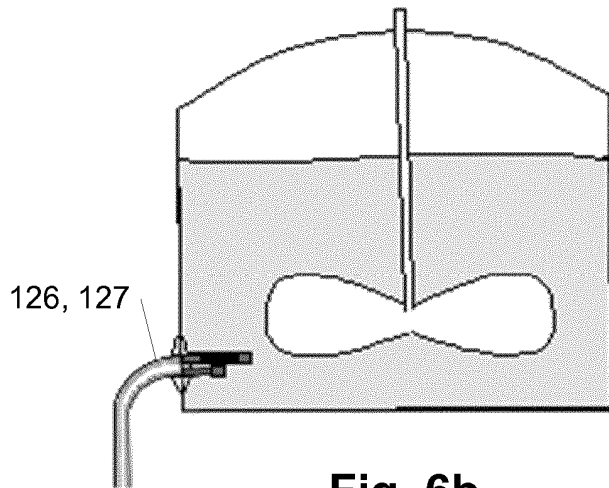


Fig. 6b

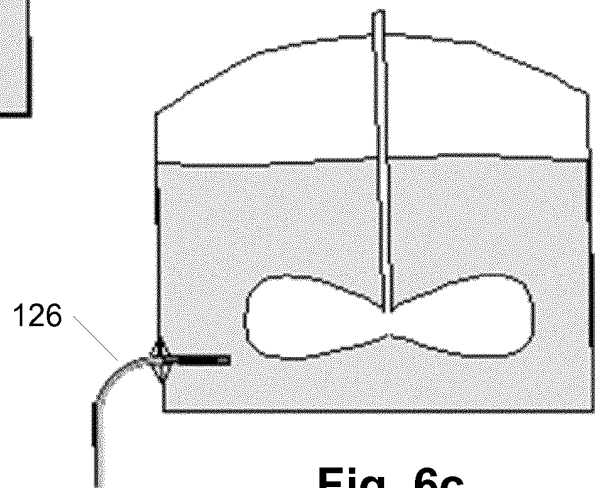


Fig. 6c

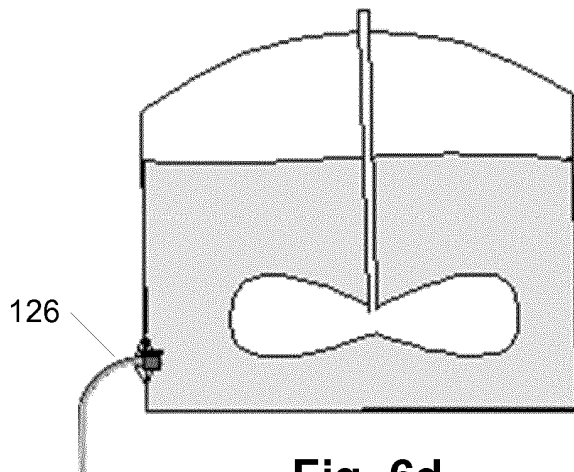


Fig. 6d

Fig. 7a

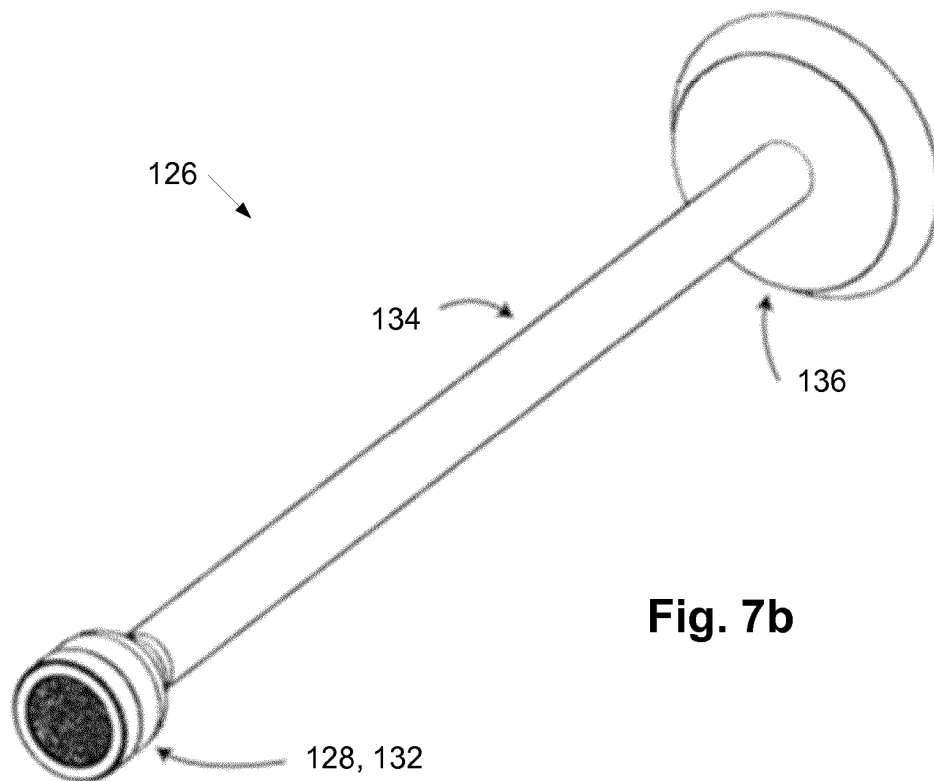
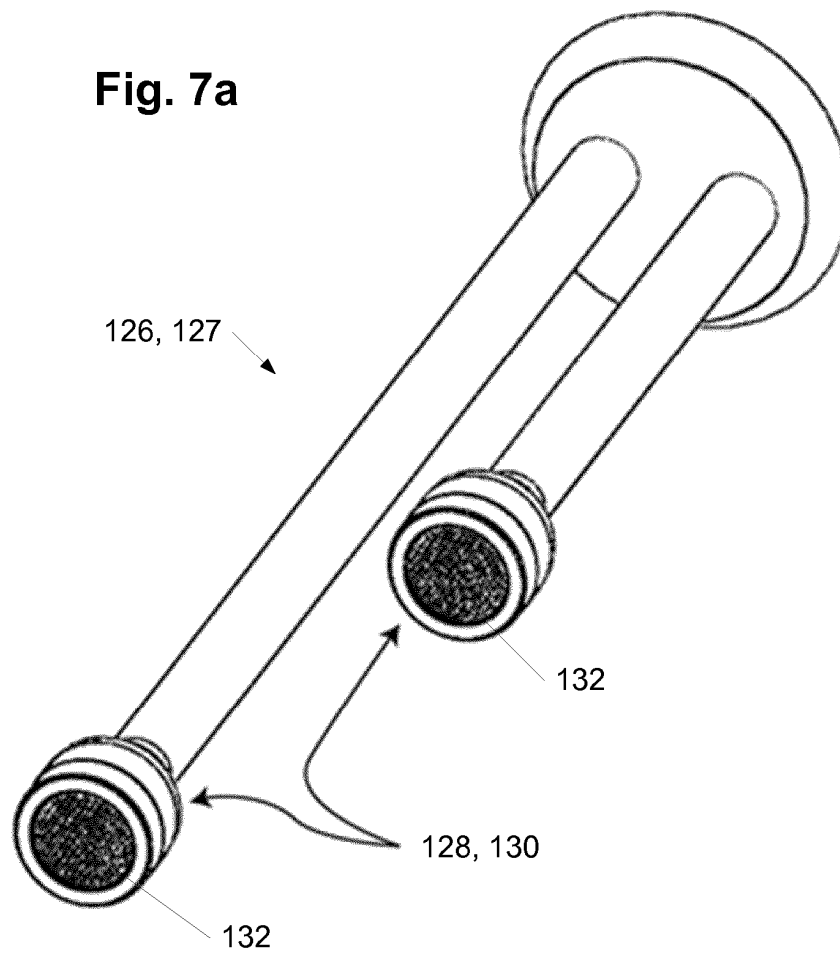
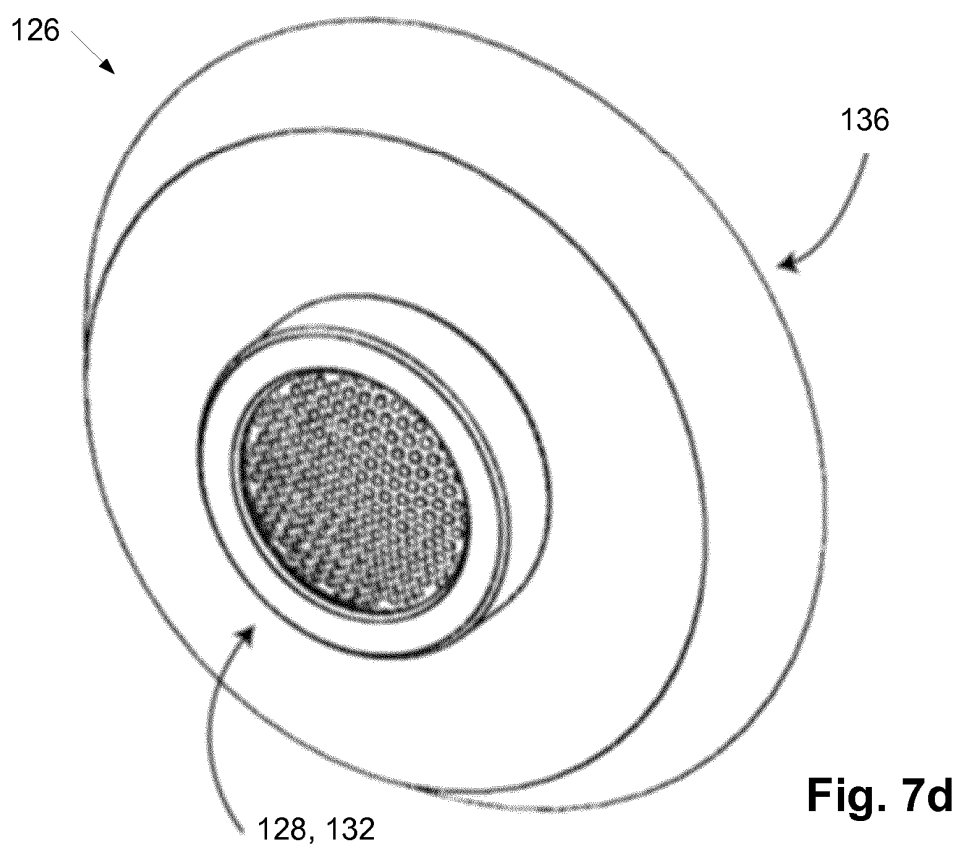
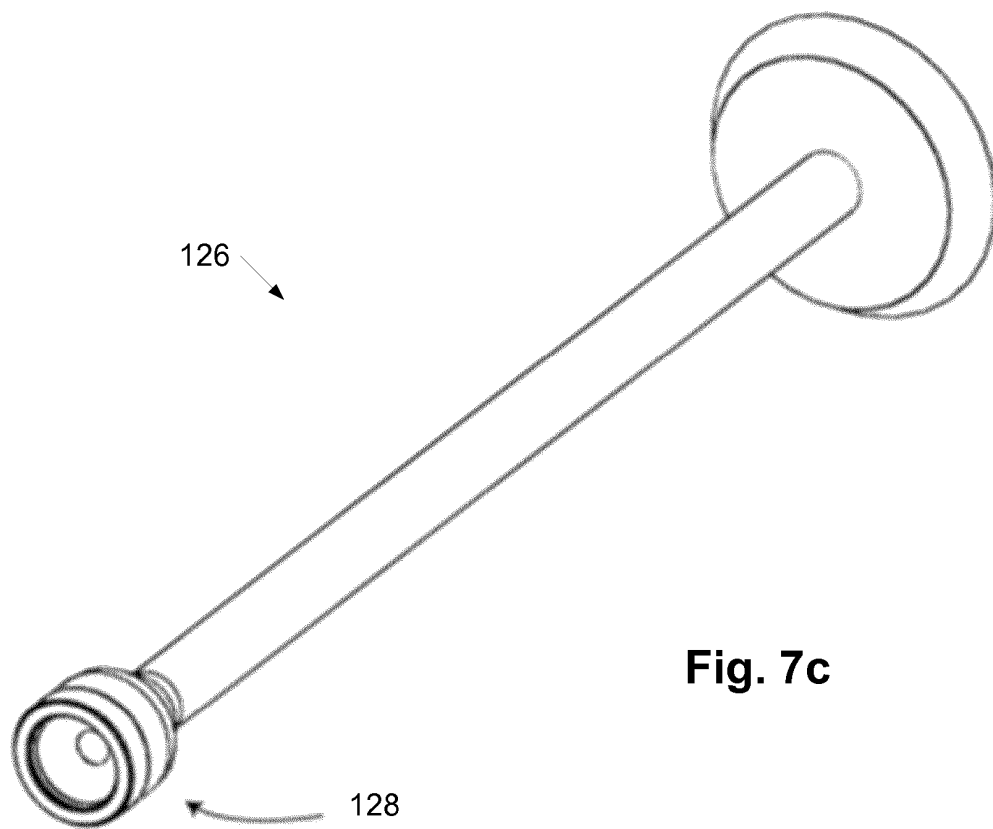


Fig. 7b



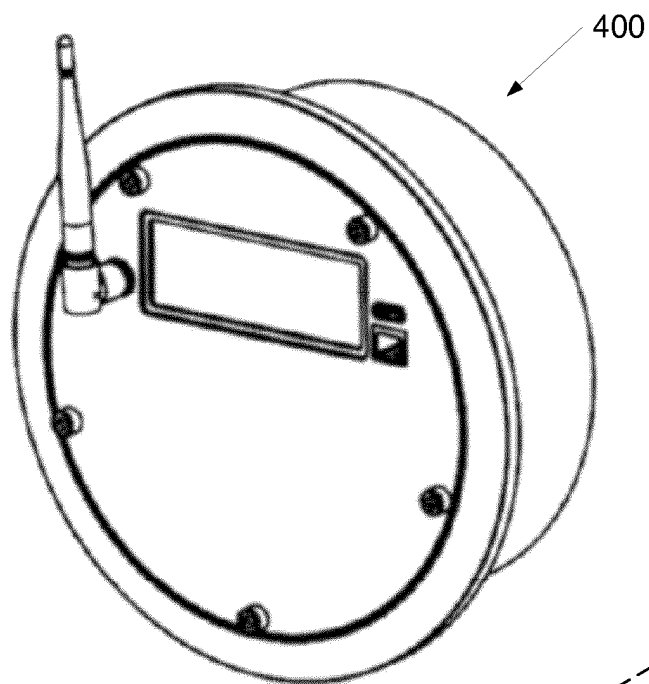


Fig. 8a

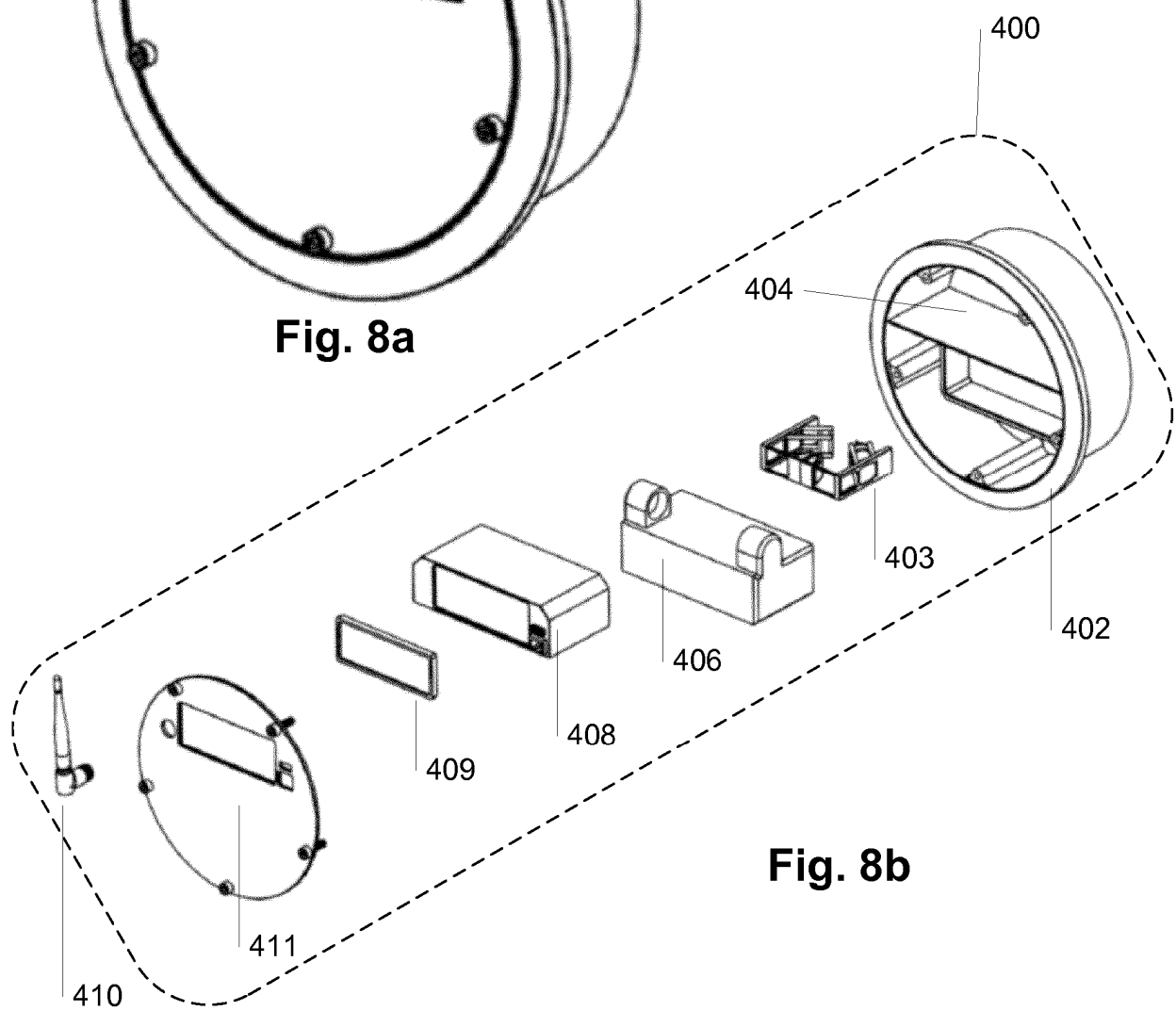


Fig. 8b

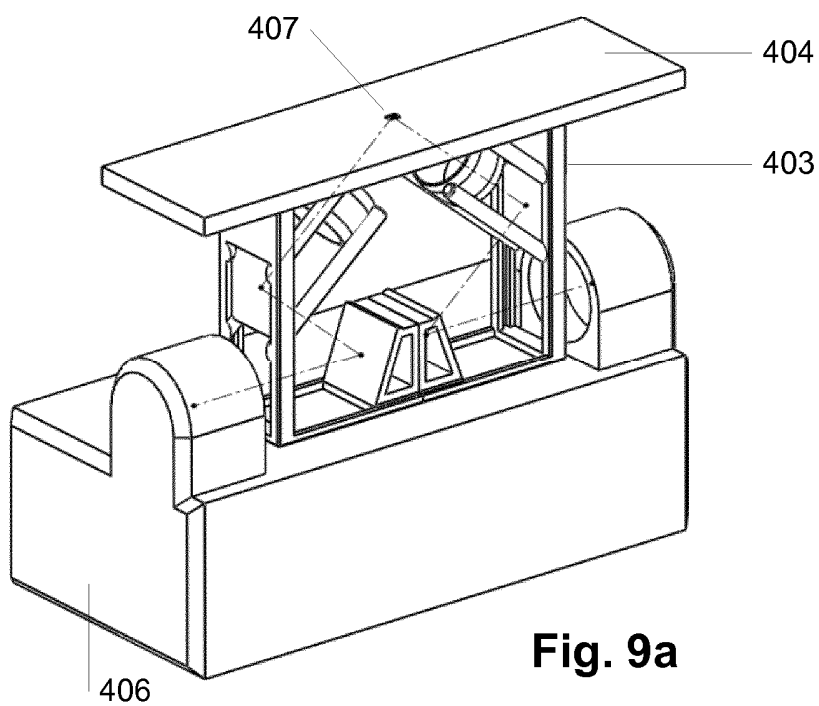


Fig. 9a

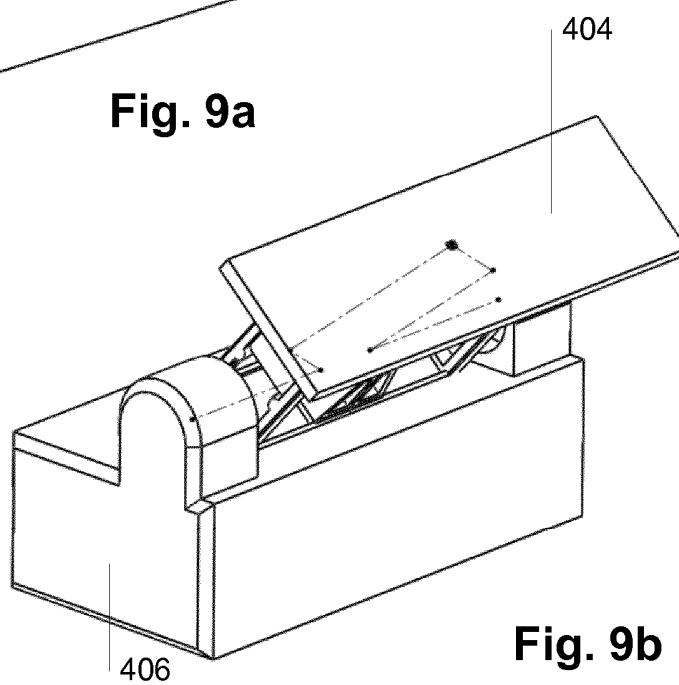


Fig. 9b

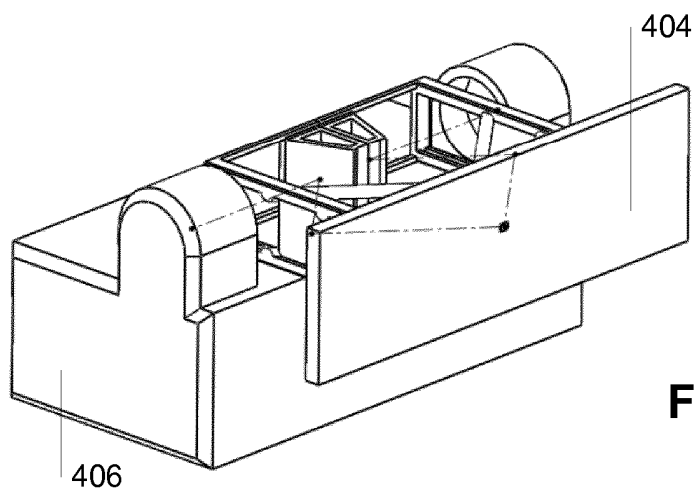
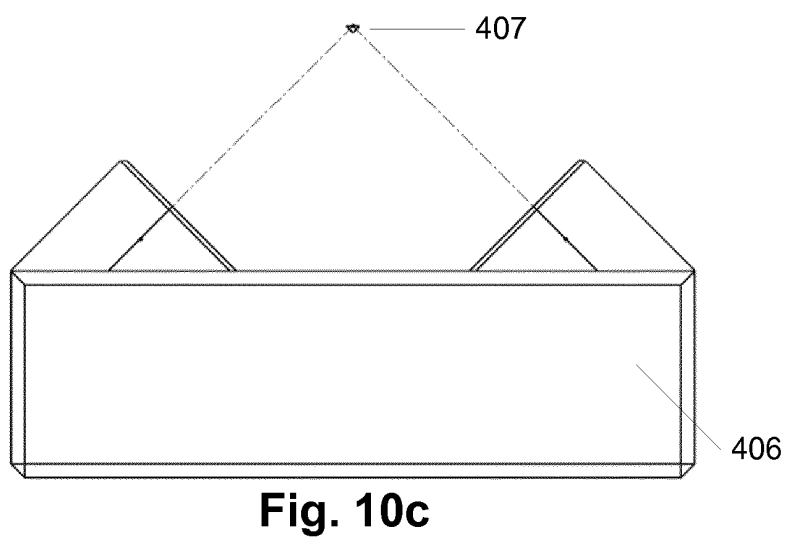
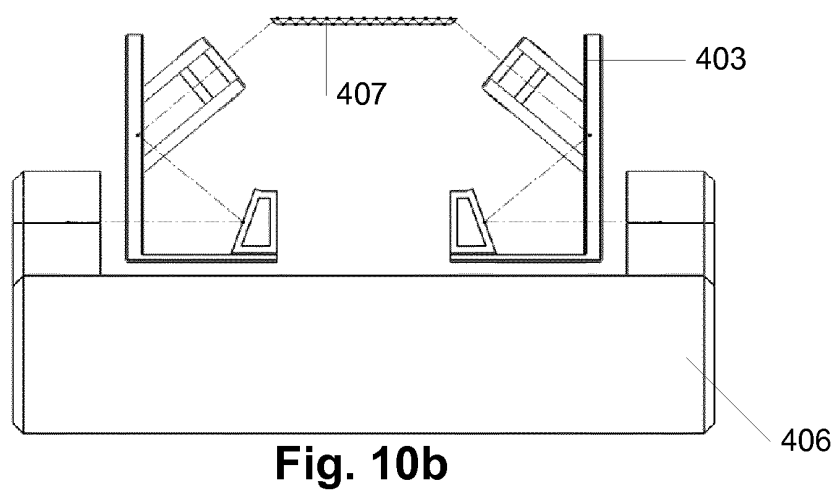
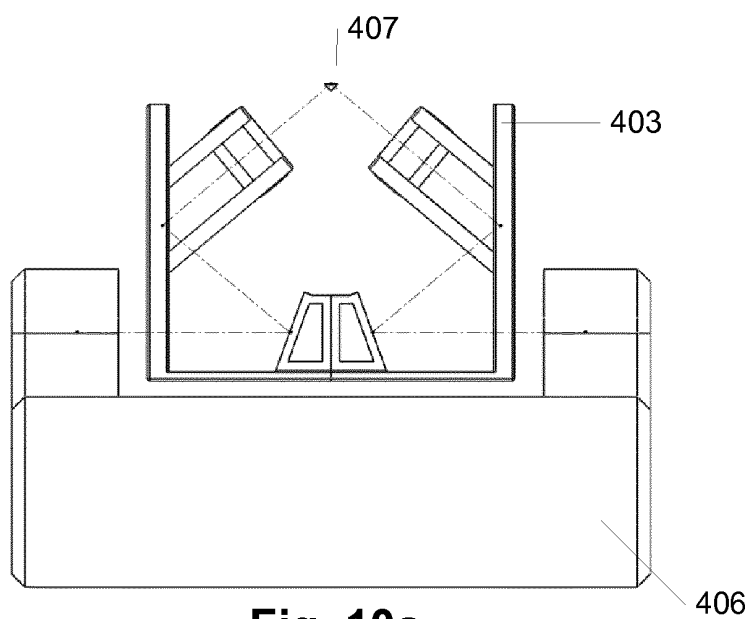


Fig. 9c



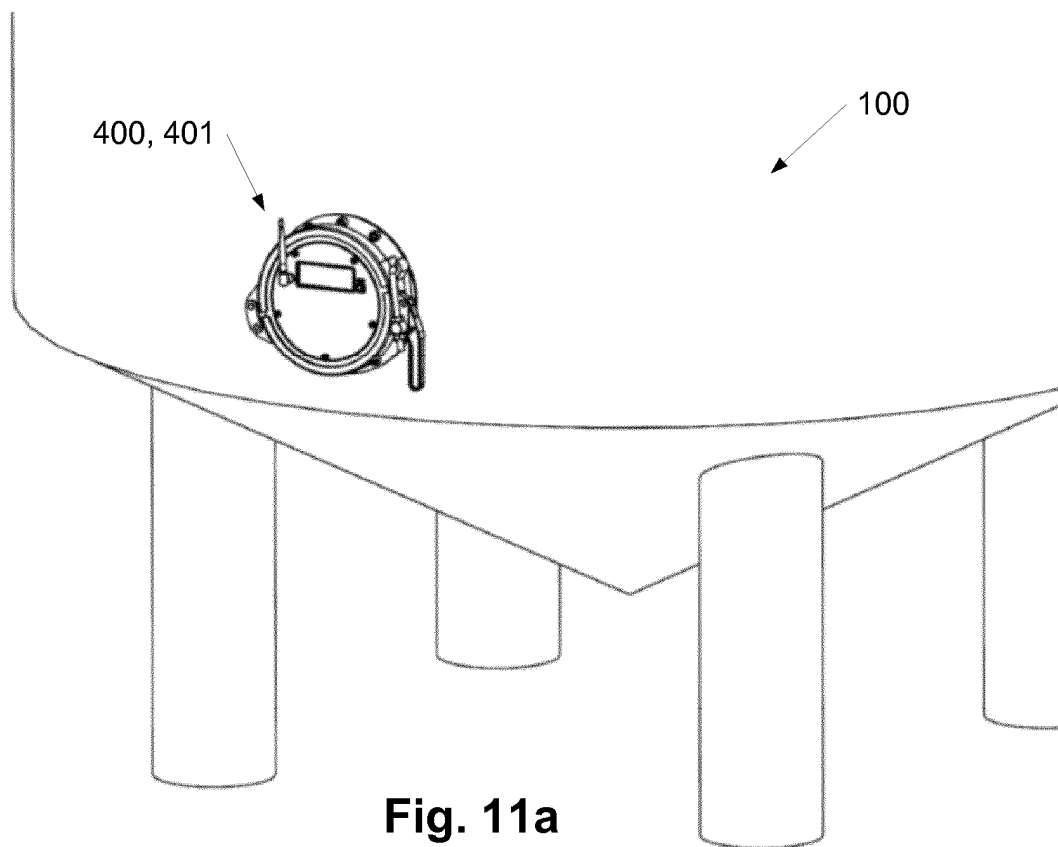


Fig. 11a

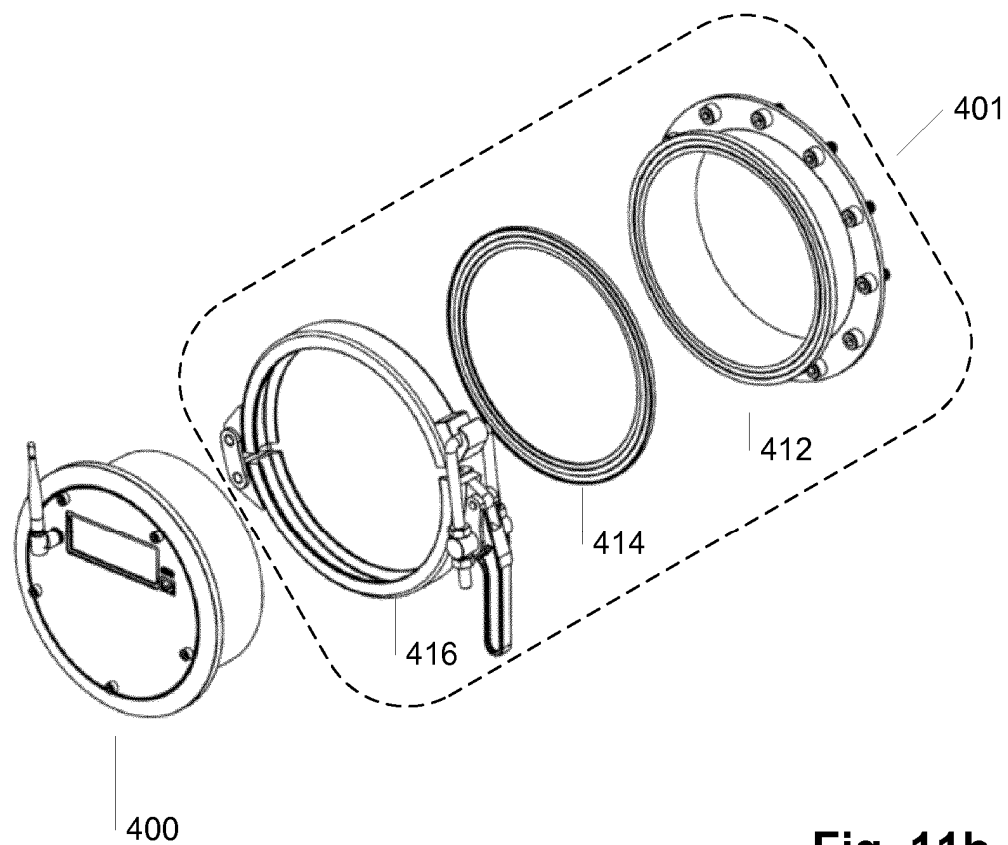


Fig. 11b

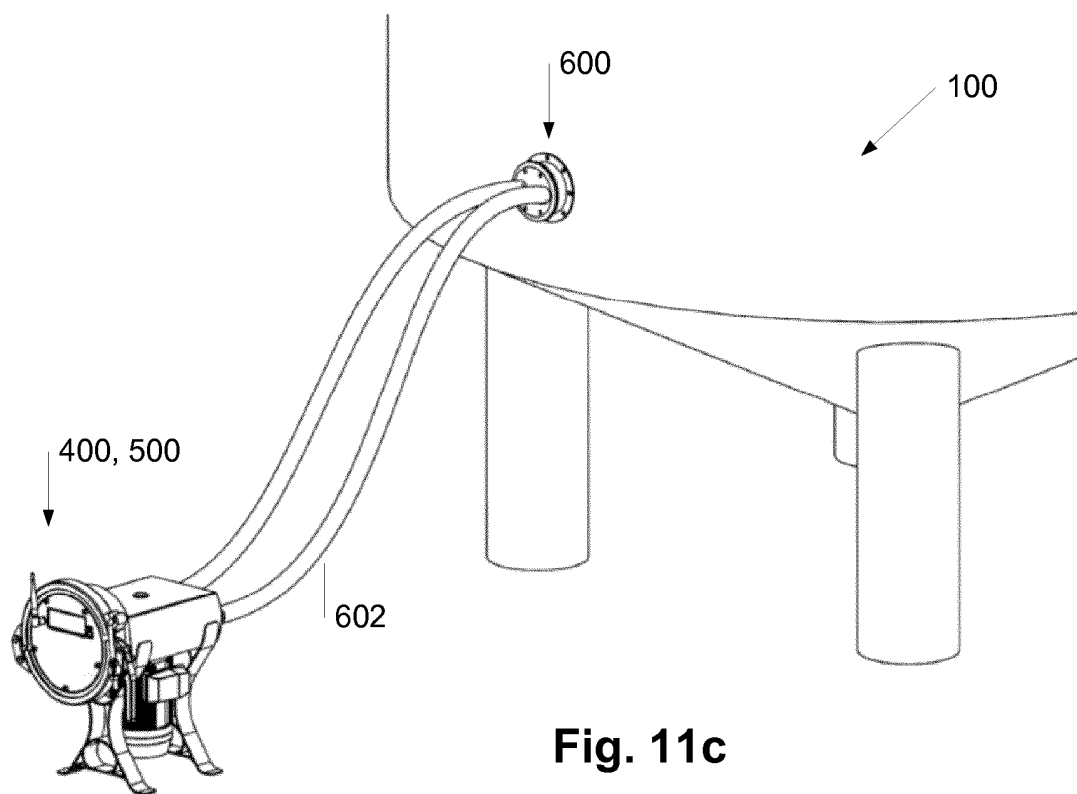


Fig. 11c

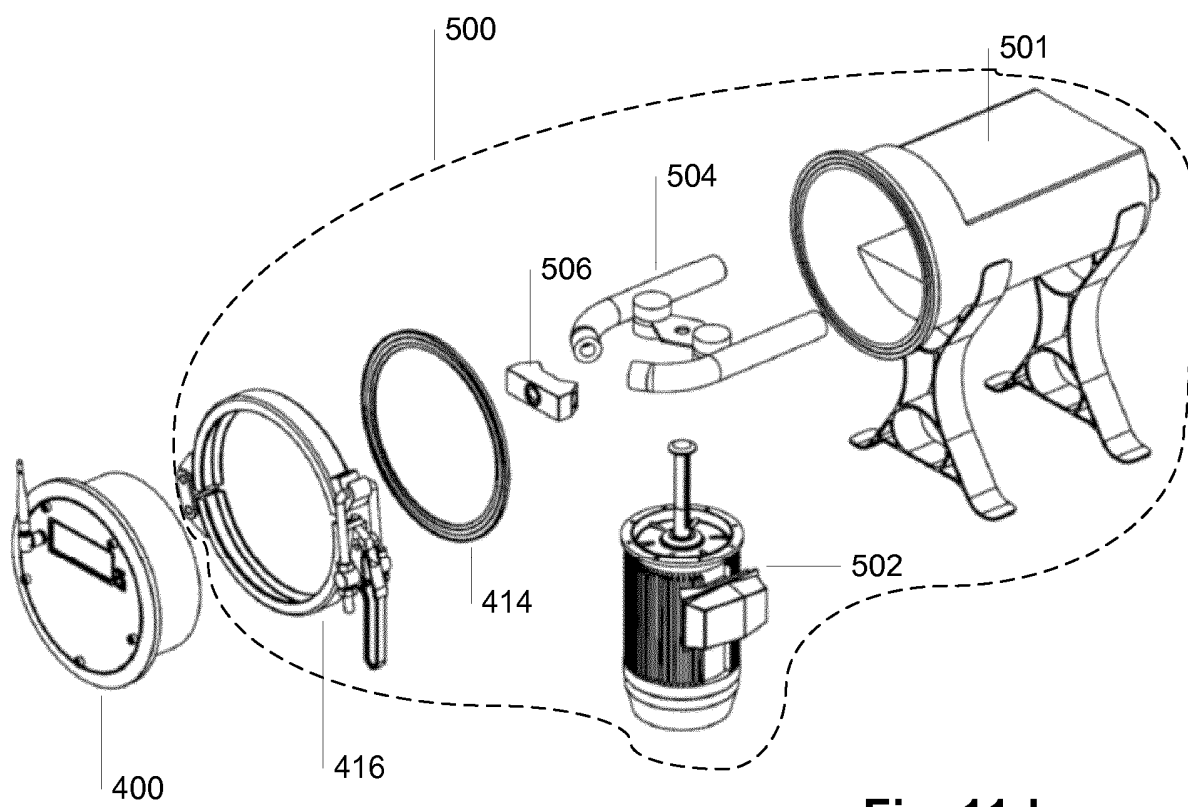
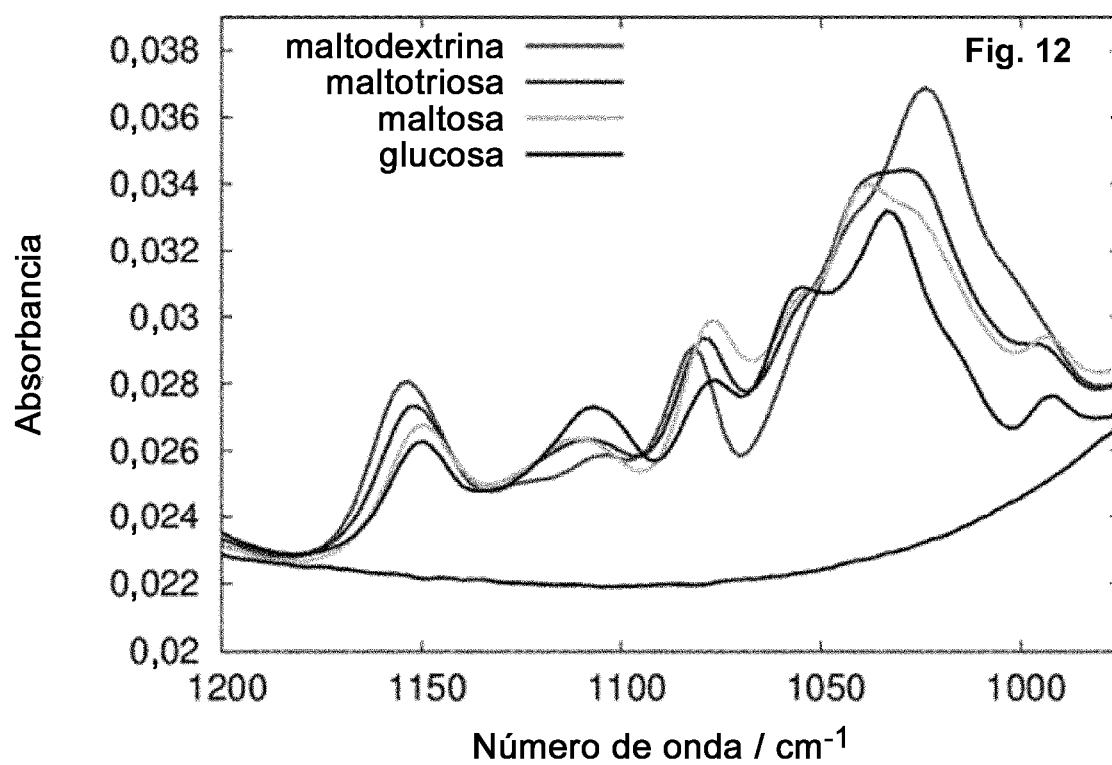


Fig. 11d



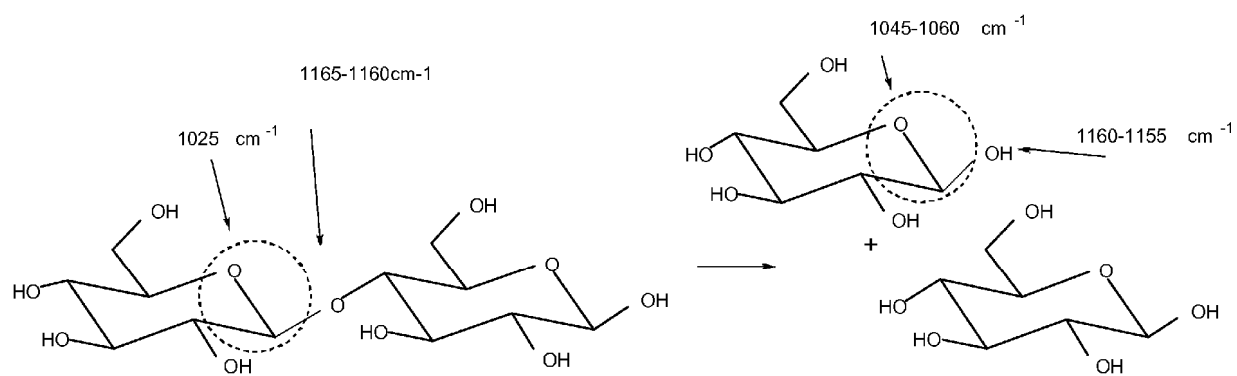


Fig. 13

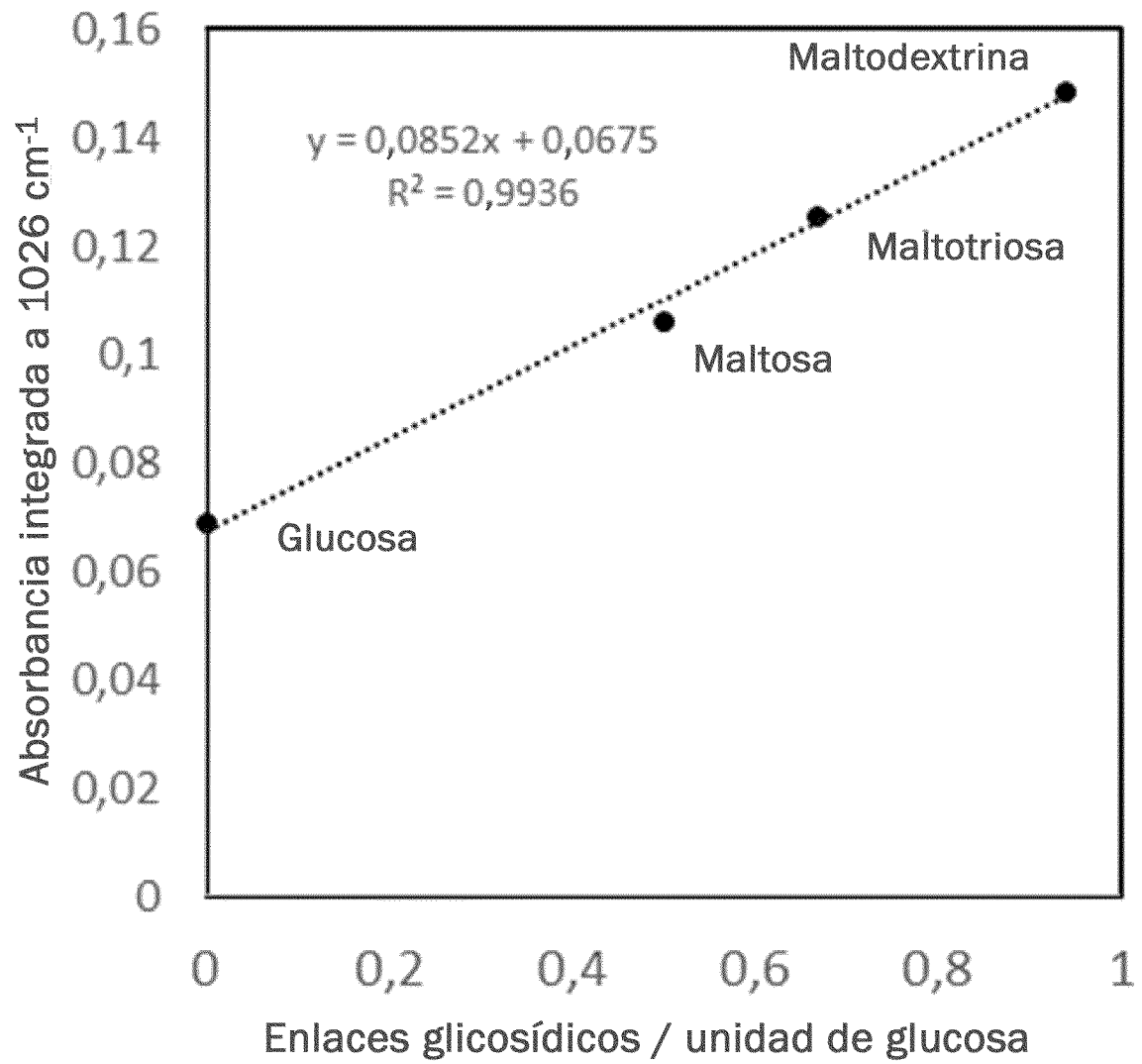
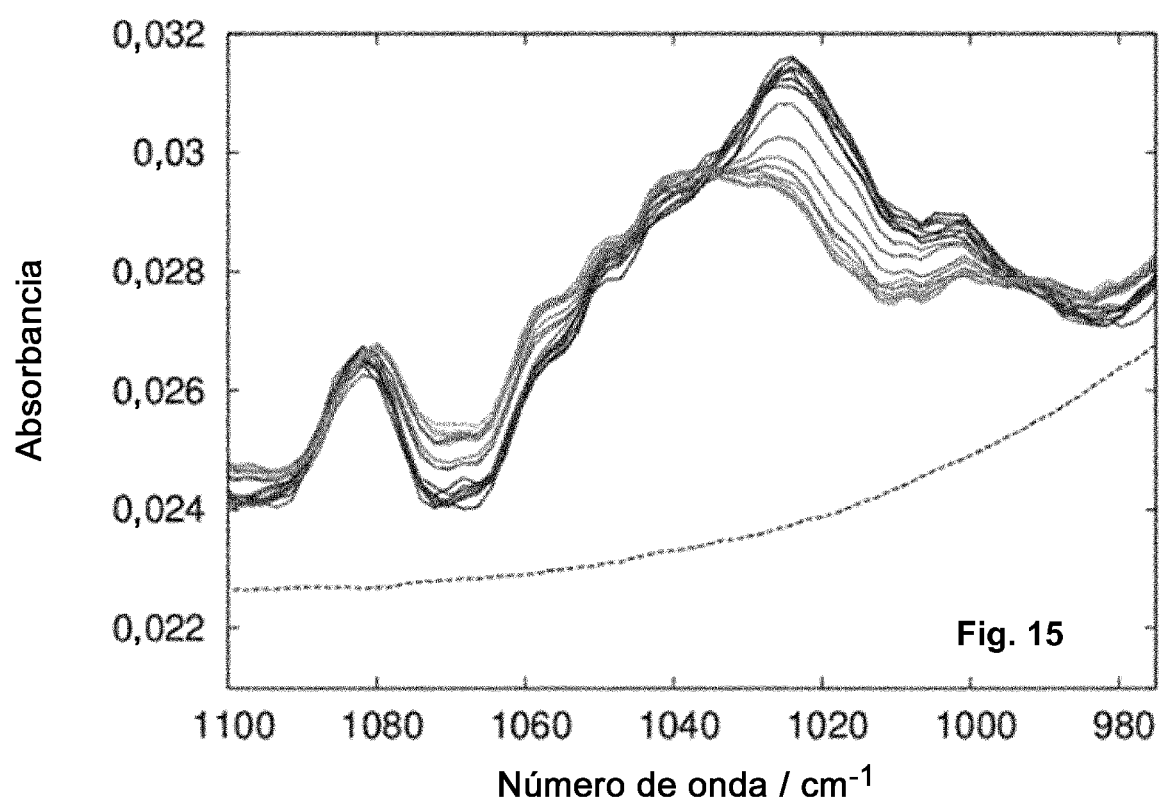


Fig. 14



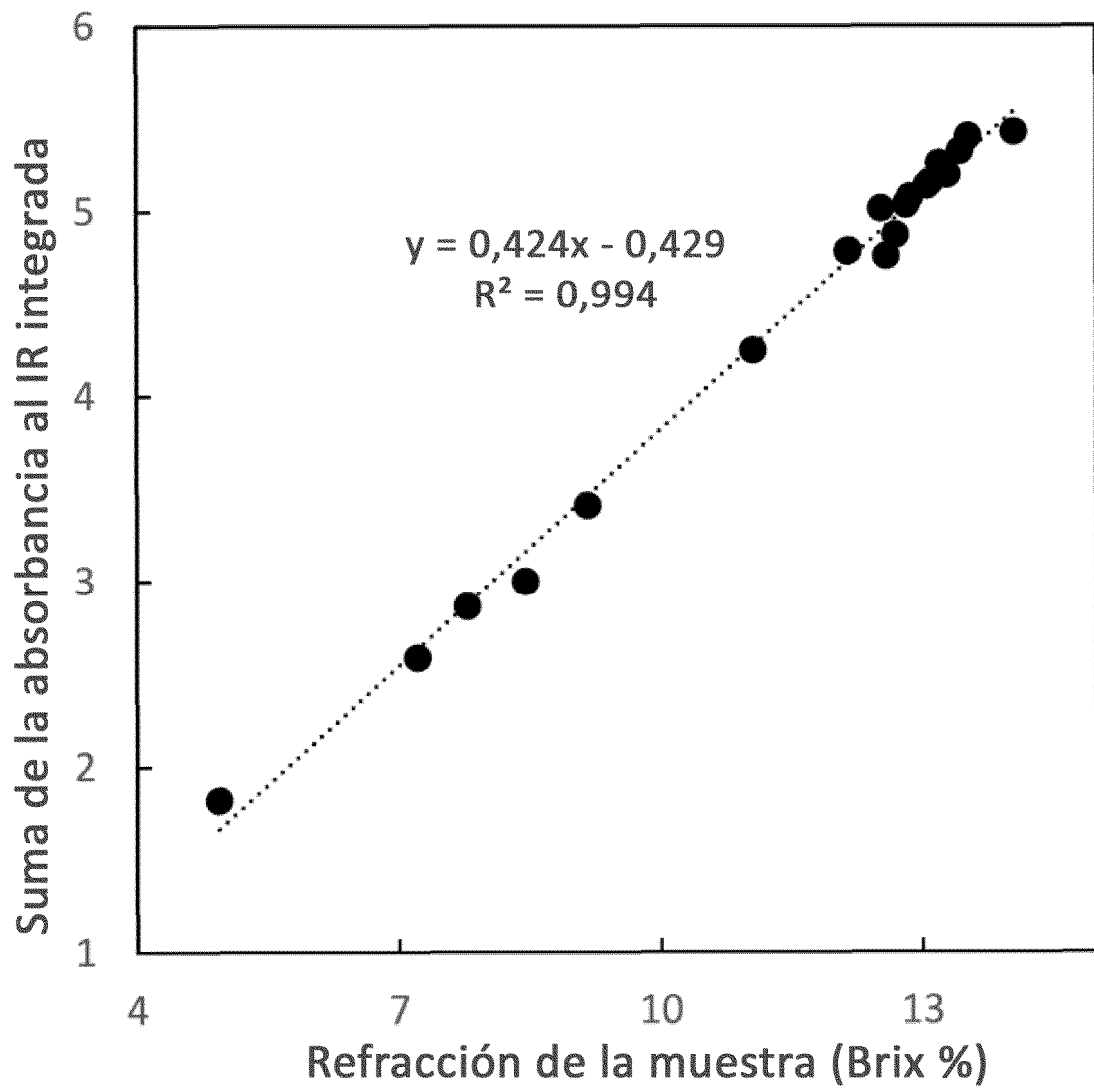
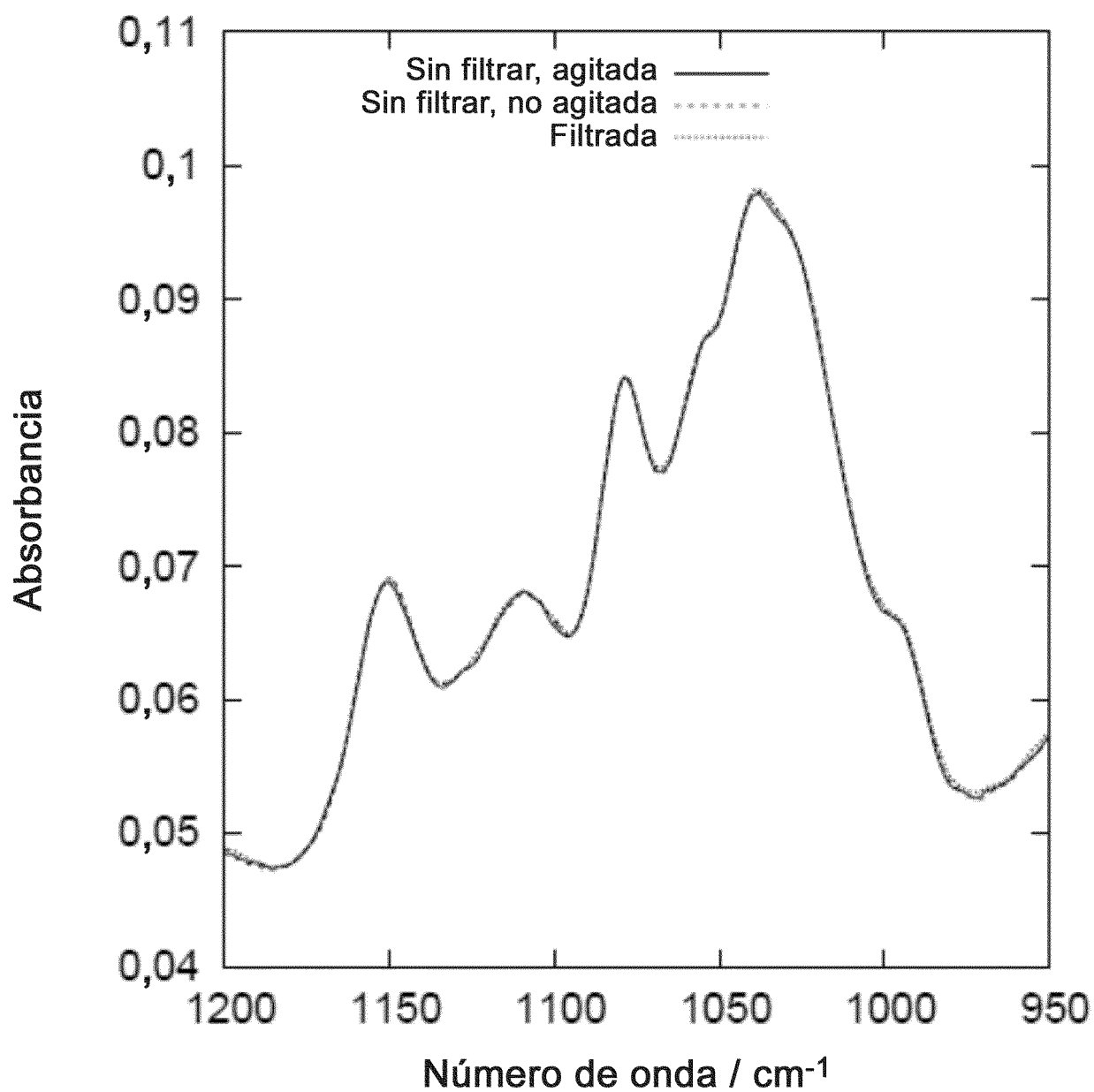


Fig. 16

**Fig. 17**

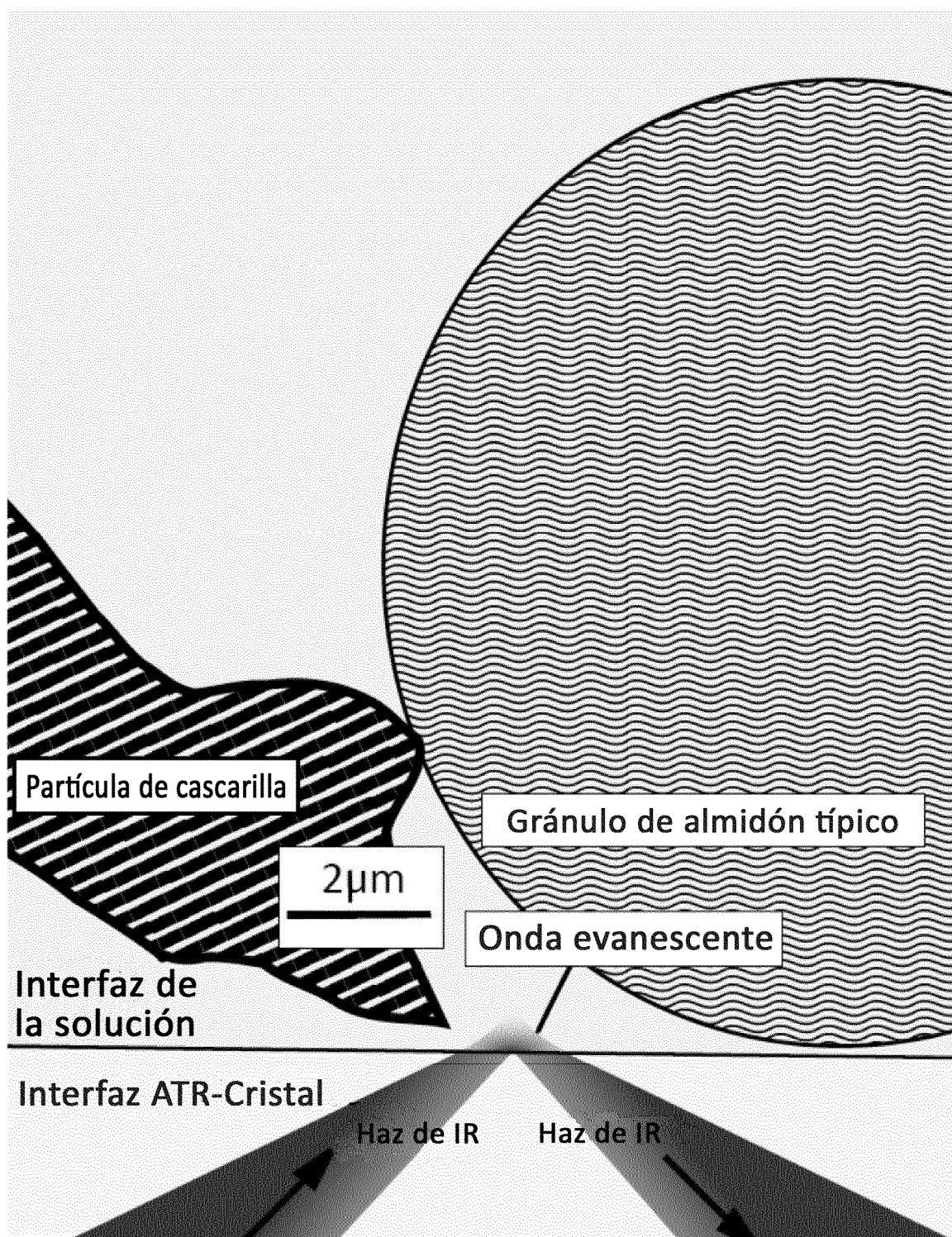
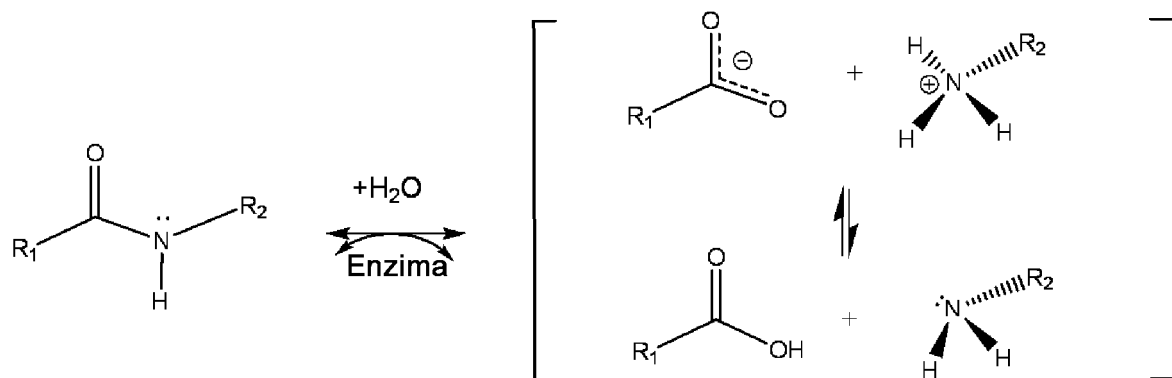


Fig. 18



$R_1, R_2 =$ Cualquier fragmento químico o biológico con la fórmula $C_a N_b O_c S_d H_e$

Fig. 19

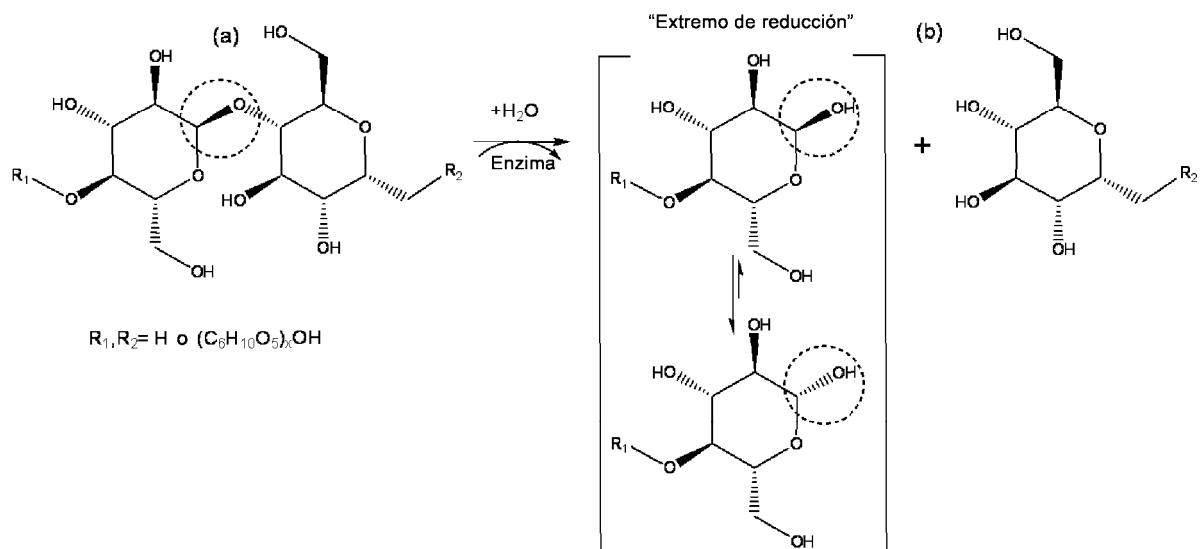
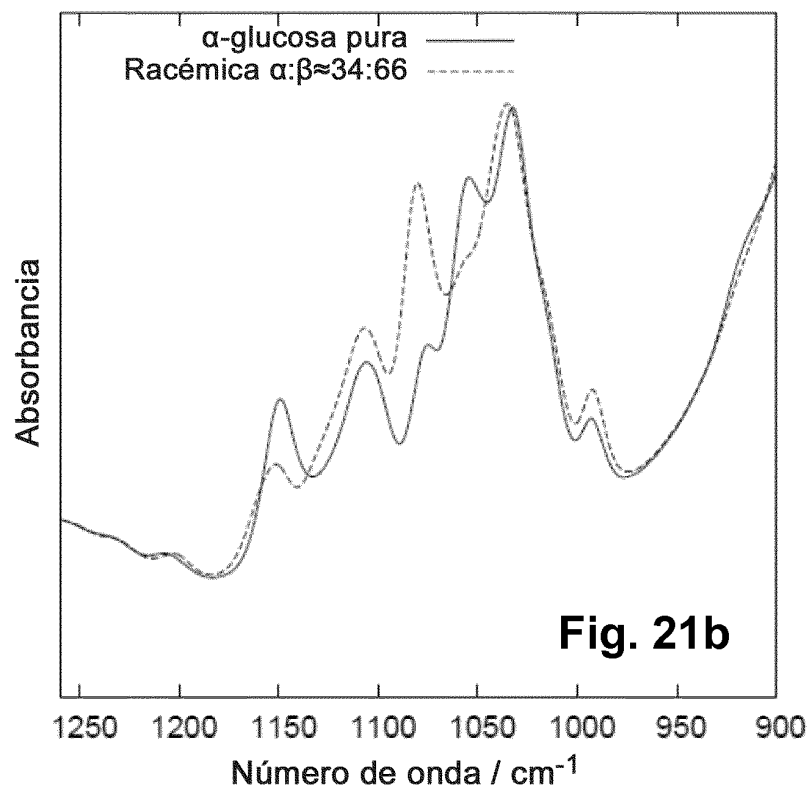
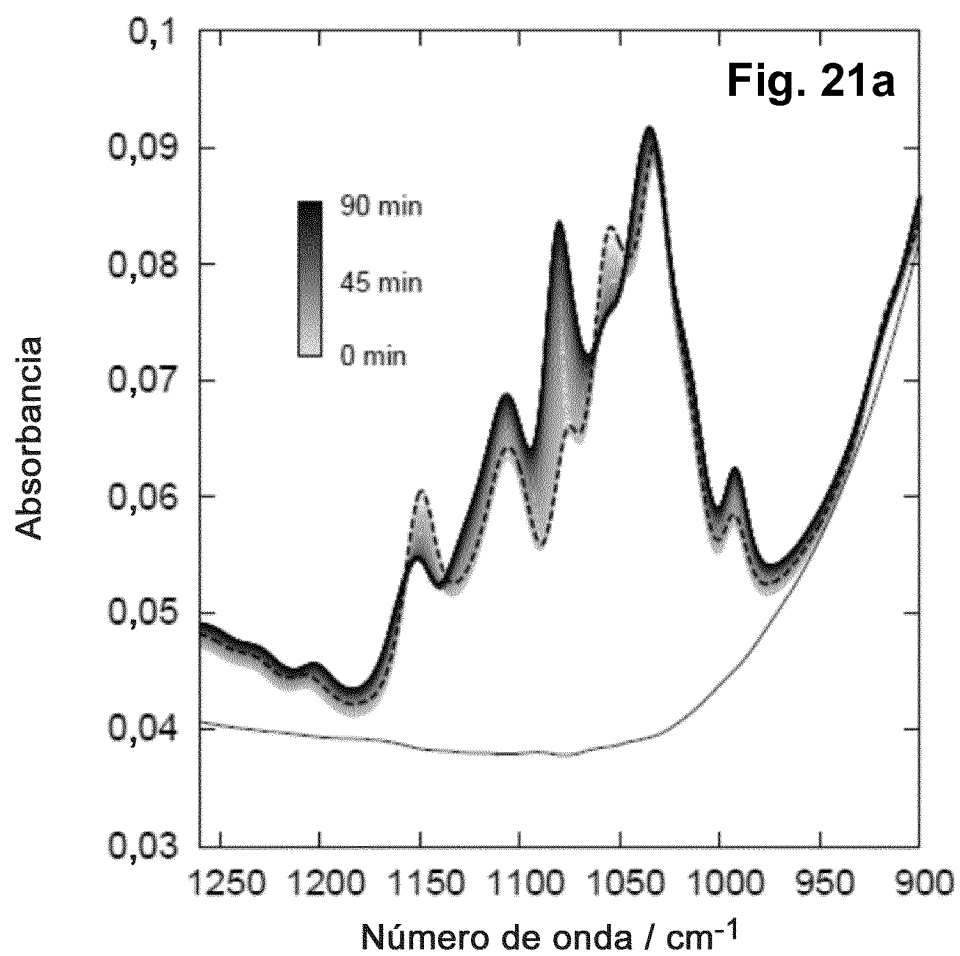
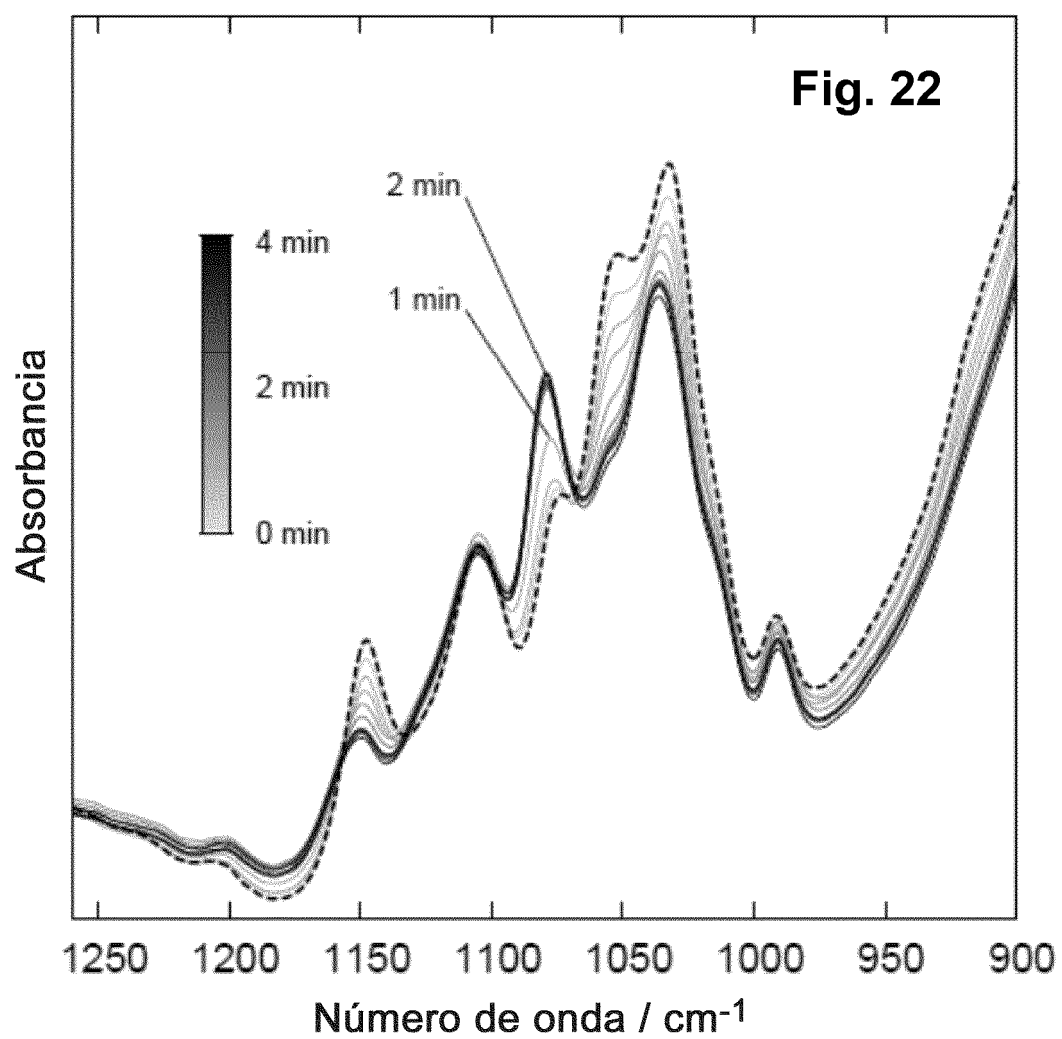


Fig. 20





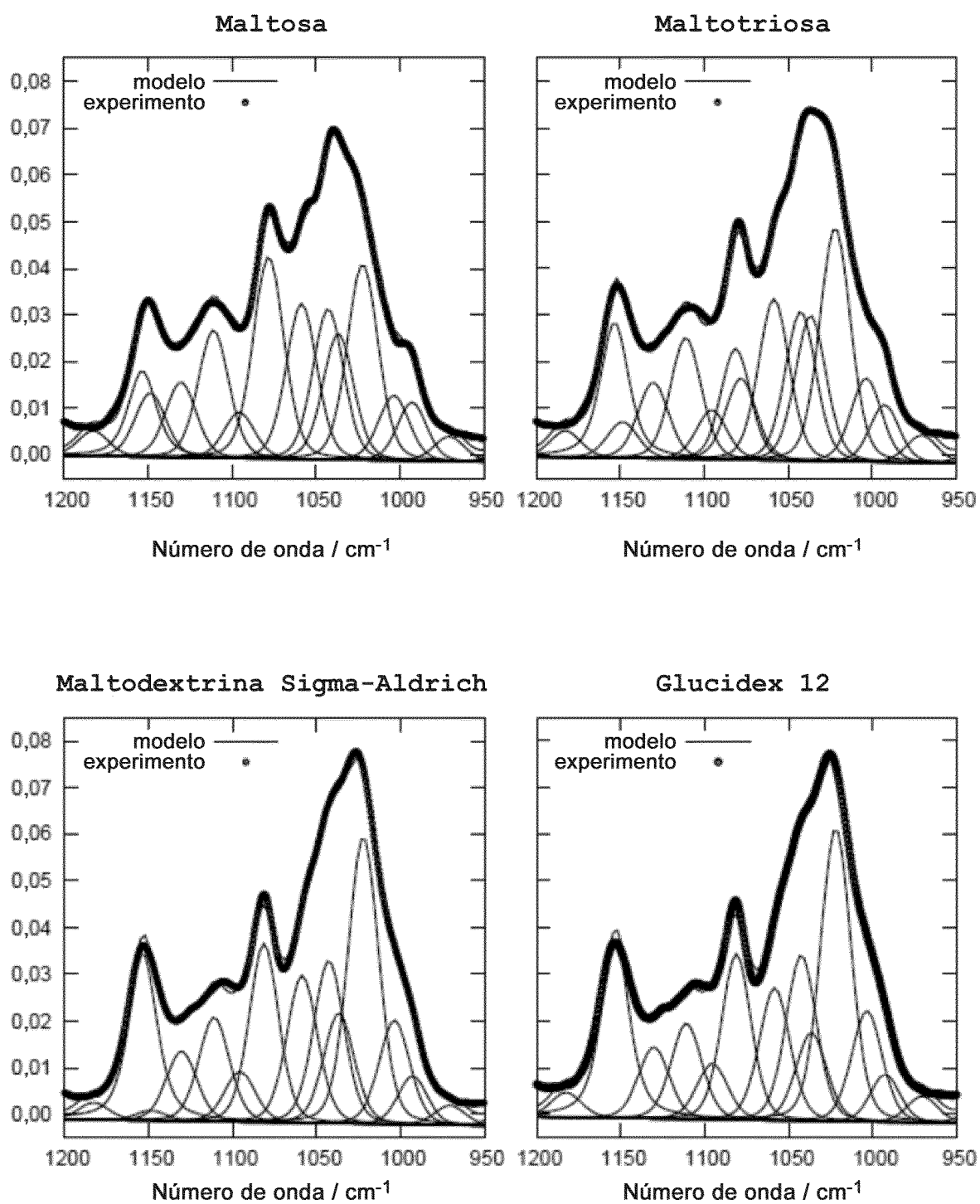


Fig. 23

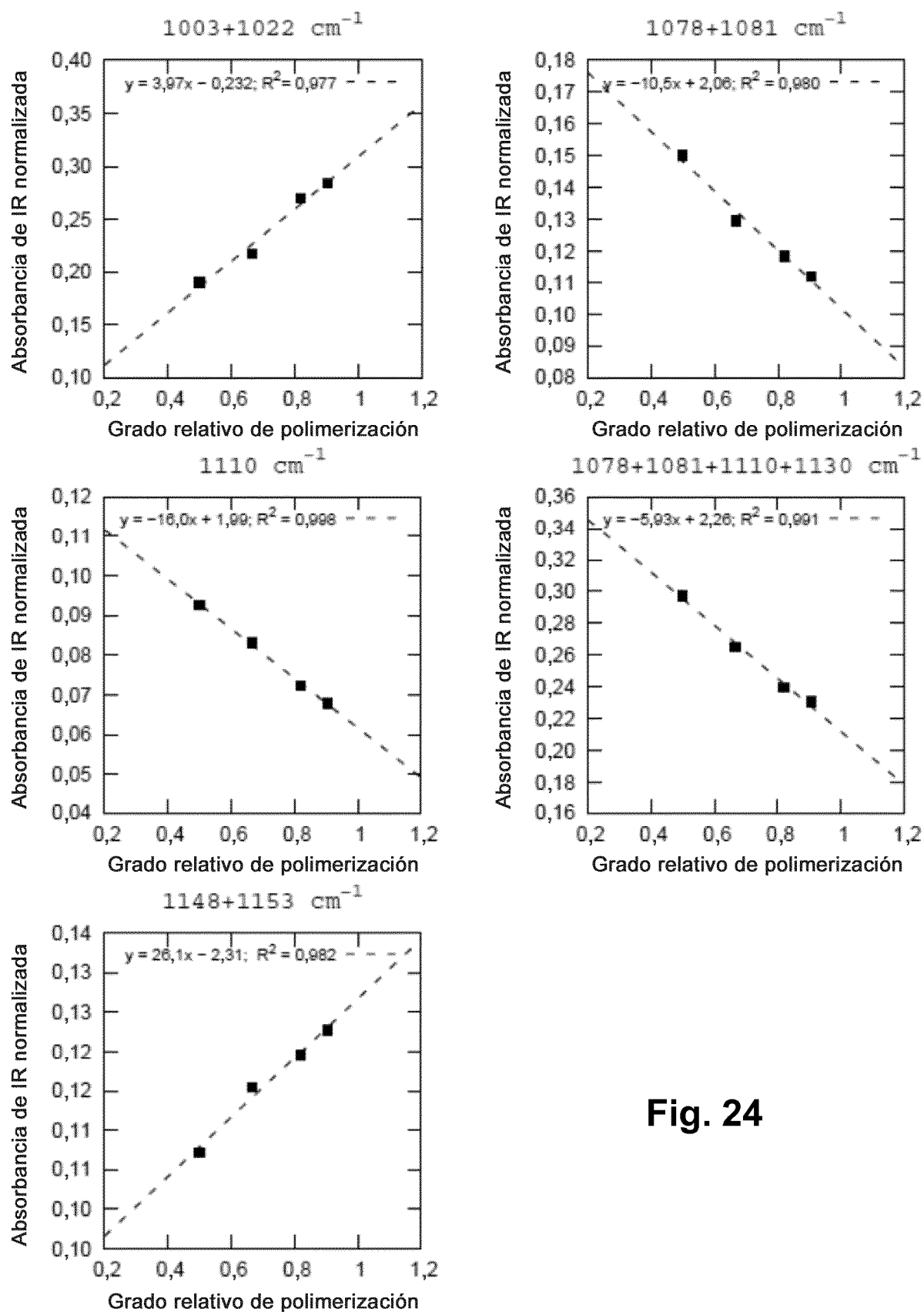


Fig. 24

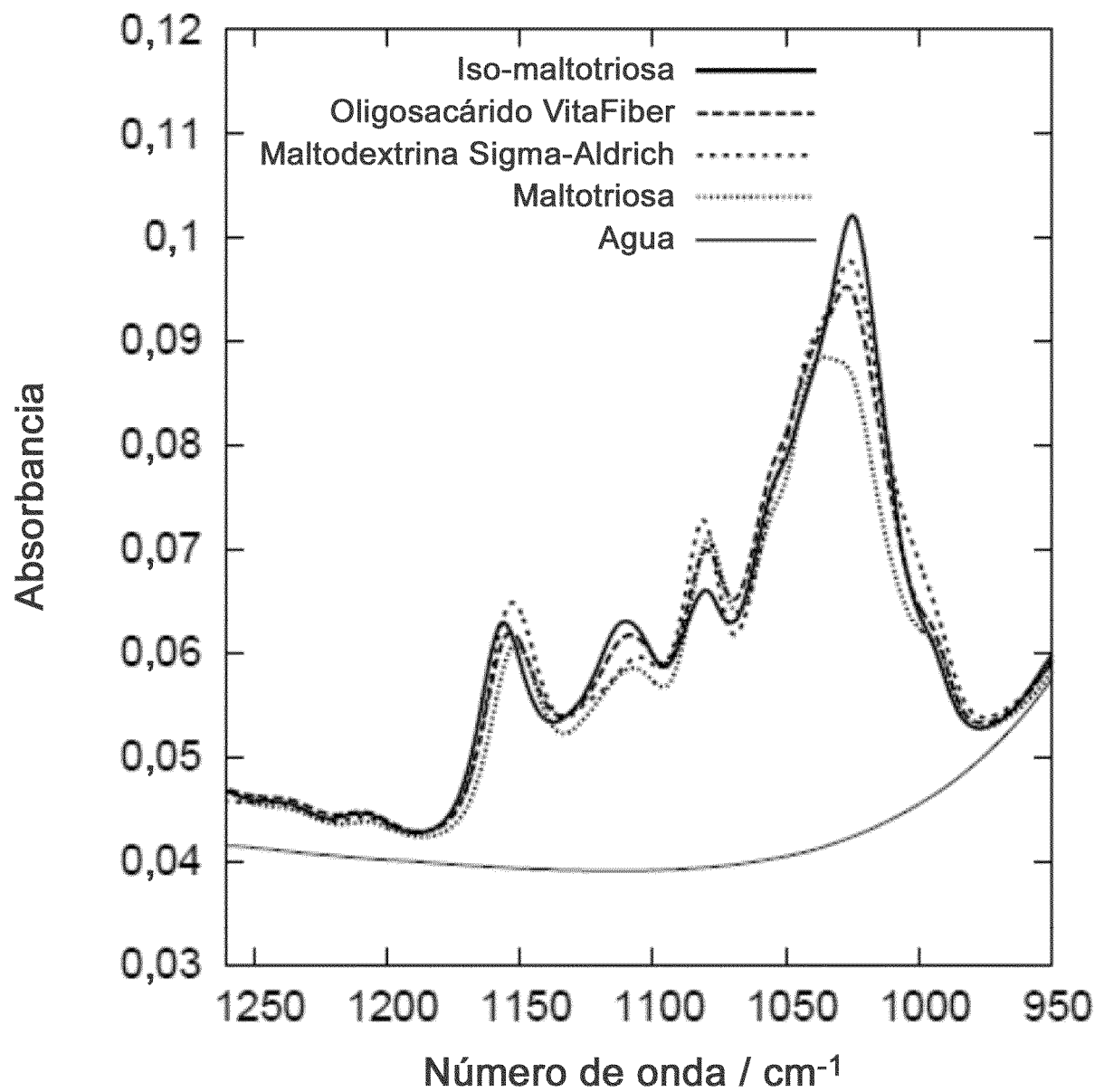
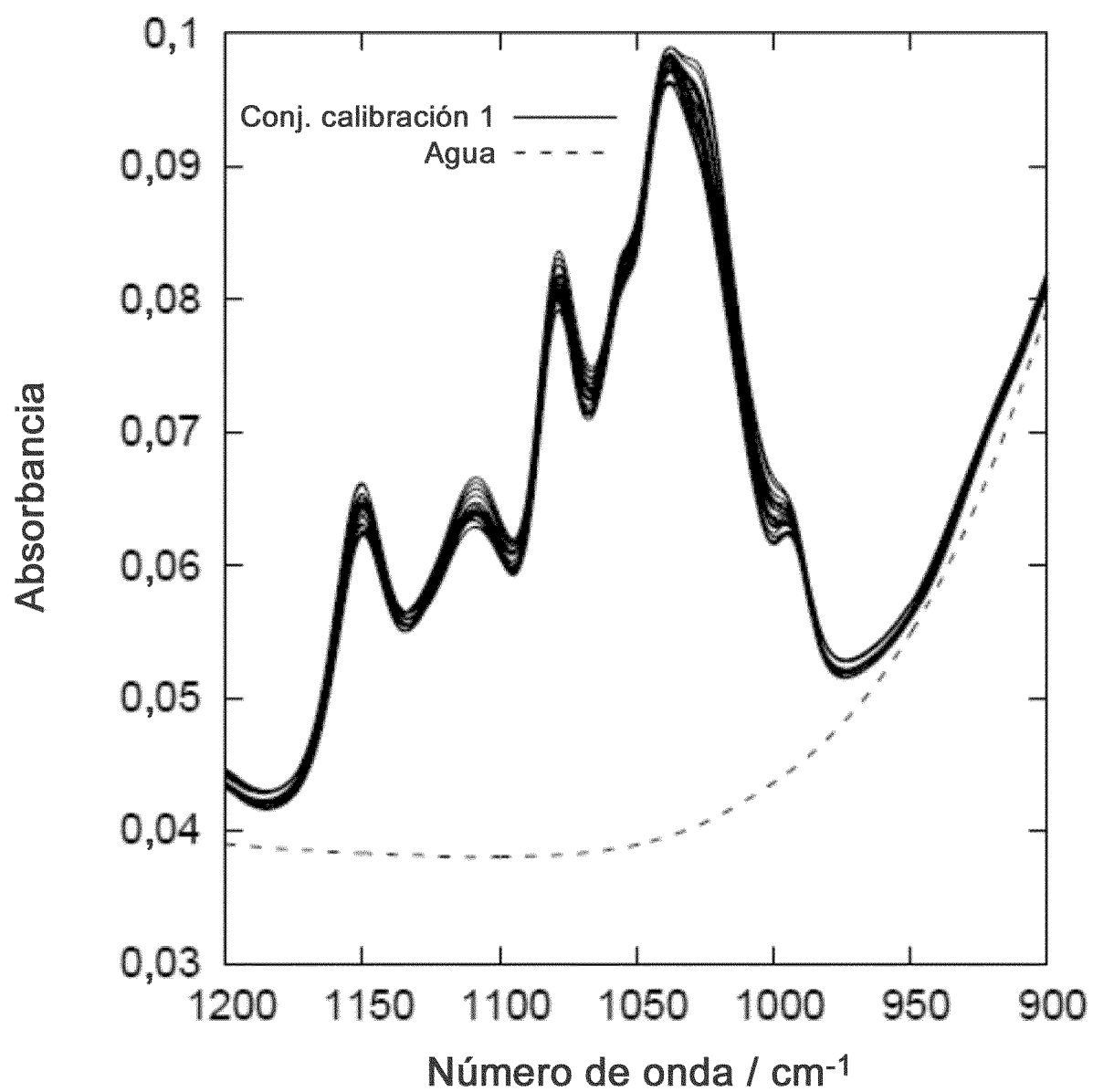


Fig. 25

**Fig. 26**

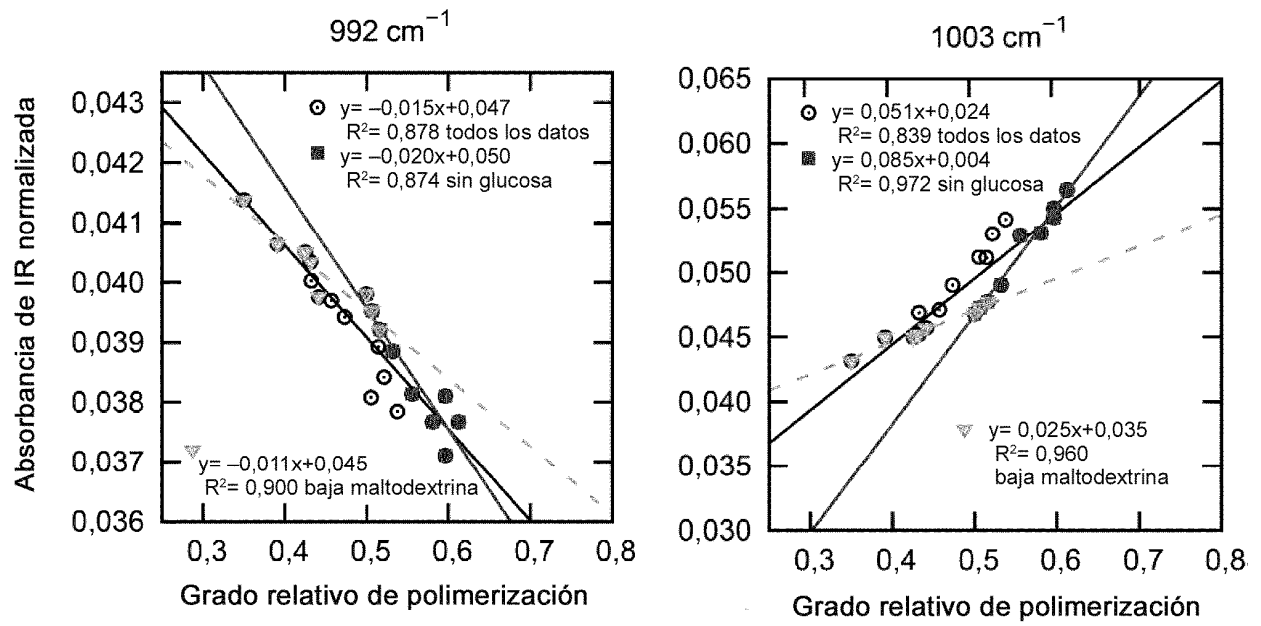


Fig. 27

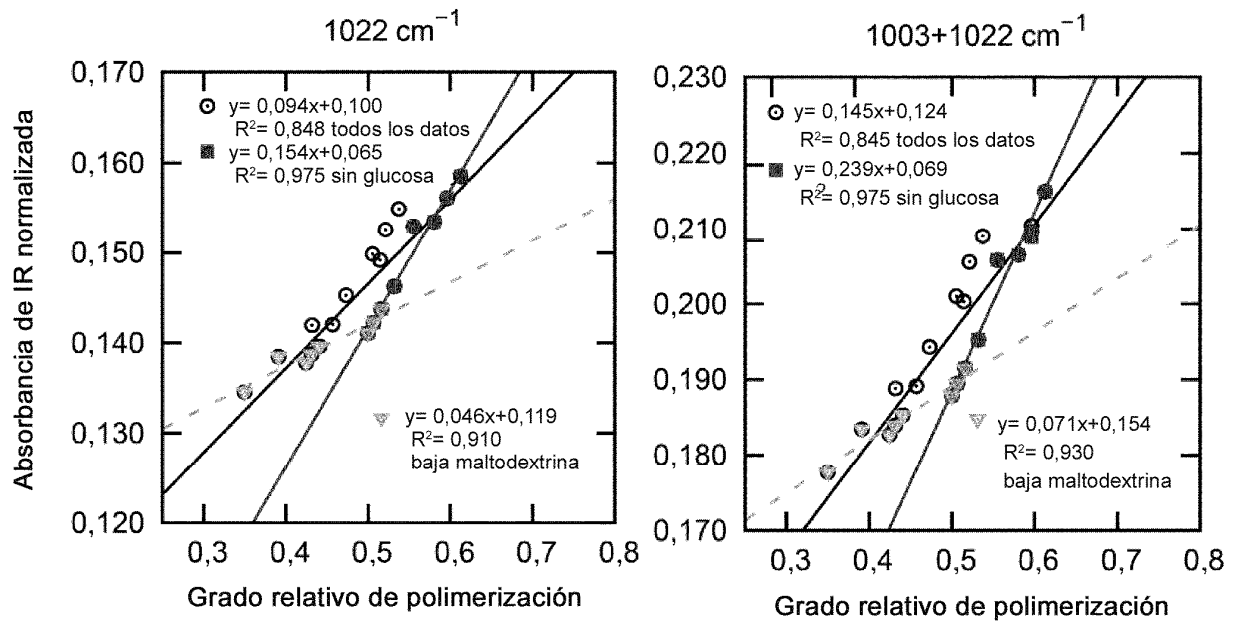


Fig. 27 (continuación I)

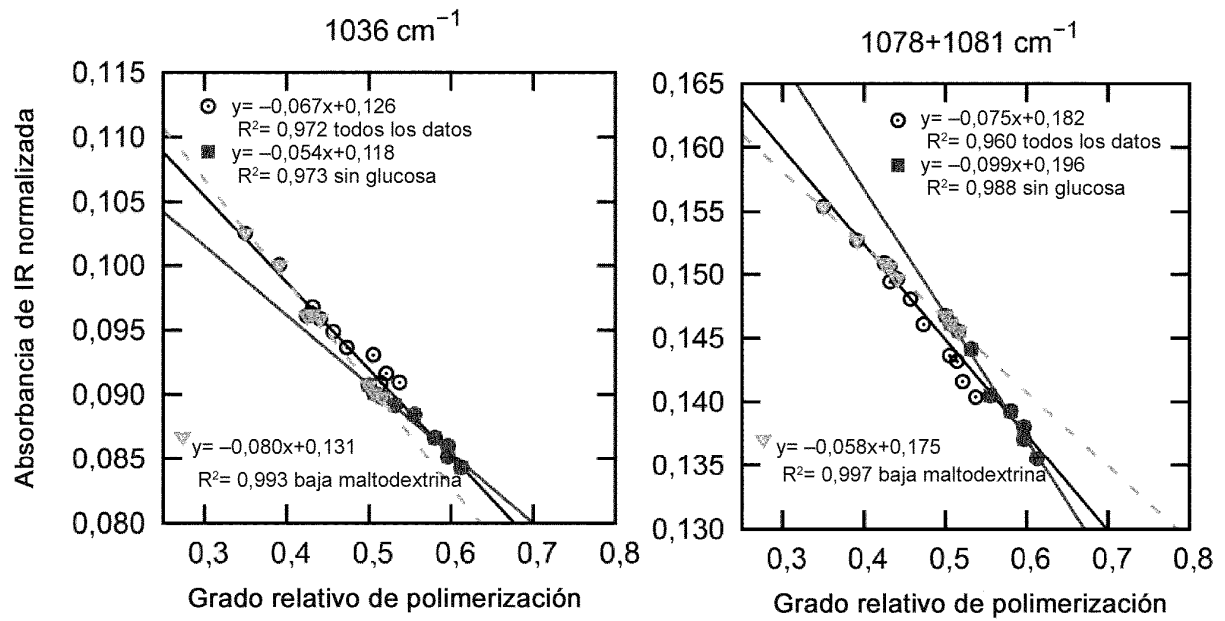


Fig. 27 (continuación II)

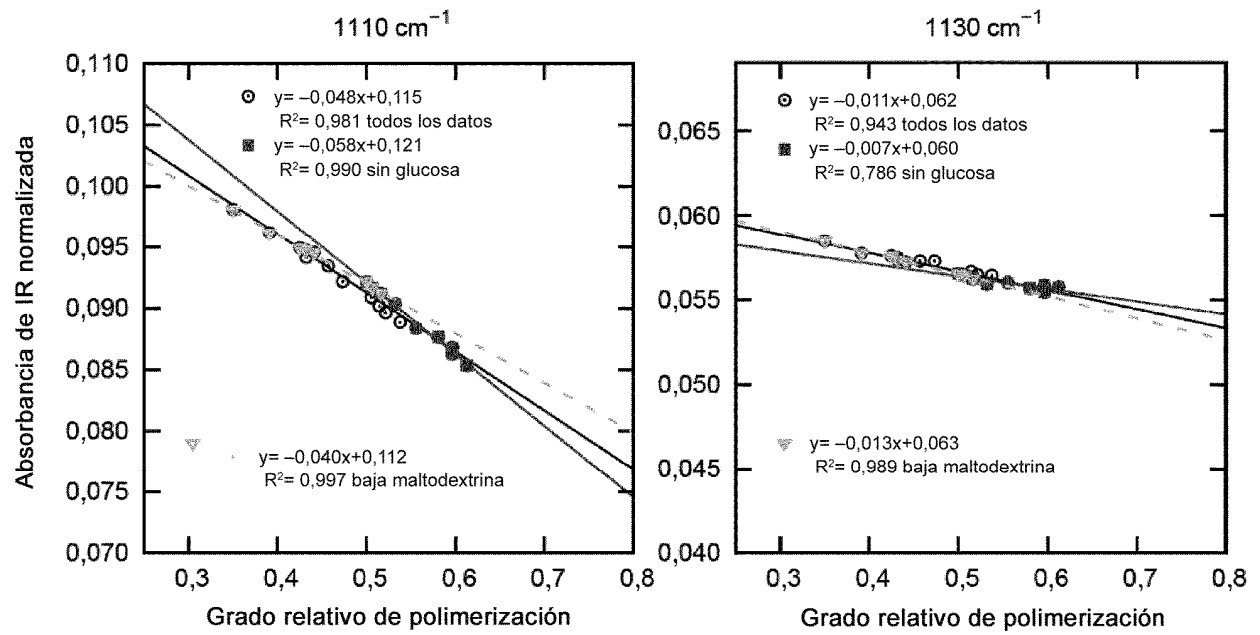


Fig. 28

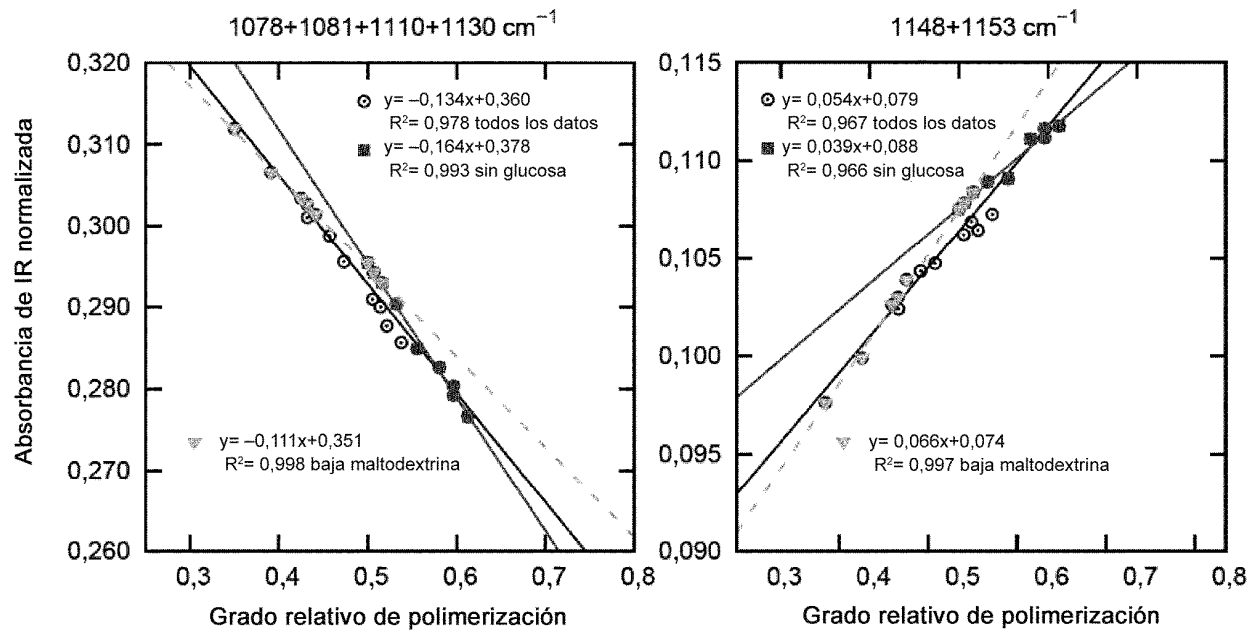


Fig. 28 (continuación)

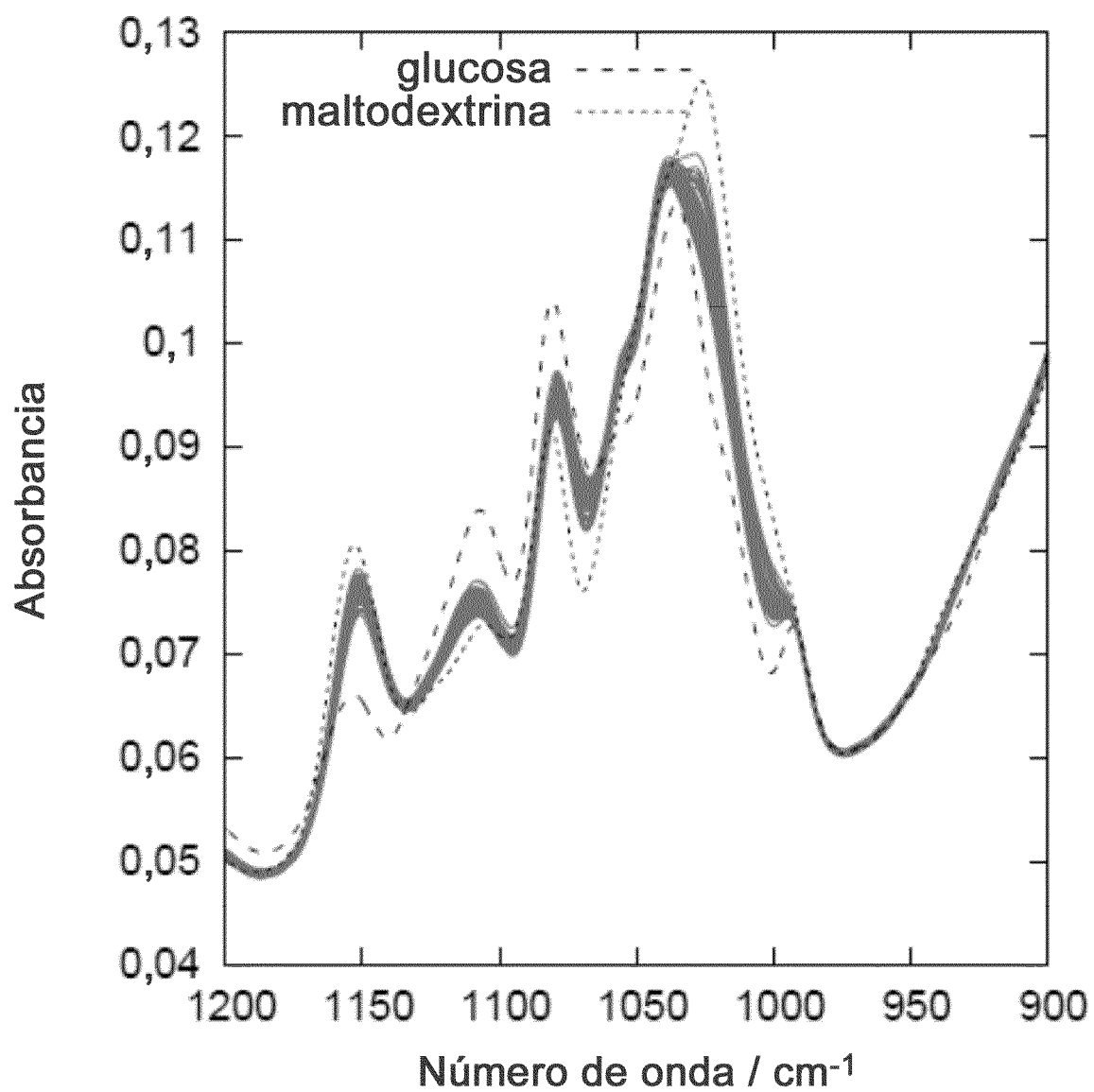


Fig. 29

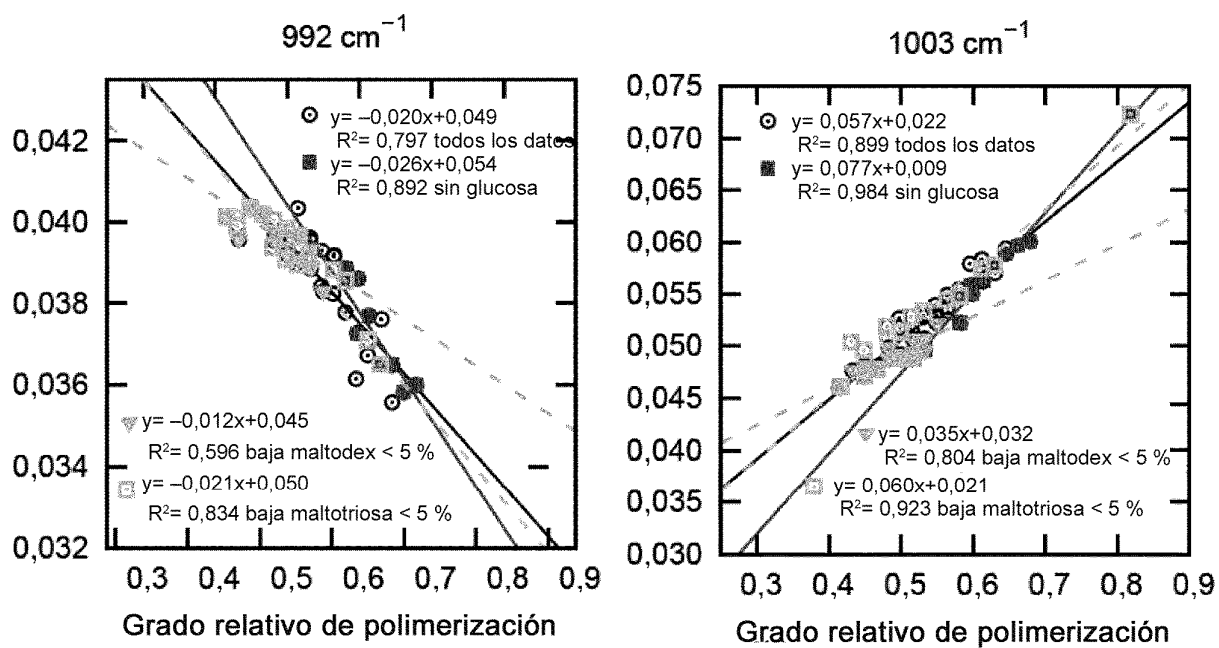


Fig. 30

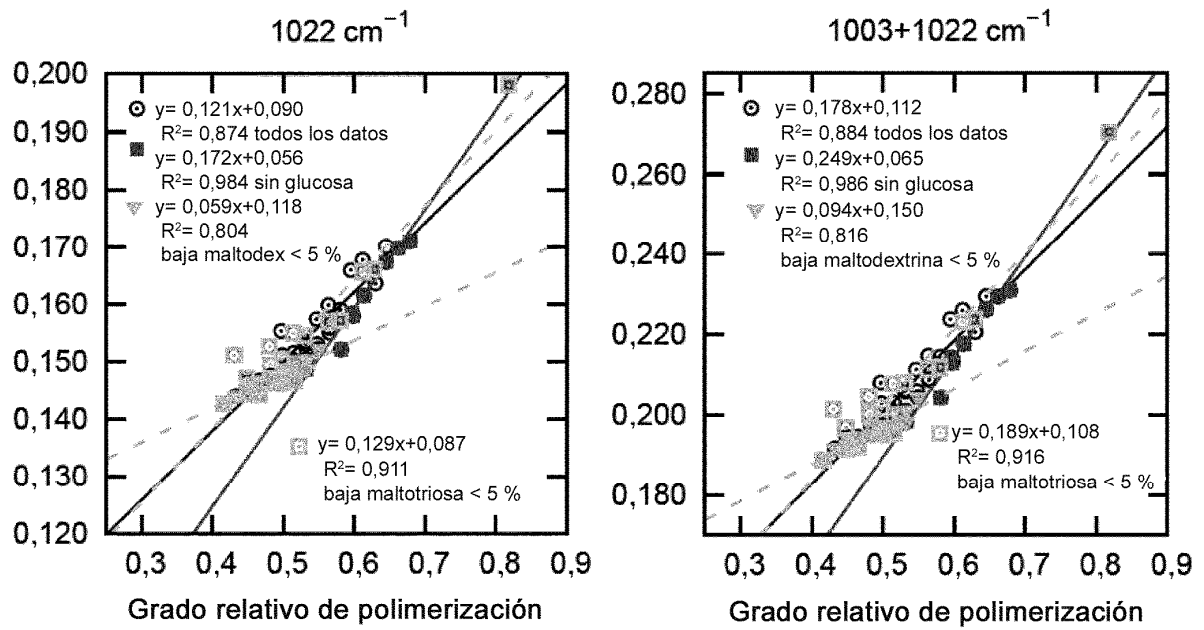


Fig. 30 (continuación I)

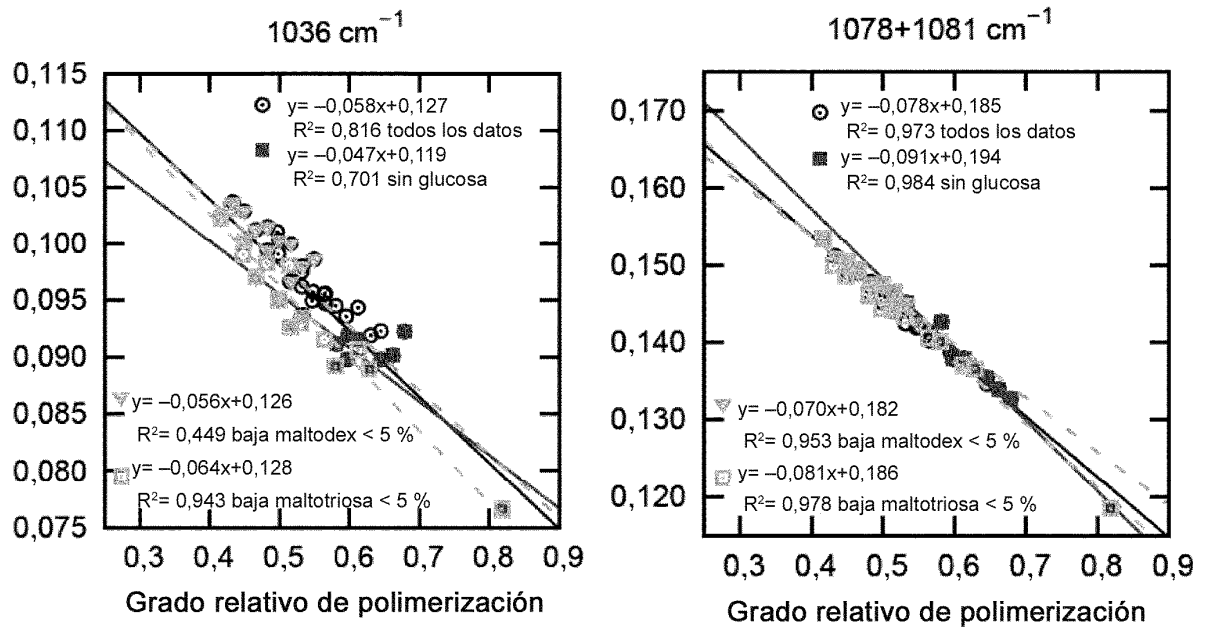


Fig. 30 (continuación II)

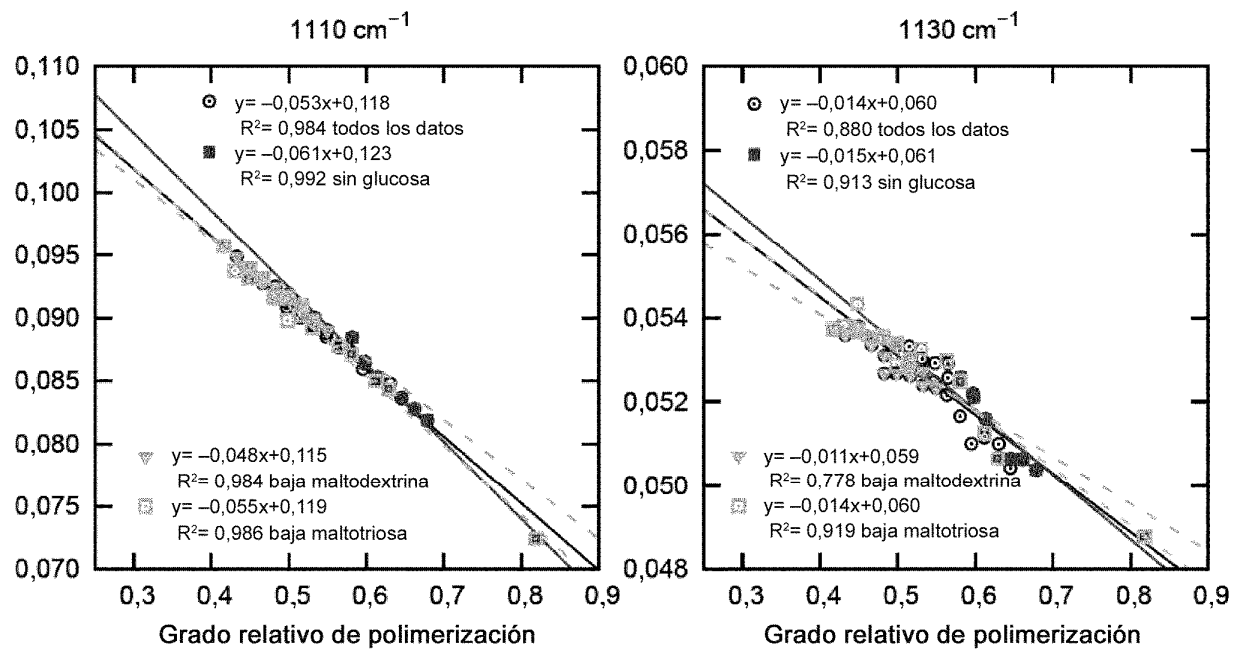


Fig. 31

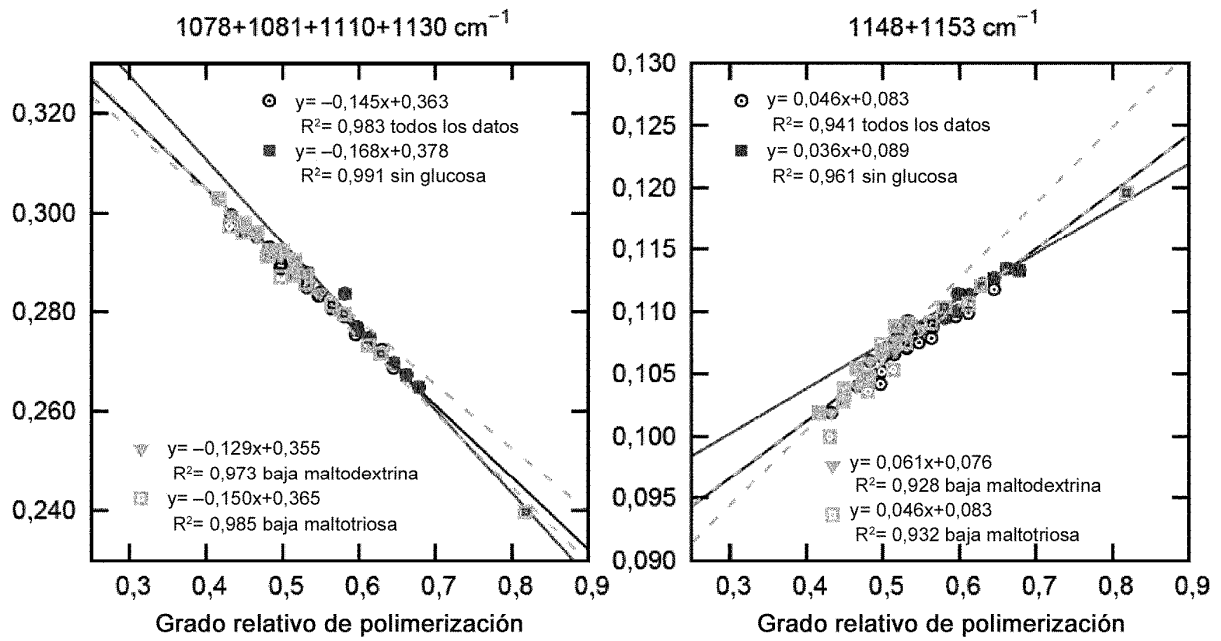


Fig. 31 (continuación)

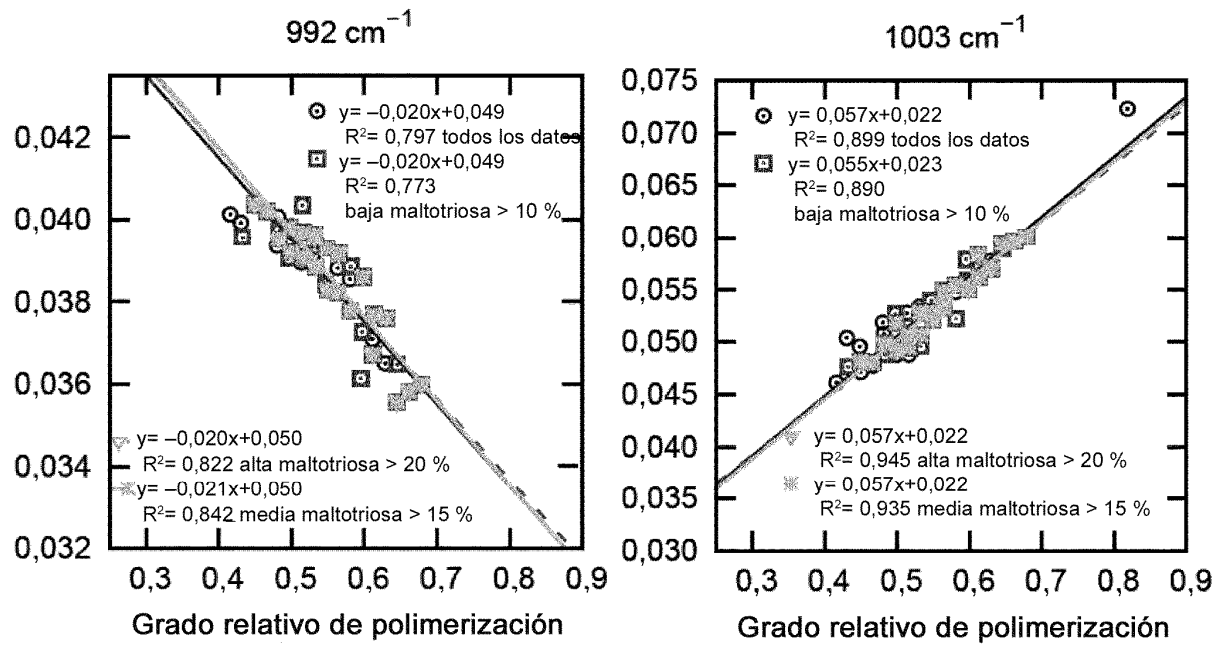


Fig. 32

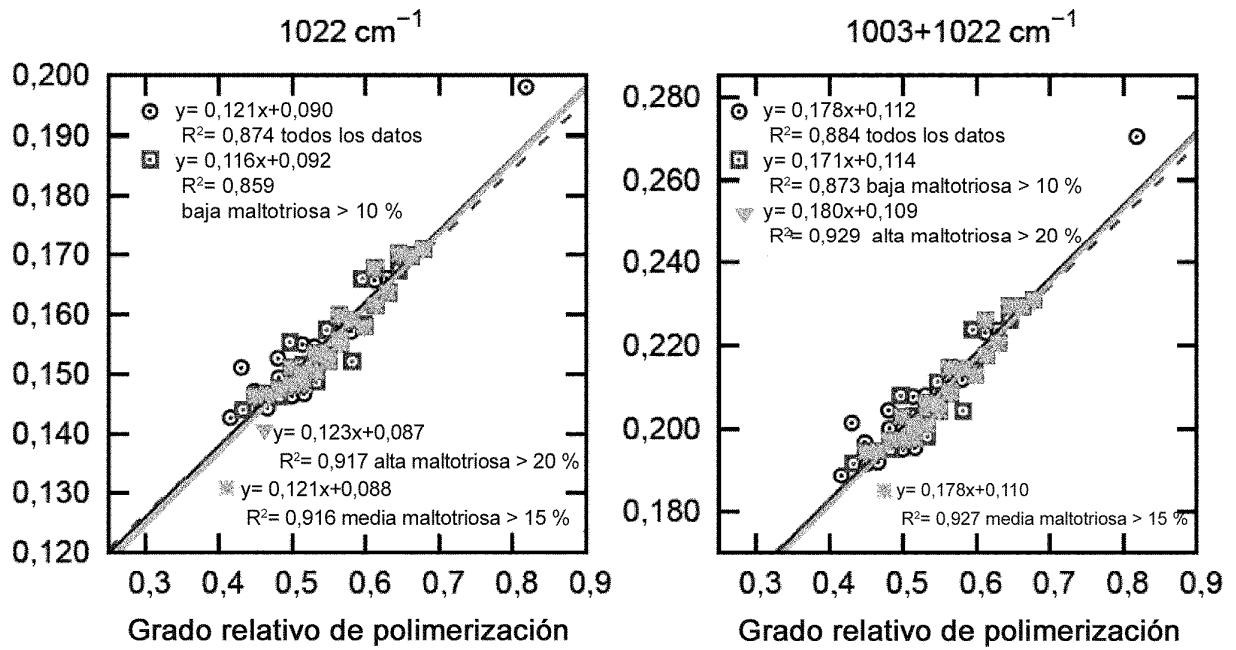


Fig. 32 (continuación I)

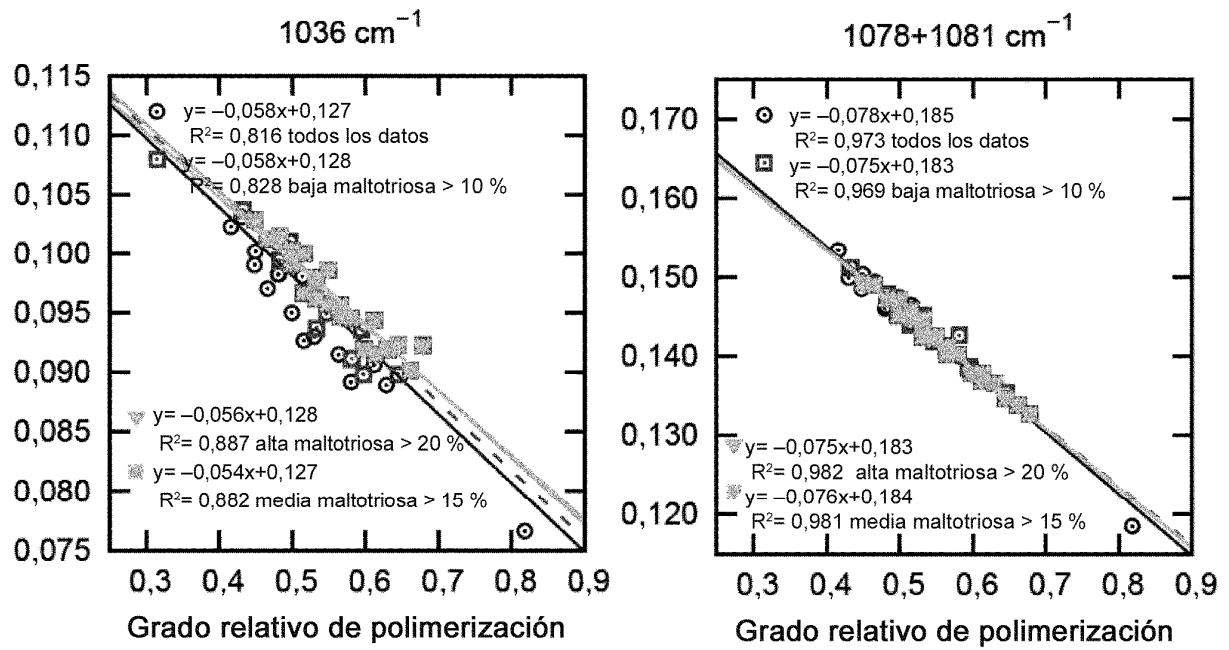


Fig. 32 (continuación II)

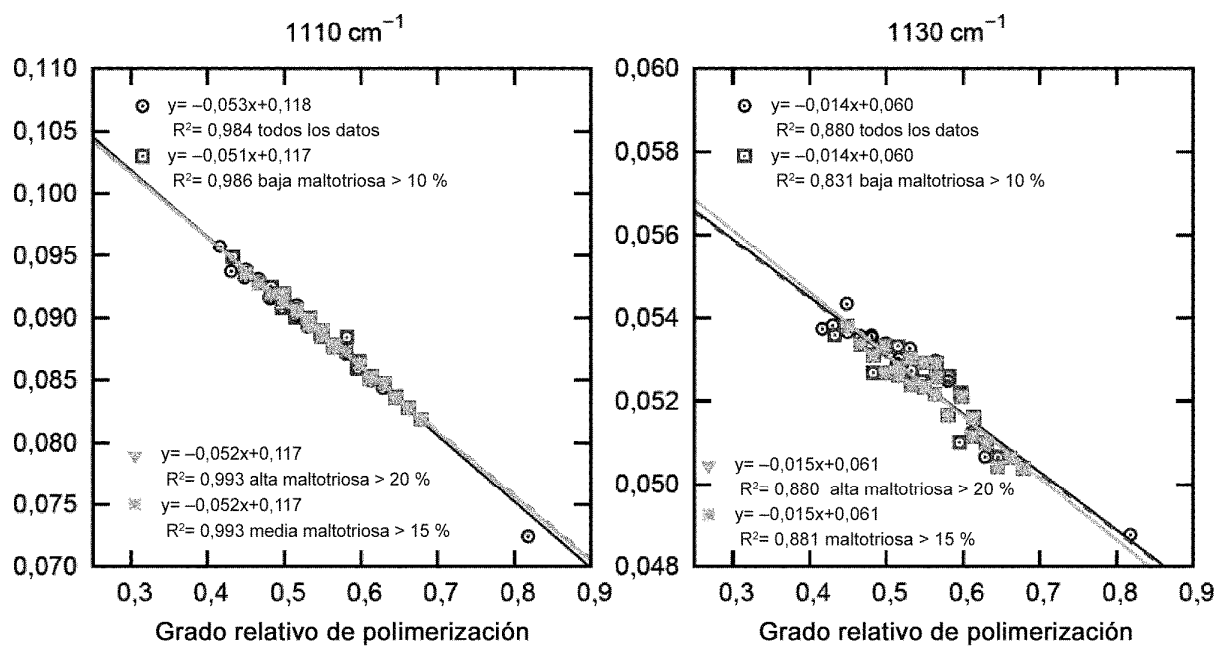


Fig. 33

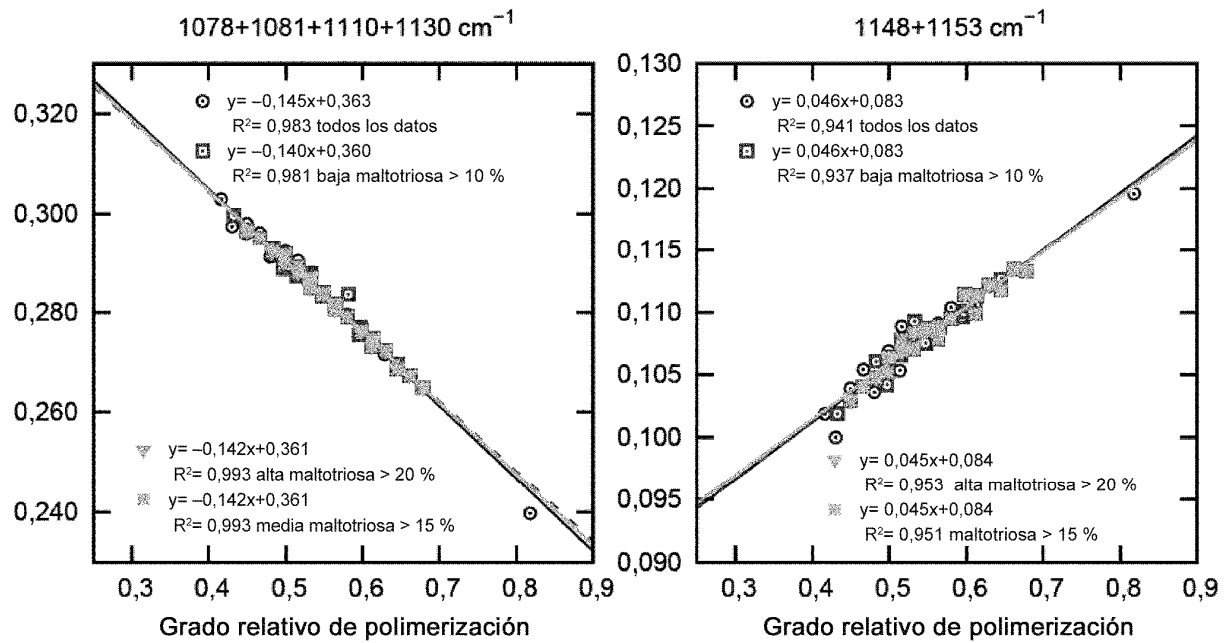
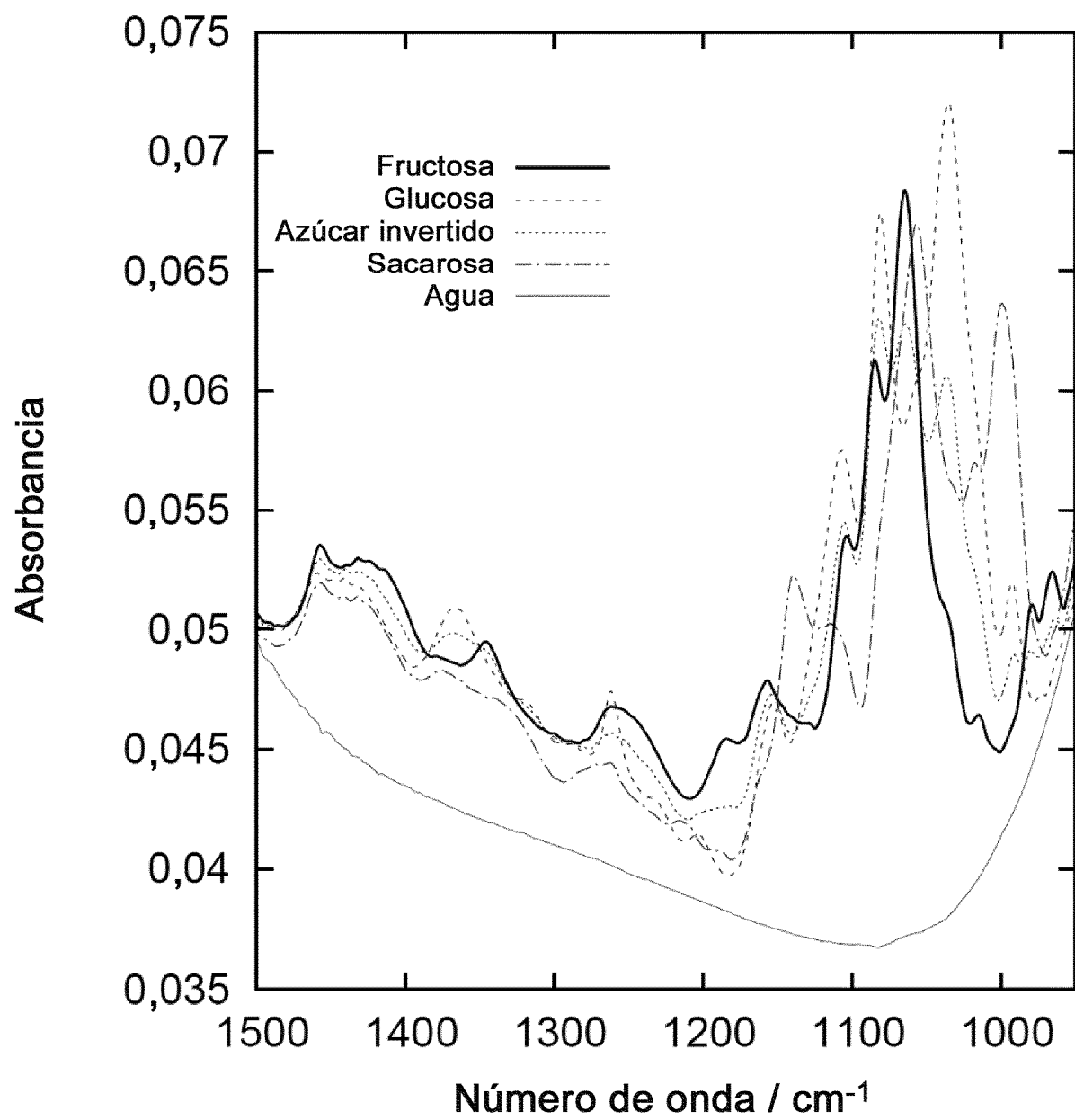


Fig. 33 (continuación)

**Fig. 34**

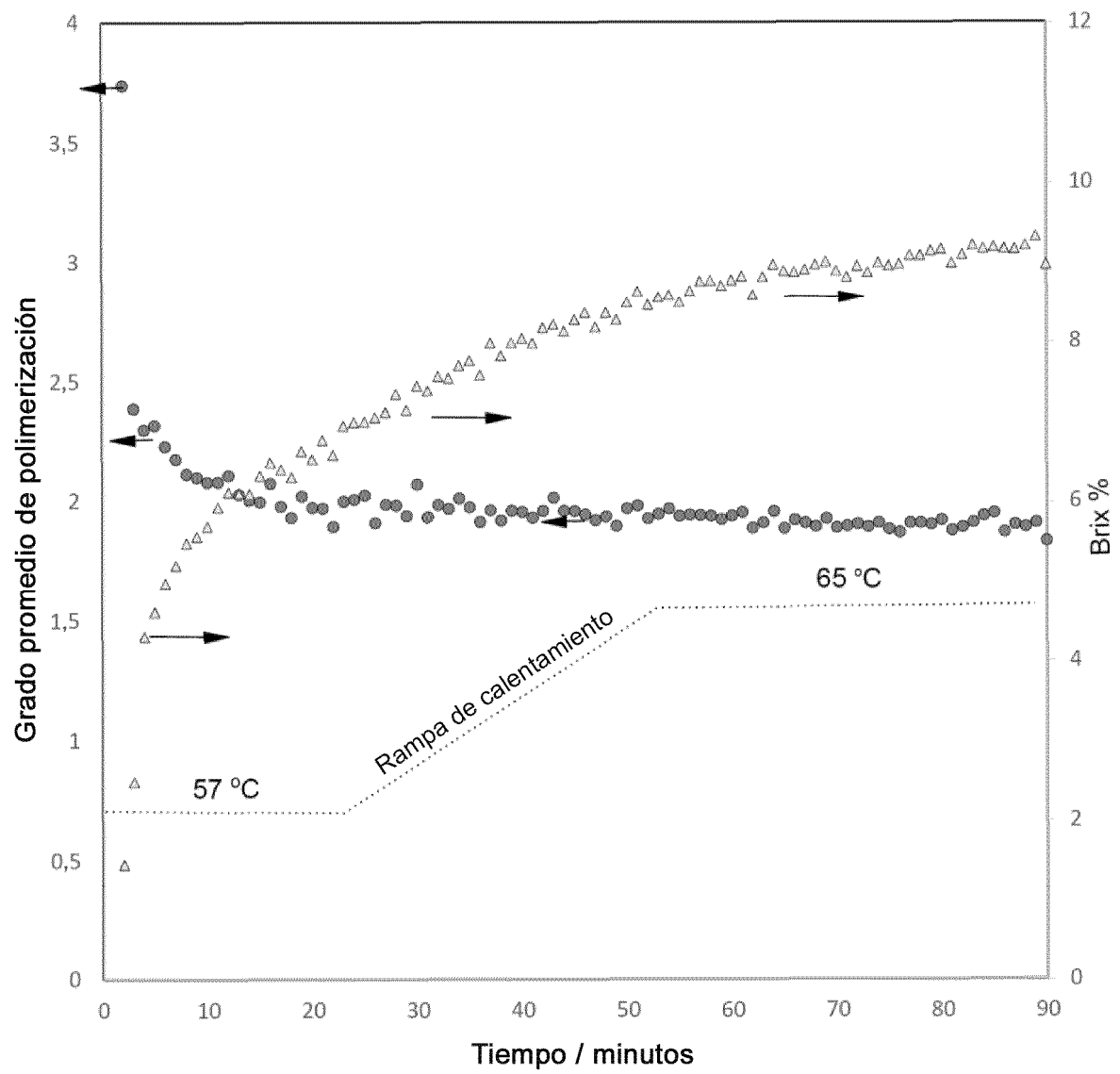


Fig. 35