



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 539**

51 Int. Cl.:  
**A23F 5/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07105686 .5**

96 Fecha de presentación : **04.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1844661**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Composiciones enzimáticas estabilizadas.**

30 Prioridad: **10.04.2006 US 279157**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2011**

73 Titular/es:  
**KRAFT FOODS GLOBAL BRANDS L.L.C.**  
**Three Lakes Drive**  
**Northfield, Illinois 60093, US**

72 Inventor/es: **Silver, Richard Stuart y**  
**Whalen-Pedersen, Erik**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 539 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

Composiciones Enzimáticas Estabilizadas.

### Campo de la Invención

5 Esta invención está dirigida a composiciones enzimáticas estabilizadas. Más específicamente, esta invención está dirigida a composiciones enzimáticas estabilizadas con materiales derivados del café. Las composiciones enzimáticas estabilizadas son especialmente útiles en la producción de productos de café.

### Antecedentes de la Invención

10 Las enzimas de uso alimenticio generalmente se producen por fermentación microbiana o por extracción de tejidos vegetales o animales. Las enzimas en bruto, las cuales generalmente están en disolución acuosa, se pueden purificar y concentrar mediante técnicas tales como centrifugación, ultrafiltración por membrana, microfiltración, precipitación de sal, precipitación de disolvente y similares. A continuación, las enzimas refinadas se estandarizan y se formulan en una forma comercializable, tal como un líquido acuoso, un polvo granulado seco o una forma granular aglomerada. Con frecuencia se usan preparaciones no formuladas (tales como concentrados enzimáticos acuosos o precipitados de sal) para los propósitos de la investigación pero no son comunes como enzimas comerciales debido a la dificultad en la manipulación, la alta probabilidad de crecimiento microbiano y/o la actividad disminuida durante el almacenamiento. La estabilización de las enzimas implica tanto inhibición del crecimiento microbiano como conservación de la actividad enzimática durante el procesamiento y almacenamiento. La actividad enzimática puede disminuir debido a un número de procesos naturales, que incluyen oxidación, hidrólisis térmica y proteólisis. El crecimiento microbiano es más común en sistemas acuosos y menos importante en formulaciones secas. Sin embargo, no todas las enzimas se pueden secar fácilmente y en muchos casos se pueden preferir las formulaciones acuosas debido a la falta de contaminantes atmosféricos y a la facilidad de uso.

25 Se pueden añadir ciertos materiales o ingredientes autorizados para uso alimenticio a formulaciones enzimáticas líquidas o secas para (1) estabilizar la actividad enzimática durante la purificación, el procesamiento, almacenamiento y/o consumo, (2) inhibir el crecimiento de microorganismos, (3) permitir la estandarización del ingrediente activo y/o (4) facilitar administraciones más convenientes de la enzima. Tales materiales o ingredientes incluyen antimicrobianos que inhiben el crecimiento microbiano en el producto, estabilizadores que preservan la actividad enzimática durante el secado, almacenamiento o consumo, dispersantes que ayudan a humedecer o dispersar la enzima, agentes tampón que controlan el pH de la formulación y durante el uso y agentes de carga/estandarización que permiten el ajuste de la actividad a un nivel estandarizado y la administración conveniente de la enzima. Ejemplos de antimicrobianos de uso alimenticio incluyen ácido sórbico, ácido propiónico, sorbato de potasio, eritorbato de sodio. Otros estabilizadores incluyen azúcares tales como sucrosa y lactosa, polioles tales como glicerol, sorbitol, manitol, sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, materiales proteínicos tales como leche sin grasa, y concentrado de proteína de suero, y similares, oligómeros tales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol y materiales anfotéricos tales como betaina y gamma-aminodibutirato. No siempre se conoce bien el mecanismo (modo de acción) de la estabilización; pero parece implicar protección de la proteína enzimática (o en algunos casos, de la entidad no-proteica requerida para la actividad) de la desnaturalización o desactivación de extremos térmicos, desecación, corte, tensión osmótica, tensión de pH, gradientes iónicos, proteólisis y otras fuerzas adversas. Los agentes tampón incluyen ácido acético, acetato de sodio, fosfato de sodio, ácido sulfúrico, carbonato de calcio y similares. Los dispersantes incluyen lecitina, saponinas y similares. Si la preparación enzimática es para ser secada, puede ser preferible añadir ingredientes de formulación o estabilizantes al líquido acuoso antes del secado ya que se mezclan mejor con las enzimas y los estabilizadores pueden proteger las enzimas durante el secado.

45 El café soluble, también denominado café instantáneo, es una alternativa conveniente al más tradicional café tostado y molido R&G (siglas del Inglés "Roast and Ground"). Sin embargo, los cafés instantáneos con frecuencia comercializan el sabor fuerte del grano R&G para la conveniencia de la preparación rápida. El café soluble generalmente se produce mediante extracción e hidrólisis térmica del café tostado y molido (R&G), seguido de separación y secado del extracto. Con frecuencia los cafés solubles pueden tener un sabor y aroma desequilibrados debido al alto grado de procesamiento y pérdidas asociadas. Las altas temperaturas y presiones usadas en tales procesos con frecuencia producen malos sabores indeseados, generando así un producto de menor calidad en comparación con el tradicional café R&G.

50 La calidad inferior de los cafés solubles ha sido un problema de hace mucho tiempo. Se han realizado diversos intentos para diseñar un proceso de café soluble de alto rendimiento que elimine los malos sabores indeseados y retenga la mayoría del sabor y aroma del café como sea posible. Se ha explorado el uso de enzimas en la producción del café soluble en un intento de resolver este problema de hace mucho tiempo.

- 5 Por ejemplo, el documento de Patente U.S. Nº 2.282.138 de Kellogg describe la producción de café soluble usando una enzima de conversión, tal como taka diastasa, para tratar el material de café. Este proceso usa corriente a alta presión (103,422 kPa (15 psi)) para suavizar y soltar la matriz del grano de café seguido de enfriamiento y tratamiento posterior con la enzima a temperaturas no considerablemente por encima de 65°C y generalmente entre 48 y 54°C.
- El documento de Patente U.S Nº 4.983.408 de Colton describe un proceso que usa enzimas para hacer solubles componentes del café después de someter el café molido a un pretratamiento "explosión por vapor" seguido de una rápida descompresión a presiones atmosféricas. Las enzimas usadas incluyen amilasas, hemicelulasa, celulasa, proteasa, celobiasa, pectinasa y lipasas.
- 10 El documento de Patente U.S. Nº 4.904.484 de Small et al. describe un método para producir café R&G mediante el tratamiento de granos de café verde o parcialmente tostados con enzimas antes de un tueste final. Las enzimas usadas incluyen enzimas digestivas de la pared celular, digestivas de componente de almacenamiento celular o fenol oxidasas. Las enzimas digestivas de pared celular incluyen celulasas, hemicelulasas, pectinasas, glucanasas, manasas y ligninasas. Las enzimas digestivas de componente de almacenamiento celular incluyen amilasas, glucosidasas, manosidasas, dextranasas y proteasas. Las enzimas fenol oxidasas incluyen tirosinasa, fenolasa y otros extractos tales como téis, zumo de manzana, zumo de pera y zumo de uva.
- 15 Se ha informado del uso de materiales de café tales como posos de café usado como nutriente de fermentación para la producción microbiana de enzimas. Véase, por ejemplo, Regalado et al., J. Sci. Food Agr., 80:9, pp. 1.343-1.350 (2.000).
- 20 Más recientemente, se han preparado extractos de café soluble preparados usando enzimas en un proceso de hidrólisis asociado con las tecnologías de permeación por membrana (véase Rep. 1745702).
- Se muele en húmedo finamente un sólido de café tostado para formar una suspensión de café. La suspensión de café se trata con una cantidad eficaz de una enzima adecuada para formar una mezcla de reacción y a continuación se trata a aproximadamente 20 a aproximadamente 90°C para hidrolizar los componentes de café de los sólidos del café tostado para formar el material de café soluble. El material de café soluble se extrae con agua y a continuación se separa en un retenido, el cual comprende la enzima y otras partículas insolubles, y un permeado, el cual comprende el extracto de café soluble purificado, usando una membrana semi-permeable. Las enzimas especialmente útiles en este proceso incluyen hidrolasas tales como mananasa, celulasa, hemicelulasa, proteasa, pectinasa, nucleasa y lipasa. Este proceso proporciona un café soluble que tiene un sabor superior más equilibrado sin compuestos de degradación térmica indeseados en comparación con el proceso térmico mientras que mantiene el comparable rendimiento de solubilización.
- 25 30
- Mientras que las enzimas hacen posible superar muchas de las limitaciones de la técnica de producción del café soluble al reducir significativamente la entrada de calor a la cual los productos están expuestos, su incorporación en los procesos del café puede llevar un grado de complejidad. Las propias proteínas enzimáticas son de alto peso molecular y se separarán mediante el proceso del café soluble, pero muchos de los ingredientes típicos de formulación o estabilización son de bajo peso molecular y persistirán en el producto final. Específicamente, los ingredientes usados para estabilizar la actividad de las enzimas durante la vida útil de almacenamiento pueden mantenerse dentro de los productos acabados y pueden causar efectos secundarios indeseados en la calidad. Por ejemplo, aunque el proceso descrito en el documento EP1745702 usa separación por membrana, tales ingredientes de la formulación pueden pasar a través de la membrana y concentrarse en el producto del café soluble. Incluso tales agentes de la formulación inicialmente insolubles tales como las maltodextrinas se pueden hacer solubles parcialmente mediante el proceso enzimático y aparecer en el producto de café. La separación de tales agentes de la formulación también incrementará la complejidad y el coste del proceso.
- 35 40
- Por consiguiente, queda una necesidad de proporcionar un método eficaz de producir café soluble que retenga el fuerte sabor y aroma del café similar al café R&G usando enzimas pero sin ingredientes de formulación convencionales normalmente usados para estabilizar tales formaciones enzimáticas. Además, queda una necesidad de proporcionar un método simplificado de producción de café soluble que reduzca los costes y las operaciones por unidad.
- 45
- Compendio de la Invención**
- 50 Esta invención está dirigida a composiciones enzimáticas estabilizadas. Más específicamente, esta invención está dirigida a composiciones enzimáticas estabilizadas con materiales derivados del café. Estas composiciones enzimáticas estabilizadas de esta invención tienen estabilidad de los componentes activos comparable a las

5 formulaciones convencionalmente estabilizadas pero solamente contienen ingredientes de formulación derivados del café. Las composiciones enzimáticas estabilizadas de esta invención se pueden usar en cualquier aplicación donde se desee evitar la inclusión de estabilizadores convencionales y otros aditivos potenciadores de la estabilidad. Las composiciones enzimáticas estabilizadas especialmente son útiles en la producción enzimática del café soluble y otros productos de café.

10 La presente invención proporciona en un primer aspecto una composición enzimática estabilizada que comprende una enzima y una cantidad eficaz de un material derivado del café para estabilizar la enzima, en el que la composición está en forma seca y en el que la composición contiene enzima al aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento y material derivado del café al aproximadamente 75 a aproximadamente 99 por ciento.

La presente invención también proporciona un método para producir un extracto de café soluble, comprendiendo dicho método:

- (1) tratar los sólidos de café para formar una suspensión de café que contiene sólidos de café;
- 15 (2) tratar la suspensión de café con una cantidad eficaz de una enzima en la forma de una composición enzimática estabilizada a una temperatura y durante un tiempo suficiente para hidrolizar los sólidos de café para formar un material de extracto de café soluble, en el que la composición enzimática estabilizada es la composición del anteriormente mencionado primer aspecto; y
- (3) tratar el material de extracto de café soluble para obtener el extracto de café soluble.

20 Esta invención también proporciona un método semi-continuo o continuo para producir un extracto de café soluble, comprendiendo dicho método:

- (1) tratar los sólidos de café tostado finamente molido con una cantidad eficaz de una enzima en la forma de una composición enzimática estabilizada en un recipiente para hidrolizar los sólidos de café para formar un material de extracto de café soluble que contiene extracto de café soluble, en el que la composición enzimática estabilizada es la composición del anteriormente mencionado primer aspecto;
- 25 (2) hacer circular el material de extracto de café soluble a través de un dispositivo de separación por membrana semipermeable para formar continuamente un retenido y un permeado, en el que el permeado contiene el extracto de café soluble y se recoge continuamente y en el que al menos una porción del retenido se recicla al recipiente.

### Descripción detallada

30 Tal como se ha indicado, esta invención está dirigida a composiciones enzimáticas estabilizadas con materiales derivados del café. Las composiciones enzimáticas estabilizadas de esta invención se pueden usar en cualquier aplicación donde se desee evitar la inclusión o el uso de los estabilizadores convencionales y otro aditivos potenciadores de la estabilidad. Por tanto, las presentes composiciones enzimáticas estabilizadas se pueden usar en la producción de diversos productos alimenticios, productos farmacéuticos, productos de cosmética y similares siempre que los materiales derivados del café sean aceptables durante el procesamiento y en el producto final. Estas composiciones enzimáticas estabilizadas evitan estabilizadores convencionales mientras que aún mantienen la estabilidad enzimática deseada y la actividad durante el almacenamiento y/o consumo usando solamente materiales derivados del café.

40 Las composiciones enzimáticas estabilizadas son especialmente útiles en la producción del café soluble y otros productos de café usando enzimas que no contienen estabilizadores convencionales normalmente asociados con las formulaciones enzimáticas. Por tanto, las composiciones enzimáticas estabilizadas de esta invención son especialmente útiles en un tratamiento enzimático de los sólidos de café para hidrolizar los materiales de café de la presente memoria.

45 La presente invención también se puede usar para estabilizar la preparación enzimática útil en las industrias alimenticias, farmacéuticas, cosméticas y otras donde los estabilizadores convencionales son indeseados. Las enzimas especialmente útiles en la preparación de alimento que se pueden estabilizar usando este método incluyen mananasa, celulasa, glucanasa, hemicelulasa, lipasa, esterasa, proteasa, carbohidrasa (por ejemplo, arabinasa, galactanasa, arabino-galactanasa), nucleasa, pectinasa, isomerasa, amilasa y ligninasa así como mezclas de los mismos. Usando las presentes composiciones enzimáticas estabilizadas de material derivado de café, se pueden

preparar fácilmente productos de café soluble sin el uso de estabilizadores enzimáticos convencionales.

Los materiales derivados del café útiles para estabilizar las composiciones enzimáticas incluyen, por ejemplo, café soluble, café tostado y molido, aceites de café, posos de café usado (es decir, parcialmente extraídos), granos de café verde molido, extracto de café acuoso, extractos de grano de café verde y similares así como mezclas de los mismos; si se desea se pueden concentrar los extractos u otros materiales de café. Por supuesto, tales materiales derivados del café no deberían incluir, o ser preparados con composiciones enzimáticas que contengan, el estabilizador convencional que la presente invención trata de eliminar del producto final. Por tanto, por ejemplo, materiales de café soluble usados para estabilizar las presentes composiciones enzimáticas no deberían derivarse del café soluble preparado usando composiciones enzimáticas estabilizadas de manera convencional.

10 Las composiciones enzimáticas estabilizadas de la presente invención se secan para formar composiciones sólidas (por ejemplo, polvo o partículas aglomeradas).

Para formulaciones secas, la proteína enzimática activa comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento de la formulación total y los materiales derivados del café comprenden aproximadamente 75 a aproximadamente 99 por ciento de la formulación total. Para formas secas, los materiales derivados del café preferiblemente están presentes durante la formación de la composición enzimática seca (por ejemplo, mediante secado por pulverización, liofilización y similares)

15 Las composiciones secas generalmente se pueden almacenar bajo condiciones ambiente, refrigeradas o de congelación.

Para los propósitos de esta invención, "estabilizadores convencionales" incluyen antimicrobianos convencionales que inhiben el crecimiento microbiano en el producto y estabilizadores convencionales que preservan la actividad enzimática durante el secado, almacenamiento o consumo. Aunque sin deseo de estar limitado por la teoría, parece que los materiales derivados del café usados en la presente invención realizan ambas de estas funciones (es decir, inhibición del crecimiento microbiano y preservación de la actividad enzimática durante almacenamiento y/o consumo). De nuevo sin deseo de estar limitado por la teoría, también parece que los materiales derivados del café también tienen otras funciones tales como, por ejemplo, agentes tampón y dispersantes en la formulación enzimática. Por tanto, parece que los estabilizadores derivados del café de esta invención proporcionan protección de la proteína enzimática (o en algunos casos, entidad no proteica requerida para la actividad) de la desnaturalización o desactivación de extremos térmicos, desecación, corte, tensión osmótica, tensión de pH, gradientes iónicos, proteólisis y otras fuerzas adversas.

30 Cuando las enzimas estabilizadas de esta invención se usan para preparar extracto de café soluble, el material de extracto no purificado comprende extracto de café soluble, enzima y otras partículas insolubles. Por supuesto, puesto que la composición enzimática estaba estabilizada con materiales derivados del café, estabilizadores no convencionales están presentes y se pueden separar la enzima y otra partícula insoluble mediante medios convencionales para obtener extracto de café soluble esencialmente libre de materiales no-café. El extracto de café deseado preferiblemente se puede separar de los otros componentes pasando la mezcla de reacción sobre una membrana semipermeable tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP1745702.

La membrana puede ser cualquier tipo de material con un tamaño de poro que es capaz de retener la enzima y otros insolubles mientras que permite la permeación de sacáridos solubles en agua, extracto de café y otros materiales. Generalmente, deberían ser adecuadas las membranas que tienen un tamaño de poro nominal de menos de aproximadamente 0,8 micras. Por ejemplo, una membrana hecha de polietersulfona con un límite de peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 50.000 Daltons es adecuada para separar el extracto de café soluble. Una membrana de polietersulfona preferida adecuada para usar en el método de esta invención está disponible de Septro, Inc. (Oceanside, CA). Por supuesto, se pueden usar otras membranas de material de construcción. La membrana puede estar contenida dentro de una célula de separación por membrana de flujo cruzado u otro dispositivo similar que se pueda usar para separación por membrana, tales como módulos enrollados en espiral, sistemas de fibra hueca, haces tubulares o módulos de placa y marco.

Las ventajas y realizaciones de esta invención se ilustran más mediante los siguientes ejemplos pero los materiales y cantidades particulares de los mismos enumerados en la presente memoria, así como otras condiciones y detalles, no se deberían construir para limitar indebidamente la invención. Todas las partes, proporciones y porcentajes están en peso al menos que se indique lo contrario.

50 **Ejemplo 1.** Se usó una enzima de mananasa no formulada, congelada (FUM: ChemGen CL160 de ChemGen Corp., Gaithersburg, MD). La enzima FUM (siglas del Inglés "Frozen Unformulated Mannanase") era de una fermentación

de *Bacillus lentus*; se separaron las células y los residuos por centrifugación seguida de concentración enzimática y purificación usando ultrafiltración por membrana; no se añadieron otros materiales. Se diluyó la enzima descongelada 1:20 en (muestra 1) agua desionizada y (muestra 2) agua desionizada que contenía café soluble al por menor Kenco® Really Rich al 10%. Las muestras de ambas disoluciones se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante 30 segundos y a continuación se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Las disoluciones tratadas, así como una disolución no calentada de la muestra 1 (es decir, control), se ensayaron para actividad de mananasa usando un ensayo viscométrico con goma de algarrobo. En comparación con el control, la muestra 1 tratada perdió aproximadamente el 33% de la actividad enzimática inicial mientras que la muestra 2, estabilizada con materiales derivados del café, perdió solamente aproximadamente 2% de la actividad enzimática inicial (es decir, actividad esencialmente sin cambios dentro de los límites experimentales).

**Ejemplo 2.** Este ejemplo ilustra la preparación de las formulaciones enzimáticas secas estabilizadas mediante materiales derivados del café. Se usó la enzima mananasa no formulada congelada (FUM) del Ejemplo 1. Se descongeló una porción de la FUM congelada y se prepararon cinco formulaciones secas (sólidas) añadiendo los siguientes ingredientes individuales (al 20 por ciento) a las muestras de FUM descongelada:

- (1) Café soluble (Maxwell House®);
- (2) Sorbitol y cloruro de sodio (10% cada uno);
- (3) Sílice (malla 40-100; Fisher Scientific);
- (4) Celulosa (polvo Neocel™; Mingtai Chemical); y
- (5) Café tostado y molido (R&G)(Maxwell House®, molido en seco a malla -30).

Las muestras 2-4 se formularon con estabilizadores típicos usados en formulaciones enzimáticas. Cada preparación se mezcló bien y a continuación inmediatamente se sometió a liofilización en un liofilizador VirTis Modelo 25ES. Las porciones de las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 20°C y 50°C; las muestras se retiraron a diferentes intervalos de tiempo para los ensayos microbiológicos y de actividad enzimática.

Se midió la actividad enzimática usando un ensayo viscométrico que usa una disolución acuosa recién preparada de goma garrofín (1%: viscosidad inicial de 2.800-3.500 mPa s (2.800-3500 cP) a 20°C). Se diluyó la formulación enzimática 1:10 en agua, se mezcló bien y a continuación se diluyó más tal como se requería. Las muestras diluidas se ensayaron rápidamente después de la preparación. Se añadió a un tubo que contenía 30 ml de disolución de goma a 20°C, 25 microlitros de una disolución adecuada de una disolución enzimática dada a "tiempo cero". Una disolución adecuada (generalmente aproximadamente 1:100) de la formulación enzimática fue eficaz para reducir la viscosidad de la goma a <500 mPa s (<500 cP) en aproximadamente 5-15 minutos.

Se mezcló cada disolución goma-enzima durante aproximadamente 30 segundos y a continuación se analizó en un viscosímetro DVII+ de Brookfield (Aguja 6 a 20 RPM). Se anotó la viscosidad frente al tiempo usando el programa informático Wingather de Brookfield. Se determinó la actividad enzimática relativa como la pendiente de la regresión lineal de la curva viscosidad frente a tiempo a 500 mPa s (500 cP) y/o el tiempo requerido para alcanzar 500 mPa s (500 cP). Puesto que la respuesta de la pendiente no era necesariamente lineal con la dilución enzimática, preferiblemente se midieron muestras comparativas y controles de referencia a la misma dilución (generalmente aproximadamente 1:100). Debido al factor de concentración implicado en la liofilización, las muestras secas, asumiendo no pérdida de actividad, deberían tener aproximadamente 2,5 veces la actividad por unidad de peso (es decir, 250) de la muestra de FUM inicial (es decir, 100). A continuación, en la Tabla 1 se muestran los resultados.

Tabla 1

Aditivo de Formulación	Actividad Relativa*	
	Almacenamiento a 20°C durante 87 días	Almacenamiento a 50°C durante 56 días
Café soluble	271	167
Sorbitol y cloruro de sodio†	198	118
Sílice‡	235	49

Tabla 1 (continuación)

Aditivo de Formulación	Actividad Relativa*	
	Almacenamiento a 20°C durante 87 días	Almacenamiento a 50°C durante 56 días
Celulosa†	159	35
Café R&G	272	163

\*La actividad relativa de FUM es 100. Las formulaciones pueden tener una actividad mayor de 100 debido a los efectos de la concentración.  
† Estabilizadores convencionales usados en formulaciones enzimáticas

Las muestras estabilizadas de material de café almacenadas a 20°C sorprendentemente tienen actividad algo mayor que las otras formulaciones incluso después de almacenamiento de casi 3 meses.

- 5 Las formulaciones almacenadas a la abusiva temperatura de 50°C eran significativamente menos activas que las almacenadas a 20°C. Sin embargo, sorprendentemente las formulaciones basadas en café retenían un porcentaje mayor de actividad (es decir, por encima de aproximadamente el 60% de la actividad permanente en el almacenamiento de 20°C) en comparación con las formulaciones de material de no-café. Por lo tanto, los materiales derivados del café en formulaciones secas sirvieron como estabilizador a temperaturas de almacenamiento de 20°C y 50°C.

Se evaluó la estabilidad microbiológica determinando los recuentos totales en placa microbiana (TPC, del Inglés "Total Plate Count") usando el método AOAC 966.23. La FUM congelada inicial tenía TPC de 9.800 recuentos/gm. El proceso de liofilización aumentó la concentración de la sustancia seca por 2,5 veces. La Tabla 2 muestra TPC microbiano en las muestras almacenadas durante 3 y 9 semanas a 20°C y durante 3 semanas a 50°C.

15 Tabla 2

Aditivo de Formulación	Recuentos Totales en Placa /g*		
	Almacenamiento a 20°C		Almacenamiento a 50°C durante 56 días
	3 semanas	9 semanas	
Café soluble	6.300	<300	240
Sorbitol y cloruro de sodio†	10.000	<300	750
Sílice†	5.500	<300	500
Celulosa†	500	<300	100
Café R&G	6.500	<300	380

\*El líquido de FUM de referencia tenía un recuentos totales en placa /g de 9.800  
† Estabilizadores convencionales usados en formulaciones enzimáticas

- 20 Todas las muestras secas mostraron una reducción significativa en TPC (en vez de un aumento debido al factor de concentración solamente). Las muestras formuladas con materiales de café eran comparables a otros materiales de la formulación. Las muestras almacenadas a 50°C tenían recuentos mucho más bajos que aquellas almacenadas a 20°C. Las muestras secas almacenadas a 20°C durante 9 semanas se ensayan todas a menos de 300 TPC/gm. Estas muestras secas tienen muy baja actividad en agua así que se inhibe el crecimiento microbiano. Todas las muestras secas tienen TPC microbiano aceptablemente bajo.

**Ejemplo 3.** Este ejemplo ilustra la preparación de formulaciones enzimáticas líquidas estabilizadas mediante materiales derivados del café. Se descongeló la enzima mananasa no formulada congelada del Ejemplo 1 y se prepararon formulaciones líquidas añadiendo los siguientes ingredientes individuales (al 20 por ciento):

- (1) Café soluble (Maxwell House®);
- 5 (2) Sorbitol y cloruro de sodio (20% cada uno); y
- (3) FUM control (no aditivos).

Se almacenaron porciones de las formulaciones líquidas acuosas a 4, 20 y 50°C y se retiraron las muestras a diferentes intervalos de tiempo para el ensayo microbiológico y de actividad enzimática usando las mismas técnicas analíticas que en el Ejemplo 1. En las Tablas 3 y 4 se muestran los resultados microbiológicos y de la actividad enzimática, respectivamente.

Tabla 3

Aditivo de Formulación	Actividad Relativa		
	4°C durante 49 días	20°C durante 60 días	50°C durante 56 días
Control	97,5	31,9	11,1
Sorbitol y cloruro de sodio†	47,6	32,3	19,0
Café soluble	73,4	10,0	0
† Estabilizadores convencionales usados en las formulaciones enzimáticas			

Tabla 4

Aditivo de Formulación	Recuentos Totales en Placa /g		
	4°C durante 3 semanas	20°C durante 3 semanas	50°C durante 3 semanas
Control	3.700	9,5 x 10 <sup>7</sup>	80
Sorbitol y cloruro de sodio†	3.600	530	270
Café soluble	100	200	20
† Estabilizadores convencionales usados en las formulaciones enzimáticas			

15 Las actividades enzimáticas para las muestras líquidas almacenadas a diferentes tiempos y temperaturas se muestran en la Tabla 3. Debido al efecto de dilución de los ingredientes de formulación, se prevé que los líquidos formulados tienen aproximadamente 60% de la actividad del control (es decir, FUM no formulada) asumiendo no efecto para los aditivos.

20 Para las muestras almacenadas a 4°C, la FUM no formulada retuvo un alto porcentaje de la actividad control (es decir, por encima del 97%) incluso después de más de 7 semanas de almacenamiento. Sorprendentemente, la formulación de café soluble almacenada a 4°C durante más de 7 semanas tenía más del 73% de la actividad control; esto es más alto que el 60% previsto si los ingredientes tuvieran no efecto. La formulación sal/sorbitol almacenada a 4°C tenía 47,6% de la actividad control.

Para el almacenamiento bajo condiciones abusivas de 50°C durante 8 semanas, la FUM no formulada retuvo solamente el 11% de la actividad control. La formulación de café soluble formó un gel virtualmente insoluble a 50°C y

perdió esencialmente toda la actividad. Durante el almacenamiento a 20°C, aunque había crecimiento microbiano sustancial en la FUM no formulada (véase a continuación), se retuvo aproximadamente el 32% de la actividad enzimática control; este material sería inaceptable debido al crecimiento microbiano. La formulación del café soluble retuvo solamente el 10% de la actividad control y se formó un gel parcialmente insoluble.

- 5 En base a estos datos, el café soluble parece ser un estabilizador eficaz de la actividad enzimática en formulaciones líquidas acuosas almacenadas en condiciones refrigeradas (4°C). Sin embargo, no es eficaz durante el almacenamiento a temperatura ambiente (20°C) o durante condiciones más abusivas (50°C).

10 Tal como se muestra en la Tabla 4, la FUM control no formulada era microbianamente inestable cuando se almacenaba a 20°C; en 3 semanas de tiempo el recuento total en placa había aumentado drásticamente. Sin embargo, el control no formulado almacenado a 4°C mostró reducción más del 60% en TPC y 99% cuando se almacenaba a 50°C. Presumiblemente esto es debido a la muerte durante el almacenamiento de una porción de los microbios inicialmente presentes. A la inversa, ambas muestras formuladas mostraron buena estabilidad microbiana cuando se almacenaban a 20°C durante 3 semanas, con la formulación de café soluble que da TPC algo más baja. Por lo tanto, el café soluble al 40% en peso inhibe el crecimiento microbiano durante almacenamiento al 20°C. En 15 almacenamiento de 6 semanas a 20°C, las muestras formuladas mostraron pequeño cambio en la TPC.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición enzimática estabilizada que comprende una enzima y una cantidad eficaz de un material derivado del café para estabilizar la enzima, en la que la composición está en una forma seca y en la que la composición contiene enzima al aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento y material derivado del café al aproximadamente 75 a aproximadamente 99 por ciento.
2. La composición de la Reivindicación 1, en la que la enzima es una enzima hidrolasa.
3. La composición de la Reivindicación 1 ó 2, en la que la enzima hidrolasa se selecciona entre el grupo que consiste en mananasa, celulasa, gluconasa, hemicelulasa, lipasa, esterasa, proteasa, arabinasa, galactanasa, arabino-galactanasa, nucleasa, pectinasa, isomerasa, amilasa, ligninasa y mezclas de las mismas.
4. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en la que el material derivado del café se selecciona entre el grupo que consiste en café soluble, café tostado y molido, aceite de café, posos de café usado, granos de café verde molido, extracto de café acuoso, extracto de grano de café verde y mezclas de los mismos.
5. Un método para producir un extracto de café soluble, comprendiendo dicho método:
- (1) tratar los sólidos de café tostado para formar una suspensión de café que contiene sólidos de café;
- (2) tratar la suspensión de café con una cantidad eficaz de una enzima en la forma de una composición enzimática estabilizada a una temperatura y durante un tiempo suficiente para hidrolizar los sólidos de café para formar un material de extracto de café soluble, en el que la composición enzimática estabilizada es la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4; y
- (3) tratar el material de extracto de café soluble para obtener el extracto de café soluble.
6. El método de la Reivindicación 5, en el que la suspensión de café en la etapa (1) se forma mediante molienda húmeda de los sólidos de café tostado y en la que el extracto de café soluble en la etapa (3) se obtiene mediante separación del material de extracto de café soluble en un retenido y un permeado, en el que el permeado comprende el extracto de café soluble.
7. El método de la Reivindicación 6, en el que la separación del material de extracto de café soluble en un retenido y un permeado se lleva a cabo usando una membrana semipermeable que tiene un límite de peso molecular desde aproximadamente 20.000 a aproximadamente 50.000 Daltons.
8. Un método semicontinuo o continuo para producir un extracto de café soluble, comprendiendo dicho método:
- (1) tratar los sólidos de café finamente molido con una cantidad eficaz de una enzima en la forma de una composición enzimática estabilizada para hidrolizar los sólidos de café para formar un material de extracto de café soluble que contiene extracto de café soluble, en el que la composición enzimática estabilizada es la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4;
- (2) hacer circular el material de extracto de café soluble a través de un dispositivo de separación de membrana semipermeable para formar continuamente un retenido y un permeado, en el que el permeado contiene el extracto de café soluble y se recoge continuamente y en el que al menos una porción del retenido se recicla al recipiente.
9. El método de la Reivindicación 8, en el que la membrana semipermeable tiene un límite de peso molecular desde aproximadamente 20.000 a aproximadamente 50.000 Daltons.