

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 847**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2006 E 06720745 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1856270**

54 Título: **Procedimientos de preparación de jarabes**

30 Prioridad:

15.02.2005 US 653008 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2014

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)
15407 MCGINTY ROAD WEST
WAYZATA, MINNESOTA 55391, US**

72 Inventor/es:

**CARLSON, TING L.;
WOO, ANTON y
ZHENG, GUO-HUA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 444 847 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

Procedimientos de preparación de jarabes.

5 **Antecedentes**

10 Los jarabes de maíz para la utilización en la producción de bebidas (por ejemplo bebidas deportivas) y otras aplicaciones alimentarias son conocidos. Sin embargo, resultaría deseable disponer para la utilización en bebidas y otras aplicaciones alimentarias, según se requiera, un producto con dulzor y funcionalidad que resulten similares a las del jarabe de maíz, pero que presente un índice glucémico más bajo.

Sumario

15 En la presente memoria se proporcionan procedimientos eficientes de preparación de jarabes de índice glucémico bajo (JIGB) sustancialmente transparentes que comprendan oligosacáridos de alternano. Estos jarabes presentan un índice glucémico relativamente bajo y adicionalmente resultan útiles en aplicaciones en las que se desea una transparencia incrementada. Estas cualidades resultan particularmente beneficiosas en formulaciones alimentarias y de bebidas.

20 Los métodos de preparación de JIGB sustancialmente transparentes según las reivindicaciones incluyen reaccionar más de un sustrato (sacarosa inicial y uno o más aceptores iniciales seleccionados de entre un azúcar o alcohol de azúcar con grupos hidroxilo libres en una o más de entre las posiciones de carbono 2, 3 y 6 que puedan aceptar una unidad de glucosa de la sacarosa) a una concentración de por lo menos 40% p/p con por lo menos una enzima alternano-sacarasa a temperaturas superiores a 45°C. En formas de realización adicionales, el sustrato se encuentra a una concentración de por lo menos aproximadamente 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55% p/p. En formas de realización adicionales, dicho sustrato y enzima pueden hacerse reaccionar a temperaturas superiores a 46, 47, 48, 49, 50 o 51°C.

30 En algunas formas de realización, los procedimientos incluyen reaccionar una o más alternano-sacarosas con el sustrato durante un periodo de tiempo relativamente corto, tal como menos de 12 horas, o menos de 11, 10, 9, 8 o 7 horas.

35 Los JIGB sustancialmente transparentes preparados a temperaturas superiores a 45°C y concentraciones de sustrato de por lo menos 40% p/p típicamente son visualmente más transparentes que los jarabes preparados a temperaturas más bajas y concentraciones de sustrato más bajas. La transparencia también puede determinarse utilizando el procedimiento de ensayo descrito en la presente memoria. En algunas formas de realización el JIGB sustancialmente transparente, ajustado a una concentración de 20% p/p, muestra una transmitancia a 650 nm superior al 93%, o superior a 94, 95, 96, 97, 98 o 99%.

40 En algunas formas de realización, el JIGB sustancialmente transparente comprende menos de 0,5% de alternano con más de un DP 12 (grado de polimerización de unidades de glucosa).

45 En algunas formas de realización, los procedimientos proporcionan JIGB sustancialmente transparente que presenta una viscosidad baja, tal como una viscosidad inferior a 14.000 cups a 80°F y una concentración de sólidos secos del 77%. En otras formas de realización, el JIGB sustancialmente transparente medido a 80°F y 77% de concentración de sólidos secos muestra una viscosidad inferior a 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000 o 4.000 cps.

50 En algunas formas de realización, la enzima alternano-sacarasa utilizada puede prepararse mediante procedimientos recombinantes tales como los descritos en la patente US n° 6.570.065. En formas de realización adicionales, la enzima recombinante es de menor tamaño o truncada en comparación con la enzima de longitud completa ("Characterization of alternansucrase from *Leuconostoc Mesenteroides* NNRL B-1355: rational and random approach to design of novel glucansucrase", Gilles Joucla, Tesis doctoral, Ingenier INSA, Toulouse, Francia, 2003).

55 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un alimento o bebida que comprende mezclar uno o más ingredientes con un jarabe sustancialmente transparente preparado mediante el procedimiento de preparación de un jarabe sustancialmente transparente según las reivindicaciones. El documento WO n° 2004/023894 (A1) da a conocer un procedimiento para la preparación de una composición alimentaria o de bebida de bajo índice glucémico, que comprende incorporar en la composición alimentaria o de bebida un edulcorante de bajo índice glucémico que comprende una mezcla de sacarosa y un componente seleccionado de entre el grupo que consiste en un jarabe y sólidos de jarabe que comprenden un aceptor seleccionado de entre el grupo que consiste en un azúcar y un alcohol de azúcar con grupos hidroxilo libres en una o más de las posiciones de carbono 2, 3 y 6 que puede aceptar una unidad de glucosa de la sacarosa, habiendo reaccionado dicha mezcla con una enzima glucano-sacarasa.

65 El documento WO n° 2004068966 (A1) da a conocer un procedimiento para alargar la longitud de la cadena de los isomalto-oligosacáridos, caracterizado porque dicho procedimiento comprende una reacción de transferencia

enzimática entre la sacarosa y los isomalto-oligosacáridos presentes en un jarabe de carbohidrato. En particular, dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (a) utilización de uno o más enzimas productoras de isomalto-oligosacáridos para convertir un jarabe de malto-oligosacáridos en un jarabe de carbohidrato que contiene isomalto-oligosacáridos, b) adición de sacarosa al jarabe de carbohidratos, c) adición de glucano-sacarasa, d) producción de un mezcla con consistencia de jarabe mediante la conversión de los isomalto-oligosacáridos contenidos en el jarabe de carbohidratos en isomalto-oligosacáridos con una longitud de cadena alargada.

Sanz et al. (J. Agric. Food Chem. 53:5911-5916, 2005) dan a conocer un procedimiento para proporcionar oligosacáridos a partir de la reacción entre sacarosa y maltosa mediante catálisis con una alternano-sacarasa aislada de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-21297.

Estos y otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción detallada y reivindicaciones a continuación.

Descripción detallada

I. Procedimientos de preparación de jarabes

Los JIGB sustancialmente transparentes descritos en la presente memoria muestran una diversidad de características físicas. Más concretamente, los oligosacáridos alternano pueden producirse a partir de un aceptor y sacarosa que se hacen reaccionar con una o más enzimas alternano-sacarasa que transferirán unidades de glucosa de la sacarosa a un carbohidrato aceptor y liberarán oligosacáridos de fructosa y glucosa de diversas longitudes. El producto resultante puede presentar un nivel de dulzor similar al de un jarabe de maíz, y una sensación en boca y funcionalidad similares a la del jarabe de maíz. Además, y más significativamente para los presentes procedimientos, el producto resultante puede caracterizarse en algunas formas de realización porque presenta un índice glucémico más bajo que la combinación de los sustratos (sacarosa y aceptores) que no se hacen reaccionar con enzima. Estos jarabes se denominan jarabes de índice glucémico bajo (JIGB) sustancialmente transparentes.

El aceptor se selecciona de entre el grupo que consiste en un azúcar o un alcohol de azúcar con grupos hidroxilo libres en una o más de las posiciones de carbono 2, 3 y 6 que pueda aceptar una unidad de glucosa de la sacarosa. El aceptor puede encontrarse en forma de jarabe o de sólidos de jarabe. Son ejemplos de los jarabes o sólidos de jarabe adecuados para la utilización en la presente memoria, maltosa, maltotriosa, panosa, jarabe de maíz rico en maltosa (más de 40%), jarabe de maíz de ED medio a bajo (equivalentes de dextrosa), rafinosa, celobiosa, maltitol, maltotriosa, maltotetrosa, glucosa, isomaltosa, isomaltitol, jarabe de cebada y sólidos de jarabe, jarabe de arroz y sólidos de jarabe, lactosa, permeato de suero, jarabe y sólidos de jarabe de almidón de tapioca, nigerosa, kojibiosa, isomaltooligosacárido, jarabe de almidón hidrogenado, jarabe y sólidos de jarabe de almidón de patata, jarabe y sólidos de jarabe de maíz, y similares. Son ejemplos de los jarabes que resultan adecuados para la utilización en las mezclas, aunque sin limitación, SATINSWEET™, disponible de Cargill, Incorporated, que contiene un mínimo de 55% a 70% en peso de maltosa y 45% a 30% en peso de glucosa y otros oligómeros que contienen glucosa. En una forma de realización, el jarabe o sólidos de jarabe comprenden una cantidad de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 99% en peso de maltosa.

Entre las enzimas alternano-sacarasa que pueden utilizarse en la reacción para producir JIGB se incluyen, aunque sin limitación, *Leuconostoc Mesenteroides* (LM) cepas NRRL B 1355, 23185, 23186, 23188, 23311 y 21297, y otras enzimas proporcionadas en la presente memoria. Estas enzimas adicionalmente pueden clonarse y expresarse recombinantemente, tal como se describe en Gilles Joucla, tesis doctoral, Ingenier INSA, Toulouse, Francia, 2003. Estas cepas pueden cultivarse y aislarse las enzimas utilizando cualquier procedimiento conocido de la técnica, tal como los procedimientos proporcionados posteriormente.

Las características físicas de los jarabes producidos pueden alterarse mediante la utilización de diferentes condiciones de reacción. Por ejemplo, pueden producirse JIGB sustancialmente transparentes mediante la reacción de una o más enzimas alternano-sacarasa en una reacción con una concentración relativamente alta de sacarosa y aceptor. Además, la eficiencia de la reacción puede incrementarse mediante la reacción a una temperatura superior a 45°C. Lo anterior permite que se requiera menos enzima para conseguir completar la reacción (es decir, cuando el sustrato remanente es <2% de los carbohidratos totales en p/p) y la reacción puede completarse en un periodo de tiempo más corto. Por ejemplo, la reacción puede llevarse a cabo a una temperatura superior a 45°C durante un periodo inferior a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o menos de 20 horas. La temperatura incrementada también puede reducir el riesgo de contaminación microbiana en algunas formas de realización.

Las características de los JIGB pueden alterarse mediante el control de la proporción de sacarosa a aceptor. Generalmente, el índice glucémico del JIGB sustancialmente transparente se reducirá a medida que se incremente la proporción de sacarosa a aceptor hasta alcanzar una proporción de aproximadamente 12:1. Por ejemplo, se espera que un producto preparado utilizando una proporción de 1:1 (sacarosa a aceptor) presentará un índice glucémico más alto que el de un producto preparado utilizando una proporción de 4:1 (sacarosa a aceptor). En algunas formas de realización se utiliza una proporción de entre aproximadamente 8:1 y aproximadamente 11:1. En otras formas de realización los procedimientos comprenden preparar JIGB utilizando proporciones de sacarosa a

aceptor de por lo menos 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 y 10:1. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona además productos alimentarios y bebidas preparados mediante dichos procedimientos.

5 Los JIGB también pueden caracterizarse por enlaces entre las moléculas de glucosa en el oligosacárido de glucosa. En algunas formas de realización el oligosacárido de glucosa presenta enlaces tanto alfa-1,3 como alfa-1,6. En algunas formas de realización, el oligosacárido de glucosa contiene además otros enlaces, tales como alfa-1,4. En algunas formas de realización, el JIGB presentará por lo menos 20% de enlaces alfa-1,3. En otras formas de realización el JIGB presentará por lo menos 20% de enlaces alfa-1,3 y por lo menos 20% de enlaces alfa-1,6.

10 En algunas formas de realización, se procesa posteriormente JIGB sustancialmente transparente para eliminar una parte, o la totalidad, de la fructosa, rindiendo de esta manera un JIGB empobrecido en fructosa. La fructosa puede eliminarse del JIGB utilizando cualquier procedimiento conocido de la técnica, por ejemplo mediante la utilización de cromatografía de columna. Generalmente, el JIGB contiene menos de 50% de fructosa. El JIGB sustancialmente transparente y/o el JIGB empobrecido en fructosa puede hidrogenarse adicionalmente para preparar un jarabe no reductor.

15 En otras formas de realización se proporciona un oligoaliterano con un grado de polimerización de entre 7 y 12 que es un carbohidrato digerible lento pero completamente que hace del JIGB un edulcorante único que ofrece una respuesta glucémica reducida y energía sostenida sin molestias intestinales ni efectos secundarios.

20 II Productos y mezclas que incluyen un jarabe de índice glucémico bajo (JIGB) sustancialmente transparente

El JIGB sustancialmente transparente descrito en la presente memoria puede mezclarse con uno o más de entre una diversidad de otros ingredientes y puede comercializarse a formuladores en forma de mezclas, o pueden proporcionarse los componentes para las mezclas al formulador de manera separada y el formulador mezclarlas durante la preparación de un producto alimentario final. El JIGB sustancialmente transparente puede mezclarse otro u otros ingredientes, tales como vitaminas, minerales, alcoholes de azúcar, edulcorantes de alta intensidad, saborizantes, intensificadores del sabor y otros edulcorantes convencionales, proporcionando el impacto nutricional deseado, así como el sabor deseado. La creación de mezclas con JIGB sustancialmente transparente se espera que mejore la homogeneidad de los productos finales.

Entre las vitaminas que pueden mezclarse con JIGB sustancialmente transparente se incluyen cualquiera de entre un grupo de sustancias orgánicas que no son proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y sales orgánicas, que resultan esenciales para el metabolismo normal, crecimiento y desarrollo del cuerpo. Entre las vitaminas se incluyen compuestos tales como A, D, E, I, biotina, colina, ácido fólico y ácido nicotínico.

Entre los compuestos minerales que pueden mezclarse con JIGB sustancialmente transparente se incluyen compuestos inorgánicos de elementos minerales, los cuales son los constituyentes minerales del cuerpo. El cuerpo excreta diariamente sales minerales y agua y, por lo tanto, deben reabastecerse. Deben reabastecerse mediante los alimentos o la gestión de complementos. Entre los ejemplos de minerales se incluyen Ca, Fe, P, Na, Cu, K y Mg.

Los saborizantes y/o intensificadores del sabor también pueden mezclarse con los JIGB. Por ejemplo, el ácido dihidroxibenzoico (DHB, incluyendo todos los isómeros), así como saborizantes tales como menta piperita, cacao y vainilla.

45 Pueden mezclarse alcoholes de azúcar con JIGB y utilizarse para proporcionar dulzor a un producto alimentario particular y en muchos casos el alcohol de azúcar no contribuye tanto al contenido calórico del producto como los edulcorantes convencionales. Los alcoholes de azúcar se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo en un azúcar cetosa o hexosa. Entre los ejemplos de alcoholes de azúcar que pueden mezclarse con los JIGB edulcorantes descritos en la presente memoria se incluyen sorbitol, manitol, xilitol, lactitol, maltitol, isomalt, hidrolizado de almidón hidrogenado y eritritol.

Los JIGB dados a conocer en la presente memoria también pueden mezclarse con edulcorantes de alta intensidad. Los edulcorantes de alta intensidad son agentes que muestran potencias edulcorantes a concentraciones muy bajas. Entre los ejemplos de edulcorantes de alta intensidad que pueden mezclarse con las composiciones de JIGB descritas en la presente memoria se incluyen sacarina, ciclamato, aspartamo, monatina, alitamo, acesulfamo potásico, sucralosa, taumatina, esteviósido y glicirrizina.

Se incluyen ejemplos adicionales de usos y productos que pueden prepararse utilizando JIGB sustancialmente transparente en los documentos WO n° 2004/023894A1 y n° 2005/089483A2.

Los ejemplos siguientes proporcionan formas de realización específicas y el experto ordinario en la materia reconocerá que estos ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no deben interpretarse como limitativos del alcance de lo reivindicado.

65

Ejemplos

Observar que NRRL B 30821 y NRRL B 30894 no se han puesto a disposición del público y por lo tanto no forman parte del alcance reivindicado.

Ejemplo 1. Procedimiento de preparación de solución enzimática

Se generaron preparaciones de enzima mediante el cultivo de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 30821 ó NRRL B 30894, en medio que contenía 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de fosfato potásico, 0,2 g/l de sulfato de magnesio (heptahidro), 0,1 g/l de sulfato de manganeso (monohidrato), 0,02 g/l de cloruro de calcio, 0,01 g/l de cloruro sódico, 0,01 g/l de sulfato ferroso (heptahidrato) y 20 a 40 g/l de glucosa de diversas fuentes. El cultivo de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 21297 se cultivó en el mismo medio, excepto en que la fuente de carbono era sacarosa al 2% y jarabe de maíz al 2% rico en maltosa (65% maltosa). Los cultivos se mantuvieron a 27°C-30°C y con el pH controlado a 6,0 (con NaOH al 10%) hasta consumirse los carbohidratos. Tras agotarse la fuente de carbono, se separaron las células mediante centrifugación a 12.200xg a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante de cultivo clarificado se concentró mediante ultrafiltración a través de una membrana de 50.000 de peso molecular de corte (MWCO: 50 kD) con el fin de obtener un concentrado enzimático de 10 veces en volumen. Se derivaron las cepas NRRL B 30821 y NRRL B 30894 a partir de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 21297 mediante mutagénesis química y expresaban constitutivamente alternano-sacarasa al cultivarse en medio de glucosa.

Ejemplo 2. Ensayo para determinar la digestibilidad

La digestibilidad del jarabe resultante se determinó mediante un ensayo de digestión *in vitro*. Se mezclaron 2 ml de jarabe de ensayo al 8% con 10 µl de glucoamilasa (Optidex L-400 de Genencor International, Palo Alto, CA) y 2 ml de tampón acetato 0,019 M, pH 4,5, y se incubó a 60°C durante 16 a 20 horas. Tras la digestión se extrajeron 2 ml del jarabe y se mezclaron con 2 ml de tampón fosfato 0,05 M, pH 6,5, 0,1 ml de NaN₃ al 1% y 0,1 g de intestino de rata en polvo (catálogo nº I-1630, Sigma-Aldrich Fine Chemicals, St. Louis, MO, USA) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. En cada punto temporal se mezclaron 0,5 ml de la mezcla con 1 ml de HCl 1,2 N para detener la reacción. Se determinó mediante HPLC con una columna Aminex HPX-87H la cantidad de glucosa liberada por la glucoamilasa y la hidrólisis de la enzima intestinal de rata, disponible de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA), con ácido sulfúrico 0,01 N (normal) como fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min y a 60°C. Se expresa la digestibilidad en % de glucosa liberada a partir de los glucooligosacáridos totales y se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de glucosa teórica liberada} = [\text{glucosa}]/[\text{fructosa}] * 0,45/0,55 * 100$$

Alternativamente, puede omitirse la etapa inicial de tratamiento de glucoamilasa.

Ejemplo 3. Ensayo de enzima y definición de unidades

A 2,5 ml de sacarosa al 40% (p/v) y maltosa en una proporción 9:1 y 0,1 ml de tampón citrato 1,5 M, pH 5,5, se añadieron 0,1 a 2,4 ml de enzima concentrada. Se llevó el volumen a 5,0 ml con agua nanopura y se incubaron las reacciones a 37°C. Tras 1 hora, se introdujeron 0,5 ml de cada reacción en un baño de agua a 90°C-100°C durante 5 minutos. Tras un breve periodo de enfriamiento, se añadió 1,0 ml de agua nanopura a las muestras de 0,5 ml y se añadieron 0,05 a 0,1 g de una mezcla de intercambio iónico que consistía de Dowex 66 y Dowex 88 (Dow Chemical Co., Midland, MI). Se invirtieron las muestras durante 2 a 3 minutos y se filtraron a través de un filtro de nilón de 0,45 µm (Whatman, Clifton, NJ) a viales de HPLC. Las muestras se sometieron a HPLC en una columna de carbohidratos HPX-87C (300 mm x 7,8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA) a 85°C con agua como fase móvil a un caudal de 0,9 ml/min. Los cálculos se basan en el porcentaje de área de fructosa respecto al área de azúcares totales. El cálculo es el siguiente: Por ciento de fructosa * 1 g de azúcares totales en 5 ml de reacción/1 h/volumen de caldo enzimático utilizado=g de fructosa/h/ml de actividad.

A continuación, los valores se convirtieron en µmoles de fructosa/min/ml utilizando el peso de la fórmula de fructosa y conversiones métricas. Una unidad se define como la liberación de 1 µmol de fructosa/minuto a 37°C y los valores se expresan en U/ml.

Ejemplo 4. Análisis del perfil de azúcares de jarabe de bajo índice glucémico

Se analizó el perfil de oligosacáridos de jarabe de bajo índice glucémico mediante un procedimiento de HPLC, tal como se indica posteriormente. Se diluyó una muestra de jarabe de bajo índice glucémico con agua desionizada hasta 5%-10% de sólidos secos, se desmineralizó con resinas de intercambio iónico (Dowex 66/Dowex 88, Dow Chemical Co., Midland, MI) y se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros antes de la inyección en la HPLC para el análisis de los azúcares. La separación de los oligosacáridos se llevó a cabo mediante la utilización de dos columnas BioRad Aminex HPX-42A, 300-7,8 mm (Hercules, CA) en serie a 65°C y con un detector del índice de refracción. Se utilizó agua como eluyente a un caudal de 0,2 ml/min. El cromatograma de una muestra típica de jarabe de bajo índice glucémico (PDF8) se muestra en la fig. 1. Los picos secuenciales mostrados en el cromatograma se asignan a oligómeros de creciente grado de polimerización (DP). Por ejemplo DP3 es un

trisacárido y DP4 es un tetrasacárido.

El pico que eluía en el menor tiempo, en el extremo izquierdo, se asignó a un pico de polímero con un peso molecular de por lo menos 250.000.

5 **Ejemplo 5. Conversión enzimática de sustrato de sacarosa/maltosa (proporción de sacarosa:maltosa=9:1) en jarabe transparente de especialidad a temperaturas elevadas**

10 Puede prepararse JIGB sustancialmente transparente de digestibilidad lenta y baja viscosidad a temperaturas superiores a 45°C. A temperaturas elevadas, la tasa de conversión de los sustratos azúcares en el jarabe transparente se incrementa mucho. Debido a la mayor velocidad de reacción a mayor temperatura, se reducen en gran medida el uso de enzima, la duración del periodo de conversión y el riesgo de contaminación microbiana durante el procesamiento. Lo anterior resulta de particular importancia en la producción comercial, al ofrecer ventajas económicas en la producción de JIGB sustancialmente transparente.

15 Se obtuvo una preparación de enzima a partir de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 30821 tal como se describe en el Ejemplo 1. La preparación de enzima presentaba una actividad de 92,5 unidades/ml según se define en el Ejemplo 3. La gravedad específica de la preparación de enzima y el agua se fijó en 1 g/ml. Se mezclaron en seco sacarosa cristalina y maltosa, ambas obtenidas de Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, USA) en una proporción de sacarosa:maltosa de 9:1 en peso seco y se molieron en un molino de café con el fin de obtener una mezcla de sustrato en polvo homogénea, denominada en lo sucesivo sustrato. El sustrato azúcar se disolvió en agua desionizada hasta concentraciones finales de 20, 30, 40 y 50% p/p, incluyendo la adición de la preparación de enzima en tubos de ensayo de polipropileno con tapa de 50 ml. Se añadió una alícuota de 0,17 ml de la preparación de enzima a cada tubo de ensayo, rindiendo dosis de enzima variables (Tabla 1). El peso total de sustrato, agua y enzima era de 8,50 g en cada tubo de ensayo. Se introdujeron los tubos de ensayo en baños de agua a 37°C, 45°C, 50°C y 55°C durante 30 minutos para equilibrar la solución de sustrato a las temperaturas respectivas antes de la adición de enzima.

20 **Tabla 1.** Concentración de sustrato, dosis de enzima y cantidades de sustrato y agua contenidas en cada tubo de ensayo. Se añadieron 0,17 ml de enzima a cada tubo de ensayo (equivalentes a 15,7 unidades totales)

Concentración de sustrato	Sustrato	Agua	Dosis de enzima
% p/p	g/tubo	ml/tubo	Unidades/g de sustrato
20	1,70	6,63	9,25
30	2,55	5,78	6,17
40	3,40	5,93	4,63
50	4,25	4,08	3,70

35 Tras la adición de la preparación de enzima, se introdujeron nuevamente los tubos de ensayo en sus baños de agua respectivos, a 37°C, 45°C, 50°C y 55°C. Tras 20 horas de incubación, se extrajo una muestra pequeña de cada tubo de ensayo. El sustrato restante en las muestras se analizó mediante HPLC tal como se describe en el Ejemplo 3, excepto en que se calculó el porcentaje de área de sustrato frente al área de azúcares totales. Se calculó la velocidad de reacción media durante la reacción de 20 h como μ moles de sustrato utilizados cada hora por cada unidad de enzima (μ moles de sustrato/h/unidad).

40 La Tabla 2, posteriormente, proporciona los resultados de la reacción, que demuestran que las reacciones a temperatura más alta y a una concentración más alta de sustrato presentan una conversión de sustrato y una tasa de reacción más altas. En consecuencia, el experto ordinario en la materia apreciará que resulta necesaria una menor cantidad de enzima para completar la reacción en menos tiempo a temperaturas y concentraciones de sustrato elevadas que a concentraciones de sustrato y temperaturas más bajas. Por ejemplo, se alcanzó una utilización de sustrato del 97% a una concentración del mismo de 50% y a 50°C utilizando 3,7 U/g de enzima, una completación del sustrato de 98% a una concentración del 40% y 45°C utilizando 4,63 U/g de enzima en comparación con una utilización de 98%, del sustrato con una concentración de sustrato de 30% y a 37°C utilizando 6,17 U/g de enzima en 20 horas. Se requirieron 9,25 U/g de enzima para completar una reacción al 20% de concentración a 37°C. Desde el punto de vista de una actividad industrial, las reacciones a elevada concentración de sustrato ofrecen además el beneficio de un menor consumo de agua y energía.

50 A partir de este experimento el experto ordinario en la materia también apreciará que resultará necesario un tiempo mucho más prolongado para completar las reacciones a una concentración de sustrato elevada y a baja temperatura (por ejemplo 37°C) debido a una tasa de reacción lenta.

Tabla 2. Efectos de la concentración de sustrato y la temperatura sobre la conversión de sustrato y la velocidad de reacción

Concentración de sustrato	Dosis de enzima	Temperatura de reacción											
		37°C		45°C		50°C		55°C					
		Reducción de sustrato %	Velocidad de reacción $\mu\text{moles/h/unidad}$	Reducción de sustrato %	Velocidad de reacción $\mu\text{moles/h/unidad}$	Reducción de sustrato %	Velocidad de reacción $\mu\text{moles/h/unidad}$	Reducción de sustrato %	Velocidad de reacción $\mu\text{moles/h/unidad}$				
% p/p	U/g												
20	9,25	99	15,6	55	8,7	22	3,5	17	3,5	2,7			
30	6,17	98	23,2	78	18,5	37	8,8	20	8,8	4,7			
40	4,63	89	28,0	98	30,9	64	20,2	32	20,2	10,1			
50	3,70	74	29,2	94	37,1	97	38,3	50	38,3	19,8			

Ejemplo 5. Propiedades químicas y fisiológicas de los jarabes transparentes preparados a temperaturas elevadas

Se obtuvo una preparación de enzima a partir de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 30821 tal como se describe en el Ejemplo 1. La preparación de enzima presentaba una actividad de 92,5 unidades/ml según se define en el Ejemplo 3. La gravedad específica de la preparación de enzima y el agua se fijó en 1 g/ml. Se mezclaron en seco sacarosa cristalina y maltosa, ambas obtenidas de Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, USA) en una proporción de sacarosa:maltosa de 9:1 en peso seco y se molieron en un molino de café con el fin de obtener una mezcla de sustrato en polvo homogénea, denominada en lo sucesivo sustrato. El sustrato azúcar se disolvió en agua desionizada hasta concentraciones finales de 50% y 60% p/p, incluyendo la adición de la preparación de enzima en tubos de ensayo de polipropileno con tapa de 50 ml. Se añadieron alícuotas de la preparación de enzima a cada tubo de ensayo con el fin de obtener dosis finales de enzima de 2 U/g, 5 U/g y 8 U/g. El peso total de sustrato, agua y enzima era de 20 g en cada tubo de ensayo. Se introdujeron los tubos de ensayo en baños de agua a 50°C durante 30 minutos para equilibrar la solución de ensayo a las temperaturas respectivas previamente a la adición de enzima. Tras 48 horas a 50°C, se analizaron las muestras para su composición de azúcares utilizando la columna dual de HPLC Aminex HPX-42A indicada en el Ejemplo 3. Se determinó la digestibilidad de las muestras mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

En general, los jarabes preparados a temperatura y concentración de sustrato elevadas contenían menos polímero y más leucrosa, aunque cantidades similares de glucooligosacáridos (Tabla 3). Debido a que la tasa de digestión *in vitro* era atribuible en gran medida al contenido de oligosacáridos, los jarabes preparados a temperatura y concentración de sustrato elevadas mostraban una digestibilidad *in vitro* similar a la de los preparados a temperatura y concentración de sustrato bajas. La tasa de digestión *in vitro* mostró tasas de digestión similares entre las muestras sometidas a ensayo. Bajo las mismas condiciones de digestión, la maltosa o los maltooligosacáridos fueron digeridos al 100% en 8 horas (datos no mostrados).

Tabla 3. Perfil de azúcares y digestibilidad *in vitro* de jarabe transparente preparado a temperaturas elevadas en comparación con el preparado a una temperatura baja

Condiciones de reacción			Perfil de azúcares						% digerido tras 8 horas
Temperatura	Concentración	Dosis de enzima	Fructosa	Leucrosa	DP2	DP3-6	DP7-12	polímeros	
°C	% p/p	U/g	%	%	%	%	%	%	%
37 (control)	20	9	40,5	7,3	1,3	5,5	44,1	1,4	34,6
50	50	5	38,4	9,7	2,2	8,9	40,8	0,0	37,5
	50	8	38,5	10,9	2,3	8,5	39,5	0,0	37,9
	60	2	38,6	12,0	2,5	9,3	37,4	0,1	39,1
	60	5	38,0	12,2	2,1	10,4	37,1	0,2	39,6
	60	8	37,2	13,3	3,0	11,6	34,9	0,0	43,4

Ejemplo 6. Transparencia de jarabes preparados a temperaturas elevadas

Debido a las concentraciones reducidas de polímero, los jarabes preparados a temperaturas elevadas mostraban otra característica importante y es que eran transparentes.

Las muestras de jarabe producido con una concentración de sustrato de 20% (p/p) y a 37°C en las instalaciones de desarrollo de procesos de Cargill en Savage (MN, USA), PDF03, PDF04, PDF06, PDF08 y PDF10, se compararon con los producidos con una concentración de sustrato de 50% (p/p) y a 50°C. Para la comparación también se incluyó una muestra producida a partir de PDF07 mediante ultrafiltración (MWCO de 50 kD) para eliminar el polímero de alternano. Todas las muestras se diluyeron con agua desionizada de ~80% de sólidos secos a 50, 40, 30, 20, 10 y 5% de sólidos secos y se midió la transmitancia de luz con un espectrofotómetro (Hewlett Packard, modelo 8453) a 650 nm utilizando una celda de 1 cm. Antes de medir la transmitancia de las muestras de ensayo, el espectrofotómetro se calibró con agua desionizada. Tal como se muestra en la Tabla 4, todas las muestras preparadas con una concentración de sustrato de 20% y a 37°C excepto PDF07 con el polímero separado mediante ultrafiltración presentaban una transmitancia de luz inferior a 96,1% y presentaban una apariencia opaca a concentraciones de 40% de sólidos secos o menos. A la inversa, la muestra preparada a temperatura elevada era tan transparente como aquella en la que se había eliminado el polímero mediante ultrafiltración en todo el abanico de concentraciones (de 0,5% de sólidos secos a 85% de sólidos secos).

Tabla 4. Transmitancia de luz de un jarabe preparado a temperatura elevada en comparación con los preparados a temperatura baja con o sin el polímero eliminado mediante ultrafiltración

Condiciones de reacción % de sólidos de la solución	50°C 50% p/p	37°C 20% p/p					
		Polímero PDF07 eliminado	PDF03	PDF04	PDF06	PDF08	PDF10
40	99,45	99,12	94,15	92,46	96,06	94,06	80,14
30	98,51	98,19	91,88	90,46	92,91	90,95	77,75
20	96,86	98,13	92,12	89,95	91,54	90,9	79,05
10	96,93	97,88	93,36	90,83	92,18	90,89	85,71
5	99,35	99,78	96,8	95,4	96,3	96,3	91,37

5 **Ejemplo 7. Jarabe preparado con NRRL B 30894 a temperatura elevada**

Se preparó según el Ejemplo 1 una preparación de enzima a partir del enzima *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 30821 y la cepa NRRL B 30894. Se preparó el lote de jarabe PDF12 con 3 U/g de sustrato de enzima de *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B 30894 a 50°C y con 50% de azúcares total a una proporción de sacarosa a maltosa de 9. Se prepararon los lotes de jarabe PDF6 y PDF7 con enzima de NRRL B 30821 a una dosis de 6 U/g de sustrato a 37°C y 20% de azúcares totales con una proporción de sacarosa a maltosa de 9. El ensayo de digestión se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 2 sin la etapa de pretratamiento con glucoamilasa. La medición de la viscosidad se llevó a cabo a diversas temperaturas con dos lotes diferentes de jarabe con 77% de sólidos secos utilizando un viscosímetro Brookfield DV-E (Brookfield Engineering Labs, Inc., Middleboro, MA).

Los lotes de jarabe PDF6 y PDF7 eran opacos y el lote de jarabe PDF12 era un jarabe transparente. El perfil de azúcares de los dos tipos de jarabe preparados a alta temperatura (PDF7) y a baja temperatura (PDF12) se muestra en la Tabla 6 y demuestra que no había polímero presente en el jarabe PDF12. El jarabe transparente presentaba una viscosidad significativamente más baja que el jarabe opaco con el mismo nivel de sólidos secos (Tabla 7) y resultó digerido por el intestino de rata en polvo a una tasa similar a la del jarabe opaco (Tabla 8).

Tabla 6. Perfil de azúcares de jarabes transparentes y jarabes opacos (en % de azúcares totales)

En %	Fructosa	Leucrosa	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
1a muestra	38,99	13,06	2,66	1,08	1,07	1,41	2,31	4,78
Tambor 1	38,27	13,04	2,8	1,25	1,23	1,53	2,42	4,82
Tambor 2	38,31	13,08	2,81	1,27	1,24	1,53	2,4	4,83
Tambor 3	38,38	13,05	2,81	1,25	1,25	1,54	2,4	4,82
PDF12	38,53	13,08	2,74	1,19	1,17	1,47	2,36	4,8
Tambor 4b	38,36	13,07	2,81	1,26	1,23	1,52	2,38	4,81
Tambor 5	38,17	13,01	2,79	1,28	1,24	1,54	2,39	4,85
Tambor 6	38,17	13,01	2,79	1,28	1,24	1,54	2,39	4,85
Cubo 1	38,27	13,02	2,79	1,27	1,25	1,55	2,41	4,85
PDF7	42,22	7,46	1,61	0,75	0,88	1,87	3,25	5,95
En %	DP8	DP9	DP10	DP11	DP12	Polímero		
PDF12	5,95	7,53	8,28	6,48	6,5	0		
PDF7	7,28	7,68	8,56	4,62	5,15	2,76		

25 **Tabla 7. Comparación entre las viscosidades de jarabes transparentes y opacos (en centipois por segundo) con 77% de sólidos secos**

1ª muestra	7530	3722	2166	1363	864
Tambor 1	1744	1053	686	455	312
Tambor 2	3478	1973	1195	756	503
Tambor 3	1313	801	506	347	240
Tambor 4b	1856	1134	713	474	309
Tambor 5	3366	1898	1175	759	509
Tambor 6	1263	766	499	344	237
Cubo 1	3225	1856	1150	857	586

Muestra	80°F viscosidad (en cps)	90°F viscosidad (en cps)	100°F viscosidad (en cps)	110°F viscosidad (en cps)	120°F viscosidad (en cps)
PDF12	3853	2133	1297	827	553
PDF7	15010	10690	7740	5870	4460

Tabla 8. Tasas de digestión de jarabes transparentes vs. jarabes opacos (en % de glucosa liberada tras 0-24 horas)

Muestra	0 horas	4 horas	8 horas	24 horas
PDF12	0,0%	25,6%	31,0%	42,5%
PDF6	3,6%	25%	31,3%	43,6%

5 **Ejemplo 8. Jarabes transparentes preparados a temperaturas elevadas con preparaciones de enzima de diversas cepas de *Leuconostoc***

10 Se obtuvieron preparaciones de enzima de 3 cepas de *Leuconostoc* diferentes utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Se disolvió un total de 3 kg de sustrato azúcar (sacarosa:maltosa=9:1) en agua corriente hasta una concentración final de 50% de sólidos secos p/p o de 52% de sólidos secos p/p, incluyendo la adición de enzima. Las reacciones se llevaron a cabo a 50°C o a 52°C (Tabla 9, posteriormente). Se extrajeron alícuotas al final de cada reacción y se determinaron sus perfiles de azúcares y digestibilidad *in vitro* tal como se describe.

15 Tal como se muestra en la Tabla 9, todas las preparaciones de enzima completaron las reacciones. El jarabe resultante mostraba una composición química y tasas de digestión *in vitro* similares.

Tabla 9. Condiciones de reacción, perfil de azúcares y digestibilidad *in vitro* de jarabes preparados a temperaturas elevadas

Cepa	Condiciones de reacción			Perfil de azúcares				% digerido tras 28 horas
	Temperatura	Concentración	Dosis de enzima	Fructosa	Leucrosa	DP2-6	DP7-12	
	C	% p/p	U/g	%	%	%	%	%
NRRL-B-30821	50	52	3	38,2	14,0	8,9	39,0	42,7
NRRL-B-30894	52	50	3,1	36,5	12,6	9,7	41,2	41,1
NRRL-B-21297*	52	50	5	36,1	13,5	9,5	40,9	45,3

* Leathers *et al.*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, páginas 278 a 283.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un jarabe sustancialmente transparente, que comprende hacer reaccionar más de un sustrato a una concentración de por lo menos el 40% p/p con por lo menos una enzima alternano-sucrasa a una temperatura superior a 45°C para formar un jarabe sustancialmente transparente, en el que el sustrato comprende sacarosa y un aceptor, y en el que el aceptor se selecciona de entre un azúcar o alcohol de azúcar con grupos hidroxilo libres en una o más de las posiciones de carbono 2, 3 y 6 que pueden aceptar una unidad de glucosa procedente de la sacarosa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos una alternano-sucrasa y los sustratos se mantienen a una temperatura superior a 45°C durante menos de 12 horas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima presenta una concentración inferior a 8 unidades/gramo de sustrato.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el jarabe a una concentración de 20% p/p presenta una transmitancia a 650 nm superior a 93%.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el jarabe comprende menos de 0,5% de alternano superior a DP12.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el jarabe presenta una viscosidad inferior a 14.000 cps a 27°C (80°F) y una concentración de sólidos secos del 77%.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasa son obtenidas a partir de bacterias del ácido láctico.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasa son obtenidas a partir de *Leuconostoc Mesenteroides*.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima o enzimas de alternano-sucrasas se obtienen a partir de una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en *Leuconostoc Mesenteroides*, cepas NRRL B 1355, 23185, 23186, 23188, 23311 y 21297.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasas son producidas de manera recombinante.
11. Jarabe preparado según el procedimiento de la reivindicación 1.
12. Composición de alimento o bebida que comprende el jarabe según la reivindicación 11.
13. Procedimiento de preparación de un alimento o bebida, que comprende mezclar uno o más ingredientes con un jarabe sustancialmente transparente preparado haciendo reaccionar más de un sustrato a una concentración de por lo menos el 40% p/p con por lo menos una enzima alternano-sucrasa a una temperatura superior a 45°C, en el que los sustratos comprenden sacarosa y un aceptor, y en el que el aceptor se selecciona de entre un azúcar o alcohol de azúcar con grupos hidroxilo libres en una o más de las posiciones de carbono números 2, 3 y 6 que puede aceptar una unidad de glucosa procedente de la sacarosa.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la bebida es una bebida deportiva.
15. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasa son obtenidas a partir de bacterias del ácido láctico.
16. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasa son obtenidas a partir de *Leuconostoc Mesenteroides*.
17. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la enzima alternano-sucrasa es obtenida a partir de una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en *Leuconostoc Mesenteroides*, cepas NRRL B 1355, 23185, 23186, 23188, 23311 y 21297.
18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la enzima o enzimas alternano-sucrasa son producidas de manera recombinante.
19. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que por lo menos uno de los ingredientes es una vitamina.
20. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que por lo menos uno de los ingredientes es un edulcorante de

alta intensidad.

21. Alimento preparado mediante el procedimiento según la reivindicación 13.

5 22. Bebida preparada mediante el procedimiento según la reivindicación 13.

Fig. 1

