

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 296**

51 Int. Cl.:

**A23L 2/02** (2006.01)

**A23L 2/385** (2006.01)

**A23L 2/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012 E 12723614 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2717724**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un producto alimenticio liquido concentrado**

30 Prioridad:

**09.06.2011 EP 11004722**

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

**06.07.2016**

73 Titular/es:

**RUDOLF WILD GMBH & CO. KG (100.0%)**  
**Rudolf-Wild-Strasse 107-115**  
**69214 Eppelheim, DE**

72 Inventor/es:

**HEIDEBACH, THOMAS;**  
**KELLER, CHRISTINE;**  
**SASS, MATTHIAS y**  
**DE WITH, AXEL**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 576 296 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

Procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que tiene un pH de menos de 3 a partir de una disolución o concentrado o extracto que tiene un valor de Brix de más de 20°.

**Antecedentes de la invención**

10 La conversión enzimática de azúcar en ácidos con la ayuda de hidrato de carbono oxidasa y catalasa encuentra muchas aplicaciones tecnológicas, particularmente en la industria alimentaria. En algunas aplicaciones la hidrato de carbono oxidasa se usa para eliminar oxígeno de un producto alimenticio con el fin de conservar su calidad. En otras aplicaciones, se desea la reducción del contenido de azúcar del producto alimenticio.

15 La conversión enzimática de azúcar en ácidos implica una reacción de oxidación/reducción, catalizada por hidrato de carbono oxidasa, en la que el oxígeno sirve como aceptor de electrones. El oxígeno se reduce para dar peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): azúcar + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → ácidos de azúcar + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La enzima catalasa cataliza la reacción: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O + ½ O<sub>2</sub>.

Si se desea la producción de una cantidad suficiente de ácidos, la adición de catalasa es necesaria para la eliminación de peróxido de hidrógeno, que es un inhibidor de hidrato de carbono oxidasa. También se requiere que al medio de reacción se le suministre continuamente oxígeno porque este último se consume en la reacción. La cantidad de oxígeno puede usarse para determinar el tiempo de incubación óptimo para el procedimiento.

20 Una hidrato de carbono oxidasa bien estudiada es glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4, GOX). Puede obtenerse ácido glucónico transformando glucosa en ácido glucónico usando glucosa oxidasa. Esto se produce mediante la producción de glucono-δ-lactona en medios acuosos cuando está disponible oxígeno. Además, se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de la reacción, que inhibe eficazmente GOX ya a concentraciones muy bajas. Por lo tanto, es común que GOX se use en combinación junto con la enzima catalasa (EC 1.11.1.6, CAT), que puede de convertir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y oxígeno (Miron *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2008).

25 Reacción de GOX: glucosa + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → ácido glucónico + 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de CAT: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O + ½ O<sub>2</sub>.

30 Debido a la producción de ácido, el procedimiento de reacción enzimática está generalmente limitado por una reducción consecutiva del valor de pH, conduciendo finalmente a la inactivación de la enzima, si no se añaden sustancias tamponantes (Miron *et al.*, 2004). Por tanto, en aplicaciones biotecnológicas de producción enzimática de ácido glucónico por medio de GOX y CAT, generalmente se estabiliza el pH dentro del intervalo óptimo de actividad enzimática mediante la adición de sustancias tamponantes o sustancias básicas para conseguir tasas de transferencia máximas, como se indica, por ejemplo, en los documentos WO-A-9635800 y DE-A-2214442.

35 En la mayoría de bebidas listas para beber (por ejemplo refrescos, bebidas fermentadas), el contenido de ácido así como la razón de azúcar con respecto a ácido debe estar en un intervalo estrecho definido, para conseguir una impresión sensorial aceptable o incluso optimizada. En el caso de bebidas listas para beber, la razón óptima de azúcar con respecto a ácido puede conseguirse mediante la producción de cantidades suficientes de ácido en condiciones de reacción optimizadas por medio de hidrato de carbono oxidasa.

40 Aunque se aplican concentraciones de glucosa moderadas en muchas aplicaciones de GOX, disoluciones de glucosa altamente concentradas también son adecuadas como sustrato. En concentrados de bebida, de los que pueden obtenerse bebidas listas para beber anteriormente mencionadas por dilución con agua, la concentración de ácido (así como el contenido de azúcar y todos los demás ingredientes) es varias veces más alta en comparación con bebidas listas para beber, conduciendo a un pH muy inferior del concentrado en comparación con la bebida lista para beber producida a partir del mismo.

45 En condiciones de reacción óptimas recomendadas (intervalo de pH y/o temperatura recomendados), no es posible generar cantidades suficientes de ácido glucónico requeridas para el concentrado de bebida antes de que el valor de pH sea demasiado bajo como para obtener actividad enzimática adicional. Por tanto, estas aplicaciones recurren a la adición de una sustancia tamponante o básica para mantener el pH del concentrado constante y dentro del intervalo de actividad enzimática óptimo. Sin embargo, en el caso de bebidas, el uso de tampones o bases para mantener el pH dentro del intervalo óptimo no siempre es adecuado debido al posible impacto sensorial negativo.

50 Para preparaciones de GOX comerciales, condiciones de reacción recomendadas en cuanto al pH están en el intervalo de pH de 4 a 7, independientemente del origen de la enzima. Como cualquiera otra enzima, GOX de diferentes orígenes pueden diferir en cuanto a su estructura y por tanto sus condiciones óptimas (Miron *et al.*, 2004). GOX se produce principalmente por subespecies de *Aspergillus* o *Penicillium*. Casi todas las preparaciones de GOX disponibles en el mercado se producen por *Aspergillus niger* (Handbook of Food Enzymology). Para GOX de

*Aspergillus niger*, se encontró que el pH de máxima estabilidad era de alrededor de 5,5 (Miron *et al.*, 2004). A pH inferior a 3, se ha encontrado que la semivida de GOX de *Aspergillus Niger* comercial es de menos de 20 minutos en condiciones de ensayo (Hatzinikolaou *et al.*, 1996). Se ha notificado que la temperatura óptima de GOX de diversas fuentes microbianas es de entre 25°C-60°C (Gibson *et al.*, 1964, Wong *et al.*, 2008, Bankar *et al.*, 2009). Por tanto, habitualmente se da el caso de que cambiando las condiciones de reacción fuera de las óptimas se para la reacción casi por completo.

Diversas patentes describen el uso combinado de GOX/CAT para la producción de ácido glucónico en bebidas. Por ejemplo, el documento WO-A-2010106170 describe el uso de GOX para producir una bebida ácida. Los autores recomiendan temperaturas de reacción de entre 25°C y 45°C y la adición de una base para mantener el pH a un valor constante adecuado de entre 3,0 y 9,0 para aumentar el rendimiento de ácido glucónico. El documento EP-A-0017708 sugiere el uso de temperaturas de reacción de entre 0°C y 10°C para la producción de ácido glucónico con combinación de GOX/CAT inmovilizada. Los solicitantes enfatizan que el valor de pH debe permanecer constantemente dentro de la región óptima de pH 4-7, por ejemplo por medio de la adición automática de NaOH durante el procedimiento. El documento WO-A-97/24454 se refiere a la producción de ácido glucónico a partir de glucosa. Los autores recomiendan además mantener el pH de la disolución de glucosa a desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7. El documento WO-A-03/031635 describe la formación de gluconato de calcio convirtiendo glucosa en ácido glucónico en presencia de una base de calcio, tal como óxido de calcio, hidróxido de calcio y/o carbonato de calcio, para neutralizar el ácido glucónico y servir como fuente de calcio. Por tanto, los procedimientos reivindicados en estas solicitudes implican trabajar en condiciones de actividad enzimática óptimas, conseguidas tamponando el pH para prevenir la inhibición debida a valores de pH bajos. El documento WO-A-2009016049 describe un método para impedir reacciones de oxidación en productos alimenticios mediante producción de maltobionato a partir de almidón o maltosa por un procedimiento enzimático. Se convierte maltosa en maltobionato en presencia de hidrato de carbono oxidasas, tales como aldosa oxidasa, celobiosa oxidasa, piranosa oxidasa y hexosa oxidasa. Además, puede añadirse catalasa para eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no deseado.

Por consiguiente, un objeto de esta invención es superar las desventajas expuestas anteriormente y proporcionar un procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que tiene una cantidad suficiente de ácidos sin la adición de sustancias tamponantes ni básicas que deterioran el gusto, que controlan el pH durante el procedimiento de oxidación de azúcar.

#### **Descripción detallada de la invención**

Dicho objeto se soluciona mediante un procedimiento según la reivindicación 1 ó 3. La presente invención también proporciona un producto alimenticio líquido concentrado según la reivindicación 16 y una composición lista para beber según la reivindicación 17.

La presente invención se basa en el hallazgo de que cuando se usan una hidrato de carbono oxidasa y catalasa en la producción de ácidos en ciertos concentrados de bebida en condiciones que se cambian muy alejadas de las condiciones de actividad enzimática óptimas en cuanto al pH (por ejemplo 2-3) y de temperatura (por ejemplo 0-20°C) la enzima todavía puede producir ácidos en cantidades considerables.

Los inventores han desarrollado un procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que tiene un pH de menos de 3, preferiblemente un pH de menos de 2,5, sin añadir sustancias tamponantes ni básicas. El procedimiento de la presente invención comprende el tratamiento de una disolución de azúcar que tiene un valor de Brix de más de 20° con hidrato de carbono oxidasa y catalasa.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que comprende tratar al menos un concentrado de zumo líquido y/o al menos un extracto de frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales o productos de cultivo, teniendo dicho concentrado o extracto un valor de Brix de más de 20°, con hidrato de carbono oxidasa y catalasa, sin ajustar el pH antes ni durante el tratamiento mediante adición de sustancias tamponantes ni sustancias básicas para obtener un producto alimenticio líquido concentrado, en el que el pH final es inferior a 3.

Un "concentrado de zumo líquido" se obtiene por eliminación selectiva de agua a partir de zumo hasta que la cantidad de agua restante en el concentrado es de desde el 20 hasta el 80% en peso basándose en el concentrado de zumo líquido. El término "extracto" se usa de manera representativa para todos los productos que se obtienen por medio de una extracción con un disolvente, tal como con maceración o percolación. El concentrado o extracto se obtiene de frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales o productos de cultivo. Anteriormente se facilitaron ejemplos para los mismos. La producción de concentrados de zumo líquidos es una práctica común y bien conocida por el experto en la técnica. Puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento que da como resultado un valor de Brix del zumo más alto después del procedimiento. Ejemplos de métodos de concentración comunes son filtración y evaporación. Los términos "concentrado de zumo líquido" y "extracto" también se refieren a sólidos solubles extraídos con agua, concentrados de zumo de fruta, productos en polvo y purés.

La disolución o concentrado o extracto que se usa en el procedimiento de la presente invención contiene azúcar. En

- el contexto de la presente invención, el término “azúcar” representa un término general para sacáridos de gusto dulce, mezclas de dichos sacáridos de gusto dulce y disoluciones en agua de los mismos. Los azúcares adecuados incluyen maltosa, lactosa, glucosa, hexosa, concentrado de sacarosa hidrolizada, sirope de azúcar invertido, jarabe de glucosa, azúcar de fruta natural a partir de zumo de fruta y concentrado de zumo de fruta (por ejemplo Fruit-up®).
- 5 Azúcares preferidos son glucosa, lactosa y hexosa de los cuales la más preferible es glucosa.
- En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes la disolución que se usa en la presente invención contiene además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales (granos) y productos de cultivo.
- 10 Frutas adecuadas son, por ejemplo, manzana, fruta de la pasión, pera, melocotón, ciruela, albaricoque, nectarina, uva, cereza, limón, lima, mandarina, tangerina, naranja, pomelo, tomate, pepino, piña, granada, kiwi, mango, papaya, plátano, sandía, cantalupo, acerola, naranja sanguina, algarroba, chirimoya, cítricos, pitaya, higo, guayaba, melón dulce, caqui, lichi, mangostán, melón, mirabel, oliva, pimienta, alquequenje, higo chumbo, calabaza, membrillo, carambola.
- 15 Bayas adecuadas son, por ejemplo, arándano rojo, grosella, frambuesa, grosella espinosa, zarzamora, arándano azul, fresa, azái, baya de aronia, grosella negra, baya de Boysen, baya de saúco, baya de Goji, arándano de fruto encarnado, mora de papel, grosella roja, escaramujo, baya Rowan, espino amarillo, endrino, espino blanco y bayas silvestres.
- Verduras adecuadas son, por ejemplo, patata, lechuga, apio, espinaca, col, berro, ruibarbo, zanahoria, remolacha, espárrago, raíz de remolacha, brócoli, endibia, hinojo, rábano picante, puerro, cebolla, guisante y espinaca.
- 20 Hierbas adecuadas son, por ejemplo, diente de león, aloe vera, hinojo, ginkgo, té verde, hibisco, malva, roibos, hojas y té.
- Frutos secos adecuados son, por ejemplo, coco, castaña, almendra, anacardo, avellana, nuez de macadamia, cacahuete, nuez pecana, piñón, pistacho, nuez.
- Especias adecuadas son, por ejemplo, canela, jengibre, regaliz y vainilla.
- 25 Cereales adecuados son, por ejemplo, cebada, linaza, salvado, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, trigo y malta.
- Productos de cultivo adecuados son, por ejemplo, judías, cacao, casia, café, ginseng, guaraná, miel, lentejas, loto, semilla de amapola, girasol, soja, y tamarindo.
- 30 Componentes adecuados adicionales son extracciones con agua, productos en polvo, partes, purés y partes fermentadas obtenidos de frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos y cereales descritos anteriormente. Componentes preferidos son hierbas, cereales fermentados y frutas fermentadas, de los que las más preferibles son hierbas.
- En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales (granos), y productos de cultivo puede añadirse al producto alimenticio líquido concentrado después del tratamiento con hidrato de carbono oxidasa y catalasa.
- 35 En combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes la disolución o concentrado o extracto usado según la presente invención tiene un valor de Brix de más de 20°, preferiblemente un valor de Brix de al menos 25°, más preferiblemente un valor de Brix de al menos 30° y lo más preferiblemente un valor de Brix de al menos 35°.
- 40 El término “°Brix” (grados Brix) se refiere a una unidad que representa el contenido de azúcar de una disolución. Un grado Brix corresponde a 1 gramo de azúcar en 100 gramos de disolución y por tanto representa la concentración de azúcar de la disolución como un porcentaje en peso (% p/p). El °Brix se mide habitualmente por medio de un refractómetro.
- 45 En el procedimiento de la presente invención la disolución o concentrado o extracto se trata con hidrato de carbono oxidasa. El término “hidrato de carbono oxidasa” se refiere a una oxidoreductasa que tiene especificidad de sustrato para hidratos de carbono. Las oxidoreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula a otra. Las oxidasas pertenecen a la clase de enzimas de oxidoreductasas. A menos que se sugiera otra cosa, las enzimas descritas a continuación y a lo largo de toda la descripción son enzimas aisladas con cofactor, si se requiere.
- 50 Una categoría de oxidoreductasas, adecuadas para su uso en la presente invención, son hidrato de carbono oxidasas que catalizan una reacción de oxidación/reducción que implica oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como aceptor de electrones. En estas reacciones, se reduce oxígeno para dar agua (H<sub>2</sub>O) o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- En particular, hidrato de carbono oxidasas que catalizan la conversión de glucosa en glucono-δ-lactona que se

descompone inmediatamente en agua para formar los ácidos aldónicos correspondientes. El procedimiento genera peróxido de hidrógeno. Un ácido aldónico es cualquiera de una familia de ácidos de azúcar obtenidos mediante oxidación del grupo funcional de aldehído de una aldosa para formar un grupo funcional de ácido carboxílico. Por tanto, su fórmula química general es  $\text{HOOC}-(\text{CHOH})_n-\text{CH}_2\text{OH}$ . Los ácidos aldónicos incluyen, por ejemplo, ácido glucónico.

Las enzimas hidrato de carbono oxidasas convierten el azúcar en la disolución o concentrado o extracto en sus respectivos ácidos de azúcar. Se conocen varias hidrato de carbono oxidasas adecuadas que pueden convertir azúcar en ácidos de azúcar y están disponibles para el experto. Ejemplos de tales hidrato de carbono oxidasas son glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), lactosa oxidasa, celobiosa oxidasa (EC 1.1.99.18), piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10) y hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5). Se prefieren glucosa oxidasa, hexosa oxidasa y lactosa oxidasa, de las que la más preferida es glucosa oxidasa.

La cantidad de oxidasa que va a usarse depende generalmente de los requerimientos específicos y de la enzima específica. Preferiblemente la cantidad de adición de oxidasa es suficiente para generar el grado de conversión deseado de azúcar en su ácido dentro de un tiempo especificado. Normalmente, una adición de hidrato de carbono oxidasa en el intervalo de desde 500 hasta 50000 ppm por kg de azúcar es suficiente, particularmente desde 2000 hasta 20000 ppm por kg de azúcar, y más particularmente desde 5000 hasta 15000 ppm por kg de azúcar.

En una realización preferida en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la actividad de hidrato de carbono oxidasa es de desde 1000 unidades/g hasta 50000 unidades/g, más preferiblemente desde 1650 unidades/g hasta 10000 unidades/g, en particular 10000 unidades/g. De manera particularmente preferible la enzima es glucosa oxidasa con una actividad de desde 1650 unidades/g hasta 10000 unidades/g.

La actividad enzimática se mide en "unidades/g", en las que 1 unidad se define como la cantidad de enzima, que convierte 1 micromol de sustrato en un minuto, es decir 1 unidad = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  en condiciones de ensayo convencionales, es decir condiciones óptimas en cuanto al pH y la temperatura. Otra medida de la actividad catalítica de una enzima es "katal", 1 katal = 1 mol/s, 1 unidad =  $16,67 \times 10^{-9}$  katal. La actividad enzimática dada en el presente documento se refiere a la actividad de preparaciones de enzima, en las que la enzima pura se mezcla con un material transportador, tal como maltodextrina.

Según el procedimiento de la presente invención se añade una catalasa (EC 1.11.1.6) en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes. Se añade catalasa para prevenir la limitación de la reacción impulsada por la hidrato de carbono oxidasa y para eliminar  $\text{H}_2\text{O}_2$  no deseado en el producto final. Tal como se describió anteriormente, la hidrato de carbono oxidasa depende de oxígeno, pero produce peróxido de hidrógeno. La ventaja de añadir catalasa al procedimiento de la presente invención es que se le proporciona oxígeno a la hidrato de carbono oxidasa y al mismo tiempo se elimina el peróxido de hidrógeno que tiene propiedades oxidantes fuertes.

En una realización preferida en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la actividad de catalasa es de desde 10000 unidades/g hasta 100000 unidades/g, más preferiblemente desde 16500 unidades/g hasta 65000 unidades/g, en particular 25000 unidades/g.

En una realización de la invención, la hidrato de carbono oxidasa y la catalasa se añaden al mismo tiempo. En otra realización, las enzimas se añaden en momentos diferentes, por ejemplo, primero se añade la hidrato de carbono oxidasa y después de algún tiempo se añade la catalasa. Sin embargo, en este último caso, es necesario enfrentarse al  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado, que puede dañar el concentrado de bebida líquido y también las actividades enzimáticas.

En combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes se añade catalasa en una cantidad que reduce la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparación con un procedimiento similar sin catalasa. Preferiblemente, la cantidad de catalasa añadida al procedimiento tal como se describe en el presente documento es una cantidad que es suficiente para obtener una reducción de al menos el 25%, 50%, 75%, 85% o 95% en la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparación con un procedimiento de control comparativo en el que la única diferencia comparativa es que no se añade catalasa, incluso más preferiblemente la cantidad de catalasa añadida al procedimiento tal como se describe en el presente documento es una cantidad que es suficiente para obtener una reducción del 100% en la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparación con un procedimiento de control comparativo, en el que la única diferencia comparativa es que no se añade catalasa. Preferiblemente, la catalasa se añade en una cantidad que también mejore el grado de conversión de azúcares en sus ácidos.

La cantidad de oxidasa con respecto a catalasa que va a usarse dependerá generalmente de los requerimientos específicos y de la actividad enzimática específica (unidades por gramo) de la preparación de enzima seleccionada. Puede determinarse y adaptarse al procedimiento de la presente invención por un experto en la técnica. Las actividades enzimáticas específicas pueden variar para diferentes preparaciones de enzima, pero están en un intervalo específico a partir del cual un experto en la técnica puede deducir razones optimizadas de oxidasa y catalasa en ppm por kg de sustrato (azúcar). Con respecto a estos antecedentes, las razones de actividad de oxidasa y catalasa deben estar en el intervalo de 1:1 a 1:100.

El tratamiento de la disolución o concentrado o extracto se lleva a cabo en condiciones que permiten que la hidrato de carbono oxidasa convierta azúcares en ácidos de azúcar. Tales condiciones incluyen temperatura, pH, características de hidrato de carbono oxidasa y catalasa.

5 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el pH del producto alimenticio líquido concentrado no se tampona ni se ajusta de otra manera durante el procedimiento, por ejemplo por medio de adición de álcali (base) ni tampones durante el procedimiento o por ejemplo por medio de eliminación parcial de ácido producido a partir de los medios de procedimiento.

10 No se añaden sustancias que pueden neutralizar el ácido producido durante el presente procedimiento, por ejemplo no se añaden bases tales como  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$  durante el tratamiento de la disolución o concentrado o extracto con oxidasa y catalasa.

15 No se añaden sustancias que pueden tamponar el ácido producido durante el presente procedimiento, por ejemplo no se añaden sustancias tamponantes tales como tampón de fosfato de sodio, tampón de carbonato, tampón de sulfato, tampón de lactato y tampón de citrato antes ni durante el tratamiento de la disolución o concentrado o extracto con hidrato de carbono oxidasa y catalasa.

20 En combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la disolución o concentrado o extracto que tiene un valor de Brix de más de 20°, puede contener además agua, concentrado de zumo de fruta, espesante, colorante, estabilizador, emulsionante, edulcorante, edulcorante de alta intensidad, extractos de plantas frescas o fermentadas o partes de plantas y extractos de frutas frescas o fermentadas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos y cereales. Estos pueden servir, por ejemplo, para el propósito de sustancias que proporcionan color y sabor.

25 Según la invención, el término "sabor" se refiere a aquellos sabores derivados de la parte reproductiva comestible de una planta de semillas, especialmente una que tiene una pulpa dulce asociada con la semilla, por ejemplo, manzanas, naranjas, limones, limas. También se incluyen sabores derivados de partes de la planta diferente de la fruta, por ejemplo, sabores derivados de frutos secos, corteza, raíces y hojas. También se incluyen dentro de este término sabores preparados sintéticamente hechos para simular sabores derivados de fuentes naturales. Los ejemplos de agentes saborizantes incluyen sabores de cola, sabores de té, canela, pimienta de Jamaica, clavo, sabores de café, sabores de cítricos incluyendo sabores de naranja, tangerina, limón, lima y pomelo. También puede usarse una variedad de otros sabores de fruta tales como manzana, uva, cereza, piña, coco y similares. Pueden usarse zumos de fruta, incluyendo naranja, limón, tangerina, lima, manzana y uva como agente saborizante.

30 Estabilizadores, colorantes, edulcorantes y sabores adecuados son manzana, fruta de la pasión, arándano rojo, pera, melocotón, ciruela, albaricoque, nectarina, uva, cereza, grosella, frambuesa, grosella espinosa, zarzamora, arándano azul, fresa, limón, lima, mandarina, tangerina, naranja, pomelo, patata, tomate, lechuga, apio, espinaca, col, berro, diente de león, ruibarbo, zanahoria, remolacha, pepino, piña, coco, granada, kiwi, mango, papaya, plátano, sandía, cantalupo o té, cebada, linaza, salvado, maíz, mijo, avena, arroz, centeno, trigo, lentejas, malta, azaí, acerola, aloe vera, manzana, albaricoque, baya de aronia, espárrago, plátano, judía, remolacha, raíz de remolacha, grosella negra, zarzamora, naranja sanguina, arándano azul, baya de Boysen, brócoli, col, cacao, cantalupo, algarroba, zanahoria, casia, apio, diente de león, chirimoya, cereza, castaña, canela, cítricos, coco, café, té, arándano rojo, pepino, grosella, pitaya, baya de saúco, endibia, hinojo, higo, jengibre, ginkgo, ginseng, baya de Goji, grosella espinosa, uva, pomelo, guaraná, guayaba, hibisco, miel, melón dulce, rábano picante, caqui, kiwi, puerro, limón, lechuga, lima, arándano de fruto encarnado, regaliz, loto, lichi, malva, mandarina, tangerina, mango, mangostán, melón, mirabel, mora de papel, nectarina, almendra, anacardo, avellana, nuez de macadamia, cacahuete, nuez pecana, piñón, pistacho, patata, nuez, oliva, cebolla, naranja, papaya, pimienta, fruta de la pasión, guisante, melocotón, pera, alquequenje, piña, ciruela, granada, semilla de amapola, higo chumbo, calabaza, 45 membrillo, frambuesa, grosella roja, ruibarbo, rooibos, escaramujo, baya Rowan, espinaca, espino amarillo, endrino, soja, carambola, fresa, girasol, tamarindo, tangerina, tomate, vainilla, berro, sandía, espino blanco, bayas silvestres.

Preferiblemente, el procedimiento comienza a una temperatura de 10° a 30°C y la temperatura se reduce durante el procedimiento hasta de 0° a 10°C en cuanto el pH es inferior a 4. El pH se mide habitualmente por medio de un pH-metro.

50 Además, puede mantenerse una temperatura constante de entre 0° y 30°C a lo largo del procedimiento. Una temperatura constante preferible es de entre 1° y 10°C y la temperatura constante más preferible es de entre 2° y 6°C.

55 En el procedimiento de preparación del producto alimenticio líquido concentrado de la presente invención el tratamiento puede realizarse varias veces. Por tanto, el tratamiento de la disolución o concentrado o extracto con hidrato de carbono oxidasa y catalasa puede repetirse varias veces, hasta que se produce una cantidad suficiente de ácido para alcanzar un pH inferior a 3, preferiblemente para alcanzar un pH inferior a 2,5.

Un tiempo de tratamiento (incubación) adecuado debe permitir el grado de conversión de azúcares en ácidos de interés. Un tratamiento (incubación) único o varios tratamientos de la disolución o concentrado o extracto con hidrato

de carbono oxidasa y catalasa son posibles. Generalmente, un tiempo de tratamiento (incubación) único adecuado se selecciona en el intervalo de desde 1 hora hasta 5 días, preferiblemente desde 10 horas hasta 4 días, lo más preferiblemente desde 36 horas hasta 3 días. Generalmente, un tiempo de varios tratamientos (incubaciones) adecuado se seleccionan en el intervalo de desde 1 día hasta 21 días.

5 Un procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado particularmente preferido comprende tratar una disolución o concentrado o extracto que comprende glucosa y té, teniendo dicha disolución o concentrado o extracto un valor de Brix de 35° o más, con glucosa oxidasa y catalasa, sin ajustar el pH antes ni durante el tratamiento mediante adición de sustancias tamponantes ni sustancias básicas para obtener un producto alimenticio líquido concentrado, en el que el pH final es inferior a 2,5.

10 El procedimiento puede llevarse a cabo con suministro constante de oxígeno bombeando aire en la disolución o concentrado o extracto que está tratándose. Puede usarse cualquier aparato de bombeo de aire convencional.

Es aceptable llevar a cabo el procedimiento con cualquier combinación de las condiciones mencionadas anteriormente, es decir, condiciones de temperatura, contenido de azúcar inicial de la disolución o concentrado o extracto y tratamientos consecutivos de la disolución o concentrado o extracto con hidrato de carbono oxidasa y catalasa, siempre que los valores de estas cantidades se encuentren dentro de los respectivos intervalos indicados anteriormente (por ejemplo temperatura de 0-30°C, un valor de Brix de más de 20°), y el producto alimenticio líquido concentrado resultante tenga la acidez deseada de pH inferior a 3. Se prefieren combinaciones que conduzcan a tiempos de incubación cortos, procedimiento simplificado en cuanto a las etapas llevadas a cabo y rentabilidad.

Preferiblemente, el producto alimenticio líquido concentrado contiene cultivos iniciadores activos que se usan con fines de fermentación. Un cultivo iniciador activo es un cultivo microbiológico que realmente lleva a cabo la fermentación. Estos cultivos iniciadores consisten habitualmente en un medio de cultivo, tal como granos, semillas o líquidos nutrientes que se han colonizados correctamente por los microorganismos usados para la fermentación. Se seleccionan cultivos iniciadores activos adecuados del grupo de la familia de *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candidia*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, en los que se prefiere una subespecie de *gluconobacter* de *Acetobacteraceae*.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, en el procedimiento según la presente invención, el producto alimenticio líquido concentrado se trata posteriormente con un cultivo iniciador activo con fines de fermentación. Se seleccionan cultivos iniciadores activos adecuados del grupo de la familia de *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candidia*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, en los que se prefiere una subespecie de *gluconobacter* de *Acetobacteraceae*. Más preferiblemente el cultivo iniciador activo se selecciona del grupo de *Saccharomyces*. De manera particularmente preferible, el cultivo iniciador activo es *Saccharomyces cerevisiae*.

Otra realización de la presente invención es el producto alimenticio líquido concentrado obtenible mediante el procedimiento de la presente invención.

35 Otra realización de la presente invención es una composición lista para beber que contiene un diluyente y el producto alimenticio líquido concentrado obtenido mediante el procedimiento de la presente invención.

Diluyentes adecuados son agua (que incluye agua carbonatada), zumo de fruta y/o sustancias adicionales del grupo de estabilizador, colorante, edulcorante, espesante y sabor.

Según la presente invención, el término "zumo de fruta" adecuado como un diluyente se refiere a zumos cítricos y no cítricos incluyendo zumos de verdura. El zumo de fruta puede proporcionarse como zumo hecho, por ejemplo, de manzana, fruta de la pasión, arándano rojo, pera, melocotón, ciruela, albaricoque, nectarina, uva, cereza, grosella, frambuesa, grosella espinosa, zarzamora, arándano azul, fresa, limón, lima, mandarina, tangerina, naranja, pomelo, patata, tomate, lechuga, apio, espinaca, col, berro, diente de león, ruibarbo, zanahoria, remolacha, pepino, piña, coco, granada, kiwi, mango, papaya, plátano, sandía y cantalupo. El término "zumo de fruta" también se refiere a sólidos solubles extraídos con agua, concentrados de zumo de fruta, productos en polvo y purés.

Otra realización de la presente invención es el uso del producto alimenticio líquido concentrado obtenido mediante el procedimiento de la presente invención para la preparación de una composición lista para beber.

Los siguientes ejemplos describen realizaciones específicas de la presente invención.

### Ejemplos

50 Ejemplo 1: Tasa de producción de ácido glucónico a diversas temperaturas

En este ejemplo, se trataron muestras de 1 l de mezcla de té edulcorado (40°Brix) con 1000 ppm de GOX (1650 unidades/g) y 1000 ppm de CAT (16500 unidades/g) a diversas temperaturas (40°C, 25°C y 3°C, respectivamente). Se facilitó un suministro constante de oxígeno bombeando aire en el concentrado con una frita de vidrio de aireación. La mezcla de té edulcorado consistía en los siguientes constituyentes (p/p):

Jarabe de azúcar invertido (71,5°Brix):	55,2%
Agua:	43,98%
Extracto de té:	0,82%

5 No se añadió sustancia tamponante ni base adicional.

Los resultados en la figura 1 muestran que la tasa de producción de ácido, expresada como reducción del pH a lo largo del tiempo, se reduce considerablemente cuando se cambia la temperatura alejándola de la condición óptima de temperatura de entre 25°C y 40°C.

Ejemplo 2: Tratamientos consecutivos con GOX y CAT a 25°C

10 Se trató una muestra de mezcla de té edulcorado de 40°Brix (composición según el ejemplo 1) con 1000 ppm de GOX (1650 unidades/g) y 1000 ppm de CAT (16500 unidades/g) 4 veces de manera consecutiva. Se facilitó un suministro de oxígeno constante bombeando aire en el concentrado con una frita de vidrio de aireación y se mantuvo todo el procedimiento de manera continua a 25°C. Después de la primera adición de las enzimas, el contenido de oxígeno del concentrado disminuyó desde inicialmente el 80-90% hasta aproximadamente el 3-5% en 1 hora. Se  
15 añadieron ambas enzimas cada 2-3 días, respectivamente. Por tanto, se añadió una cantidad total de 4000 ppm de cada enzima. Se detuvo el procedimiento después de 11 días, cuando el pH disminuyó finalmente hasta 2,53 y se detectó analíticamente una cantidad final de 13,3 g/l de ácido glucónico.

Ejemplo 3: Tratamientos consecutivos con GOX y CAT a 3°C

20 Se llevó a cabo un experimento similar al presentado en el ejemplo 2, con la diferencia de que se mantuvo la temperatura a 3°C durante todo el procedimiento. La reacción condujo a un pH final de 2,33 y se detectó analíticamente 26,3 g/l de ácido glucónico después de 11 días de incubación. Por tanto, un ajuste de la temperatura alejándola de la condición óptima común aumentó significativamente la cantidad de ácido glucónico producido a aproximadamente el 100% y redujo el pH del concentrado hasta por debajo de 2,5.

Ejemplo 4: Ensayo de planta piloto

25 El ejemplo 4 muestra un ensayo de planta piloto para la producción de un producto alimenticio líquido concentrado. Se trataron 25 kg de mezcla de té edulcorado de 40°Brix (composición según el ejemplo 1) con 1000 ppm de GOX (1650 unidades/g) y 1000 ppm de CAT (16500 unidades/g) 4 veces de manera consecutiva. Se añadieron ambas enzimas cada 2 días, respectivamente. Se facilitó un suministro de oxígeno constante bombeando aire en el concentrado con una velocidad de flujo volumétrica de 3 l/min. Se mantuvo todo el procedimiento de manera  
30 continua a 3°C por medio de un recipiente de vidrio templado de doble pared. Se detuvo el procedimiento después de 11 días, cuando el pH alcanzó 2,29 y se detectó analíticamente una cantidad final de 23,3 g/l de ácido glucónico. La figura 2 muestra el cambio en el valor de pH y la concentración de ácido glucónico durante el procedimiento.

Ejemplo 5: Tratamiento con GOX y CAT que tiene alta eficacia

35 Se diluyó concentrado de zumo de uva comercial (65°Brix) con agua destilada hasta 40°Brix. Se trataron 800 g de esta mezcla con una preparación de 165 ppm de GOX (Gluzyme 1000 BG, Novozymes, con una actividad declarada de 10.000 unidades/g) y una preparación de 660 ppm de CAT (Catazyme 25L, Novozymes con una actividad declarada de 25.000 unidades/g). Se facilitó un suministro de oxígeno constante bombeando aire en el concentrado con una frita de vidrio de aireación y se mantuvo todo el procedimiento de manera continua a 3°C durante 6 días. Después de 6 días, el concentrado de zumo de uva tenía un pH de aproximadamente 2,6 y contenía  
40 aproximadamente 97 g/l de ácido glucónico. Se pasteurizó el concentrado a 85°C durante 1 min para inactivar la actividad enzimática residual. En la figura 3 se muestra el desarrollo de la reducción de pH y la producción de ácido glucónico durante el procedimiento.

Ejemplo 6: Tratamiento posterior del producto alimenticio líquido concentrado tratado enzimáticamente con un cultivo de fermentación microbiano

45 Posteriormente se diluyó el concentrado agrio, tratado con enzima, del ejemplo 5 con agua destilada hasta 35°Brix y se calentó hasta 28°C. Entonces se añadió una preparación de levadura comercial (SIHA - Aktiv Hefe 3, *Saccharomyces cerevisiae*, Begerow) a una concentración de 200 mg/l. Después de 30 h de incubación a 28°C, se redujo el valor de Brix en un 1,5% hasta 33,5°Brix y se produjo un 1% en volumen de etanol en el concentrado, debido a la acción metabólica del cultivo de fermentación. Entonces se pasteurizaron los concentrados fermentados  
50 a 85°C durante 1 min para inactivar la levadura. Se diluyó adicionalmente el concentrado de zumo de fruta fermentado con agua mineral hasta 4-8°Brix para crear una bebida de tipo refresco, agridulce, refrescante con un delicioso gusto fermentado.

**Bibliografía no de patente**

Wong, C. M., Wong, K. H., Chen, X. D. (2008): Glucose oxidase; natural occurrence, function, properties and industrial applications, *Applied Microbial Biotechnology*; 78:927-938.

Bankar, S. B., Mahesh, V. B., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009): Glucose oxidase - an overview; *Biotechnology advances*, 27:489-501.

5 Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. P., Massey, V. (1964): Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase; *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 3927-3934.

Miron J., Gonzales, M. P., Vasquez, J. A., Pastrana, L., Murado, M. A. (2004): A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects and their interactions. *Enzyme and microbial technology* 34:513-522.

10 *Handbook of Food Enzymology*, Eds.: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D., W., S. (2003), Marcel Dekker, Nueva York, 425-432.

Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingey, A., Kekos, O, Goodenough, P., Stougaard, A. (1996) New glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:371-381.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que comprende  
 5 tratar una disolución de azúcar que tiene un valor de Brix de más de 20°, con hidrato de carbono oxidasa y catalasa sin ajustar el pH antes ni durante el tratamiento mediante adición de sustancias tamponantes ni sustancias básicas;  
 para obtener un producto alimenticio líquido concentrado, en el que el pH final es inferior a 3.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la disolución comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales y productos de cultivo.
- 10 3. Procedimiento de preparación de un producto alimenticio líquido concentrado que comprende tratar al menos un concentrado de zumo líquido y/o al menos un extracto de frutas, bayas, verduras, hierbas, frutos secos, especias, hongos, cereales o productos de cultivo, teniendo dicho concentrado un valor de Brix de más de 20°, con hidrato de carbono oxidasa y catalasa, sin ajustar el pH antes ni durante el tratamiento mediante adición de sustancias tamponantes ni sustancias básicas;  
 15 para obtener un producto alimenticio líquido concentrado, en el que el pH final es inferior a 3.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la hidrato de carbono oxidasa se selecciona del grupo que consiste en glucosa oxidasa, hexosa oxidasa y lactosa oxidasa.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la disolución o  
 20 concentrado o extracto tiene un valor de Brix de al menos 30°.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la temperatura durante el tratamiento es de entre 0° y 30°C, y/o el tratamiento comienza a una temperatura de 10° a 30°C, y/o la temperatura durante el tratamiento se reduce hasta de 0 a 10°C en cuanto el pH es inferior a 4.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha disolución o  
 25 concentrado o extracto comprende además al menos un compuesto funcional seleccionado del grupo que consiste en un estabilizador, un colorante, un edulcorante y un sabor.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el azúcar se selecciona del grupo que consiste en maltosa, lactosa, glucosa, hexosa, un concentrado de sacarosa hidrolizada, un jarabe de azúcar invertido, un jarabe de glucosa, un azúcar de fruta natural a partir de zumo  
 30 de fruta y concentrado de zumo de fruta.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el producto alimenticio comprende un cultivo iniciador activo.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8. caracterizado porque el producto alimenticio líquido concentrado se trata posteriormente con un cultivo iniciador activo para fermentación.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque el cultivo iniciador activo se selecciona del grupo que consiste en la familia de *lactobacillaceae*; *bifodobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candidia*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Saccharomyces*.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la actividad de hidrato de carbono oxidasa es de desde 1000 unidades/g hasta 50000 unidades/g, y/o la actividad de catalasa es de desde 10000 unidades/g hasta 100000 unidades/g.  
 40
13. Producto alimenticio líquido concentrado obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Composición lista para beber que comprende un diluyente y el producto alimenticio líquido concentrado según la reivindicación 13.
- 45 15. Uso del producto alimenticio líquido concentrado obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de una composición lista para beber.

Fig. 1

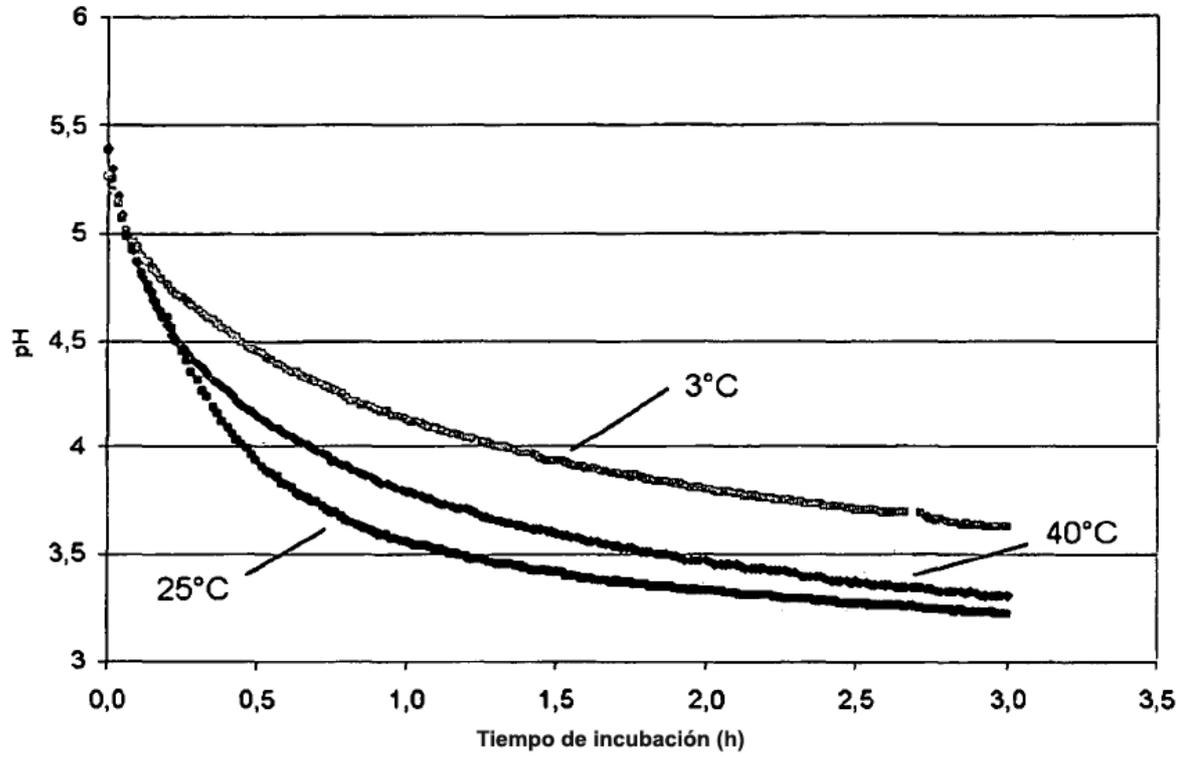


Fig. 2

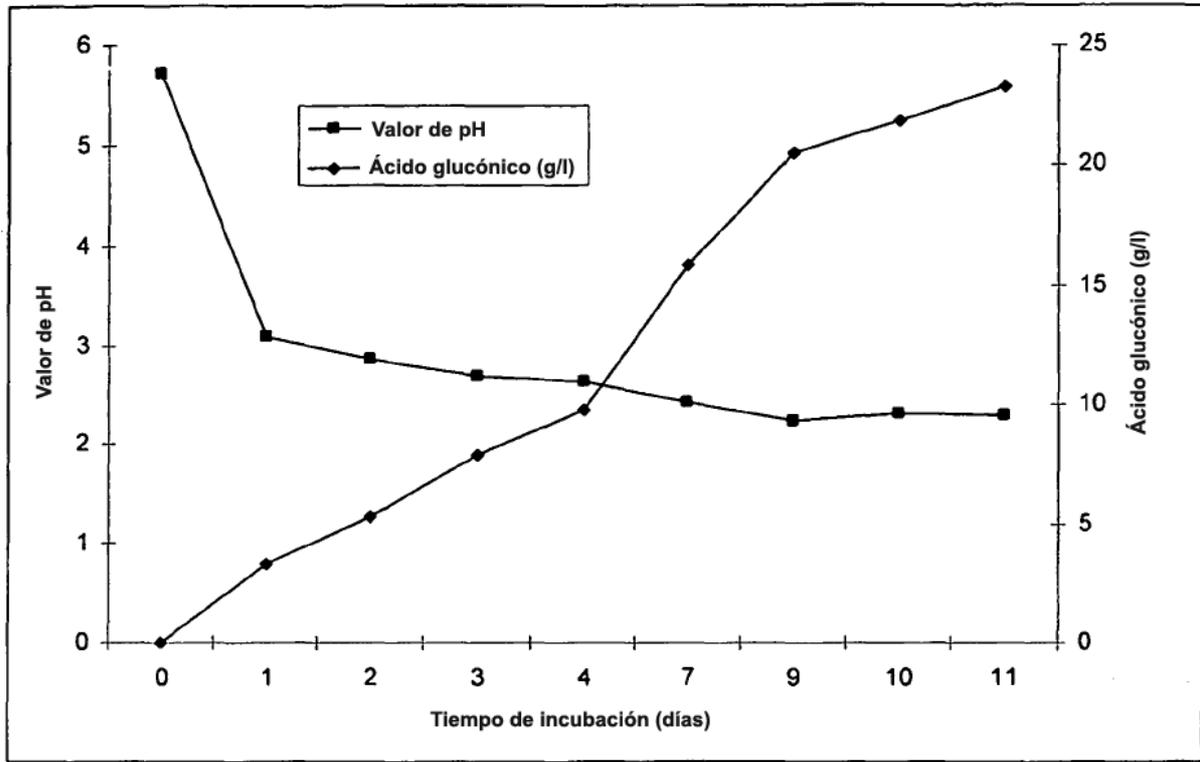


Fig. 3

