(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 612 343**

(51) Int. Cl.:

A23L 2/80	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)
C09B 61/00	(2006.01)
A23L 2/02	(2006.01)
A23L 33/105	(2006.01)
A23L 3/349	(2006.01)
A23L 3/3472	(2006.01)
A23L 2/44	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010** **E 14171966 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2792254**

(54) Título: **Extracción de compuestos fenólicos y su uso en composiciones con ácido fumárico**

(30) Prioridad:

16.04.2009 US 170090 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2017

(73) Titular/es:

OCEAN SPRAY CRANBERRIES, INC. (100.0%)
One Ocean Spray Drive
Lakeville-Middleboro, MA 02349, US

(72) Inventor/es:

DRAVENSTADT, LOWELL VERNON;
LENT, PAULA;
GOMEZ, MARGARITA;
MANTIUS, HAROLD L.;
ROSE, LAWRENCE;
NOJEIM, STEPHEN;
MCNAMARA, CHRISTOPHER y
JOHNSON, JAMES

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Marta

ES 2 612 343 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

Extracción de compuestos fenólicos y su uso en composiciones con ácido fumárico

Campo técnico

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, composiciones y procesos relacionados con la concentración de compuestos fenólicos.

Antecedentes

Muchos compuestos fenólicos, por ejemplo, compuestos fenólicos derivados de plantas (por ejemplo, los compuestos fenólicos de frutas y verduras), pueden ser útiles en productos alimenticios y/o como productos sanitarios (por ejemplo, complementos dietéticos), debido a su bien documentada asociación con la salud humana. Algunos alimentos, por ejemplo, algunas frutas tales como los arándanos, proporcionan una fuente rica en compuestos fenólicos.

El documento US 4 622 227 A describe un acidulante humectable y soluble que comprende ácido fumárico y sólidos de jugos naturales.

El documento US 6 210 681 B1 describe un extracto de una planta, una especie del género *Vaccinium*, que está enriquecida en una fracción que tiene actividad para inhibir la adherencia de ciertas especies bacterianas a diversos sustratos.

El documento US 2003/008057 A1 describe una composición (por ejemplo, una bebida) que comprende: sacarosa, fructosa, un hidrocoloide y agua.

El documento EP 1 913 951 A1 describe un método para la extracción de polifenol a partir de jugo de arándano.

El documento US 2009/035226 A1 describe extractos vegetales enriquecidos en fenoles para el tratamiento periodontal.

Sin embargo, los métodos actuales para la recuperación de compuestos fenólicos derivados de plantas son ineficaces o producen unas mezclas de compuestos fenólicos indeseables. Se desean métodos mejorados para la recuperación y/o la concentración selectiva de compuestos fenólicos. Dichos métodos pueden proporcionar nuevas oportunidades en el ámbito del desarrollo de productos para la salud.

Sumario

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes 1 y 11. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención. Se proporcionan composiciones y procesos para la extracción, la obtención y/o la concentración (por ejemplo, el enriquecimiento) de compuestos fenólicos.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la extracción de compuestos fenólicos. Estos métodos pueden incluir las etapas de la obtención de una materia prima líquida. Algunas materias primas líquidas útiles pueden incluir cualquier compuesto fenólico que contenga la materia prima. En algunas realizaciones, la materia prima líquida incluye un jugo obtenido a partir de uno o más compuestos fenólicos contenidos en frutas, verduras, legumbres y similares. Por ejemplo, la materia prima líquida puede incluir el jugo obtenido a partir de arándanos (por ejemplo, jugo de arándano). El jugo de arándano puede obtenerse mediante cualquier método que permita la obtención del jugo a partir de arándanos. En algunos casos, el jugo de arándano puede obtenerse mediante la trituración de arándanos y la purificación del jugo de arándano resultante. Algunos métodos adecuados para su uso en dicha aplicación son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una extracción a contracorriente. Después, la materia prima líquida puede ponerse en contacto con un material que retenga, capture o se una a los compuestos fenólicos, y que no retenga, capture ni se una sustancialmente a los azúcares ni a los ácidos orgánicos. La duración y las condiciones bajo las que la materia prima se pone en contacto con dicho material (por ejemplo, una resina) pueden ser modificadas de forma que al menos una porción de los compuestos fenólicos presentes en la materia prima líquida sea retenida, capturada o unida, sin retener, capturar ni unirse al menos a los azúcares ni a los ácidos orgánicos. En algunos aspectos, la materia prima líquida se pone en contacto con una resina. Algunas resinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, resinas con una o más de las siguientes propiedades físicas: un área superficial mayor o igual a aproximadamente 300 m^2/g (por ejemplo, mayor de 380 m^2/g o igual a aproximadamente 700 m^2/g), resinas de un éster alifático, una capacidad de retención de humedad de entre aproximadamente el 61 % y aproximadamente el 69 %, una porosidad mayor de aproximadamente 0,5 ml/ml. En algunos aspectos, la resina puede incluir una resina Amberlite™ XAD-7HP. En algunos aspectos la resina puede incluir una Amberlite™ FPX-66. El material que se pone en contacto con la materia prima líquida (por ejemplo, la resina) puede lavarse a continuación mediante el uso de una solución que no reduzca sustancialmente la cantidad de compuestos fenólicos retenidos, capturados o unidos en la misma. Algunas

soluciones de lavado útiles pueden incluir un disolvente diluido en agua a una concentración que no reduzca sustancialmente la cantidad de compuestos fenólicos retenidos, capturados o unidos al material (por ejemplo, la resina). Algunos ejemplos de disolventes incluyen, por ejemplo, etanol a una concentración de aproximadamente el 5 % en volumen. La porción de compuestos fenólicos retenida, capturada o unida al material (por ejemplo, la resina) puede obtenerse a continuación mediante el uso de una solución que comprende un disolvente, en la que la solución de elución disminuye sustancialmente la cantidad de compuestos fenólicos unidos a la resina. Algunas soluciones de elución adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, aproximadamente etanol al 95 % en volumen o aproximadamente acetona al 90 % en volumen. En algunas realizaciones, pueden obtenerse los compuestos fenólicos resultantes. Opcionalmente pueden llevarse a cabo etapas adicionales para eliminar cualquier disolvente presente en la solución de los compuestos fenólicos, y/o la solución puede ser concentrada.

La solución que contiene los compuestos fenólicos resultante del proceso descrito anteriormente se denomina en el presente documento extracto. Dichos extractos pueden incluir compuestos fenólicos a una segunda concentración, en la que la segunda concentración es mayor que la primera concentración, y en la que la primera concentración es la concentración de los compuestos fenólicos presentes en la materia prima líquida. Además, el extracto puede incluir al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) y uno o más de los siguientes: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares. Dichos extractos, si son líquidos, pueden secarse para proporcionar así un extracto seco.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la elaboración de una bebida adecuada para su ingestión por parte de un sujeto (por ejemplo, de un sujeto humano o no humano). Dichos métodos pueden incluir la obtención de los compuestos fenólicos mediante el uso del proceso descrito anteriormente, y la adición del extracto resultante a un líquido adecuado para su ingestión por parte de un ser humano y/o de un animal no humano. Algunos ejemplos de bebidas pueden incluir, pero no se limitan a, bebidas que contienen jugo o jugos de frutas.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona compuestos fenólicos que contienen extractos. Dichos extractos pueden incluir al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) y al menos una de las siguientes características o propiedades: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en del jugo de arándano o en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares. Estos extractos pueden ser líquidos, secos o parcialmente secos (por ejemplo, deshidratados, liofilizados o en polvo), o un extracto en gel.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones que incluyen al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) y al menos una de las siguientes características o propiedades: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares. Estos extractos pueden ser líquidos, secos o parcialmente secos (por ejemplo, deshidratados, liofilizados o en polvo), o un extracto en gel.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones que incluyen ácido fumárico (por ejemplo, ácido fumárico aislado o purificado) y compuestos fenólicos (por ejemplo, compuestos fenólicos aislados, purificados o enriquecidos (por ejemplo, PAC)). En algunas realizaciones, la proporción entre el ácido fumárico y los compuestos fenólicos (por ejemplo, las proantocianidinas (PAC) en dichas composiciones es de desde aproximadamente 4.000:1 hasta aproximadamente 100:1. Por ejemplo, la proporción puede ser de aproximadamente 135:1, o de aproximadamente 238:1. En algunas realizaciones, estas composiciones pueden estar presentes en una bebida. Dichas bebidas pueden tener un pH de entre aproximadamente un pH de 2,0 hasta aproximadamente un pH de 3,49. En algunas realizaciones, el pH de dichas medidas puede ser igual o mayor a un pH de 3,49. Por ejemplo, el pH puede ser desde aproximadamente un pH de 2,0 hasta aproximadamente un pH de 4,1 (por ejemplo, un pH de 3,7 o un pH de 4,1). En algunas realizaciones, la bebida puede ser una bebida que incluye jugo de manzana o la bebida puede ser jugo de manzana. En algunos aspectos, las composiciones que comprenden ácido fumárico aislado y compuestos fenólicos aislados pueden incluir una proporción entre el ácido

fumárico y los compuestos fenólicos (por ejemplo, las PAC) de aproximadamente, por ejemplo, 10:1 - 50:1, o de aproximadamente 14:1. Dichas composiciones también pueden estar presentes en una bebida. En algunos casos, dichas bebidas pueden tener un pH mayor o igual a aproximadamente un pH de 3,5, y/o la bebida puede contener jugo de naranja. En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos presentes en estas composiciones pueden incluir, por ejemplo, al menos antocianinas y PAC, y uno de los siguientes de los siguientes: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares. Alternativamente, o además, los compuestos fenólicos pueden obtenerse mediante el uso de los métodos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones que incluyen ácido fumárico (por ejemplo, ácido fumárico aislado o purificado) y compuestos fenólicos (por ejemplo, compuestos fenólicos aislados, purificados o enriquecidos (por ejemplo, PAC)) pueden estar en polvo o ser líquidas. En algunas realizaciones, las composiciones que incluyen ácido fumárico (por ejemplo, ácido fumárico aislado o purificado) y compuestos fenólicos (por ejemplo, compuestos fenólicos aislados, purificados o enriquecidos (por ejemplo, PAC)) pueden estar en un envase. En algunas realizaciones, la composición comprende ácido fumárico aislado y compuestos fenólicos aislados, por ejemplo, en un envase adecuado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona bebidas (por ejemplo, bebidas adecuadas para su ingestión por parte de un ser humano o de un animal no humano (por ejemplo, bebidas de jugos de frutas) que incluyen compuestos fenólicos que contienen al menos PAC y ácido fumárico. En dichos aspectos, la concentración de las PAC puede ser de entre aproximadamente $4,2 \times 10^{-4}$ mg/ml y $8,29 \times 10^{-3}$ mg/ml y la concentración del ácido fumárico puede ser de entre aproximadamente un 0,01 % (peso/volumen (p/v)) y un 0,15 % (p/v). En algunas realizaciones, la concentración de las PAC puede ser de aproximadamente $4,2 \times 10^{-3}$ mg/ml y la concentración del ácido fumárico puede ser de aproximadamente un 0,1 % (p/v). En algunos casos, el pH de las bebidas que contienen dichas composiciones puede ser de desde aproximadamente un pH de 2,0 hasta aproximadamente un pH de 3,49, o la bebida puede ser jugo de manzana o una bebida que comprende jugo de manzana. En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos de dichas bebidas pueden incluir al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) y al menos uno de los siguientes: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares, o los compuestos fenólicos pueden obtenerse mediante el uso de los métodos divulgados en el presente documento.

En algunos aspectos, dichas bebidas pueden incluir una concentración de PAC de entre aproximadamente $4,2 \times 10^{-4}$ mg/ml y 0,1 mg/ml y una concentración de ácido fumárico de entre aproximadamente un 0,01 % (peso/volumen (p/v)) y un 0,15 % (p/v). Por ejemplo, en algunos casos, la concentración de las PAC puede ser de aproximadamente 5×10^{-2} mg/ml y la concentración del ácido fumárico puede ser de aproximadamente un 0,07 % (p/v). En algunos casos, el pH de las bebidas que contienen dichas composiciones puede ser mayor o igual a aproximadamente un pH de 3,5 y/o el jugo puede ser una bebida que comprende jugo de naranja.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la elaboración de composiciones para la reducción de la contaminación bacteriana (por ejemplo, la contaminación por *Aliciclobacillus* (ACB)) de una bebida. Dicho método puede incluir la obtención de ácido fumárico aislado y de compuestos fenólicos aislados que comprenden PAC; y la combinación de los compuestos fenólicos aislados y el ácido fumárico para producir una proporción entre el ácido fumárico y las PAC de desde aproximadamente 4.000:1 hasta aproximadamente 100:1 cuando la composición es añadida a la bebida. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 135:1 o de aproximadamente 238:1.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la elaboración de composiciones para la reducción de la contaminación bacteriana (por ejemplo, la contaminación por *Aliciclobacillus* (ACB)) de una bebida. Dichos métodos pueden incluir la obtención de ácido fumárico aislado y de compuestos fenólicos aislados que comprenden PAC; y la combinación de los compuestos fenólicos aislados y el ácido fumárico para producir una proporción entre el ácido fumárico y las PAC de desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 50:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 14:1.

En algunos aspectos, la presente divulgación engloba métodos para la elaboración de bebidas que incluyen la obtención de una bebida; y la adición a la bebida de compuestos fenólicos que comprenden PAC y ácido fumárico, en la que la concentración final de las PAC añadidas externamente es de entre aproximadamente $4,2 \times 10^{-4}$ mg/ml y

8,29 x 10^{-3} mg/ml, y la concentración del ácido fumárico es de entre aproximadamente un 0,01 % (peso/volumen (p/v)) y un 0,15 % (p/v). En algunas realizaciones, la concentración de PAC puede ser de aproximadamente 4,2 x 10^{-3} mg/ml y la concentración del ácido fumárico es de aproximadamente un 0,1 % (p/v), y/o el pH de la bebida puede ser de desde aproximadamente un pH de 2,0 hasta aproximadamente un pH de 3,49. En algunas realizaciones, la bebida puede ser jugo de manzana o una bebida que comprende jugo de manzana. En dichas realizaciones, la concentración de las PAC añadidas externamente puede ser de aproximadamente 4,2 x 10^{-3} mg/ml y la concentración del ácido fumárico puede ser de un 0,1 % (p/v). En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos incluidos en dichas bebidas pueden incluir al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) y al menos uno de los siguientes: una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5; un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo que el perfil oligomérico de las PAC en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos; una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos; compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de aproximadamente un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de aproximadamente un 5 % de azúcares. En algunas realizaciones, estos métodos pueden incluir la adición a la bebida de compuestos fenólicos que comprenden PAC y ácido fumárico, en los que la concentración final en la bebida de las PAC añadidas externamente es de entre aproximadamente 4,2 x 10^{-4} mg/ml y 0,1 mg/ml y la concentración del ácido fumárico es de entre aproximadamente un 0,01 % (peso/volumen (p/v)) y un 0,15 % (p/v). En algunas realizaciones, la concentración de las PAC puede ser de aproximadamente 5 x 10^{-2} mg/ml y la concentración del ácido fumárico puede ser de aproximadamente un 0,07 % (p/v), y/o la bebida puede tener un pH mayor o igual a aproximadamente un pH de 3,5, y/o la bebida puede ser jugo de naranja o una bebida que comprende jugo de naranja. En algunas realizaciones, la bebida es jugo de naranja y la concentración de las PAC añadidas externamente es de aproximadamente 5 x 10^{-2} mg/ml y la concentración del ácido fumárico es de un 0,07 % (p/v).

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y los materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la materia. Los materiales, los métodos y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto predominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y figuras, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que proporciona una realización del proceso divulgado en el presente documento. A hasta K se corresponden con las ID de las muestras mostradas en la Tabla 7.

La FIG. 2 es una gráfica de líneas que muestra el crecimiento de especies de *Aliciclobacillus* en presencia de concentraciones de extracto y de ácido fumárico.

Las FIG. 3A - 3B son gráficos de barras que muestran las cifras logarítmicas de las UFC de *Aliciclobacillus* en jugo de manzana tratado con extracto (CE, mg de PAC / 8 oz) y/o con ácido fumárico (%). Media + EEM. n = 3. (A) las diferencias significativas están indicadas con letras diferentes. (B) reducción logarítmica en el número de UFC de *Aliciclobacillus*.

Las FIG. 4A - 4B son gráficos de barras que muestran las cifras logarítmicas de las UFC de *Aliciclobacillus* en jugo de naranja tratado con extracto (CE, mg de PAC / 8 oz) y/o con ácido fumárico (%). Media + EEM. n = 3. (A) las diferencias significativas están indicadas con letras diferentes. (B) reducción logarítmica en el número de UFC de *Aliciclobacillus*.

Descripción detallada

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que pueden extraerse, obtenerse y/o concentrarse compuestos fenólicos a partir de una materia prima que contenga compuestos fenólicos mediante el uso del proceso divulgado en el presente documento. Adicionalmente, la presente divulgación proporciona que estos compuestos fenólicos extraídos pueden usarse en el desarrollo de productos saludables y de conservantes alimentarios. Consecuentemente, la presente divulgación proporciona, entre otros, procesos que pueden usarse para la extracción, la obtención y/o la concentración (por ejemplo, el enriquecimiento) de compuestos fenólicos (por ejemplo, de compuestos fenólicos naturales, por ejemplo, de compuestos fenólicos vegetales) a partir de materias primas que contienen compuestos fenólicos, y composiciones (por ejemplo, extractos) que contienen los compuestos fenólicos obtenidos mediante el uso de estos procesos (por ejemplo, extractos enriquecidos en compuestos fenólicos). Dichas composiciones - que en el presente documento se denominan "compuestos fenólicos," "extractos enriquecidos" o simplemente "extractos" - pueden incluir, por ejemplo, al menos, antocianinas y proantocianidinas (PAC).

Procesos

Haciendo referencia a la FIG. 1, se proporciona un diagrama de flujo que ilustra una realización ejemplar de un proceso para la extracción de compuestos fenólicos a partir de una materia prima que contiene compuestos fenólicos (por ejemplo, arándanos o una solución obtenida a partir de arándanos). El proceso puede usar una materia prima que contiene compuestos fenólicos. Esta materia prima puede ser un sólido o un líquido. Las materias primas sólidas pueden ser licuadas o solubilizadas, y opcionalmente filtradas para generar una materia prima líquida antes de su uso en el proceso divulgado.

El proceso puede comenzar con una materia prima líquida que contiene compuestos fenólicos (por ejemplo, jugo de arándano obtenido mediante una extracción a contracorriente (CCE), según se describe en las Patentes de EE.UU. nº 5.320.861 y 5.419.251). Las materias primas líquidas pueden contener unas cantidades conocidas de sólidos por volumen (por ejemplo, aproximadamente 5 libras de sólidos por galón, o aproximadamente 50 Brix). Si es necesario (por ejemplo, para disminuir o aumentar la concentración de los sólidos en el líquido), la materia prima líquida puede ser diluida (por ejemplo, mediante el uso de agua o de agua de ósmosis inversa (RO)) en "un tanque de mezcla" 10 para producir una menor concentración de sólidos por volumen (por ejemplo, aproximadamente 2,3 libras de sólidos por galón, o aproximadamente 25 Brix), o concentrarse para producir una mayor concentración de sólidos por volumen (por ejemplo, aproximadamente 8,6 libras de sólidos por galón, o aproximadamente 75 Brix). La concentración de sólidos en la materia prima líquida puede ser modificada para producir una viscosidad, por ejemplo, para permitir un paso o flujo óptimo del material a través de las columnas 20 y 30 (por ejemplo, la concentración de sólidos puede ser de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, o aproximadamente de 8,6 libras de sólidos por galón). La materia prima líquida puede mantenerse en el tanque de mezcla 10 antes de ser suministrada a las columnas 20 y 30.

Antes de entrar en contacto con la materia prima líquida, la resina de las columnas 20 y 30 puede ponerse en contacto con un volumen de líquido (por ejemplo, agua o agua de ósmosis inversa (RO)) suficiente para eliminar o diluir el medio (por ejemplo, etanol) usado para el almacenamiento de la resina. La materia prima líquida puede ser suministrada a continuación desde el tanque de mezcla 10 a las columnas de resina 20 y 30, en las que la resina se pone en contacto con la materia prima líquida durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que los compuestos fenólicos (por ejemplo, una porción de los compuestos fenólicos) presentes en la materia prima se unan a la resina (por ejemplo, sean capturados o retenidos por la resina). El líquido que sale de las columnas 20 y 30 se denomina flujo dinámico de la materia prima. Un volumen inicial del flujo dinámico de la materia prima puede desecharse como residuo o redirigirse para un procesado adicional. El resto del volumen del flujo dinámico de la materia prima puede recogerse en forma de un filtrado que contiene compuestos fenólicos reducidos.

Después puede suministrarse un volumen de solución de lavado desde el tanque de lavado 50 a las columnas de resina 20 y 30 para eliminar la materia prima residual. Puede recogerse todo el flujo dinámico de la solución de lavado en forma de filtrado.

Posteriormente puede suministrarse un volumen de una disolución de elución que contiene un disolvente desde el tanque de elución 60 a las columnas de resina 20 y 30 para extraer los compuestos fenólicos unidos (por ejemplo, una porción sustancial de los compuestos fenólicos unidos) de la resina. La totalidad del volumen, o una porción del mismo, del flujo dinámico de la solución de elución, puede recogerse en el recipiente de almacenamiento 70.

Las etapas anteriores representan un ciclo único del proceso ejemplar. Este ciclo puede repetirse cualquier número de veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces), según sea necesario para obtener un volumen objetivo de la solución de elución, en una única serie. Los ciclos repetidos pueden ser de tipo por lotes, semicontinuos o continuos. Antes de los ciclos adicionales, las columnas pueden enjuagarse. Alternativamente, si no son necesarios ciclos adicionales, la resina de las columnas 20 y 30 puede ser sumergida en etanol para su almacenamiento.

Cuando sea necesario, por ejemplo, una vez que se ha recogido un volumen suficiente de flujo dinámico de la solución de elución en el tanque de almacenamiento 70, el flujo dinámico de la solución puede ser suministrado a un tanque de suministro evaporador 80 y después introducirse en un ciclo a través del evaporador 90 y de la cuba ultrarrápida 100 (por ejemplo, una o varias veces, según sea necesario para reducir el contenido en disolvente del flujo dinámico de la solución a menos de 90 partes por millón mediante el uso de, por ejemplo, el evaporador 130), donde se recoge mucho disolvente mediante evaporación para producir un volumen de una solución que contiene una cantidad reducida del disolvente y agua, y los compuestos fenólicos concentrados. La solución producida en el disolvente (es decir, el extracto, es decir, el extracto líquido que contiene, por ejemplo, agua y los compuestos fenólicos extraídos) puede suministrarse al tanque 110 y/o al contenedor 120.

En algunos casos, el extracto líquido opcionalmente puede secarse, por ejemplo, secarse por pulverización.

Las etapas descritas anteriormente constituyen una única serie de un único proceso.

Lo anterior es una descripción de una realización del proceso. Los expertos en la materia serán capaces de modificar el proceso y apreciarán que son posibles numerosas variaciones y están en la presente divulgación.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso divulgado en el presente documento puede incluir uno o más ciclos englobados en una única serie. Las series pueden repetirse según sea necesario.

La materia prima que puede usarse el proceso anterior puede incluir cualquier material natural y/o sintético (por ejemplo, soluciones y líquidos) que contenga compuestos fenólicos (por ejemplo, que contenga una cantidad (por ejemplo, una cantidad natural) al menos de antocianinas y/o de proantocianidinas (por ejemplo, de proantocianidinas de tipo A)). Los compuestos fenólicos pueden incluir, por ejemplo, la clase de compuestos reconocida en la técnica que también pueden conocerse como fenoles, y todos los compuestos conocidos en la materia englobados por esta clase de compuestos. La clase de los compuestos fenólicos engloba un intervalo diverso de compuestos naturales y sintéticos. El fenol es compuesto fenólico más sencillo, que contiene un solo grupo hidroxilo unido directamente a un grupo aromático. Los compuestos fenólicos también incluyen los polifenoles, que contienen más de una unidad de fenol por molécula. Los polifenoles más habituales se clasifican como flavonoides. Todos los flavonoides contienen un núcleo que consiste en dos anillos fenólicos y un heterociclo oxigenado. Los flavonoides se clasifican adicionalmente basándose en su estado de oxidación. Algunos ejemplos de clases de flavonoides incluyen flavonoles, flavanoles, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. Las proantocianidinas (PAC), o taninos condensados, son una forma de flavanol que está formada por cadenas poliméricas de catequinas (véase, por ejemplo, Cheynier V., Am. J. Clin. Nutr., 81: 223S-229S, 2005). Se ha informado de que las PAC se forman a través de reacciones de las antocianinas con compuestos que contienen un doble enlace polarizable. Consecuentemente, las PAC difieren en la naturaleza de sus unidades constitutivas, en la secuencia, en las posiciones de los enlaces interflavánicos, en la longitud de la cadena y en la presencia de sustituyentes (por ejemplo, de grupos galoílo o glucosilo). Las PAC, incluyendo las PAC de mayor peso molecular, son generalmente solubles en un medio acuoso o en un medio hidroalcohólico. La afinidad y la astringencia de la proteína PAC se correlaciona (por ejemplo, aumenta) con el grado de polimerización y de galoilación de la PAC. Específicamente, las de PAC mayor peso molecular son más astringentes que las PAC oligoméricas (Vidal et al., J. Sci. Food Agric., 83: 564-573, 2003). Adicionalmente, las PAC con un bajo grado de polimerización, por ejemplo, un grado de polimerización de entre 2 y 4 (de dímero a tetrámero), es decir, las PAC oligoméricas, son muy bioactivas. Algunos ejemplos de listas de los compuestos englobados por la clase están disponibles al público y pueden encontrarse, por ejemplo, en internet (véase, por ejemplo, la dirección de internet en.wikipedia.org/wiki/Category:Phenols (visitada al 27 de noviembre de 2009, y con la última modificación el 23 de noviembre de 2009 a las 14:07), en libros de texto y en publicaciones periódicas. El término compuestos fenólicos incluye aquellos compuestos englobados por las clases químicas de los fenoles, los polifenoles, los flavonoles, los flavanoles, las catequinas, las flavanonas, las antocianidinas, y los isoflavonoides, y las proantocianidinas (PAC).

Algunas materias primas que contienen compuestos fenólicos pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, frutas de plantas del género *Vaccinium,* arándanos (por ejemplo, el jugo, las semillas, la piel, la pulpa y las hojas), el jugo, las semillas y la piel de la uva, la manzana, la fruta del algarrobo, el arándano rojo, el mirtilo, el arándano azul (y el jugo obtenido a partir del mismo), la grosella negra, la aronia, la aronia negra, y la corteza de pino, los cacahuetes (por ejemplo, las pieles de cacahuetes), el ginkgo (por ejemplo, las hojas de ginkgo), las nueces de cola, la Rathania (por ejemplo, la raíz de Rathania), la canela, el coco, el té negro y el té verde. En algunos casos, la materia prima puede incluir, pero no se limita a, (1) arándanos completos, (2) pieles de arándanos, (2) semillas de arándanos, (3) pulpa de arándanos, (4) hojas de arándanos, (5) plantas de arándanos completas, (6) y cualquier combinación de (1) - (6). Además, en los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse materiales distintos a los divulgados si el material contiene compuestos fenólicos. Los métodos para la identificación y la cuantificación de los compuestos fenólicos en los materiales o en las materias primas son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una espectroscopía directa a 280 nm; una espectroscopía indirecta mediante el uso de, por ejemplo, reactivos y ensayos reconocidos en la técnica y disponibles comercialmente, por ejemplo, ensayo de Vanillan, ensayo de Folin-Denis, ensayo de Folin-Ciocalteu, ensayo de azul de Prusia, ensayo de Bate-Smith y ensayo de Porter; y una cromatografía de líquidos, por ejemplo, mediante el uso de ultravioleta, fluorescencia, espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear (RMN). Las técnicas de detección de compuestos fenólicos también se divulgan en la bibliografía (véase, por ejemplo, Fereidoon y Naczk, Food Phenolics, Technomic Publishing Co. Inc., 995).

La materia prima puede ser sólida o líquida y estar fresca o congelada. Las materias primas sólidas pueden ser licuadas o solubilizadas, por ejemplo, llevadas a una solución, antes de comenzar el proceso. Las materias primas congeladas pueden ser descongeladas, por ejemplo, antes de su uso. La materia prima también puede usarse con o sin modificaciones. Algunos ejemplos de modificaciones útiles pueden incluir una selección, un refinado y/o un procesado mecánico. Por ejemplo, pueden emplearse los materiales para eliminar los desechos (por ejemplo, el material que no contiene PAC), por ejemplo, desechos, y/o clasificarse para seleccionar el material con un tamaño definido. Cuando el material es una fruta (por ejemplo, arándanos), el material puede cortarse en rodajas y/o pelarse para exponer la carne interior de la fruta (por ejemplo, la pulpa del arándano) y para aumentar el área superficial del material. En algunos casos, las pieles y la pulpa pueden usarse conjuntamente, o pueden separarse y usarse por separado.

La materia prima también puede incluir un jugo (por ejemplo, jugo de arándano) producido mediante un prensado tradicional, una digestión enzimática y/o una extracción a contracorriente (CCE) (la CCE se describe en las Patentes de EE.UU. nº 5.320.861 y 5.419.251 o el jugo según se describe en, o se obtiene mediante el uso de, los métodos

descritos en las Patentes de EE.UU. nº 6.733.813; 6.977.092; y 7.022.368.

Según se usa en el presente documento, un jugo se refiere, por ejemplo, al líquido exprimido o extraído a partir de una o más de las frutas o de las verduras divulgadas en los párrafos anteriores (por ejemplo, arándanos) o un puré de las porciones comestibles de una fruta o de una verdura que se usa como bebida.

En algunas realizaciones, la materia prima no es un ultrafiltrado y/o no se trata previamente mediante el uso de una ultrafiltración, por ejemplo, una ultrafiltración, por ejemplo, según se divulga en la Publicación de EE.UU. nº 20090035432.

El volumen de materia prima líquida usado en el proceso (por ejemplo, en un único ciclo del proceso) puede modificarse según sea necesario. Por ejemplo, el volumen de materia prima en un único ciclo del proceso puede incluir desde aproximadamente 100 ml hasta aproximadamente 10 galones para series a pequeña escala, y desde aproximadamente 100 galones hasta aproximadamente 1.000 galones, y hasta, por ejemplo, 20.000 galones para series a gran escala.

En algunos casos, el volumen y/o la concentración de la materia prima líquida usados pueden basarse en la capacidad adsorbente de la resina, que puede basarse en el volumen de resina presente en la columna), de forma que el volumen y/o la concentración de la materia prima líquida estén optimizados para no superar la capacidad adsorbente de la resina. Por ejemplo, el volumen de materia prima líquida puede ser menor o igual o mayor que la capacidad adsorbente de la resina.

El volumen de materia prima líquida puede ser aumentado o disminuido para proporcionar una concentración elegida de sólidos. En algunos casos, se puede aumentar o disminuir el volumen de una primera materia prima con una primera concentración de sólidos para proporcionar una segunda materia prima con una concentración de sólidos mayor o menor. En algunos casos, la concentración de sólidos en una materia prima líquida puede seleccionarse para proporcionar una cierta viscosidad, por ejemplo, de forma que la materia prima líquida permita un cierto caudal. Algunos ejemplos de concentraciones de sólidos que puede haber presentes en una materia prima líquida incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente un 1-10 %, un 11-20 %, un 21-30 %, un 31-40 %, un 41-50 %, más del 50 % o un 25 % (la concentración de sólidos en una materia prima líquida también puede expresarse en términos de porcentaje o de Brix). Algunos métodos para aumentar el volumen de una materia prima líquida incluyen, por ejemplo, la adición de un volumen de una solución adecuada (por ejemplo, de agua) a la materia prima líquida, por ejemplo, para aumentar el volumen total de la materia prima líquida y reducir así la concentración de sólidos en la materia prima.

Algunos métodos para disminuir el volumen de una materia prima líquida incluyen, por ejemplo, ósmosis inversa o evaporación, o ambos, por ejemplo, para disminuir el volumen total de la materia prima líquida y aumentar así la concentración de sólidos en la materia prima. En algunos casos, el volumen de materia prima líquida puede ser de aproximadamente 346 galones y la concentración de sólidos en la materia prima líquida puede ser de aproximadamente un 50 %, por ejemplo, por columna, por ciclo. Si fuera necesario, el volumen de la materia prima puede aumentarse para proporcionar una materia prima líquida que contiene aproximadamente un 25 % de sólidos antes de poner en contacto la materia prima líquida con la resina, por ejemplo, mediante la adición de un volumen igual (por ejemplo, de aproximadamente 346 galones) de líquido (por ejemplo, de agua) a la materia prima líquida.

En algunas realizaciones, la preparación de una materia prima para su uso en los procesos divulgados en el presente documento no incluye una etapa de extracción, por ejemplo, una etapa de extracción ácida o alcalina.

El tamaño (por ejemplo, el volumen o la capacidad o el área (por ejemplo, en m^2) de una columna individual) de una columna para su uso en el proceso divulgado anteriormente puede ser modificado según la escala del proceso. Por ejemplo, un proceso a pequeña escala (por ejemplo, un proceso a escala de laboratorio) puede usar columnas (por ejemplo, una o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10 o 20) con una capacidad de entre aproximadamente 100 ml y aproximadamente 10 galones (por ejemplo, 1 litro), y un proceso a gran escala (por ejemplo, un proceso a escala industrial o comercial) puede usar columnas (por ejemplo, una o más columnas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 o más de 20 columnas) con una capacidad de entre aproximadamente 10 galones y aproximadamente 1.000 galones (por ejemplo, de aproximadamente 141 galones).

El volumen de líquido (por ejemplo, de agua) que puede usarse para eliminar o diluir el medio usado para el almacenamiento de la resina en las columnas de resina puede incluir cualquier volumen de líquido que sea suficiente para sustituir completamente el medio o diluir el medio al menos aproximadamente un 10 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 20 %, un 50 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 99 %).

Algunas resinas adecuadas para su uso en los procesos divulgados en el presente documento incluyen, por ejemplo, una resina (por ejemplo, una resina sintética) que se pueda unir a los compuestos fenólicos presentes en una materia prima que contiene los compuestos fenólicos. Dichas resinas pueden incluir, por ejemplo, una resina con (1) una primera afinidad de unión por, y que se une (por ejemplo, que se une específicamente) a, los compuestos fenólicos; y (2) una segunda afinidad de unión por los ácidos orgánicos y/o los azúcares, en la que la

segunda afinidad de unión es menor que la primera afinidad de unión, por ejemplo, de forma que la resina no se une (por ejemplo, no se une sustancialmente) a los ácidos orgánicos ni/o a los azúcares de una materia prima.

En algunos casos, la resina puede (i) unirse a los compuestos fenólicos con una polaridad entre no polar e intermedia, (ii) estar basada en estireno que tiene uno o más sustituyentes bromo, (iii) ser hidrófoba, ser un polímero acrílico alifático no iónico, (iv) proporcionar una mayor área superficial de unión, (v) ser una resina orgánica, (vi) ser una resina de intercambio iónico, (vii) ser una resina aromática, (viii) ser una resina de ácido (met)acrílico, (ix) ser una resina de (met)acrilato, (x) ser una resina alifática de acrilonitrilo, y/o cualquier combinación de (i) - (x).

Algunos ejemplos de resinas disponibles comercialmente que pueden usarse en los procesos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, SP207 Sepabeads™ (Mitsubishi Chemical), SP700 Sepabeads™ (Mitsubishi Chemical), Diaion HP20 (Mitsubishi Chemical), Diaion SP70 (Mitsubishi Chemical), Diaion SP825 (Mitsubishi Chemical), Diaion SP850 (Mitsubishi Chemical), metacrilato de Diaion HP2MG (Mitsubishi Chemical), ADS-5 (Nankai University, Tianjin, China), ADS-17 (Nankai University, Tianjin, China), Amberlite™ XAD-4 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberlite™ XAD-16 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberlite™ XAD-1600 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberlite™ XAD-2 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberlite™ XAD-1180 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberlite™ XAD-2000 (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass), Amberchrom™ CG300-C (Rohm & Hass), y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la resina no es la resina C18 disponible comercialmente.

En algunas realizaciones, la resina es la disponible en el mercado como Amberlite™ FPX66 (Rohm & Hass). La FPX66 tiene las siguientes propiedades: la FPX66 consiste en microesferas blancas que forman una matriz que consiste en un polímero aromático macrorreticular. La capacidad de retención de humedad de la resina es del 60-68 % y su gravedad específica es de entre 1,015 y 1,025. La resina tiene un coeficiente de uniformidad menor o igual a 2,0, un tamaño armónico medio de 0,600-0,750 mm, un contenido en finos de menos de 0,300 mm, y un área superficial mayor o igual a 700 m^2/g. La porosidad de la resina es de 1,4 cc/g.

En algunas realizaciones, la resina es la resina disponible en el mercado Amberlite™ XAD-7HP (fabricada por Organo Co. y distribuida mundialmente por Rohm & Hass). La información sobre la XAD-7HP puede encontrarse en la página web de Rohm & Hass amberlyst.com/xad7hp_typical.htm. Específicamente, la resina XAD-7HP tiene las siguientes propiedades: la XAD-7HP es una resina de un éster polimérico reticulado alifático macrorreticular que consiste en microesferas blancas traslúcidas que tienen una capacidad de retención de humedad del 61-69 %. La resina tiene una elevada área superficial (por ejemplo, de aproximadamente 300-500 m^2/g (por ejemplo, mayor de 380 m^2/g)), una gravedad específica de entre 1,06 y 1,08, un tamaño de poro medio de aproximadamente 450 Angstroms, un diámetro medio de aproximadamente 560 µm, y tanto una fase polimérica continua como una fase porosa continua. El tamaño armónico medio de las microesferas es de 0,56-0,71 mm, con un coeficiente de uniformidad menor o igual a 2,0. La temperatura operativa máxima de la resina es de 80-100 ºC (es decir, 175-210 ºF).

La cantidad de resina usada puede variar y depende de la escala del proceso y/o del volumen o la capacidad de la columna.

El tiempo y las condiciones suficientes para que los compuestos fenólicos presentes en la materia prima se unan a la resina incluyen aquellos tiempos y condiciones en los que se unen al menos y/o aproximadamente un 1 % o un 10 % (por ejemplo, al menos y/o aproximadamente un 1 %, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % y un 100 %, o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores) de los compuestos fenólicos presentes en la materia prima líquida, a la resina. Algunos métodos para la evaluación del porcentaje de compuestos fenólicos presentes en la materia prima que se han unido a la resina pueden incluir, por ejemplo, las etapas de evaluar en primer lugar la cantidad de compuestos fenólicos en la materia prima líquida, y evaluar a continuación la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el flujo dinámico de la materia prima y/o de los compuestos no fenólicos contenidos en el filtrado, en los que cualquier diferencia en la cantidad de compuestos fenólicos es una indicación de la cantidad de los compuestos fenólicos unidos a la resina. Los métodos para la detección de compuestos fenólicos son conocidos en la materia y están ejemplificados anteriormente.

El tiempo y las condiciones suficientes para que los compuestos fenólicos presentes en la materia prima se unan a la resina pueden ser controlados, por ejemplo, mediante la modificación del caudal de la materia prima en la resina (por ejemplo, el tiempo que está en contacto la materia prima con la resina), y/o de la temperatura en la columna de resina. Por ejemplo, el caudal de la materia prima en la columna de resina puede incluir, pero no se limita a, aproximadamente 1,0-6,0 galones por minuto (por ejemplo, aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,5, 6,0 galones por minuto), y la temperatura en la columna de resina puede seleccionarse para minimizar el crecimiento microbiano (por ejemplo, a 35 ºF - 80 ºF).

Como se ha mencionado anteriormente, puede desecharse un volumen del flujo dinámico de la materia prima como residuo o redirigirse para un procesado adicional. Algunos ejemplos de volúmenes que pueden desecharse incluyen al menos y/o aproximadamente, un 0,5 %, un 1 %, un 5 %, un 10 %, y aproximadamente un 20 %.

Algunas soluciones de lavado útiles en los procesos divulgados en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, soluciones basadas en agua que contienen uno o más disolventes que no reducirán (por ejemplo, que no reducirán sustancialmente) la cantidad de compuestos fenólicos unidos a la resina. Algunos ejemplos de soluciones de lavado pueden incluir agua o agua mezclada con uno o más disolventes, por ejemplo, agua que contiene hasta aproximadamente un 25 % de disolvente (por ejemplo, hasta y/o aproximadamente un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, un 1 %, un 0,5 %, y/o por debajo del 0,5 % de disolvente). Algunos disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, propanol), acetona, hexano y/o mezclas de los mismos.

En algunos casos, la solución de lavado es una solución basada en agua que contiene un 5 % ± 1 % de etanol total (por ejemplo, 1 parte de etanol en 19 partes de agua). El volumen de la solución de lavado puede ser adaptado al volumen o la capacidad de la columna que contiene la resina, en la que una vez el volumen de resina de la columna se denomina un volumen de lecho. Por ejemplo, el volumen de la solución de lavado puede incluir, por ejemplo, menos de un volumen de lecho, aproximadamente un volumen de lecho, aproximadamente dos volúmenes de lecho, o más de dos volúmenes de lecho.

En algunos casos, el volumen de la solución de lavado puede ser de aproximadamente 282 galones o de aproximadamente 2 volúmenes de lecho, y la solución de lavado puede incluir aproximadamente un 5 % ± 1 % de etanol total (por ejemplo, 1 parte de etanol en 19 partes de agua).

En algunos casos, el volumen de la solución de lavado puede ser de aproximadamente 282 galones o de aproximadamente 2 volúmenes de lecho, y la solución de lavado puede incluir aproximadamente un 5 % ± 1 % de alcohol desnaturalizado estándar (SDA), por ejemplo, SDA 35A 190, en agua (la información adicional relativa al SDA 35A 190 puede encontrarse en la dirección de internet sasoltechdata.com/tds/sda35A_190.pdf).

Un único ciclo puede incluir 1 o más etapas de lavado (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más etapas de lavado) por cada ciclo. Adicionalmente, las etapas de lavado pueden llevarse a cabo durante un tiempo y en unas condiciones que permitan una eliminación óptima de los compuestos no fenólicos de la resina. Por ejemplo, el caudal de la solución de lavado en la columna de resina puede incluir, pero no se limita a, 1,0-6,0 galones por minuto (por ejemplo, aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,5, 6,0 galones por minuto), y la temperatura en la columna de resina puede seleccionarse para minimizar el crecimiento microbiano (por ejemplo, a 35 ºF - 80 ºF).

Las soluciones de elución que pueden usarse en los procesos divulgados en el presente documento pueden incluir soluciones basadas en agua que contienen uno o más disolventes a cualquier concentración que disminuirán (por ejemplo, que disminuirán sustancialmente) la asociación entre la resina-compuestos fenólicos unidos y la resina, de forma que los compuestos fenólicos sean liberados de la resina. Algunos ejemplos de soluciones de elución pueden incluir un disolvente o una mezcla de un disolvente y agua (por ejemplo, en el que la concentración del disolvente es de aproximadamente un 100 %, o de menos de un 100 %, por ejemplo, de aproximadamente un 99 %, un 98 %, un 97 %, un 96 %, un 95 %, un 90 %, un 85 %, un 80 %, un 75 %, un 70 %, un 60 %, un 55 %). Algunos disolventes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, propanol), acetona y hexano. En algunos casos, la solución de elución es una solución basada en agua que contiene un 95 % ± 1 % de etanol total. El volumen de la solución de elución puede incluir, por ejemplo, menos de un volumen de lecho, aproximadamente un volumen de lecho, aproximadamente dos volúmenes de lecho, o más de dos volúmenes de lecho.

En algunos casos, el volumen de la solución de elución puede ser de aproximadamente 346 galones o de aproximadamente 2,8 volúmenes de lecho, y la solución de elución puede incluir un 95 % de etanol total en agua.

En algunos casos, el volumen de la solución de elución puede ser de aproximadamente 346 galones o de aproximadamente 2,8 volúmenes de lecho y la solución de elución puede incluir un 95 % de alcohol desnaturalizado estándar (SDA), por ejemplo, SDA 35A 190, en agua.

Un único ciclo puede incluir 1 o más etapas de elución (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más etapas de elución) por cada ciclo. Adicionalmente, las etapas de elución pueden llevarse a cabo durante un tiempo y en unas condiciones que permitan una extracción óptima de los compuestos fenólicos de la resina. Por ejemplo, el caudal de la solución de lavado en la columna de resina puede incluir, pero no se limita a, 1,0-6,0 galones por minuto (por ejemplo, aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,5, 6,0 galones por minuto), y la temperatura en la columna de resina puede seleccionarse para minimizar el crecimiento microbiano (por ejemplo, a 35 ºF - 80 ºF).

En algunas realizaciones, el flujo dinámico de elución se recoge sin ningún procesado adicional. En otras realizaciones, el flujo dinámico de elución es procesado adicionalmente. Por ejemplo, las soluciones que contienen los compuestos fenólicos pueden evaporarse mediante el uso de al menos una etapa de evaporación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más etapas de evaporación), por ejemplo, para reducir la cantidad de disolvente presente en la solución, dando como resultado una solución que contiene compuestos fenólicos, agua y una cantidad reducida de disolvente en comparación con la solución de elución. En algunos casos, la etapa de evaporación puede repetirse para reducir adicionalmente la cantidad de disolvente presente en la solución. Algunos métodos de evaporación pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, métodos de evaporación por lotes y métodos de evaporación continua, métodos por caída en película, métodos por ascenso en película, métodos por caída y ascenso en película (por ejemplo, mediante el uso de placas y tubos), métodos con múltiples efectos, métodos con efectos individuales y una recompresión por vapor.

En algunos casos, la etapa de evaporación puede repetirse, por ejemplo, hasta que la cantidad de disolvente en la solución sea menor de aproximadamente 90 partes por millón. Algunos métodos de evaporación pueden incluir, por ejemplo, el uso de una temperatura (por ejemplo, de calor) y/o de una presión (por ejemplo, a vacío) suficientes para reducir la cantidad de disolvente en la solución. Algunos ejemplos de condiciones pueden incluir una temperatura de al menos aproximadamente 70 ºC (por ejemplo, aproximadamente de 71 ºC, de 72 ºC, de 73 ºC, de 74 ºC, de 75 ºC, de 76 ºC, de 77 ºC, de 78 ºC, de 79 ºC, de 80 ºC, de 81 ºC, de 82 ºC, de 83 ºC, de 84 ºC, de 85 ºC, de 86 ºC, de 87 ºC, de 88 ºC, de 89 ºC, de 90 ºC y por encima de 90 ºC (o el equivalente en Fahrenheit)) y una presión de al menos aproximadamente 50 mBar (por ejemplo, de 50 mBar, de 60 mBar, de 70 mBar, de 80 mBar, de 90 mBar y por encima de 90 mBar). En algunas realizaciones, las condiciones de evaporación pueden ser de aproximadamente 124 ºF y de aproximadamente 130 mBar. Otras condiciones de evaporación ejemplares incluyen las combinaciones de temperatura y vacío mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1: condiciones de evaporación ejemplares

Temperatura (ºF)	Vacío (mBar)
104	73,77
114	98,61
124	130,35
134	170,46
144	220,67
154	282,93
164	359,48
174	452,8
184	565,72
194	701,24
204	862,9
212	2.605,4

En algunos casos, puede llevarse a cabo una etapa de evaporación junto con una etapa para reducir la concentración de sólidos en el líquido (por ejemplo, una etapa de dilución).

En algunas realizaciones, la evaporación puede incluir (i) la eliminación del disolvente de las soluciones que contienen los compuestos fenólicos y (ii) la concentración de las soluciones que contienen los compuestos fenólicos. En algunos casos, (i) y (ii) se llevan a cabo de forma simultánea mediante el uso de, por ejemplo, un evaporador rotatorio (Rotovap). Alternativamente, (i) puede llevarse a cabo mediante el uso de, por ejemplo, columnas de destilación, y (ii) puede llevarse a cabo simultáneamente o posteriormente. Otros métodos ejemplares para la eliminación del disolvente incluyen, pero no se limitan a, el uso de la temperatura y/o de vacío como se ha descrito anteriormente mediante el uso de, por ejemplo, un evaporador rotatorio (Rotovap).

En algunas realizaciones, la evaporación puede incluir (i) la eliminación del disolvente de la solución que contiene los compuestos fenólicos mediante el uso de columnas destilación, y (ii) la concentración de las soluciones que contienen los compuestos fenólicos mediante el uso de un evaporador en placa de ascenso en película. Alternativamente o además, la evaporación puede incluir el uso de evaporadores de circulación forzada o de hervidores Pfaudler.

La solución resultante de la etapa de evaporación es un líquido (por ejemplo, agua) que contiene los compuestos fenólicos (un extracto líquido). El extracto no comprende jugo de fruta, por ejemplo, jugo de fruta exprimido o extraído a partir de una materia prima divulgada anteriormente en ausencia del proceso divulgado en el presente documento; o jugo de fruta producido mediante un prensado tradicional, una digestión enzimática o mediante una

CCE; o un jugo según se ha descrito o se obtiene mediante el uso de los métodos descritos en las Patentes de EE.UU. nº 6.733.813; 6.977.092; y 7.022.368. En algunos casos, puede obtenerse el extracto líquido y opcionalmente analizarse, por ejemplo, para evaluar la cantidad de compuestos fenólicos y/o para caracterizar los tipos de compuestos fenólicos presentes.

El extracto líquido puede concentrarse, por ejemplo, para aumentar la concentración de sólidos en el extracto. Algunos métodos de concentración incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, uno o más de concentración con membrana, concentración con calor, concentración a vacío (presión reducida) y concentración por congelación. En algunos casos, puede obtenerse este extracto líquido y opcionalmente analizarse, por ejemplo, para evaluar la cantidad de compuestos fenólicos y/o para caracterizar los tipos de compuestos fenólicos presentes.

Los extractos líquidos pueden secarse para proporcionar un extracto seco que contiene los compuestos fenólicos. Algunos métodos para el secado de extractos líquidos pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, liofilización, secado a vacío, secado por pulverización, secado en tambor, secado en estantería y secado por microondas.

Si fuera necesario puede analizarse un extracto líquido o seco, por ejemplo, para evaluar la cantidad de compuestos fenólicos presente y/o para caracterizar los compuestos fenólicos presentes (por ejemplo, para determinar las cantidades relativas de compuestos fenólicos (por ejemplo, de antocianinas y de PAC) presentes en el extracto.

Opcionalmente, los extractos también pueden esterilizarse. La esterilización puede llevarse a cabo mediante un método usado habitualmente por los expertos en la materia, tal como una esterilización a alta presión, una esterilización por calor, una esterilización por filtración y una esterilización con microondas.

Extractos

Los extractos (por ejemplo, los extractos enriquecidos en compuestos fenólicos) obtenidos mediante el uso de los procesos divulgados en el presente documento pueden ser extractos líquidos, secos, semisecos o en polvo (por ejemplo, extractos en polvo, deshidratados o liofilizados) que contienen al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC). Dichos extractos pueden ser caracterizados adicionalmente por tener o contener una cantidad total de antocianinas de al menos aproximadamente un 1 % (en peso por volumen (p/v), en peso por peso (p/p), o en volumen por volumen (v/v)), según se evalúa (por ejemplo, se cuantifica) mediante el uso de una HPLC. Por ejemplo, los extractos pueden contener al menos aproximadamente o aproximadamente un 1 %, por ejemplo, al menos aproximadamente un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 6 %, un 7 %, un 8 %, un 9 %, un 10 %, un 11 %, un 12 %, un 13 %, un 14 %, un 15 %, un 16 %, un 17 %, un 18 %, un 19 %, un 20 % (p/v, p/p o v/v) o al menos aproximadamente un 21 % (p/v, p/p o v/v), o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de antocianinas, según se evalúa mediante una HPLC. Dichos extractos también pueden contener al menos aproximadamente un 10 % (p/v, p/p o v/v) de PAC, según se evalúa (por ejemplo, se cuantifica) mediante el uso de, por ejemplo, una HPLC. Por ejemplo, los extractos pueden contener al menos aproximadamente o aproximadamente un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 % (p/v, un p/p, un o v/v), un más de 61 %, un 65 %, un 70 %, un 75 % o al menos aproximadamente un 80 % (p/v, p/p o v/v), o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de PAC, según se evalúa mediante una HPLC.

La cantidad de PAC en un extracto puede ser evaluada o cuantificada mediante el uso del DMAC (el método DMAC se divulga en Cunningham et al., Analysis and Standardization of Cranberry Products, Quality Management of Nutraceuticals, ACS Symposium Series, 803 ed., American Chemical Society, Washington D.C., páginas 151-166, 2002. En dichos casos, los extractos que contienen al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) pueden contener aproximadamente o al menos aproximadamente un 40 % (p/v, p/p o v/v) de PAC, según se evalúa (por ejemplo, se cuantifica) mediante el uso de, por ejemplo, el DMAC. Por ejemplo, los extractos pueden contener al menos aproximadamente o aproximadamente un 40 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % (p/v, un p/p, o v/v), más de un 80 % (p/v, p/p o v/v), o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de PAC, según se evalúa mediante el DMAC; y/o

una proporción entre las antocianinas y las PAC de aproximadamente 1:5 (por ejemplo, aproximadamente de 1:2, de 1:2,5, de 1:3, de 1:3,5, de 1:4, de 1,4,5, de 1:5, de 1:5,5, de 1:6, de 1,6,5, de 1:7, de 1:7,5, de 1:8, de 1:8,5, de 1:9, de 1:9,5 o aproximadamente de 1:10), en la que las antocianinas se evalúan (por ejemplo, se cuantifican) mediante el uso de, por ejemplo, una HPLC, y las PACS se evalúan (por ejemplo, se cuantifican) mediante el uso de, por ejemplo, una HPLC o el DMAC; y/o

un perfil oligomérico de las PAC que es sustancialmente el mismo o similar (por ejemplo, sustancialmente similar) al perfil oligomérico de las PAC presentes en la materia prima de jugo de arándano CCE. Alternativamente o además, el perfil oligomérico de las PAC puede incluir cantidades mayores de 2-mer y mayores de 10-mers que otros oligómeros de PAC. Alternativamente o además, el perfil oligomérico de las PAC puede incluir unas proporciones de oligómeros de PAC de aproximadamente 6(1mer):28(2mer):11(3mer):8(4mer):6(5mer):7(6mer):3(7mer):4(8mer):2(9mer):26(> 10mer); y/o

una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es sustancialmente la misma (por ejemplo, prácticamente igual) que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales presentes en los arándanos o en la fruta a partir de la cual se extrajeron los compuestos fenólicos, por ejemplo, presentes en los arándanos o en el jugo de arándano extraído a contracorriente; y/o

una proporción entre las PAC y la quercetina, el quercgalac, la quercitrina, la miricetina y/o el quercaraban que es la misma (por ejemplo, sustancialmente la misma) o similar, (por ejemplo, sustancialmente similar) a la proporción entre las PAC y la quercetina, el quercgalac, la quercitrina, la miricetina y/o el quercaraban presentes en el jugo de arándano CCE; y/o

una proporción entre las PAC y las antocianinas totales que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas totales en los arándanos o en la fruta a partir de la cual se extrajeron los compuestos fenólicos, por ejemplo, presentes en los arándanos o en el jugo de arándano extraído a contracorriente; y/o

compuestos fenólicos (por ejemplo, compuestos fenólicos poliméricos) con un peso molecular (por ejemplo, un peso molecular medio) de menos de 14.000 Daltons; y/o

PAC (por ejemplo, 10 % o más de las PAC totales en el extracto) con unas longitudes de la cadena polimérica de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o mayores de 10, o combinaciones de las mismas; y/o

una mayor concentración de antocianina y de PAC de la que hay presente en los arándanos o en la fruta a partir de la cual se extrajeron los compuestos fenólicos, por ejemplo, presente en los arándanos o en la materia prima de jugo de arándano extraído a contracorriente, por ejemplo, una mayor concentración de peso seco.

Los extractos que contienen al menos antocianinas y proantocianidinas (PAC) pueden ser opcionalmente caracterizados adicionalmente basándose en la cantidad de ácidos orgánicos (por ejemplo, de ácidos orgánicos totales) y de azúcares (por ejemplo, de azúcares totales) en el extracto. Por ejemplo, los extractos pueden contener menos de un 5 % (p/v, p/p o v/v) de ácidos orgánicos (por ejemplo, aproximadamente un 5 % o menos de aproximadamente un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, un 1 % de ácidos orgánicos, menos de un 1 % de ácidos orgánicos, nada de ácidos orgánicos (por ejemplo, el extracto puede estar exento (por ejemplo, sustancialmente exento) de ácidos orgánicos), o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores), y/o menos de un 5 % de azúcar (por ejemplo, aproximadamente un 5 % o menos de aproximadamente un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, un 1 % de azúcar, menos de un 1 % de azúcar, sin azúcar (por ejemplo, el extracto puede estar exento (por ejemplo, sustancialmente exento) de azúcar), o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores).

Los compuestos fenólicos extraídos mediante el uso del proceso descrito en el presente documento pueden ser solubles en un medio acuoso.

Un extracto puede formularse en forma de una composición para su uso en un animal (por ejemplo, en un ser humano y/o en un animal no humano), por ejemplo, para su ingestión o consumo por parte de un animal (por ejemplo, de un ser humano y/o de un animal no humano). Dichas composiciones pueden incluir excipientes, por ejemplo, para aumentar la estabilidad, la solubilidad, la vida útil, el sabor, para estandarizar la cantidad de un compuesto en particular en la composición, y/o la bioabsorción del extracto. Algunos ejemplos de excipientes incluibles incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol e inhibidores de las enzimas que degradan y/o modifican los compuestos fenólicos, tales como inhibidores de las polifenoloxidasas, de las peroxidasas, de las glicosidasas, de las descarboxilasas y de las esterasas. Alternativamente o además, los extractos pueden combinarse con agentes que los protegen frente a reacciones oxidantes (por ejemplo, antioxidantes). Puede emplearse un medio de diafiltración diferente (por ejemplo, agua acidificada) para estabilizar y/o ajustar el color del extracto.

Uso de los extractos

En algunas realizaciones, los extractos divulgados en el presente documento pueden usarse en o como nutricéuticos y/o como complementos alimenticios. Por ejemplo, los extractos pueden formularse en forma de polvos, de píldoras, de comprimidos, de cápsulas o de jarabes para su administración a un individuo (por ejemplo, a un ser humano o no humano) mediante cualquier vía, por ejemplo, mediante ingestión. Alternativamente o además, los extractos pueden usarse para complementar un alimento o una bebida para mejorar los beneficios en la salud conferidos por el alimento o la bebida. Por ejemplo, dicho extracto podría aplicarse a (por ejemplo, untarse sobre o infundirse en) frutas, verduras, legumbres, y similares (por ejemplo, arándanos secos) para crear un producto alimenticio con unos beneficios mejorados para la salud. Alternativamente o además, los extractos pueden usarse para complementar bebidas, por ejemplo, bebidas de jugos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, jugo de frutas y bebidas de jugo de fruta (por ejemplo, cócteles de jugo de arándano y mezclas de jugos), té (por ejemplo, de hierbas y té que no es de hierbas), hojas de té, yogur, leche, batidos de frutas, gomas de mascar, complementos dietéticos, agua, aguas aromatizadas, bebidas energéticas y leche (por ejemplo, leche líquida y en polvo).

Composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico y usos de las mismas

Algunas especies del género *Aliciclobacillus* (ACB) incluyen, por ejemplo, bacterias acidófilas, termófilas y formadoras de esporas tales como *Aliciclobacillus acidoterrestris* y *Aliciclobacillus acidocaldarius.* La contaminación por ACB de las bebidas de jugos puede causar un deterioro debido la producción de guayacol, un compuesto orgánico que imparte un sabor y un olor desagradables.

La contaminación por ACB de las bebidas de jugos puede estar provocada por la presencia de un residuo de tierra en la bebida de jugo. Consecuentemente, un lavado cuidadoso de la fruta con agua no contaminada durante el

procesado puede reducir la contaminación por ACB. Sin embargo, algunas frutas son difíciles de lavar concienzudamente. Dichos métodos también son ineficaces y no pueden ser aplicados a bebidas de jugos previamente procesadas y envasadas (por ejemplo, a un jugo envasado). La contaminación por ACB también puede estar presente en el azúcar en bruto o refinado que se añade a los jugos. Una vez que hay presente ACB en una línea de producción, puede ser difícil de eliminar debido a que las esporas de la ACB son resistentes al calor. La pasteurización no puede usarse siempre para eliminar la ACB debido a que las altas temperaturas requeridas para la eliminación de las esporas de ACB pueden ser perjudiciales para la calidad del jugo. También pueden usarse ciertos tipos de filtración y de radiación para eliminar la ACB, pero dichos métodos no son adecuados para todos los productos. Unas elevadas concentraciones de compuestos fenólicos pueden reducir la contaminación por ACB en bebidas tales como los jugos de fruta. La aplicación de dichos métodos está limitada, sin embargo, debido a que la cantidad de compuestos fenólicos necesaria provoca un cambio indeseable en el color de la bebida. El ácido fumárico solo también puede reducir la contaminación por ACB en las bebidas de jugos, pero no sin alterar de forma indeseable el sabor del jugo.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden (por ejemplo, que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en) compuestos fenólicos (por ejemplo, compuestos fenólicos concentrados, aislados o purificados (por ejemplo, los extractos divulgados en el presente documento)) y ácido fumárico. Estas composiciones pueden ser añadidas a las bebidas de jugos que son susceptibles a una contaminación microbiana (por ejemplo, a una contaminación bacteriana o a una contaminación por ACB), para reducir o prevenir la contaminación microbiana (por ejemplo, una contaminación bacteriana o una contaminación por ACB) en las mismas.

Algunas bebidas de jugos susceptibles a una contaminación por ACB incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, bebidas de jugos contaminadas con tierra, bebidas de jugos contaminadas con azúcar en bruto o refinado que contiene ACB o esporas de ACB, y bebidas de jugos que contienen esporas de ACB. Alternativamente, las composiciones pueden ser añadidas a las bebidas de jugos para reducir o prevenir la contaminación por ACB en jugos contaminados por ACB, por ejemplo, jugos que contienen microbios viables de ACB. Dado que la contaminación por ACB reduce la vida útil de las bebidas de jugo, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para aumentar la vida útil de las bebidas de jugo, o como conservantes de las bebidas de jugo. Adicionalmente, dichos resultados pueden conseguirse sin alterar de forma indeseable el sabor ni el aspecto de la bebida de jugo debido a la actividad sinérgica entre los dos componentes. Según se usa en el presente documento, "sinergia" o "actividad sinérgica" y similares se refieren a un efecto combinado de dos componentes que es mayor que los efectos individuales de los mismos componente solos o cuando se añaden conjuntamente. Por ejemplo, según se usa en el presente documento, sinergia se refiere a la cantidad de reducción en la contaminación por ACB de una bebida de jugo, a la reducción en el crecimiento de ACB o a un aumento en la muerte de ACB, en presencia de ácido fumárico y de compuestos fenólicos, que no se observa en presencia del ácido fumárico o de los compuestos fenólicos solos.

En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento previenen o reducen el crecimiento de ACB, destruyen las células de ACB quiescentes o en división y/o eliminan las esporas de ACB.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden unas proporciones entre los compuestos fenólicos y el ácido fumárico pueden incluir unas proporciones entre los compuestos fenólicos (por ejemplo, las PAC) y el ácido fumárico que son útiles en las bebidas de jugo con una mayor acidez. Algunos ejemplos de bebidas de jugos con una mayor acidez pueden incluir, pero no se limitan a, jugo de manzana (por ejemplo, aproximadamente un pH de 2,9-3,3 o aproximadamente un pH de 2,9-4,1, por ejemplo, un pH de 3,7), jugo de limón (por ejemplo, aproximadamente un pH de 2,3), jugo de arándano (por ejemplo, aproximadamente un pH de 2,3-2,5), mezclas de frutas tropicales, jugo de pomelo (por ejemplo, aproximadamente un pH de 2,9-3,5), jugo de piña (por ejemplo, aproximadamente un pH de 3,4), jugo de uva (por ejemplo, aproximadamente un pH de 2,8-3,3), y mezclas de jugos que contienen dos o más de estos jugos solos o junto con unas bebidas de jugo con un bajo pH. En algunas realizaciones, las bebidas de jugos con una mayor acidez tienen un pH de entre aproximadamente un pH de 2 - un pH de 3,49.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden proporciones entre los compuestos fenólicos y el ácido fumárico pueden incluir unas proporciones entre los compuestos fenólicos (por ejemplo, las PAC) y el ácido fumárico que son útiles en bebidas de jugos con un menor pH (por ejemplo, una menor acidez). Algunos ejemplos de bebidas de jugos con un menor pH pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, jugo de naranja (por ejemplo, aproximadamente un pH de 3,5-4,2, un pH de 3,9 o un pH de 4,6) y/o jugo de verduras (por ejemplo, aproximadamente un pH de 3,9-4,3), En algunas realizaciones, los jugos con un menor pH tienen un pH de más (es decir, más alcalino) de aproximadamente un pH de 3,5.

Algunas proporciones útiles entre el ácido fumárico y los compuestos fenólicos (por ejemplo, las PAC) pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, unas proporciones entre el ácido fumárico y las PAC de entre aproximadamente 4.000:1 - 100:1, de 3.571:1 - 121:1, de aproximadamente 135:1 o de aproximadamente 238:1. En algunos casos, dichas proporciones pueden ser útiles en las bebidas de jugos con mayor acidez.

Otros proporciones útiles entre el ácido fumárico y los compuestos fenólicos (por ejemplo, las PAC) para su uso con bebidas de jugos con un mayor pH pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, unas proporciones entre el ácido fumárico y las PAC de entre aproximadamente 10:1 - 50:1, o de 14:1. En algunos casos, dichas proporciones pueden ser útiles en las bebidas de jugos con un menor pH.

En algunos casos, los compuestos fenólicos y el ácido fumárico pueden estar presentes en una bebida de jugo a unas concentraciones sinérgicas. Con respecto al ácido fumárico, dichas concentraciones pueden estar definidas mediante el uso de cualquier unidad reconocida en la técnica (por ejemplo, porcentaje en peso/volumen (por ejemplo, g/100 ml) o porcentaje en volumen/volumen). Las concentraciones de los compuestos fenólicos también pueden estar definidas mediante el uso de cualquier término reconocido en la técnica (por ejemplo, porcentaje en peso/volumen (por ejemplo, g/100 ml) o porcentaje en volumen/volumen) y puede ser expresadas bien en forma de compuestos fenólicos totales o bien como compuestos fenólicos específicos (por ejemplo, proantocianidinas (PAC)). En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos pueden ser extractos obtenidos mediante el uso de los procesos divulgados en el presente documento, y la cantidad de PAC en el extracto puede ser de aproximadamente un 55 %.

En algunas realizaciones, las concentraciones de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico añadidos a una bebida pueden incluir, por ejemplo, 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC (es decir, 0,1 mg de PAC / 8 oz) - 8,291 x 10^{-3} mg/ml de PAC (es decir, 1,99 mg de PAC / 8 oz), 2,1 x 10^{-3} mg/ml de PAC - 8,3 x 10^{-3} mg/ml de PAC, 2,1 x 10^{-3} mg/ml de PAC - 6,3 x 10^{-3} mg/ml de PAC, o aproximadamente 4,2 x 10^{-3} mg/ml de PAC (es decir, 1 mg de PAC / 8 oz), y entre aproximadamente un 0,01 % (por ejemplo, un 0,001 % - 0,05 %) y aproximadamente un 0,15 % (por ejemplo, aproximadamente un 0,10 % - 0,2 %) de ácido fumárico, o aproximadamente un 0,1 % de ácido fumárico en peso (por ejemplo, en p/p si el extracto y el ácido fumárico están secos, en v/p, o viceversa, si uno del extracto o el líquido está seco).

En otras realizaciones, las concentraciones de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico añadidos a una bebida pueden ser, por ejemplo, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC (es decir, 0,1 mg de PAC / 8 oz) - 100 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 80 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 60 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 40 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 20 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 10 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 5 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 1 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,5 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,1 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,05 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,04 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,03 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,02 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,01 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,005 mg/ml de PAC, de 4,2 x 10^{-4} mg/ml de PAC - 0,001 mg/ml de PAC o de 0,05 mg/ml de PAC (es decir, 12 mg de PAC / 8 oz), y entre aproximadamente un 0,01 % (por ejemplo, un 0,001 % - 0,05 %) y aproximadamente un 0,15 % (por ejemplo, aproximadamente un 0,10 % - 0,2 %) de ácido fumárico, o aproximadamente un 0,1 % de ácido fumárico en peso (por ejemplo, en p/p si el extracto y el ácido fumárico están secos, en v/p, o viceversa, si uno del extracto o el líquido está seco).

En algunas realizaciones, las concentraciones de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, no más de aproximadamente 0,04 mg/ml de PAC, o no más de aproximadamente 1 mg/ml de PAC, o entre aproximadamente 0,04 mg/ml y aproximadamente 0,17 mg/ml (por ejemplo, 0,15 mg/ml - 0,19 mg/ml) de PAC, y entre aproximadamente un 0,01 % (por ejemplo, un 0,001 % - 0,05 %) y aproximadamente un 0,15 % (por ejemplo, aproximadamente un 0,10 % - 0,2 %) de ácido fumárico en peso.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden los compuestos fenólicos y el ácido fumárico (por ejemplo, los compuestos fenólicos y el ácido fumárico secos) pueden ser preparadas en unas cantidades que son suficientes para producir unas concentraciones sinérgicas de los compuestos fenólicos y el ácido fumárico cuando son añadidos a un volumen de bebida de jugo. Dichas composiciones pueden ser preparadas según cualquiera de las proporciones descritas anteriormente, solas o en unas cantidades suficientes para proporcionar una concentración sinérgica de los compuestos fenólicos y el ácido fumárico cuando la composición es añadida a un volumen definido de una bebida de jugo. Dichas composiciones están incluidas en la presente invención. Algunos ejemplos de volúmenes de bebida de jugo en los que pueden prepararse y/o añadirse dichas composiciones incluyen, pero no se limitan a, 0,1, 0,5, 1, 10, 20, 50, 100, 200, 250, 300, 330 y 500 ml, 1,2, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1.000, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000 l, y por encima de 1.000,000 l (o los volúmenes equivalentes en onzas y galones), o un intervalo entre dos cualesquiera de los números enteros indicados anteriormente.

Métodos para la elaboración de composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico

Las composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico pueden incluir compuestos fenólicos concentrados, purificados o aislados que incluyen al menos PAC, en las que los compuestos fenólicos se concentran y/o se aíslan a partir de cualquier materia prima que contenga compuestos fenólicos, por ejemplo, cualquier materia prima que contenga compuestos fenólicos divulgada en el presente documento. Los métodos para la concentración y/o el aislamiento de los compuestos fenólicos son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una filtración, y aquellos métodos divulgados, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 5.840.322, 6.440.471, 6.210.681, 5.650.432, 5.646.178, 5.474.774, 5.525.341, 6.720.353 y 6.608.102.

En algunas realizaciones, los compuestos fenólicos son los extractos aquí divulgados o se obtienen mediante el uso de los procesos divulgados en el presente documento.

En algunas realizaciones, los extractos para su uso en o como conservantes de alimentos contienen aproximadamente un 90 % de PAC (por ejemplo, PAC de tipo A).

El ácido fumárico, según se incluye en las composiciones divulgadas en el presente documento, puede incluir cualquier ácido fumárico disponible comercialmente y las sales y los ésteres del mismo (por ejemplo, fumaratos). El ácido fumárico también se conoce en la materia como ácido trans-butenodioico, tiene la fórmula química $HO_2CCH=CHCO_2H$, y tiene una masa molecular de 116,07 g/mol. Las composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico pueden ser preparadas mediante el uso de cualquier combinación de compuestos fenólicos y ácido fumárico líquidos o secos. De forma análoga, las composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico pueden ser por sí mismas líquidas o secas (por ejemplo, secadas por pulverización). En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico están secas (por ejemplo, secadas por pulverización). En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden compuestos fenólicos y ácido fumárico pueden incluir los compuestos fenólicos aislados y el ácido fumárico aislado. Dichas composiciones también pueden consistir en, o consistir esencialmente en, los compuestos fenólicos aislados y el ácido fumárico aislado. Las composiciones pueden estar contenidas en cualquier contenedor, recipiente o vial adecuado para el almacenamiento o la distribución de la composición y/o la adición de la composición a una bebida de jugo. Por ejemplo, las composiciones pueden disponerse en el interior de un contenedor en unas cantidades suficientes para producir unas concentraciones sinérgicas de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico cuando la composición se añade a un volumen líquido de una bebida de jugo. Algunos ejemplos de contenedores adecuados incluyen, pero no se limitan a, contenedores de plástico, de vidrio, de metal y de papel, adecuados para un único uso o para múltiples usos. En algunas realizaciones, los contenedores pueden estar marcados o etiquetados para ilustrar, bien la cantidad de la composición contenida los mismos, o bien el volumen de bebida de jugo al que debería añadirse la composición, por ejemplo, para producir una concentración sinérgica de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico. Por ejemplo, un contenedor que contiene unas cantidades suficientes de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico para proporcionar unas concentraciones sinérgicas de los compuestos fenólicos y del ácido fumárico en 1 l de una bebida de jugo puede estar marcado o etiquetado como "1 l".

Ejemplos

La invención se caracteriza adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el ámbito de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: caracterización del extracto (extracción a pequeña escala)

El extracto obtenido mediante el uso de procesos a pequeña escala (a escala de laboratorio) se caracterizó para determinar los tipos de compuestos fenólicos presentes y las cantidades relativas de los diferentes compuestos fenólicos presentes (es decir, las cantidades relativas de un tipo de compuesto fenólico con respecto a otro tipo de compuesto fenólico). También se evaluó el material no fenólico.

En resumen, la materia prima (es decir, el jugo de arándano extraído a contracorriente (CCE)) se concentró mediante el uso de una ósmosis inversa para aumentar el contenido Brix desde 1 Brix (la concentración obtenida después de la CCE) pasta 18 Brix y una evaporación para aumentar adicionalmente el contenido Brix desde 18 Brix hasta 50 Brix. Después, la materia prima CCE de 50 Brix se diluyó en agua hasta 25 Brix. La materia prima diluida se puso en contacto con una resina Amberlite™ XAD-7HP. Se recogió el flujo dinámico en forma de un filtrado con los compuestos fenólicos reducidos. La resina se lavó mediante el uso de una solución de lavado de etanol SDA al 5 %. El flujo dinámico se recogió según caía la solución de lavado. Después, los compuestos fenólicos unidos se eluyeron mediante el uso de una solución de elución de etanol SDA al 95 %. Se recogió el flujo dinámico de la solución de elución y se concentró mediante el uso de una evaporación (calor y vacío) para producir un extracto líquido que contiene un 25 % de sólidos. Después el extracto se secó por pulverización mediante el uso de un secador por pulverización menor portátil NIRO. Los volúmenes usados en el anterior proceso a pequeña escala se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Volúmenes usados en un proceso a pequeña escala de ciclo único

	Pequeña escala (de laboratorio) (ml salvo que se indique)
Volumen de la columna	1 l
Volumen de resina en la columna	943
Volumen de materia prima (50 Brix)	2.452
Volumen de materia prima (25 Brix)	4.904
Volumen de materia prima no recogida en forma de flujo dinámico de materia prima	709

	Pequeña escala (de laboratorio) (ml salvo que se indique)
Volumen de flujo dinámico de materia prima con compuestos fenólicos reducidos	4.195
Volumen de la solución de lavado	2.000
Volumen de la solución de elución	2.452
Caudal (en todas las etapas)	15,6 ml/minuto
Volumen de reequilibrado	2.678

Se analizaron distintos extractos de múltiples series de ciclo único a pequeña escala para determinar la cantidad de compuestos fenólicos, de ácidos orgánicos y de azúcares. Los datos de cada serie se combinaron y se calcularon las medias. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: caracterización del extracto

	Promedio (%)	Mín. (%)	Máx. (%)	Desviación típica
% de sólidos	95,52	95,18	97,25	0,97
Quínico	0,07	0,03	0,12	0,05
Málico	0,17	0,11	0,25	0,07
Cítrico	0,26	0,11	0,38	0,11
Ácidos orgánicos totales	0,50	0,39	0,76	0,17
PAC [2]	55,00	55,00	55,00	0,00
PAC [1]	18,20	18,20	18,20	0,00
Compuestos fenólicos (Folina)	44,40	35,49	55,44	8,50
Antocianinas [1]	6,86	4,94	9,78	2,24
Dextrosa	0,17	0,00	0,67	0,33
Fructosa	0,00	0,00	0,00	0,00
Sacarosa	0,00	0,00	0,00	0,00
Azúcares totales	0,17	0,00	0,67	0,33
Quercetina	0,54	0,17	1,22	0,59
Quercitrina	3,03	0,95	4,23	1,81
Hiperósido	2,24	0,93	4,71	2,14
Miricetina	0,24	0,09	0,52	0,24
Kulina	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaempferol	0,00	0,00	0,00	0,00
Isohamnetina	0,00	0,00	0,00	0,00
Isoquercitrina	0,00	0,00	0,00	0,00
Flavonoles totales	6,05	5,17	7,06	0,95
Portador de estandarización	20,58	9,50	32,10	12,57
Agente de flujo	0,80	0,80	0,80	0,00
Recuperación total	121,44	101,18	144,77	

[1] Evaluados mediante una HPLC

[2] Evaluados mediante el DMAC

[1] y [2] son valores normalizados

Según se muestra en la Tabla 3, el contenido primario del extracto es de compuestos fenólicos (véase "compuestos fenólicos (folina)" en la Tabla 3), con las PAC y las antocianidinas presentes en las cantidades más altas. También se detectaron cantidades de flavanoles, quercetina, quercitrina, hiperósido y miricetina.

Como contraste, el extracto está sustancialmente exento de azúcares (véase "azúcares totales" en la Tabla 3) y de ácidos orgánicos. Además, el contenido total en ácidos orgánicos era menor del 1 %, y el contenido total en azúcar era menor del 1 %. Estas observaciones indican que el proceso divulgado en el presente documento puede usarse para la obtención de un extracto a partir de una materia prima de jugo de arándano CCE que contiene unas

elevadas cantidades de PAC y de anotocianinas y que está sustancialmente exento de ácidos orgánicos y de azúcares. Adicionalmente, los bajos valores de la desviación típica mostrados confirman que la variación entre lotes es baja, o que las cantidades mostradas en la Tabla 3 pueden ser obtenidas de una forma uniforme.

Como se ha mencionado anteriormente, las PAC incluyen moléculas con diversas longitudes de cadena. Se llevaron a cabo experimentos para determinar las longitudes de las cadenas de las PAC presentes en el extracto. También se llevaron a cabo experimentos para determinar las longitudes de las cadenas de las PAC presentes en múltiples muestras de materia prima CCE usadas para la obtención del extracto, para permitir la comparación entre los perfiles de las PAC de la materia prima y del extracto. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: contenido en PAC oligoméricas del extracto (g de PAC oligoméricas / 100 g de PAC)

ID de la muestra	1mers (%)	2mers (%)	3mers (%)	4mers (%)	5mers (%)	6mers (%)	7mers (%)	8mers (%)	9mers (%)	10mers (%)	> 10mers (%)	total %
CCE 1	6,87	25,31	10,35	6,10	4,27	5,11	1,46	1,59	2,39	0,00	36,55	100,00
CCE 2	5,11	30,86	11,52	9,13	6,67	8,12	3,40	3,23	1,81	0,00	20,14	100,00
CCE 3	7,02	29,39	9,98	7,14	5,13	6,11	3,25	3,88	2,81	0,00	25,28	100,00
CCE 4	6,27	26,22	10,08	7,89	5,82	7,06	4,01	4,03	2,70	0,00	25,92	100,00
CCE 5	5,52	28,95	11,38	8,40	6,19	7,53	3,99	4,15	2,75	0,00	21,15	100,00
Media	6,2	28,15	10,66	7,73	5,62	6,79	3,22	3,4	2,49	0	25,8	
Extracto	6,35	28,23	10,71	8,08	5,56	7,06	4,00	4,21	1,93	0,00	23,87	100,00

Según se muestra en la Tabla 4, el perfil de las PAC en el extracto es sustancialmente similar a los perfiles de las PAC detectados en múltiples muestras de materia prima CCE. Esta observación sugiere que los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse para la obtención de las PAC en las cantidades presentes en una materia prima CCE. Más específicamente, 2mer y > 10mer de PAC son las más prevalentes tanto en el extracto como en la materia prima CCE. Las cantidades de otras PAC oligómeras también se han conservado en el extracto en comparación con la materia prima CCE. Según han revelado estos experimentos, las proporciones de PAC oligómeras tanto en el extracto como en la materia prima CCE son de aproximadamente 6(1mer):28(2mer):11(3mer):8(4mer):6(5mer):7(6mer):3(7mer):4(8mer):2(9mer):26(> 10mer). Por lo tanto, los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse para la obtención de un abstracto que contiene antocianinas y PAC, en el que las PAC oligómeras están presentes en las cantidades presentes en la materia prima.

A continuación se llevaron a cabo experimentos para evaluar la cantidad de PAC con respecto a otros compuestos fenólicos, incluyendo antocianinas y compuestos fenólicos totales, en el extracto y en la materia prima. Estos experimentos se llevaron a cabo para permitir la determinación de si las proporciones entre las PAC y los otros compuestos fenólicos presentes en la materia prima están conservadas en el extracto. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5: proporciones entre las PAC y los compuestos fenólicos en la materia prima CCE y en el extracto

ID de la muestra	1		2		3		4	
Tipo de muestra	CCE	Extracto	CCE	Extracto	CCE	Extracto	CCE	Extracto
PAC totales (%) - peso seco	2,6	97,9	1,6	77,6	1,8	81,1	1,9	85,2
Compuestos fenólicos totales (%) - peso seco	2,2	62,5	1,6	52,6	1,8	56,1	1,7	58,5
PAC:compuestos fenólicos totales	1,3	1,6	1,2	1,5	1,1	1,4	1,3	1,4
PAC:anotocianina total (TAcy)	5,7	14,0	4,9	11,2	5,3	13,2	6,7	16,3
Azúcares totales - peso seco	64,1	0,0	70,3	0,0	69,2	0,0	66,5	0,0
Ácidos orgánicos totales - peso seco	40,5	0,3	48,3	0,3	44,5	0,3	42,9	0,3
PAC (ppm) / Quercetina (ppm):	279,7	207,2	231,4	191,6	215,7	194,1	43,5	51,1
PAC (ppm) / QuercGalac (ppm):	39,1	22,3	21,9	13,0	18,8	15,3	28,3	24,4
PAC (ppm) / Quercitrina (ppm):	152,8	99,2	92,3	75,3	99,6	93,5	96,9	97,5
PAC (ppm) / Miricetina (ppm):	187,6	170,3	221,2	183,1	144,7	148,7	36,3	38,8
PAC (ppm) / QuercArabano (ppm):	108,3	76,8	85,7	74,8	64,1	64,1	74,7	75,1
Sólidos totales (%)	55,4	95,7	58,4	96,0	54,7	97,1	56,3	97,9

Tabla 6: proporciones medias entre las PAC y los compuestos fenólicos en la materia prima CCE y en el extracto

	Proporciones medias	
	CCE	Extracto
PAC:compuestos fenólicos	1,2	1,5
PAC:antocianinas totales (TAcy)	5,65	13,7
PAC:Quercetina	192,6	161
PAC:Galactósido de quercetina (QuercGalac)	27,0	18,8
PAC:Quercitrina	110,4	91,4
PAC:Miricetina	147,5	135,2
PAC:Arabanósido de quercetina (QuercAraban)	83,2	72,7

Según se muestra en la Tabla 5, las cantidades de las PAC totales y de los compuestos fenólicos totales están aumentadas en el extracto en comparación con la materia prima CCE. Esta observación confirma que los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse para la concentración de los compuestos fenólicos. La Tabla 5 también presenta datos que confirman que las cantidades de azúcares y de ácidos orgánicos son reducidas en el extracto en comparación con la materia prima CCE. Esta observación valida los datos mostrados en la Tabla 3, que el extracto contiene unas cantidades reducidas de azúcares y de ácidos orgánicos, y confirma que los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse para la separación de los compuestos fenólicos de los azúcares y los ácidos, y para la obtención de un extracto de compuestos fenólicos.

Según se muestra en las Tablas 5 y 6, la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales presentes en materia prima está conservada en el extracto. De forma análoga, la proporción entre las PAC y la quercetina, el

quercgalac, la quercitrina, la miricetina y el quercaraban presentes en la materia prima también están conservadas en el extracto. Como contraste, aunque en el extracto hay presentes antocianinas, la proporción entre las PAC y las antocianinas presentes en la materia prima no está conservada en el extracto (véase PACs:TAcy).

Por lo tanto, los datos presentados en el presente documento demuestran que los procesos divulgados en el presente documento pueden usarse para la obtención de un extracto que contiene antocianinas y PAC, en el que las PAC oligómeras están presentes en las cantidades presentes en la materia prima, y en el que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales y las PAC, y de las PAC y la quercetina, el quercgalac, la quercitrina, la miricetina y el quercaraban en el extracto son las mismas que las proporciones de los mismos compuestos fenólicos en la materia prima.

Ejemplo 2: optimización del proceso

Algunas de las etapas o de los materiales usados en el proceso descrito en el Ejemplo 1 se sustituyeron en un intento de optimizar adicionalmente el proceso. En resumen, se repitió el proceso descrito en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones: (1) la etapa de lavado se llevó a cabo mediante el uso de agua en lugar de mediante el uso de etanol al 5 %; (2) la etapa de lavado y la etapa de dilución se llevaron a cabo mediante el uso de acetona; (3) la resina Amberlite™ XAD-7HP fue sustituida por la resina FPX-66 y la etapa de lavado se llevó a cabo mediante el uso de agua en lugar de mediante el uso de etanol al 5 %; (5) la resina Amberlite™ XAD-7HP fue sustituida por la resina FPX-66; y (6) la resina Amberlite™ XAD-7HP fue sustituida por la resina FPX-66 y la etapa de lavado y la etapa de dilución se llevaron a cabo mediante el uso de acetona. A continuación se evaluó el rendimiento de los compuestos fenólicos extraídos, la pureza del extracto y la estabilidad del extracto. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: optimización del proceso

Modificación # (véase el texto del Ej. 3)	1	2	3	4	5	6
Resina	XAD-7HP	XAD-7HP	XAD-7HP	FPX-66	FPX-66	FPX-66
Lavado	Agua	5 % de EtOH	5 % de acetona	Agua	5 % de EtOH	5 % de acetona
Elución	90 % de EtOH	90 % de EtOH	90 % de acetona	90 % de EtOH	90 % de EtOH	90 % de acetona
Datos de rendimiento						
Rendimiento de las PAC (% de de prima-Av)	92,59	97,57	101,44	86,32	88,43	96,76
Rendimiento de los compuestos fenólicos (folina-Av)	77,98	77,78	79,35	67,45	80,37	84,55
Datos de pureza						
PAC (% de dwb-Av)	51,49	64,40	71,02	41,66	42,96	44,76
Compuestos fenólicos (Folina-Av)	48,68	51,34	51,88	36,55	38,83	41,32
Compuestos fenólicos (Folina-Bruns)	47,55	61,86	67,70	32,74	38,43	39,72
Compuestos fenólicos (HPLC-OS)	93,97	155,63	108,32	81,56	88,12	87,45
Acis (ppm-OS)	65.056	83.085	46.977	58.855	66.269	50.301
Quercetina (ppm-OS)	4120	No realizado	No realizado	3.180	3.300	3.140
ORAC (Bruns)	8.131	9.701	10.379	6.756	7.410	6.633
Estabilidad de la bebida						
Turbidez de la bebida, pendiente frente al tiempo	2,87	1,52	1,93	2,44	2,14	2,68
Color de la bebida, pendiente frente al tiempo	-3,27	-4,66	-3,35	-3,50	-1,92	-2,65

Según se muestra en la Tabla 6, tanto la resina XAD-7HP como la FPX-66 produjeron unas elevadas cantidades de PAC y de compuestos fenólicos totales. Sin embargo, globalmente la XAD-7HP proporcionó unos resultados mayores que la FPX-66, incluyendo la estabilidad de la turbidez. Como contraste, la FPX-66 proporcionó unos resultados ligeramente mejores en la estabilidad del color. Adicionalmente, todas las condiciones de lavado y de elución ensayadas proporcionaron buenos resultados. Se observó que la acetona era la mejor solución de lavado y de elución para la recuperación y la pureza de las PAC y de los compuestos fenólicos.

Estos resultados sugieren que, mientras que el proceso descrito en el Ejemplo 1 es eficaz para la obtención de un extracto que contiene antocianinas y PAC, en el que las PAC oligómeras están presentes en las cantidades presentes en la materia prima, y en el que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales y entre las PAC y las PAC y la quercetina, el quercgalac, la quercitrina, la miricetina y el quercaraban del extracto son las

mismas que las proporciones de los mismos compuestos fenólicos en la materia prima; el proceso puede ser modificado mediante el uso de los cambios aquí mostrados sin comprometer la eficacia.

Ejemplo 3: comparación entre las extracciones a pequeña escala y a gran escala

Se llevaron a cabo experimentos para confirmar que el proceso descrito en el Ejemplo 1 puede llevarse a cabo a gran escala (es decir, a una escala comercial) y que los extractos obtenidos mediante el uso de un proceso a gran escala representan los extractos descritos en el Ejemplo 1.

Los volúmenes de materiales usados en un único ciclo de un proceso a gran escala se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: volúmenes en un único ciclo de un proceso a pequeña escala

	Gran escala (comercial) (galones salvo que se indique)
Volumen de la columna	141
Volumen de resina en la columna	133
Volumen de materia prima (50 Brix)	346
Volumen de materia prima (25 Brix)	692
Volumen de materia prima no recogida en forma de flujo dinámico de materia prima	100
Volumen de flujo dinámico de materia prima con compuestos fenólicos reducidos	592
Volumen de la solución de lavado	282
Volumen de la solución de elución	346
Caudal (en todas las etapas)	2,2 galones/minuto
Volumen de reequilibrado	378

Los extractos obtenidos mediante el uso de un proceso a pequeña escala se compararon a continuación con el extracto obtenido mediante el uso de un proceso a gran escala.

En resumen, se llevó a cabo un proceso a pequeña escala mediante el uso de arándanos CCE según se describe en el Ejemplo 1 mediante el uso de los volúmenes mostrados en la Tabla 2, y se llevó a cabo un proceso a gran escala mediante el uso del proceso descrito en el Ejemplo 1 con los volúmenes mostrados en la Tabla 7.

En la FIG. 1A se proporciona una representación esquemática del proceso anterior. La FIG. 1 incluye los puntos en los que se tomaron ciertas muestras. Las características necesarias de cada una de las muestras mostradas en la FIG. 1 se detallan en la Tabla 9.

A continuación, los extractos resultantes de las extracciones a pequeña escala y a gran escala se analizaron y se compararon. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: comparación de los extractos obtenidos mediante el uso de una extracción a gran escala y a pequeña escala

ID de la muestra	A gran escala	A pequeña escala 1	A pequeña escala 2	A pequeña escala 3	A pequeña escala 4	A pequeña escala 5	A pequeña escala 6	A pequeña escala 7	A pequeña escala 8
Sólidos (%)	97,25	96,15	97,44	97,2	96,45	95,72	96,02	97,13	97,85
Ácidos orgánicos totales (%)	0,85	0,42	0,80	0,61	0,62	0,26	0,31	0,27	0,31
Azúcares totales (%)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PAC (DMAC)	61,61	91,26	67,98	82,89	80,44	97,86	77,60	81,13	85,17
Antocianinas (HPLC)	10,96	6,59	7,12	7,94	7,18	6,71	6,66	5,99	5,12
Compuestos fenólicos totales (Folina)	51,39	54,79	47,58	51,98	57,54	58,73	55,02	5,99	5,12

Según se muestra en la Tabla 8, los resultados notificados en el Ejemplo 2 y en la Tabla 4, obtenidos mediante el uso de procesos a pequeña escala eran reproducibles en múltiples procesos a pequeña escala y en una extracción a escala comercial.

Estos resultados sugieren que un extracto que contiene antocianinas y PAC, en el que las PAC oligómeras están presentes en las cantidades presentes en la materia prima, y en el que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales y las PAC, y las PAC y la quercetina, el quercgalac, la quercitrina, la miricetina y el quercaraban en el extracto, son sustancialmente las mismas que las proporciones que pueden obtenerse de los mismos compuestos fenólicos en la materia prima mediante el uso de procesos a gran escala.

Tabla 9: características de la muestra del proceso extracción

ID de la muestra	Descripción	Análisis	Especificación
A	CCE 1	Turbidez Recuento de placa total (TPC) Levaduras Mohos	 < 1.000/g < 100/g < 100/g
B	Agua de ósmosis inversa	TPC Levaduras Mohos	< 1.000/g < 100/g <100/g
C	CCE 2	% de sólidos ºBrix Gravedad específica	Lectura y registro (RR) (%) RR (%) RR (g/ml)
D	Materia prima líquida para el suministro a la columna de resina	% de sólidos PAC Compuestos fenólicos % de acidez valorable Turbidez Antocianinas TPC Levaduras Mohos	25 ± 1 % ≥ 1,5 % dwb RR (% dwb) RR (%) RR (NTU) RR (ppm) < 1.000/g < 100/g < 100/g
E	Solución de lavado	% Etoh	5 ± 1 % (v/v)
F	Filtrado exento de compuestos fenólicos	ºBrix	≥ 2
G	Solución de elución	% de agua	<20& % por Karl Fisher
H	Flujo dinámico de la materia prima	% de sólidos PAC TPC Levaduras Mohos	RR (%) RR (% dwb) < 1.000/g < 100/g < 100/g
I	Extracto evaporado 1	% de sólidos % Etoh	2.562 % RR (%)
J	Extracto evaporado 2	% de sólidos % Etoh	25 ± 2 % RR (%)
K	Extracto líquido	% de sólidos Etoh PAC Compuestos fenólicos Antocianinas Aspecto Aroma TPC Levaduras Mohos	25 ± 2 % < 90 ppm ≥ 56 % dwb R (% dwb) RR (% dwb) Líquido de color intenso rojo/púrpura Aroma de arándano < 1.000/g < 100/g < 100/g

Ejemplo 4: uso de los extractos para la conservación de alimentos

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si puede usarse la combinación del extracto obtenido mediante el uso de los procesos divulgados en el presente documento y ácido fumárico para reducir el deterioro.

En resumen, se inocularon varios jugos con aproximadamente 100 esporas de una mezcla de las cepas de ACB indicadas en la Tabla 10. Después las esporas se recogieron de las placas de PDA (agar de dextrosa de patata) y se inactivaron por calor.

Tabla 10: cepas de ACB usadas

ID	Fuente (origen)
230	Jugo de manzana Hassia
231	NFPA (National Food Processors Association)
233	Jugo de manzana Hassia
245	Craving - menos azúcar Tropical
247	Jugo de melocotón
250	Jugo de pomelo rosa al 100 %

El extracto adecuado para su uso en los métodos divulgados en este Ejemplo puede obtenerse mediante el uso de cualquier técnica conveniente y a partir de cualquier materia prima adecuada. En este caso, el extracto se obtuvo a partir de arándanos, que son una fuente particularmente rica de PAC, mediante el uso de los procesos divulgados en el presente documento. En resumen, se cargó jugo de arándano a 25 Brix una columna de resina Rohm & Haas XAD-7HP. La columna se lavó con una solución que contiene un 5 % de etanol / un 95 % de agua para eluir los azúcares, los ácidos y otros componentes no deseados. El extracto se eluyó mediante el lavado de la columna mediante el uso de una solución que contiene un 90 % de etanol y un 10 % de agua. El eluído se concentró mediante evaporación hasta un 25 % de sólidos, después se secó por pulverización hasta un polvo. La cantidad de PAC en el polvo variaba entre un 55 y un 85 % en peso.

La concentración de PAC se evaluó para los experimentos de este Ejemplo como sigue. En resumen, se aplicó la muestra que se iba analizar a una columna Sephadex LH-20. La columna se lavó después con agua destilada y después con un 25 % de etanol / 75 % de agua. Estos lavados eluyeron los azúcares, los ácidos orgánicos, las antocianinas y los compuestos fenólicos monoméricos. Las PAC se eluyeron después mediante el lavado de la columna con un 70 % de acetona en un 30 % de agua. El eluído se deja reaccionar con una solución de dimetilaminocinamaldehído (DMAC) al 0,1 % en ácido clorhídrico al 30 % en metanol al 70 %. El DMAC puede actuar como un electrófilo condensándose con anillos aromáticos en un medio ácido, y es muy específico por los flavanoles. Cuando se añade un reactivo preparado de DMAC a una solución que contiene PAC se produce una condensación de aldehído con el monómero terminal de una proantocianidina polimérica en la posición del carbono ocho del anillo A del flavanoide. Los aductos coloreados resultantes tienen una absorción máxima a 640 nm. Se desarrolló una curva patrón de absorbancia a 640 nm mediante el uso de soluciones con un contenido conocido en PAC de arándano purificadas.

Las muestras de jugos se complementaron con jugo de arándano, con extracto, con ácido fumárico, o ambos, en presencia y en ausencia de aproximadamente 100 esporas de ACB/ml, según se muestra en la Tabla 11. Después, las muestras de jugos se almacenaron a 43 ºC. Periódicamente se tomaron alícuotas de los cubos y se ensayaron para comprobar la ACB mediante un subcultivo en placas de PDA. También se llevó a cabo una prueba sensorial por parte de un grupo de 2-4 personas cualificadas para detectar la presencia de guayacol. Las pruebas se realizaron en diversos intervalos durante un periodo de 1 mes. Se incluyeron controles negativos (jugo no inoculado) en las pruebas y se ensayaron al mismo tiempo que el producto inoculado.

Tabla 11: resultados de conservación de alimentos

Jugo de muestra	Extracto, mg de PAC / 8 oz	% de ácido fumárico (p/p)	% de jugo de arándano	pH	Brix	TA (%)	Micro (crecimiento)	Sensorial
CranPomBlue	0	0	7,33	3,56	12,52	0,45	+	+
CranPomBlue	40	0	7,33	3,5	10,54	0,48	-	-
Tropical Citrus	0	0,14	0	3,43	13,35	0,46	+	+
Tropical Citrus	40	0,14	0	3,4	13,4	0,46	-	-
Tropical Citrus	30	0,14	0	3,41	13,13	0,46	-	-
Tropical Citrus	20	0,14	0	3,41	13,18	0,46	-	-
Tropical Citrus	10	0,14	0	3,42	13,21	0,46	-	-
Bebida de agua de extracto	40	0	0	2,67	2,74	0,17	-	-
Tropical con Ruby Red	5	0,14					+	
Tropical con Ruby Red	7,5	0,14					-	
Tropical con Ruby Red	9,5	0,14					-	
Tropical con Ruby Red	10	0,14					-	

Jugo de muestra	Extracto, mg de PAC / 8 oz	% de ácido fumárico (p/p)	% de jugo de arándano	pH	Brix	TA (%)	Micro (crecimiento)	Sensorial
Tropical con Ruby Red	10,5	0,14					-	
Resultados microbiológicos [+] = crecimiento microbiano; [-] no se detectó crecimiento Resultados sensoriales [+] = sabor anormal, típico de la presencia de guayacol; [-] sin sabores anormales								

Según se muestra en la Tabla 11, la combinación del extracto y de ácido fumárico en los jugos previno el crecimiento de ACB y la producción de guayacol. Se observaron unos resultados similares con jugo de manzana y con jugo de naranja.

Estas observaciones apoyan que la combinación del extracto y de ácido fumárico da como resultado un efecto sinérgico a ciertas concentraciones. Específicamente, la reducción en la contaminación promovida por la combinación del extracto y de ácido fumárico es mayor que el efecto aditivo de los componentes. Esta sinergia fue evaluada adicionalmente en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 5: concentración inhibidora mínima de las composiciones que comprenden el extracto y ácido fumárico

Se evaluó la capacidad de las composiciones descritas en el Ejemplo 4 (es decir, las composiciones que comprenden el extracto y ácido fumárico) para inhibir el crecimiento de ACB a lo largo de un intervalo de diferentes concentraciones, para establecer la concentración inhibidora mínima (MIC) de la composición.

El extracto se obtuvo mediante el uso de los procesos descritos en el presente documento y contenía un 55 % de PAC según se determinó mediante el uso del DMAC. El ácido fumárico se obtuvo a partir de un proveedor comercial (Tate and Lyle, IL, número de lote FT7C2301B4).

Se inoculó jugo de manzana con esporas de una mezcla de cepas de ACB (ocho cepas de *A. acidoterrestris* y una cepa de ACB obtenida a partir de jugo de manzana). Estas esporas se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sometieron a un choque térmico a 76 ºC durante 10 minutos. La concentración de esporas se determinó mediante el uso de un hemocitómetro con una microscopía de contraste de fases. Los jugos se inocularon con 1.000 esporas/ml. Las muestras inoculadas se incubaron durante 48 horas y después se cultivaron en agar de dextrosa de patata acidificado (PDA + TA) a 43 ºC durante 72 horas. Después se contaron las unidades formadoras de colonias. Las proporciones entre el extracto y el ácido fumárico usadas en estos experimentos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: proporción entre el extracto y el ácido fumárico

I	Extracto (mg de PAC / 8 oz)				
Ácido fumárico (%)	0	1,0	2,0	3,0	4,0
0	0/0	1/0	2/0	3/0	4/0
0,05	0/0,05	1/0,05	2/0,05	3/0,05	4/0,05
0,10	0/0,10	1/01,0	2/0,10	3/0,10	4/0,10
0,15	0/0,15	1/01,5	2/0,15	3/0,15	4/0,15
0,20	0/0,20	1/0,20	2/0,20	3/0,20	4/0,20

Los datos se representaron en el formato de un isobolograma. Dichos gráficos son útiles en la evaluación de la sinergia. Específicamente, dos compuestos que dan como resultado un efecto aditivo producen una línea recta. Una desviación a la izquierda de esta línea indica que la combinación de los dos compuestos es sinérgica, mientras que una desviación a la derecha de la línea indica que la combinación de los dos compuestos es antagonista (Vigil et. al., Methods for activity assay and evaluation of results, Antimicrobials in Food, 3ª Edición, CRC Press, editado por Davidson, Sofos y Branen, 2005).

Según se muestra en la FIG. 2, las composiciones que comprenden el extracto y el ácido fumárico inhibieron el crecimiento de ACB a un intervalo de concentraciones. Específicamente, el crecimiento de ACB fue inhibido a unas concentraciones de un 0,1 % de ácido fumárico y un 0,01 mg de PAC / 8 oz. Adicionalmente, la FIG. 2 muestra un claro efecto sinérgico a unas concentraciones de entre un 0,15 % - 0,1 % de ácido fumárico y 0,01-1,99 mg de PAC / 8 oz. Como se ha mencionado anteriormente, los resultados mostrados en la FIG. 2 representan los experimentos llevados a cabo mediante el uso de jugo de manzana.

Ejemplo 6: experimentos de reducción logarítmica

La inhibición del crecimiento de ACB por parte de las composiciones que comprenden el extracto y el ácido fumárico fue confirmado en jugo de manzana al 100 % (Ocean Spray - véase la FIG. 3) y en jugo de naranja al 100 % (Ocean Spray - véase la FIG. 4). Las composiciones ensayadas con cada tipo de jugo se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: proporción entre el extracto y el ácido fumárico

	Extracto (mg de PAC / 8 oz)			
Ácido fumárico (%)	Jugo de manzana		Jugo de naranja	
	0,0	2,5	0,0	12,0
0,0	0,0/0,0	2,5/0,0	0,0/0,0	12,0/0,0
0,07	-	-	0,0/0,07	12/0,07
0,14	0,0/0,14	2,5/0,14	-	-

El jugo de manzana se inoculó con nueve cepas de ACB (ocho cepas de *A. acidoterrestris* y una cepa de ACB obtenida a partir de jugo de manzana), y el jugo de naranja se inoculó con cuatro cepas de *A. acidoterrestris.* Las esporas se sometieron a un choque térmico y se enumeraron según se describe en el Ejemplo 5. Después, las muestras de jugo se inocularon con 500 esporas y se incubaron a 43 ºC durante 48 horas (manzana) o 72 horas (naranja) antes de colocarlas en placas de PDA + TA. Las placas se incubaron a 43 ºC y UFC durante 72 horas. Las UFC se cuantificaron según se ha descrito en el Ejemplo 5. Los recuentos de las UFC se transformaron logarítmicamente y se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple LSD de Fisher. Se calcularon las reducciones logarítmicas para el ácido fumárico y para el extracto, solos y en combinación. Los resultados se muestran en las FIG. 3 y 4.

Según se muestra en las FIG. 3 y 4, se cuantificó la magnitud de la inhibición de ACB por parte del extracto y del ácido fumárico en jugo de manzana y en jugo de naranja. Tanto el extracto como el ácido fumárico inhibieron significativamente el crecimiento de ACB en el jugo de manzana (FIG. 3A). La combinación del extracto y el ácido fumárico, sin embargo, dio como resultado una reducción sinérgica en el crecimiento de ACB (ANOVA: $p < 0,001$). Se produjo una reducción logarítmica de seis en el crecimiento de ACB en el jugo de manzana con la aplicación combinada del extracto y el ácido fumárico (FIG. 3B). Estos datos apoyan que la combinación del extracto y el ácido fumárico redujo sinérgicamente el crecimiento de ACB en el jugo de manzana, dando como resultado una reducción > 6 log en el número de UFC.

Según se muestra en la FIG. 4, en el jugo de naranja, la ACB fue inhibida por el ácido fumárico solo. Adicionalmente, la combinación del extracto y el ácido fumárico inhibió sinérgicamente la ACB en el jugo de naranja (ANOVA: $p < 0,001$). No hubo ningún efecto con el extracto solo (FIG. 4A). La combinación del extracto y el ácido fumárico dio como resultado una reducción > 2 log en el crecimiento de ACB (FIG. 4B). Estos datos apoyan que la combinación del extracto y el ácido fumárico redujo sinérgicamente el crecimiento de ACB en el jugo de naranja, dando como resultado una reducción > 2 log en el número de UFC.

Consecuentemente, los datos presentados en el presente documento apoyan que la combinación del extracto y el ácido fumárico puede usarse de forma eficaz para reducir el deterioro de los jugos de frutas por parte de la ACB.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

ácido fumárico aislado;
compuestos fenólicos aislados,
en la que los compuestos fenólicos aislados comprenden proantocianidinas (PAC); y
en la que la proporción entre el ácido fumárico y las PAC es de entre 4.000:1 y 100:1, o en la que la proporción entre el ácido fumárico y las PAC es de entre 50:1 y 10:1.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción entre el ácido fumárico y las PAC es de entre 3.571:1 y 121:1.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción es de 135:1 o de 238:1.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende jugo de manzana.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción es de 14:1.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende jugo de naranja.

7. La composición de la reivindicación 1,
en la que los compuestos fenólicos aislados se obtienen mediante:

(i) la obtención de una materia prima líquida que comprende jugo de arándano;
(ii) la puesta en contacto de la materia prima con una resina que se une a los compuestos fenólicos, y que no se une sustancialmente a los azúcares ni a los ácidos orgánicos, durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que los compuestos fenólicos de la materia prima se unan a la resina, en la que la resina es una resina de un éster alifático;
(iii) la puesta en contacto de la resina con una solución de lavado, en la que la solución de lavado no reduce sustancialmente la cantidad de compuestos fenólicos unidos a la resina;
(iv) la puesta en contacto de la resina con una solución de elución que comprende un disolvente, en la que la solución de elución disminuye sustancialmente la cantidad de compuestos fenólicos unidos a la resina; y
(v) la recogida de la solución de elución.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que los compuestos fenólicos aislados comprenden al menos antocianinas y PAC y uno de los siguientes:

una proporción entre las antocianinas y las PAC de 1:5;
un perfil oligomérico de las PAC que es el mismo que el perfil en el jugo de arándano o en los arándanos;
una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos;
una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos;
compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de un 5 % de azúcares.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición en polvo.

10. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición líquida.

11. Una bebida que comprende:

ácido fumárico y
compuestos fenólicos, en la que los compuestos fenólicos comprenden proantocianidinas (PAC),
en la que la concentración de PAC es de entre 4,2 x 10^{-4} mg/ml y 8,29 x 10^{-3} mg/ml, y la concentración de ácido fumárico es de entre un 0,01 % (peso/peso (p/p)) y un 0,2 % (p/p), o
en la que la concentración de PAC es de entre 4,2 x 10^{-4} mg/ml y 0,1 mg/ml, y la concentración de ácido fumárico es de entre un 0,01 % (p/p) y un 0,2 % (p/p).

12. La bebida de la reivindicación 11, en la que la concentración de PAC es de 4,2 x 10^{-3} mg/ml y la concentración de ácido fumárico es de un 0,1 % (p/p).

13. La bebida de la reivindicación 11, en la que la bebida es jugo de manzana o una bebida que comprende jugo de manzana.

14. La bebida de la reivindicación 11, en la que la concentración de PAC es de 5 x 10^{-2} mg/ml y la concentración de ácido fumárico es de un 0,07 % (p/p).

15. La bebida de la reivindicación 11, en la que los compuestos fenólicos comprenden al menos antocianinas y PAC y al menos uno de los siguientes:

una proporción entre las antocianinas y las PAC de 1:5;
un perfil oligomérico de las PAC que es el mismo que el perfil en el jugo de arándano o en los arándanos;
una proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales que es la misma que la proporción entre las PAC y los compuestos fenólicos totales en el jugo de arándano o en los arándanos;
una proporción entre las PAC y las antocianinas que no es la misma que la proporción entre las PAC y las antocianinas en el jugo de arándano o en los arándanos;
compuestos fenólicos con un peso molecular medio de menos de 14.000 Daltons; menos de un 5 % de ácidos orgánicos; y/o menos de un 5 % de azúcares.

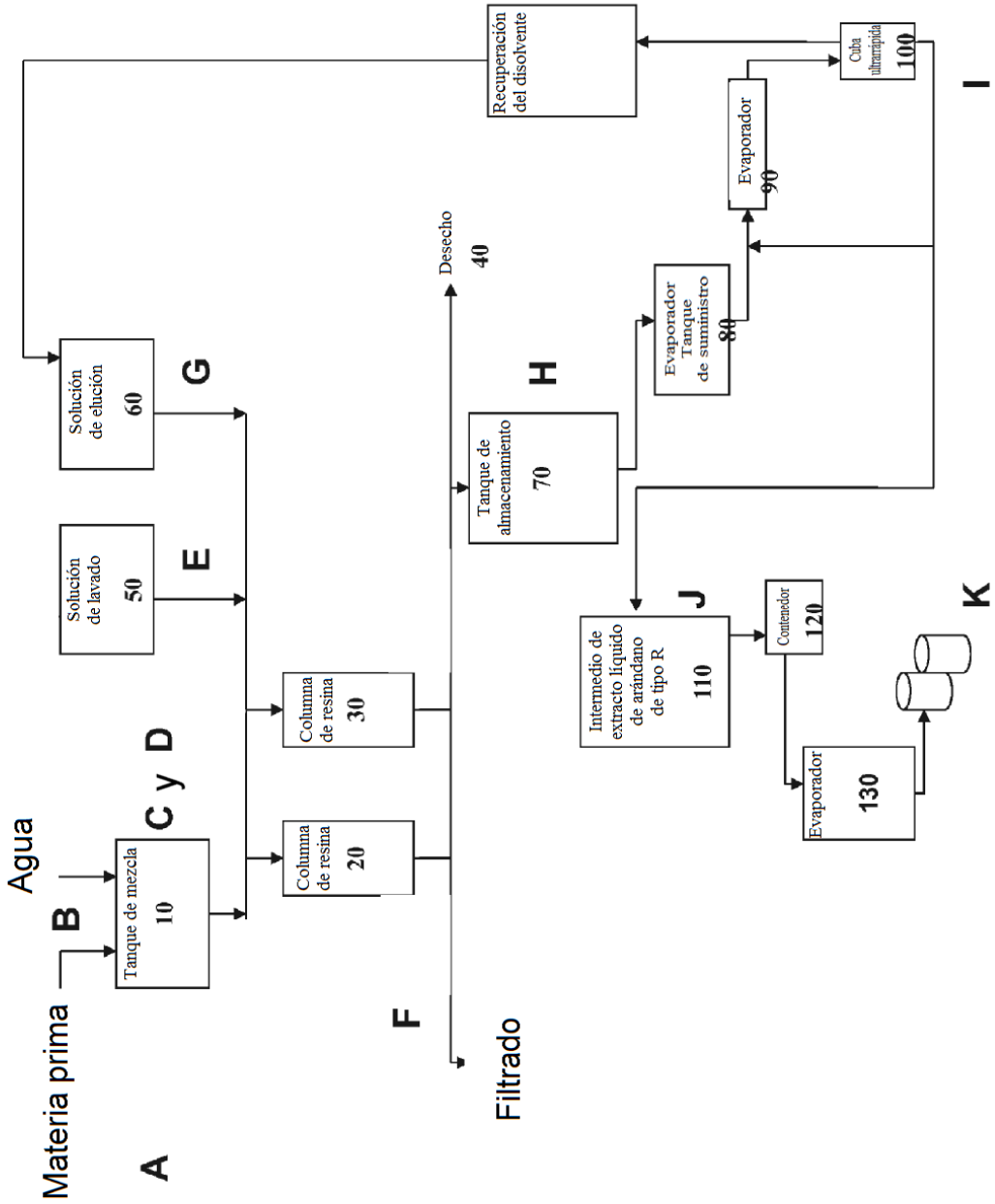

Materia prima
A
B
Agua
Tanque de mezcla
10
C y D
Solución de lavado
50
E
Solución de elución
60
G
Columna de resina
20
Columna de resina
30
F
Filtrado
Desecho
40
Tanque de almacenamiento
70
H
Recuperación del disolvente
Evaporador Tanque de suministro
80
Evaporador
90
Cuba ultrarápida
100
I
Intermedio de extracto líquido de arándano de tipo R
110
J
Contenedor
120
Evaporador
130
K

FIG. 1

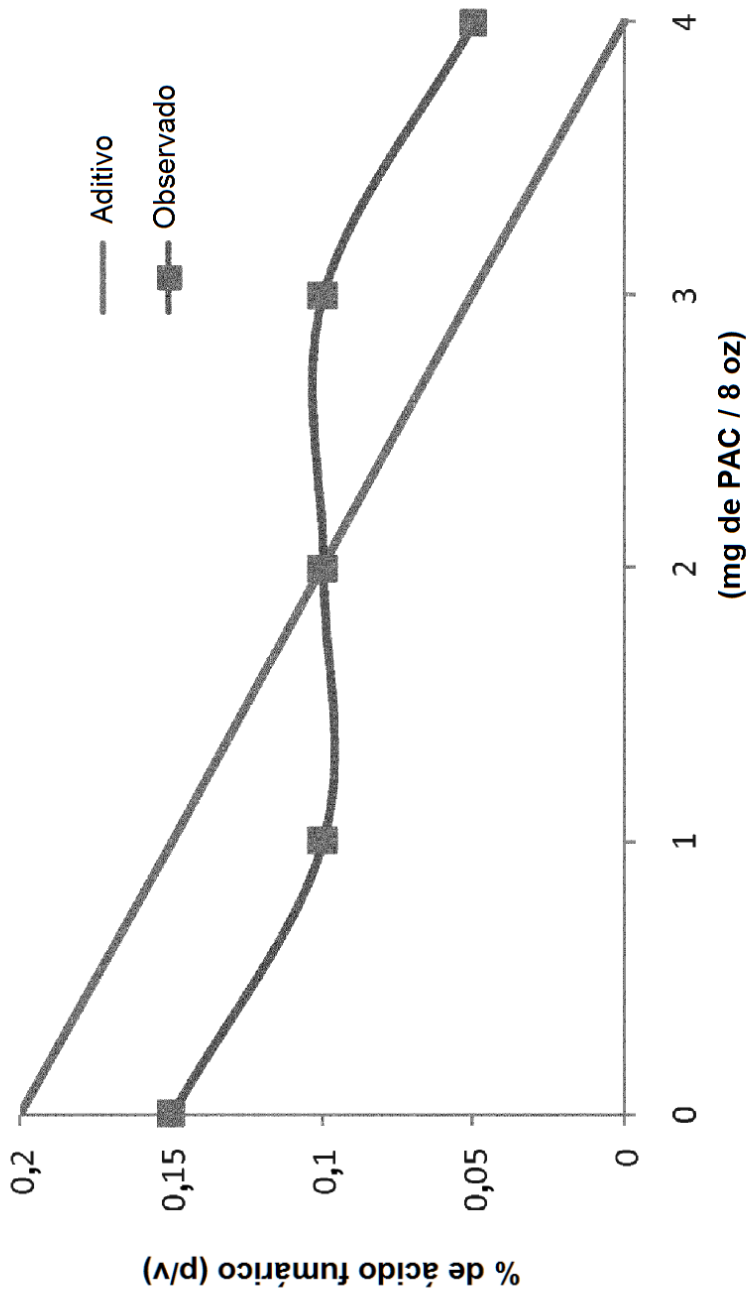
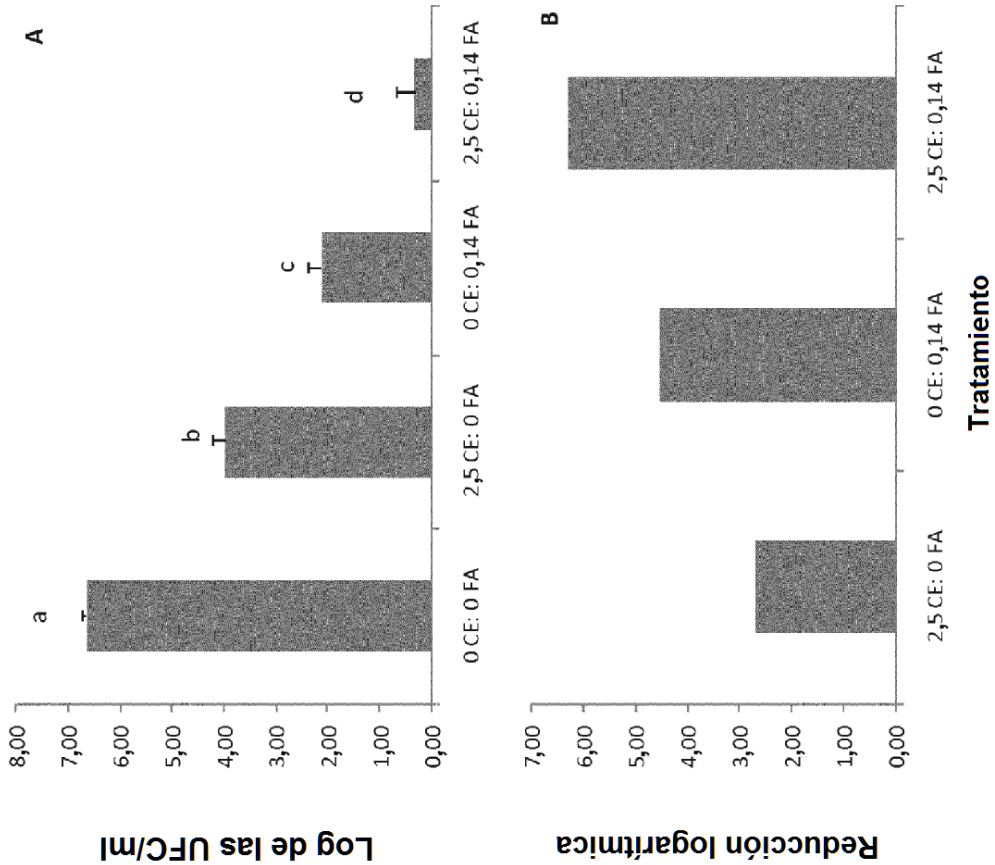
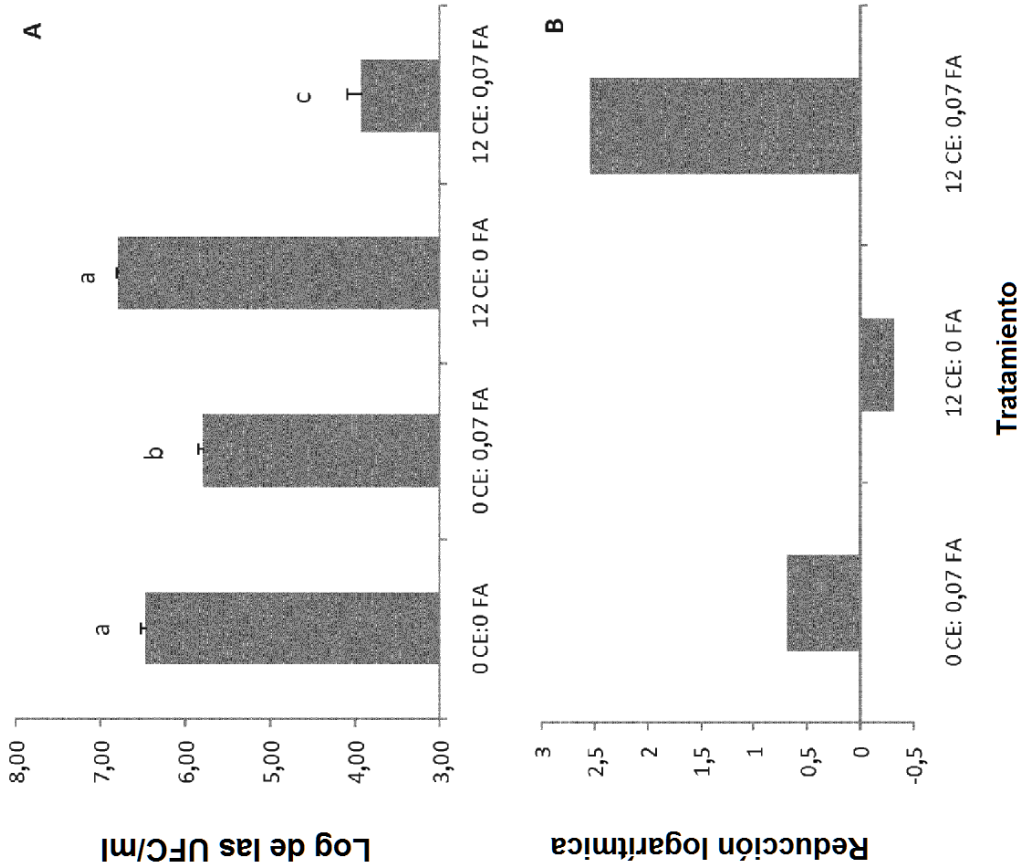

Aditivo
Observado
% de ácido fumárico (p/v)
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
1
2
3
4
(mg de PAC / 8 oz)

FIG. 2


A
Log de las UFC/ml
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
a
b
c
d
0 CE: 0 FA
2,5 CE: 0 FA
0 CE: 0,14 FA
2,5 CE: 0,14 FA
B
Reducción logarítmica
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
2,5 CE: 0 FA
0 CE: 0,14 FA
2,5 CE: 0,14 FA
Tratamiento

FIGs. 3A-3B


A
Log de las UFC/ml
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
a
b
a
c
0 CE:0 FA
0 CE: 0,07 FA
12 CE: 0 FA
12 CE: 0,07 FA
B
Reducción logarítmica
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
0 CE: 0,07 FA
12 CE: 0 FA
12 CE: 0,07 FA
Tratamiento

FIGs. 4A-4B