

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 765**

51 Int. Cl.:

**A23L 2/74** (2006.01)

**B01D 61/44** (2006.01)

**A23L 2/38** (2006.01)

**A23L 2/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2013 PCT/DK2013/050215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14000746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013 E 13737795 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2866594**

54 Título: **Procedimiento para producir bebidas por retirada de ácido**

30 Prioridad:

**29.06.2012 DK 201270384**

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

**25.02.2019**

73 Titular/es:

**CARLSBERG BREWERIES A/S (100.0%)  
Ny Carlsberg Vej 100  
1799 Copenhagen V, DK**

72 Inventor/es:

**DONALDSON, IAIN;  
GOJKOVIC, ZORAN y  
VAAG, PIA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 701 765 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para producir bebidas por retirada de ácido

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las bebidas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10

La Organización Mundial de la Salud (OMS) predice que el sobrepeso y la obesidad pueden ser pronto la causa más significativa de mala salud. Los alimentos y bebidas que apoyen un estilo de vida saludable están por lo tanto muy demandados. Tales productos deberían ser preferiblemente bajos en calorías, pero altos en otros nutrientes beneficiosos.

15

El documento EP 0748 168 se refiere a una bebida refrescante sin alcohol que se prepara fermentando glucosa a ácido glucónico usando un microorganismo Sin embargo, después de la fermentación bacteriana, el líquido resultante contiene un alto nivel de ácido glucónico y gluconato. Para reducir esto, la bebida tiene que diluirse, reduciendo por tanto el nivel de otros micronutrientes.

20

El documento US20120114791 se refiere a procedimientos para la producción de bebidas alcohólicas con contenido reducido de alcohol. Los procedimientos comprenden el tratamiento de una solución de partida de bebida no fermentada con glucosa oxidasa y glucosa isomerasa, que puede conducir a una reducción del azúcar de alrededor del 19 %. Los procedimientos pueden contener una etapa adicional de retirada de al menos una porción del ácido

25

glucónico generado, p. ej. mediante neutralización por adición de una sustancia formadora de una sal escasamente soluble de ácido glucónico, preferiblemente carbonato de calcio.

30

El documento US3.265.607 divulga un aparato para mejorar el sabor del zumo de fruta. El aparato comprende un dispositivo de electrodiálisis multicameral que tiene una pluralidad de cámaras de zumo y electrolito alternadas entre dos cámaras de electrolito terminales, estando separadas dichas cámaras entre sí por membranas permeoselectivas de iones.

35

El documento GB1037725 divulga un aparato y un proceso para modificar el contenido iónico de alimentos líquidos mientras se ajusta y controla el pH del producto resultante. En particular, el documento divulga un proceso para el tratamiento de concentrado de té para producir un té instantáneo menos caro.

40

El documento EP0049497 se refiere a un proceso para modificar la acidez y el contenido iónico de un producto alimentario acuoso por electrodiálisis en un sistema que comprende un par de electrodos y dos o más membranas. El proceso es valioso para reducir la acidez del café instantáneo.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

45

La presente invención proporciona procedimientos para preparar bebidas bajas en calorías y altas en micronutrientes beneficiosos. En particular, la invención proporciona procedimientos para la retirada de ácidos orgánicos durante la producción de bebida. Como se describe anteriormente, la reducción del nivel de glucosa puede conducir a la producción de ácidos, p. ej. ácido glucónico. Los presentes inventores han encontrado que los procedimientos de la técnica anterior están limitados porque la producción de ácido inhibe en última instancia la retirada de glucosa, y por tanto pueden retirarse solo niveles relativamente bajos de glucosa y/o se producen altos niveles de ácidos. De forma interesante, la presente invención proporciona procedimientos donde se retiran los ácidos orgánicos generados continuamente, preferiblemente simultáneamente a la generación de los ácidos orgánicos. Por tanto, en los procedimientos de la invención, la retirada de azúcar no está afectada por la acumulación de altos niveles de ácidos orgánicos, porque los ácidos orgánicos pueden retirarse continuamente. De forma interesante, la invención demuestra que tales bebidas son apetecibles, proporcionando un buen sabor. Si la acidez se mantiene a un nivel bajo, entonces los azúcares pueden mantenerse a un nivel bajo, permitiendo una

55

bebida con un bajo contenido de calorías. La invención proporciona procedimientos para reducir el nivel de ácido orgánico mientras que al mismo tiempo retiene el nivel de uno o más micronutrientes. De forma interesante, los procedimientos descritos en la presente memoria conducen a bebidas apetecibles, p. ej. bebidas con un buen aroma y sabor. Los compuestos de aroma importantes se retienen en las bebidas. Otro rasgo interesante de las bebidas preparadas según los procedimientos

60

de la invención es que, incluso en ausencia de adición de ingredientes no naturales, las bebidas son apetecibles y contienen un buen nivel de micronutrientes.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de preparación de una bebida, donde el procedimiento  
5 comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y  
b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

10 c) incubar dicho líquido con

(i) uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico y/o  
(ii) con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa en un ácido orgánico;  
y/o

15 iii) con uno o más microorganismos fermentadores de azúcar capaces de fermentar azúcar hasta un ácido orgánico  
y/o

iv) con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de azúcar para formar un ácido orgánico; y

20 d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido, mientras se retiene dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante unos apilamientos de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dichos apilamientos de membranas

25 i) al menos una celda que consiste en:

1. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y

2. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara para el líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales

30 pueden estar conectadas

ii) un conjunto de membranas terminales

iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos

iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

35 y donde la retirada implica las etapas de

i) insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; y

ii) insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y

iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

40 iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos,

donde dicho líquido de AX-REED es la bebida o dicho líquido de AX-REED puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida.

45 El líquido de partida puede incubarse en la cámara para el líquido de partida durante un tiempo de retención predeterminado.

La etapa d) implica retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED.

50

### **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra una visión general de un equipo de REED.

55 La Figura 2 muestra el consumo de maltosa y glucosa durante dos fermentaciones controladas por REED consecutivas.

La Figura 3 muestra la concentración de ácido cítrico, ácido málico y ácido ascórbico en zumo de limón durante el tratamiento con REED con el tiempo. El panel A) muestra el tratamiento durante 4,5 h, mientras que el panel B) muestra el tratamiento durante 3,5 h.

La Figura 4 muestra un equipo de REED ejemplar.

60 La Figura 5 muestra la preferencia por bebidas con 22 g/l, 37 g/l o 52 g/l de glucosa en un panel de prueba de 75

personas. Existe una clara preferencia por la bebida que contiene 37 g/l.

La Figura 6 muestra los perfiles de aroma de cerveza para la bebida A y la bebida B evaluados por un panel de cata entrenado. Línea continua: Bebida A (basada en REED).

Línea de puntos: Bebida B (basada en mosto diluido).

5 La Figura 7 muestra el perfil de pH durante la prueba 59 (panel A) y durante la prueba 60 (panel B)).

### Descripción detallada de la invención

#### Procedimiento de producción de una bebida

10

La presente invención se refiere a procedimientos para producir una bebida o una base de bebida, donde dicha base de bebida puede procesarse hasta la bebida por adición de uno o más compuestos aromatizantes.

En particular, los procedimientos de la invención son útiles para preparar bebidas con una relación de azúcar a ácido orgánico en el intervalo de 60:1 a 1:2, que los presentes inventores han encontrado que es particularmente  
15 apetecible. Dicha relación de azúcar a ácido orgánico puede ser cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico". Los procedimientos de la invención son también útiles para preparar bebidas con acidez reducida. Los procedimientos de acuerdo con la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas. Los procedimientos de la invención comprenden en general las etapas de:

20

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y  
b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e  
c) incubar dicho líquido con

25

(i) uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico y/o  
(ii) una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa en un ácido orgánico; y/o  
iii) con uno o más microorganismos fermentadores de azúcar capaces de fermentar azúcar hasta un ácido orgánico y/o

30

iv) con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de azúcar para formar un ácido orgánico; y

35

d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido mientras se retiene dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

La etapa d) retira al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65  
40 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

El líquido de AX-REED puede ser la bebida final, sin embargo el líquido de AX-REED puede procesarse también  
45 adicionalmente para obtener la bebida final. Por tanto, en una realización de la invención, los procedimientos comprenden efectuar las etapas a), b), c) y d), donde la bebida es el líquido de AX-REED obtenido.

El líquido de partida de la etapa a) puede ser cualquier líquido útil como líquido de partida para la preparación de una bebida. En particular, puede ser cualquiera de los líquidos de partida descritos a continuación en la presente  
50 memoria en las secciones "Procedimiento de producción de bebida fermentada" y "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana" y "Procedimiento de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar".

El micronutriente de la etapa a) puede ser cualquiera de los micronutrientes descritos a continuación en la presente  
55 memoria en la sección "Micronutriente".

El azúcar del líquido de partida puede ser cualquiera de los azúcares descritos en la sección "Azúcar".

La etapa b) del procedimiento es una etapa opcional, que puede efectuarse para convertir uno o más azúcares en  
60 glucosa. Que se efectúe o no esta etapa dependerá de si el líquido de partida contiene azúcares distintos de glucosa

y de si es deseable convertir uno o más de dichos otros azúcares en glucosa.

Se describen procedimientos que retiran principalmente ácidos orgánicos del líquido de partida para producir una bebida o base de bebida con menos acidez. En estas realizaciones, si el líquido de partida comprende un nivel y composición de azúcar que son también deseables en la bebida o base de bebida final, entonces la etapa b) se excluirá en general.

En otras realizaciones de la invención, el procedimiento comprende una etapa de fermentación (etapa c (i)). En estas realizaciones, es preferible que si el líquido de partida comprende solo bajos niveles de glucosa, o si el líquido de partida comprende altos niveles de azúcares distintos de glucosa, se efectúe entonces la etapa b). La etapa b) puede conformarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Conversión de azúcar en glucosa".

En la etapa c (i), se reduce el nivel de glucosa fermentando glucosa, preferiblemente para obtener un ácido orgánico. En general, la etapa c) se efectúa en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un nivel de azúcar que es mayor que el deseable. Por tanto, la etapa c), tal como la etapa c (i), es en particular parte del procedimiento en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende más de un 10 %, por ejemplo más de un 9 %, tal como más de un 8 %, por ejemplo más de un 7% de azúcar. Dichos porcentajes se dan como p/p. El azúcar puede ser cualquiera de los azúcares descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Azúcar". La etapa c (i) puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Incubación con microorganismo fermentador de glucosa".

En otras realizaciones de la invención, el procedimiento comprende una etapa c que comprende incubación con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa en un ácido orgánico (etapa c (ii)). En estas realizaciones, es preferible que si el líquido de partida comprende solo bajos niveles de glucosa, o si el líquido de partida comprende altos niveles de azúcares distintos de glucosa, se efectúe entonces la etapa b). La etapa b) puede conformarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Conversión de azúcar en glucosa".

La etapa c (ii) comprende incubación con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa en un ácido orgánico. La etapa c (ii) reduce el nivel de glucosa por degradación enzimática de glucosa para obtener un ácido o ácidos orgánicos. En general, la etapa c) se efectúa en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un nivel de azúcar que es mayor que el deseable. Por tanto, la etapa c), tal como la etapa c (ii), es en particular parte del procedimiento en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende más de un 10 %, por ejemplo más de un 9 %, tal como más de un 8 %, por ejemplo más de un 7% de azúcar. Dichos porcentajes se dan como p/p. El azúcar puede ser cualquiera de los azúcares descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Azúcar". La etapa c (ii) puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Incubación con enzima degradante de glucosa".

La retirada de uno o más iones ácidos del líquido se efectúa usando apilamiento de membranas de AX-REED. Como se usa en la presente memoria, la expresión "retirar un ácido orgánico" hace referencia a retirar el ion ácido de dicho ácido orgánico. El apilamiento de membranas de AX-REED puede ser cualquiera de los apilamientos de membranas de AX-REED descritos a continuación en la presente memoria en la sección "AX-REED" y la retirada puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "AX-REED". La retirada de dichos iones ácidos se efectúa preferiblemente de una manera donde se retiene en el líquido al menos un micronutriente. Dicho micronutriente puede ser cualquiera de los micronutrientes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente". La expresión "retener dicho al menos un micronutriente" como se usa en la presente memoria significa que la concentración de dicho al menos un micronutriente no ha disminuido más de un 30 %, preferiblemente no más de un 20 %, tal como no más de un 10 %, por ejemplo la concentración de dicho micronutriente no ha disminuido más de un 5 % durante el desempeño de la etapa d). Aún más preferiblemente, "retener dicho al menos un micronutriente" significa que la concentración de dicho micronutriente es la misma o mayor antes y después del desempeño de la etapa d).

La etapa d) implica en general la retirada de iones ácidos por las siguientes etapas:

- i) insertar el líquido de partida en la cámara para líquido de partida en el apilamiento de membranas de AX-REED; y
- ii) insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para líquido de diálisis en el apilamiento de membranas de AX-REED; y
- iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

Dicha incubación del líquido de partida en dicha cámara puede efectuarse durante un tiempo de retención predeterminado. El tiempo de retención predeterminado puede seleccionarse según el procedimiento específico. En general, los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana" requieren tiempos de retención más cortos. Mientras que los procedimientos descritos en las secciones "Procedimientos de producción de una bebida fermentada" y "Procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar" requieren en general tiempos de retención más largos. El tiempo de retención puede seleccionarse para obtener un pH deseado. En particular, el tiempo de retención puede seleccionarse para obtener un tiempo de contacto deseable, que puede ser cualquiera de los tiempos de contacto descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Tiempo de contacto".

Además de las etapas a) a d) esbozadas anteriormente, los procedimientos de la invención pueden comprender también una etapa e), donde la etapa e) comprende retirar al menos parte de un catión del líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED). El apilamiento de membranas de CX-REED puede ser cualquiera de los apilamientos de membranas de CX-REED descritos a continuación en la presente memoria en la sección "CX-REED" y la etapa e) puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos en la sección "CX-REED". Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento para preparar una bebida con acidez reducida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y  
 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e  
 c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa; y  
 d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y  
 e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

La etapa e) puede implicar retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

La etapa e) implica en general la retirada de cationes por las siguientes etapas:

i) insertar el líquido de partida, el líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de AX-REED en la cámara para líquido de AX-REED; y  
 ii) insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para líquido de diálisis; y  
 iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
 iv) incubar dicho líquido en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

Dicha incubación del líquido de partida en dicha cámara puede efectuarse durante un tiempo de retención predeterminado. El tiempo de retención predeterminado puede seleccionarse según el procedimiento específico. El tiempo de retención puede seleccionarse para obtener una conductividad deseada. En particular, el tiempo de retención puede seleccionarse para obtener un tiempo de contacto deseable, que puede ser cualquiera de los tiempos de contacto descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Tiempo de contacto".

El líquido de CX-REED puede ser la bebida final. Sin embargo, el líquido de CX-REED puede procesarse también adicionalmente para obtener la bebida final. Por ejemplo, el líquido de CX-REED será la bebida final o será una base de bebida que será la bebida final después de la adición de uno o más compuestos adicionales como se describe a continuación en la presente memoria para la etapa f). Por tanto, en una realización la invención proporciona procedimientos de preparación de bebidas, donde los procedimientos comprenden efectuar las etapas a), b), c), d) y e) como se esboza anteriormente, donde la bebida es el líquido de CX-REED.

Como se describe en otro lugar de la presente memoria, las etapas d) y e) pueden efectuarse entonces simultáneamente o de forma parcialmente simultánea. En estas realizaciones, puede hacerse referencia al líquido resultante como "líquido de REED".

5

Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento para preparar una bebida con acidez reducida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el
- 10 micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e
- c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa; y
- d) retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- 15 e) retirar de forma al menos parcialmente simultánea al menos parte de un catión del líquido de partida o del líquido parcialmente tratado con AX-REED, obteniendo así un líquido de REED, donde dicho líquido de REED retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

- 20 El líquido de REED puede ser la bebida final. Sin embargo, el líquido de REED puede procesarse también adicionalmente para obtener la bebida final. Por ejemplo, el líquido de REED será la bebida final o será una base de bebida que será la bebida final después de la adición de uno o más compuestos adicionales como se describe a continuación en la presente memoria para la etapa f). El líquido de REED puede tratarse también con una o ambas de las etapas g) y h) descritas a continuación en la presente memoria.

25

Además de las etapas anteriormente mencionadas, el procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa f), donde la etapa d) comprende añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de partida y/o al líquido durante el procedimiento y/o a la bebida. Dichos compuestos adicionales pueden ser cualquier compuesto deseable de añadir a una bebida, por ejemplo los compuestos adicionales pueden ser uno o más seleccionados de entre el grupo

30

consistente en compuestos aromatizantes y conservantes. El compuesto aromatizante puede ser por ejemplo cualquiera de los compuestos aromatizantes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Compuesto aromatizante". Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento para preparar una bebida, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- 35 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e
- c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa; y
- d) retirar al menos un 15 % del uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene dicho al menos un
- 40 micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED mientras se retiene dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,
- 45 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- f) añadir uno o más compuestos adicionales, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes, obteniendo así una bebida.

## 50 Procedimiento de producción de bebida fermentada

En una realización preferida de la invención, el procedimiento comprende efectuar la etapa c). En particular, los procedimientos de la invención pueden comprender preferiblemente efectuar la etapa c) (i). Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento

55

comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- c) incubar dicho líquido con

60

(i) uno o más microorganismos capaces de fermentar dicho azúcar para producir un ácido orgánico y

d) retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED.

5

El microorganismo capaz de fermentar dicho azúcar para producir un ácido orgánico puede ser cualquier microorganismo útil con estas características. En particular, se prefiere que el microorganismo sea un microorganismo fermentador de glucosa. Por tanto, la invención proporciona procedimientos para producir una bebida que comprenden las etapas de

10

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa

15 hasta un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

20

Dicho líquido de AX-REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final como se describe a continuación.

25 Este procedimiento puede comprender además la etapa e) y por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

30

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

35

donde dicho orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,

40

donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

El líquido de CX-REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final. Se prefiere que el líquido de CX-REED sea la bebida final o que la bebida final se obtenga añadiendo uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED.

45

Las etapas d) y e) pueden efectuarse al menos de forma parcialmente simultánea y, por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

50

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

55

d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido, donde dicho orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) retirar de forma al menos parcialmente simultánea al menos parte de un catión del líquido de partida o del líquido parcialmente tratado con AX-REED, obteniendo así un REED, donde dicho líquido de REED retiene al menos un 65

60

% de dicho al menos un micronutriente, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

5 El líquido de REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final. Se prefiere que el líquido de REED sea la bebida final o que la bebida final se obtenga añadiendo uno o más compuestos adicionales al líquido de REED.

10 Por tanto, el procedimiento puede comprender además una etapa f) de adición de uno o más compuestos adicionales al líquido de partida, el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED. En realizaciones de la invención que no contienen la etapa e), la etapa f) comprende entonces preferiblemente añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de AX-REED. En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

15 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

20 d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene dicho al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,

25 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y

f) añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes, obteniendo así la bebida.

30

El procedimiento comprende también una etapa g) de adición de uno o más líquidos adicionales al líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED para obtener la bebida final. En particular, dichos líquidos adicionales pueden ser bebidas, de modo que la bebida final sea una mezcla entre el líquido de CX-REED y una bebida adicional o una mezcla entre el líquido de REED y una bebida adicional. Por tanto, en un aspecto la

35 invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

40 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

45 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,

50 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y

f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes; y

55 g) proporcionar un líquido adicional, por ejemplo una bebida, y mezclar dicho líquido de CX-REED con dicho líquido adicional, obteniendo así la bebida.

Dicho líquido adicional puede ser cualquier líquido que sea deseable mezclar con el líquido de CX-REED. En particular, el líquido adicional puede ser una bebida. En una realización, dicho líquido adicional es una bebida alcohólica tal como una bebida fermentada, tal como un mosto fermentado o un zumo de fruta. Por ejemplo, el

60 líquido adicional puede seleccionarse de entre el grupo consistente en cerveza, vino y sidra. El líquido adicional

puede ser también un zumo de fruta fermentado obtenido mezclando zumo de fruta con azúcar seguido de fermentación con levadura, procurando un líquido con alto contenido de alcohol. En la presente memoria, se hace referencia a tales líquidos también como zumo de fruta rico en azúcar fermentado. A este respecto, la expresión "rico en azúcar" hace referencia por tanto a que se añade azúcar adicional al zumo de fruta antes de la fermentación. Por ejemplo, la bebida adicional puede ser zumo de fruta fermentado con azúcar añadido que contiene al menos un 10 %, tal como al menos un 12 %, de alcohol. Dicho zumo de fruta fermentado puede ser, por ejemplo, zumo de manzana fermentado, y puede hacerse referencia entonces como zumo de manzana rico en azúcar fermentado.

Los procedimientos de la invención pueden ser útiles para preparar bebidas bajas en alcohol mezclando una bebida alcohólica convencional con un líquido de CX-REED obtenido usando la misma base que se usa para la bebida alcohólica convencional como líquido de partida.

Por tanto, en una realización la bebida final puede ser una cerveza baja en alcohol, tal como una cerveza que contiene menos de un 0,5 % de alcohol, por ejemplo una cerveza que contiene menos de un 0,1 % de alcohol o incluso una cerveza "sin alcohol", que se obtiene diluyendo una cerveza convencional con líquido de CX-REED o líquido de REED preparado según la presente invención. Frecuentemente, el líquido de CX-REED es bajo en azúcar y en general sin alcohol, pero sigue reteniendo otros atributos de sabor del líquido de partida y, por consiguiente, proporciona a la bebida final todos estos atributos de sabor. Por tanto, el líquido de CX-REED retiene en general uno o más compuestos de aroma presentes en el líquido de partida como se describe a continuación en la presente memoria en la sección "Compuestos de aroma". En esta realización, el líquido de partida para preparar el líquido de CX-REED o el líquido de REED comprende preferiblemente un extracto de cereal, más preferiblemente mosto.

De forma similar, en otra realización la bebida final puede ser una sidra baja en alcohol, tal como una sidra que contiene menos de un 0,5 % de alcohol, por ejemplo una sidra que contiene menos de un 0,1 % de alcohol o incluso una sidra "sin alcohol", que se obtiene diluyendo una sidra convencional con líquido de CX-REED o líquido de REED preparado según la presente invención. En esta realización, el líquido de partida para preparar el líquido de CX-REED o el líquido de REED comprende o consiste preferiblemente en zumo de pera o zumo de manzana, preferiblemente zumo de manzana.

En todavía otra realización, la bebida final puede ser una sidra baja en calorías, que se obtiene diluyendo un zumo de manzana rico en azúcar fermentado convencional con el líquido de CX-REED o el líquido de REED. En esta realización, el líquido de partida para preparar el líquido de CX-REED comprende o consiste preferiblemente en zumo de pera o zumo de manzana, preferiblemente zumo de manzana.

Además, en esta realización el líquido de CX-REED tiene preferiblemente un contenido de glucosa de como máximo 60 g/l, tal como máximo 50 g/l, por ejemplo como máximo 40 g/l. En realizaciones donde se prepara un líquido de REED, el líquido de REED tiene entonces preferiblemente un contenido de glucosa de como máximo 60 g/l, tal como máximo 50 g/l, por ejemplo como máximo 40 g/l.

En otra realización, la bebida final puede ser un vino bajo en alcohol, tal como un vino que contiene menos de un 0,5 % de alcohol, por ejemplo un vino que contiene menos de un 0,1 % de alcohol o incluso un vino "sin alcohol", que se obtiene diluyendo un vino convencional con líquido de CX-REED o líquido de REED preparado según la presente invención. En esta realización, el líquido de partida para preparar el líquido de CX-REED o el líquido de REED comprende o consiste preferiblemente en un zumo de uva.

Está también comprendido en la presente invención que los procedimientos pueden comprender una etapa h) de procesamiento adicional del líquido de AX-REED o el líquido de CX-REED o el líquido de REED para obtener la bebida final. Dicho procesamiento adicional puede ser por ejemplo una etapa de incubación del líquido de AX-REED o el líquido de CX-REED o el líquido de REED con uno o más microorganismos tales como levadura. Dichos procedimientos pueden comprender la etapa g) anteriormente descrita, y por tanto los procedimientos pueden comprender la incubación del líquido obtenido en la etapa g) con uno o más microorganismos tales como levadura. Los microorganismos para emplear en la etapa h) pueden ser en particular levadura, tal como levadura de panadería, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus*, anteriormente conocida como *S. carlsbergensis*. Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e
- c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa

hasta un ácido orgánico; y

- d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- 5 e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- 10 f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes; y
- h) incubar dicho líquido de AX-REED o dicho líquido de X-REED con uno o más microorganismos tales como levadura, opcionalmente seguido de la retirada de dicho microorganismo, obteniendo así la bebida.

15

Dicha etapa h) puede incluirse en particular en realizaciones de la invención donde la bebida es una cerveza, tal como una cerveza baja en alcohol o una cerveza sin alcohol.

- 20 Durante la etapa c), se genera ácido orgánico y durante la etapa d) se retira el menos algo de dicho ácido orgánico generado. Como se describe en otro lugar, las etapas c) y d) pueden efectuarse simultáneamente, y por tanto puede generarse ácido orgánico continuamente por dichos microorganismos y al menos algo del ácido orgánico generado puede retirarse continuamente mediante dicho apilamiento de membranas de AX-REED. Aunque se retira al menos un 10 % del ácido orgánico, está contenido en la invención que se mantiene al menos algo del ácido orgánico generado en la bebida, y por tanto está comprendido en la invención que la bebida puede contener más ácido
- 25 orgánico que el líquido de partida. Este es en particular el caso cuando el líquido de partida tiene un alto nivel de azúcar y un bajo nivel de ácidos orgánicos. Para alcanzar una relación apetecible entre azúcar y ácido orgánico, tal como cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico", puede ser preferible entonces que la bebida contenga más ácido orgánico que el líquido de partida. Por tanto, preferiblemente la bebida tiene una relación de azúcar a ácido orgánico como se describe a
- 30 continuación en la presente memoria en la sección de "Relación de azúcar a ácido orgánico". De acuerdo con la invención, se retira en la etapa d) al menos un 15 %, por ejemplo al menos un 20 %, tal como al menos un 25 %, tal como al menos un 30 % del ácido orgánico generado en la etapa c). Dicho ácido orgánico puede ser cualquiera de los ácidos orgánicos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Ácido orgánico".
- 35 Por tanto, la etapa d) puede comprender en una realización preferida la retirada de al menos un 15 % del ácido láctico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido láctico, tal como al menos un 25 % del ácido láctico, tal como al menos un 30 % del ácido láctico generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicho microorganismo fermentador de glucosa es capaz de fermentar glucosa hasta ácido láctico.
- 40 La etapa d) puede comprender en otra realización preferida la retirada de al menos un 15 % del ácido cítrico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido cítrico, tal como al menos un 25 % del ácido cítrico, tal como al menos un 30 % del ácido cítrico generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicho microorganismo fermentador de glucosa es capaz de fermentar glucosa hasta ácido cítrico.
- 45 La etapa d) puede comprender en otra realización la retirada de al menos un 15 % del ácido málico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido málico, tal como al menos un 25 % del ácido málico, tal como al menos un 30 % del ácido málico generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicho microorganismo fermentador de glucosa es capaz de fermentar glucosa hasta ácido málico.
- 50 La etapa d) puede comprender en otra realización preferida la retirada de al menos un 15 % del ácido acético, por ejemplo al menos un 20 % del ácido acético, tal como al menos un 25 % del ácido acético, tal como al menos un 30 % del ácido acético generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicho microorganismo fermentador de glucosa es capaz de fermentar glucosa hasta ácido acético.
- 55 En estas realizaciones de la invención, el micronutriente puede ser por ejemplo cualquiera de los micronutrientes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente"; y el azúcar puede ser por ejemplo cualquiera de los azúcares descritos en la sección "Azúcar", y la etapa d) puede efectuarse por ejemplo de cualquiera de los modos descritos en la sección "AX-REED", y la etapa e) puede efectuarse por ejemplo de cualquiera de los modos descritos en la sección "CX-REED". Dicha relación de azúcar a ácido orgánico puede ser
- 60 cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a

ácido orgánico".

En particular, en realizaciones de la invención referentes a los procedimientos de producción de bebidas fermentadas, se prefiere entonces seleccionar dicho micronutriente de entre el grupo consistente en minerales, y en particular el grupo de minerales descrito a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente". En estas realizaciones, se prefiere efectuar las etapas d) y e) de modo que se retenga en el líquido al menos un 65 % de al menos 2, preferiblemente de al menos 3, minerales seleccionados de entre el grupo de calcio, magnesio y hierro. Por tanto, se prefiere que la bebida final contenga al menos un 65 % del nivel de al menos 2, preferiblemente de al menos 3, minerales presentes en el líquido de partida, donde dichos minerales se seleccionan de entre el grupo consistente en calcio, magnesio y hierro presentes en el líquido de partida. En estas realizaciones, se prefiere también efectuar las etapas d) y e) de modo que se retenga en el líquido al menos un 80 % de al menos 2, preferiblemente de al menos 3, minerales seleccionados de entre el grupo de calcio, magnesio y hierro. Por tanto, se prefiere que la bebida final contenga al menos un 80 % del nivel de al menos 2, preferiblemente de al menos 3, minerales presentes en el líquido de partida, donde dichos minerales se seleccionan de entre el grupo consistente en calcio, magnesio y hierro presentes en el líquido de partida.

El líquido de partida puede ser cualquier líquido útil para preparar una bebida. Se prefiere generalmente que el líquido de partida sea un producto natural. La expresión "producto natural" como se usa en la presente memoria hace referencia a un producto obtenido a partir de fuentes naturales por extracción en agua o por escurrido donde no se añaden productos químicos extra. Por tanto, en una realización el líquido de partida es un extracto, concentrado o un zumo de una planta o parte de planta donde no se ha añadido azúcar extra.

En realizaciones de la invención referentes a producir una bebida fermentada, se prefiere que el líquido de partida tenga un nivel relativamente alto de uno o más azúcares, por ejemplo un alto nivel de uno o más de los azúcares descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Azúcar". Por tanto, el líquido de partida puede comprender por ejemplo más de un 10 %, por ejemplo más de un 9 %, tal como más de un 8 %, por ejemplo más de un 7 % de azúcar. Dichos porcentajes se dan como p/p.

En una realización de la invención, el líquido de partida es un líquido con un alto nivel de maltosa. Por tanto, el líquido de partida puede ser un líquido que contiene más de 40 g/l, tal como más de 50 g/l, por ejemplo más de 60 g/l de maltosa.

En particular, el líquido de partida puede ser un extracto de uno o más cereales. Dichos cereales pueden seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo, mijo, tritical, trigo sarraceno, fonio y quinoa. Más preferiblemente, el cereal se selecciona de entre los grupos consistentes en cebada, trigo, centeno, avena, maíz y arroz, más preferiblemente el cereal es cebada.

El extracto puede ser un extracto del cereal per se, sin embargo, el cereal puede estar también malteado y el extracto puede ser un extracto del cereal malteado. Como se usa en la presente memoria, el término "malteado" hace referencia a los granos de cereal que se han sometido a remojo, se han dejado germinar y entonces han secado. Dicho secado puede ser por ejemplo secado en estufa.

Dicho extracto de cereal o cereal malteado es preferiblemente un extracto acuoso.

Por tanto, en una realización preferida de la invención, y en particular en realizaciones de la invención referentes a los procedimientos de producción de una bebida fermentada, el líquido de partida puede ser entonces un extracto de malta, tal como extracto de malta de cebada. Más preferiblemente, el líquido de partida puede ser mosto. El líquido de partida puede ser también un extracto de una mezcla de malta de cebada y otros cereales.

En una realización particularmente preferida, el líquido de partida es mosto. Se entiende por el término "mosto" como se usa en la presente memoria un extracto líquido de malta. El mosto puede prepararse también incubando un extracto de cebada no malteada con una mezcla enzimática que hidroliza los componentes de la cebada. Además de dicha malta o extractos derivados de cebada, el mosto puede prepararse a partir de malta y componentes adicionales, tales como material que contiene almidón adicional parcialmente convertido en azúcares fermentables. El mosto se obtiene en general por maceración, opcionalmente seguida de lavado.

El término "maceración" como se usa en la presente memoria hace referencia a la incubación de la malta molida en agua. La maceración se efectúa preferiblemente a una temperatura específica y en un volumen de agua específico. La maceración puede producirse en presencia de complementos, que se entiende que comprenden cualquier fuente de carbohidrato distinta de malta tal como, pero sin limitación, cebada no malteada, jarabes de cebada o maíz o

arroz, como granos enteros o productos procesados como sémola, jarabes o almidón.

El término "lavado" como se usa en la presente memoria hace referencia a un proceso de extracción de azúcares residuales y otros compuestos de granos gastados después de macerar con agua caliente. El lavado se realiza típicamente en una cuba filtro, un filtro de maceración u otro aparato para permitir la separación del agua extraída de los granos gastados.

Se hace referencia generalmente al mosto obtenido después de maceración como "primer mosto", mientras que se hace referencia generalmente al mosto obtenido después de lavado como el "segundo mosto". Si no se especifica, el término mosto puede ser el primer mosto, segundo mosto o una combinación de ambos.

Por tanto, el líquido de partida puede ser mosto, tal como primer mosto, segundo mosto o una mezcla de los mismos.

Está comprendido también en la invención que el líquido de partida puede ser un extracto, un concentrado o un zumo de una planta o parte de planta que se ha tratado con una o más enzimas. Por ejemplo, dicho extracto, concentrado o zumo de una planta o parte de planta puede haberse tratado con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucosidasas, proteasas, pectinasas y celulasas. En realizaciones de la invención donde el líquido de partida es mosto, dicho líquido de partida puede haberse preparado empleando una etapa de tratamiento enzimático con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucosidasas, proteasas, pectinasas y celulasas, preferiblemente del grupo consistente en glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas, proteasas, pululaninas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, dextrinasas límite y  $\beta$ -glucosidasas. El tratamiento con glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas puede considerarse como la etapa b) de los procedimientos de la invención.

Sin embargo, en una realización se prefiere no añadir proteasas en ninguna etapa durante el procedimiento.

En una realización de la invención, el líquido de partida es un zumo de fruta o extracto que contiene un alto nivel de azúcar. En particular, el líquido de partida puede ser un zumo de fruta o extracto que contiene naturalmente un alto nivel de azúcar, tal como más de 40 g/l, tal como más de 50 g/l, por ejemplo más de 60 g/l de azúcar. Dicho zumo de fruta puede ser por ejemplo zumo de uva, zumo de pera o zumo de manzana. Los procedimientos de la invención pueden usarse para producir una bebida apetecible con contenido de azúcar reducido en comparación con el zumo o extracto de fruta, mientras se retienen uno o más micronutrientes valiosos.

En ciertas realizaciones de la invención, el pH del líquido de partida puede ajustarse mediante la adición de base o ácido, tal como hidróxido de potasio o ácido láctico. Esto puede hacerse, por ejemplo, para iniciar la fermentación a un pH conforme para el microorganismo, tal como el microorganismo fermentador de glucosa.

En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta, el líquido de partida comprenderá entonces altos niveles de maltosa, y en estas realizaciones de la invención, los procedimientos comprenden preferiblemente una etapa de conversión de al menos algo de dicha maltosa en glucosa.

Por consiguiente, es también un aspecto de la invención proporcionar procedimientos de preparación de una bebida, donde los procedimientos comprenden las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y maltosa, donde dicho líquido de partida por ejemplo puede comprender o incluso consistir en un extracto y/o mosto de malta; y

b) convertir al menos algo de dicha maltosa en glucosa; y

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED) como se describe a continuación en la presente memoria en la sección "AX-REED"

y opcionalmente el procedimiento comprende además una o ambas de las etapas e) y f) como se esboza anteriormente.

La etapa b) de conversión de maltosa en glucosa puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la sección "Conversión de azúcar en glucosa".

La etapa c) de los procedimientos para producir una bebida fermentada como se describe en esta sección puede

efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Incubación con microorganismo fermentador de glucosa".

La etapa b) y la etapa c) pueden efectuarse secuencialmente, efectuando primero la etapa b) y entonces la etapa c).

- 5 Sin embargo, está también comprendido en la invención que la etapa b) y la etapa c) pueden efectuarse simultáneamente o al menos de forma parcialmente simultánea. Por ejemplo, cuando se efectúa la etapa b) con la ayuda de una enzima como se describe en la sección "Conversión de azúcar en glucosa" a continuación en la presente memoria, entonces puede añadirse la enzima al líquido de partida junto con el microorganismo fermentador de glucosa. Cuando se efectúa la etapa b) con la ayuda de un microorganismo tal como un microorganismo
- 10 catabolizante de maltosa como se describe en la sección "Conversión de azúcar en glucosa" a continuación en la presente memoria, puede incubarse entonces el líquido de partida con dicho microorganismo y con el microorganismo fermentador de glucosa simultáneamente. En realizaciones de la invención donde se efectúa la etapa b) con la ayuda de un microorganismo, se prefiere efectuar la etapa b) y la etapa c) simultáneamente.
- 15 Las etapas c) y d) pueden efectuarse también secuencialmente, efectuando primero la etapa c) y entonces la etapa d). Sin embargo, se prefiere efectuar la etapa c) y la etapa d) simultáneamente, o al menos en forma parcialmente simultánea. Por tanto, puede incubarse el líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico y simultáneamente se retira el menos algo de dicho ácido orgánico del líquido. Por tanto, a medida que se produce el ácido orgánico a partir del microorganismo fermentador
- 20 de glucosa se retira entonces del líquido, asegurando un nivel bajo constante de dicho ácido orgánico en el líquido durante la fermentación.

Por consiguiente, las etapas b), c) y d) pueden efectuarse todas simultáneamente. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c) y d) simultáneamente.

- 25 En general, la etapa d) se efectuará antes que la etapa e), sin embargo está contenido también en la invención que las etapas d) y e) pueden efectuarse simultáneamente. Preferiblemente, sin embargo, se efectúa la etapa d) antes que la etapa e).
- 30 En otra realización muy preferida de la invención, se efectúan las etapas d) y e) simultáneamente. Por tanto, en esta realización pueden efectuarse las etapas de realización b), c), d) y e) todas simultáneamente. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c), d) y e) simultáneamente. Las etapas d) y e) pueden efectuarse en particular simultáneamente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dichos apilamientos de
- 35 membranas de AX-REED y dichos de CX-REED están conectados en paralelo.

- En todavía otra realización muy preferida de la invención, se efectúan las etapas d) y e) de forma parcialmente simultánea. En esta realización, la etapa d) puede efectuarse por ejemplo durante un periodo de tiempo dado, después del cual se efectúan ambas etapas d) y e) simultáneamente. Por tanto, pueden retirarse uno o más iones
- 40 ácidos del líquido mediante AX-REED durante un periodo de tiempo dado, después del cual se retiran ambos iones ácidos y al menos un catión respectivamente mediante AX-REED y CX-REED, donde se efectúan AX-REED y CX-REED simultáneamente. Por tanto, en esta realización pueden efectuarse las etapas de realización b), c), d) y e) todas al menos de forma parcialmente simultánea. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c), d) y e) al menos de forma parcialmente simultánea. Cuando las etapas d) y e) se
- 45 efectúan al menos de forma parcialmente simultánea, esto se hace preferiblemente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dicho apilamiento de membranas de AX-REED y dicho de CX-REED están conectados en paralelo.

- En una realización de la invención, se prefiere no añadir azúcar al líquido de partida y, además, se prefiere no añadir
- 50 azúcar en ninguna etapa durante el procedimiento. Además, se prefiere no añadir azúcar a la bebida final.

Está comprendido en la invención que cualquiera de los procedimientos puede comprender como última etapa la etapa i) de adición de CO<sub>2</sub> para obtener una bebida carbonatada.

## 55 **Conversión de azúcar en glucosa**

- Los procedimientos de la invención pueden comprender una etapa b) de conversión de al menos algo de azúcar que no es glucosa en glucosa. Esta etapa es una etapa opcional, que puede efectuarse solo en realizaciones de la invención donde sea deseable reducir el nivel de azúcar, o en realizaciones de la invención donde sea deseable
- 60 reducir el nivel de un azúcar particular que no sea glucosa.

El azúcar puede seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en fructosa, maltosa, maltotriosa, lactosa y sacarosa. Por tanto, la etapa b) puede comprender uno o más de los siguientes:

- 5 i. Conversión de fructosa en glucosa
- ii. Conversión de maltosa en glucosa
- iii. Conversión de maltotriosa en glucosa
- iv. Conversión de lactosa en glucosa
- v. Conversión de sacarosa en glucosa

10

En particular, la etapa b) puede comprender uno o más de los siguientes:

- i. Conversión de maltosa en glucosa
- ii. Conversión de maltotriosa en glucosa
- 15 iii. Conversión de sacarosa en glucosa

Dicha conversión puede hacerse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por el especialista. En una realización, puede hacerse esto enzimáticamente poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa. Esto puede hacerse también empleando uno o más microorganismos capaces de catabolizar dicho azúcar para formar glucosa.

20

En realizaciones preferidas de la invención, la etapa b) comprende entonces convertir maltosa en glucosa. Además, la etapa b) puede comprender convertir maltotriosa en glucosa. Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende maltosa y/o maltotriosa, por ejemplo en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta.

25

Por tanto, la etapa b) puede comprender convertir al menos algo de dicha maltosa en glucosa y al menos algo de dicha maltotriosa en glucosa poniendo en contacto el líquido de partida con una o más enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa y de maltotriosa a glucosa.

30

Por tanto, la etapa b) puede comprender convertir al menos algo de dicha maltosa en glucosa poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa.

Dicha enzima puede ser en una realización preferida una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de  $\alpha$ -D-glucosa (1 $\rightarrow$ 4)-ligados sucesivamente desde los extremos no reductores de un oligosacárido, dando como resultado la liberación de  $\beta$ -D-glucosa. En particular, la enzima es preferiblemente capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa. La enzima puede ser en particular una enzima clasificada como EC 3.2.1.3. Por tanto, la enzima puede ser una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa. Dicha glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa puede ser de cualquier organismo fuente útil, por ejemplo puede ser una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de origen microbiano o de origen vegetal. En una realización, la enzima es una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de SEQ ID NO: 1 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de SEQ ID NO: 2 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de SEQ ID NO: 3 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. Un homólogo funcional de una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa es un polipéptido capaz de catalizar la hidrólisis de residuos de  $\alpha$ -D-glucosa (1 $\rightarrow$ 4)-ligados terminales sucesivamente a partir de los extremos no reductores de un oligosacárido con liberación de  $\beta$ -D-glucosa, y que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada con una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de referencia.

40

45

Dicha enzima puede ser también una enzima capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -ligadas. La enzima puede ser en particular una enzima clasificada como EC 3.2.1.1. Por tanto, la enzima puede ser una  $\alpha$ -amilasa. Dicha  $\alpha$ -amilasa puede ser de cualquier organismo fuente útil, por ejemplo puede ser una  $\alpha$ -amilasa de origen microbiano o de origen vegetal. En una realización, la enzima es una  $\alpha$ -amilasa de SEQ ID NO: 4 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una  $\alpha$ -amilasa de SEQ ID NO: 5 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos

55

60

un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una  $\alpha$ -amilasa de SEQ ID NO: 6 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. Un homólogo funcional de una  $\alpha$ -amilasa es un polipéptido capaz de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -ligadas, y que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada con una  $\alpha$ -amilasa de referencia.

Dicha enzima puede ser también una enzima capaz de catalizar la lisis de enlaces (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucosídicos en pululano, amilopectina y glicógeno, y en las dextrinas límite  $\alpha$  y  $\beta$  de amilopectina y glicógeno. La enzima puede ser en particular una enzima clasificada como EC 3.2.1.41. Por tanto, la enzima puede ser una pululanasa. Dicha pululanasa puede ser de cualquier organismo fuente útil, por ejemplo puede ser una pululanasa de origen microbiano. En una realización, la enzima es una pululanasa de SEQ ID NO: 7 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una pululanasa de SEQ ID NO: 8 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, la enzima es una pululanasa de SEQ ID NO: 9 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. Un homólogo funcional de una pululanasa es un polipéptido capaz de catalizar la lisis de enlaces (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucosídicos en pululano, amilopectina y glicógeno, y en las dextrinas límite  $\alpha$  y  $\beta$  de amilopectina y glicógeno, y que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada con una pululanasa de referencia.

La determinación de la identidad de secuencia porcentual entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Es un ejemplo no limitante preferido de algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Se incorpora tal algoritmo a los programas BLASTN y BLASTP de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410.

Para caracterizar la identidad, se alinean las secuencias en cuestión de modo que se obtenga la homología (coincidencia) de mayor orden. Basándose en estos principios generales, la "identidad porcentual" de dos secuencias aminoacídicas, puede determinarse usando el algoritmo BLASTP [Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences; *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 174 247-250], que está disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y usando la configuración por defecto sugerida aquí (es decir, matriz= Blosum62; hueco abierto= 11; hueco de extensión= 1; hueco de penalización x límite= 50; expectativa= 10; tamaño de palabra= 3; filtro conectado). El algoritmo BLAST efectúa una operación de dos etapas, alineando primero dos secuencias basándose en las configuraciones y determinando entonces la identidad de secuencia porcentual en un intervalo de superposición entre dos secuencias alineadas. Además de la identidad secuencial porcentual, BLASTP determina también la similitud de secuencia porcentual basándose en las configuraciones.

Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Se incorpora tal algoritmo al programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias FASTA (Pearson WR, *Methods Mol Biol*, 2000, 132: 185-219). Align calcula identidades de secuencia basándose en un alineamiento global. Align0 no penaliza por huecos al final de las secuencias. Cuando se utiliza el programa ALIGN o Align0 para comparar secuencias aminoacídicas, se usa preferiblemente una matriz de sustitución BLOSUM50 con penalizaciones de apertura/extensión de hueco de -12/-2.

La identidad de secuencia según la presente invención se determina sobre la longitud completa de la secuencia de referencia.

El líquido de partida puede ponerse en contacto con dicha enzima capaz de catalizar la conversión de un azúcar en glucosa, por ejemplo una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa, en cualquier momento adecuado durante los procedimientos. Por tanto, esta etapa puede efectuarse antes de la etapa c). También es posible hacer esto simultáneamente a la etapa c). Es además posible hacer esto al mismo tiempo que se prepara el líquido de partida. Por tanto, el líquido de partida puede prepararse poniendo en contacto cualquier líquido adecuado con dicha enzima y opcionalmente uno o más compuestos adicionales.

En una realización de la invención, se prepara el líquido de partida poniendo en contacto un extracto de una planta o una fruta, p. ej. un extracto de malta, con una enzima capaz de catalizar la conversión de un azúcar en glucosa, por ejemplo una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa así como con una o más enzimas adicionales. La enzima capaz de catalizar la conversión de azúcar en glucosa puede ser en particular un glucano

5 1,4- $\alpha$ -glucosidasa, mientras que las enzimas adicionales pueden ser por ejemplo una o más seleccionadas de entre el grupo consistente en proteasas, pululanasa,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas,  $\beta$ -glucosidasas, pectinasas y celulasas.

La etapa b) de los procedimientos de la invención puede comprender en una realización poner en contacto el líquido de partida con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en enzimas clasificadas como EC

10 3.2.1.3, enzimas clasificadas como EC 3.2.1.1 y enzimas clasificadas como EC 3.2.1.41. En particular, la etapa b) de los procedimientos de la invención puede comprender en una realización poner en contacto el líquido de partida con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas,  $\alpha$ -amilasas y pululanasa, donde dicha glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y pululanasa puede ser cualquiera de las glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas,  $\alpha$ -amilasas y pululanasa descritas anteriormente en la presente memoria.

15 Las enzimas pueden proporcionarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo como polipéptidos recombinantes o purificarse de un organismo fuente. La enzima puede proporcionarse también en una mezcla enzimática o como un extracto bruto del organismo fuente. Los organismos fuente pueden ser, por ejemplo, *Aspergillus* spp. o *Rhizopus* spp. Este puede ser en particular el caso para glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas. El organismo fuente puede

20 ser también *Bacillus* spp. o *Lactobacillus* spp. Este puede ser en particular el caso para pululanasa. Están disponibles comercialmente preparaciones enzimáticas adecuadas por ejemplo en Novozyme, Dinamarca.

La etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 % del azúcar en el líquido de partida que no es glucosa

25 en glucosa.

Por tanto, la etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 98 % de la maltosa en el líquido de partida en glucosa, en particular cuando el líquido de

30 partida es mosto, la etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 98 % de la maltosa en dicho mosto en glucosa.

La etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un

35 98 % de la maltotriosa en el líquido de partida en glucosa.

La etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 98 % de la sacarosa en el líquido de partida en glucosa.

40 La etapa b) puede comprender convertir al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 98 % de la fructosa en el líquido de partida en glucosa.

Cuando dicho azúcar se convierte en glucosa con la ayuda de una enzima, la cantidad de azúcar convertido en

45 glucosa puede ajustarse ajustando el tiempo de tratamiento enzimático, la temperatura y/o la cantidad de enzima usada. El especialista será capaz de determinar un tiempo, temperatura y cantidad útiles para obtener la cantidad deseada de conversión de azúcar.

En otra realización de la invención, se efectúa la etapa b) con la ayuda de un microorganismo. Dicho

50 microorganismo debería ser capaz de catabolizar dicho azúcar para formar glucosa. Se prefiere además que dicho microorganismo sea capaz de excretar al menos parte de la glucosa formada al líquido circundante.

Se prefiere además que dicho microorganismo esté completamente desprovisto de proteasas extracelulares, es decir que dicho microorganismo no exprese ni excrete ninguna proteasa.

55 En realizaciones preferidas de la invención, la etapa b) comprende entonces convertir maltosa en glucosa. Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende maltosa y/o maltotriosa, por ejemplo en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta. Por tanto, la etapa puede comprender convertir maltosa en glucosa mediante la puesta en contacto del líquido de

60 partida con un microorganismo catabolizante de maltosa capaz de convertir maltosa en glucosa.

Preferiblemente, dicho microorganismo catabolizante de maltosa es capaz de excretar al menos parte de dicha glucosa. Más preferiblemente, dicho microorganismo catabolizante de maltosa es capaz de captar maltosa del líquido de partida, hidrolizar dicha maltosa a glucosa y excretar al menos parte de dicha glucosa.

5

El microorganismo catabolizante de maltosa puede ser cualquier microorganismo, pero en una realización es una bacteria. Es un ejemplo de un microorganismo catabolizante de maltosa útil *Lactobacillus sanfransiscensis*.

#### Incubación con microorganismo fermentador de glucosa

10

Los procedimientos de la invención pueden comprender una etapa c) de incubación del líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa.

La expresión "microorganismo fermentador de glucosa" como se usa en la presente memoria hace referencia a cualquier microorganismo capaz de convertir glucosa en alcoholes y/o ácidos en condiciones anaeróbicas. Preferiblemente, el microorganismo fermentador de glucosa es un microorganismo capaz de convertir glucosa en un ácido orgánico en condiciones anaeróbicas. Dicho ácido orgánico puede ser cualquiera de los ácidos orgánicos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Ácido orgánico". En particular, el ácido orgánico puede seleccionarse de entre el grupo consistente en ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido acético, ácido succínico, ácido isocítrico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido fumárico y ácido oxalacético. En una realización preferida, el ácido orgánico es ácido láctico.

Por consiguiente, en una realización preferida de la invención el microorganismo fermentador de glucosa es capaz de fermentar glucosa para obtener ácido láctico. Más preferiblemente, el microorganismo fermentador de glucosa es capaz de captar glucosa, convertir la glucosa en ácido láctico en condiciones anaeróbicas y excretar al menos algo de dicho ácido láctico.

El microorganismo fermentador de glucosa para usar con la presente invención puede seleccionarse preferiblemente de entre el grupo consistente en levadura y bacterias. En particular, el microorganismo fermentador de glucosa puede ser un microorganismo de pureza alimentaria, es decir un microorganismo que es aceptable para uso en la producción de alimentos y bebidas para seres humanos.

En una realización, se prefiere que el microorganismo fermentador de glucosa sea un microorganismo que no pueda crecer de manera significativa en cerveza, más preferiblemente dicho microorganismo no es capaz de crecer en cerveza. En particular, el microorganismo puede ser una bacteria incapaz de crecer en cerveza.

Se prefiere además que dicho microorganismo esté completamente desprovisto de proteasas extracelulares, es decir que dicho microorganismo no exprese ni excrete ninguna proteasa. En una realización, el microorganismo es levadura. Dicha levadura puede ser por ejemplo una levadura de la familia de Kluyveromyces, p. ej. *K. lactis* o *K. marxianus*. La levadura puede ser también cualquiera de las levaduras productoras de ácido orgánico descritas en Loureiro V, Malfeito-Ferreira M: Spoilage yeasts in the wine industry, International Journal of Food Microbiology 2003: 86: 23-50. Por ejemplo, la levadura puede ser de la familia de *Kloeckera*, *Dekkera* *Brettanomyces* o *Pichia*.

En una realización de la invención, la levadura puede seleccionarse de entre el grupo consistente en levaduras enumeradas en la tabla 1.

Tabla 1

Género	Especie
Ambrosiozyma van der Walt	A. philentoma
	A. platypodis
Cyniclomyces van der Walt et Scott	C. guttulatus
Debaryomyces	D. marama
	D. tamarai
	D. ranriji var. Vanriji
Guilliermondella Nadson et Krassinikov	G. selenospa
Hanseniaspora zikes	H. guilliermondii
	H. occidentalis
	H. osmophila
	H. uvarum

ES 2 701 765 T3

	H. valbyensis
	H. vineae
Hansenula H. et P. Sydow	H. alni
	H. americana
	H. beckii
	H. beijerinckii
	H. bimundalis
	H. californica
	H. canadensis
	H. capsulata
	H. dimennae
	H. holstii
	H. jadinii
	H. minuta
	H. petersonii
	H. polymorpha
	H. saturnus var. Saturnus
Issatchenkia Kudriavzev	I. occidentalis
	I. orientalis
	I. scutulata var. scutulata
	I. terricola
Kluyveromyces van der Walt emend van der Walt	K. delphensis
	K. phaffii
	K. africanus
	K. blattae
	K. waltii
	K. lodderi
	K. polysparus
	K. wickerhomii
	K. aestuarii
Metschnikowia Kamienski	M. bicuspidata var. bicuspidata
	M. lunata
	M. pulcherrima
	M. zobellii
Nadsonia Sydow	N. elongata
Pachysolen Boidin et Adzet	P. tannophilus
Pachytichospora van der Walt	P. transvaalensis
Pichia Hansen	P. abadieae
	P. amylophia
	P. besseyi
	P. bovis
	P. cactophila
	P. delftensis
	P. dispersa
	P. farinosa
	P. fermentans
Saccharomyces Meyen ex Reess	S. acetii
	S. capensis
	S. chevalieri
	S. coreanus
	S. globosus
	S. norbensis
	S. oleaceus
	S. servazzii

	S. telluris
	S. unisporus
Saccharomyces Hansen Synonym: Saccharomyces ludwigii Hansen var. vini Kroemer et Heinrich (1922)	S. ludwigii
Saccharomycopsis Schönning	S. crataegensis
	S. vini
Schizosaccharomyces Lindner	S. malide vorans
Torulaspora Lindner	T. globosa
Zygosaccharomyces Barkev	Z. bailii
	Z. bisporus
	Z. microellipsoides
	Z. mrakii
Leucosporidium Fell, Statzell, Hunter et Phaff	L. frigidum
	L. nivalis
Brettanomyces Kufferath et van Laer	B. abstinens
	B. custersianus
	B. naardensis
Candida Berkout	C. anatomiae
	C. apicola
	C. atlantica
	C. atmospherica
Kloeckera Janke	K. apiculata
	K. apis
	K. Corticis
	K. japonica
	K. javanica
Trichosporon Behrend	T. eriense
	T. fermentans

En una realización de la invención, el microorganismo fermentador de glucosa es una bacteria acidoláctica. La bacteria acidoláctica puede ser por ejemplo una bacteria del orden Lactobacillales. En particular, la bacteria acidoláctica puede ser una bacteria de un género seleccionado de entre el grupo consistente en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. En particular, la bacteria acidoláctica puede ser una bacteria de un género seleccionado de entre el grupo consistente en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*.

10 Por tanto, en una realización el microorganismo fermentador de glucosa puede ser un *Lactobacillus* seleccionado de entre el grupo consistente en *L. chungangensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum* y *L. raffinolactis*. Preferiblemente, el microorganismo fermentador de glucosa puede ser *Lactococcus lactis*.

Por tanto, en una realización el microorganismo fermentador de glucosa puede ser un *Lactobacillus* seleccionado de entre el grupo consistente en *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. antri*, *L. apodemi*, *L. aviarius*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. camelliae*, *L. casei*, *L. cateniformis*, *L. ceti*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. composti*, *L. concavus*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. crustorum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. dextrinicus*, *L. diolivorans*, *L. equi*, *L. equigenerosi*, *L. farraginis*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fornicalis*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. fuchuensis*, *L. gallinarum*, *L. gasserii*, *L. gastricus*, *L. ghanensis*, *L. graminis*, *L. hammesii*, *L. hamsteri*, *L. harbinensis*, *L. hayakitensis*, *L. helveticus*, *L. hilgardii*, *L. homohiochii*, *L. iners*, *L. ingluviei*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranoferens*, *L. kefirii*, *L. kimchii*, *L. kitasatonis*, *L. kunkeei*, *L. leichmannii*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. oligofermentans*, *L. oris*, *L. panis*, *L. pantheris*, *L. parabrevis*, *L. parabuchneri*, *L. paracollinoides*, *L. parafarraginis*, *L. parakefirii*, *L. paralimentarius*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. psittaci*, *L. rennini*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. rimae*, *L. rogosae*, *L. rossiae*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. satsumensis*, *L. secaliphilus*, *L. sharpeae*, *L. siliginis*, *L. spicheri*, *L. suebicus*, *L. thailandensis*, *L. ultunensis*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. versmoldensis*, *L. vini*, *L. vitulinus*, *L. zeae* y *L. zymae*, preferiblemente el *Lactobacillus* puede seleccionarse de entre el grupo consistente en *L. amylolyticus*, *L. delbrueckii* y *L. fermentum*.

Por tanto, en una realización el microorganismo fermentador de glucosa puede ser un *Pediococcus* seleccionado de entre el grupo consistente en *P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *P. stilesii*, preferiblemente el *Pediococcus* puede seleccionarse de entre el grupo consistente en *P. acidilactici*, *P. dextrinicus* y *P. pentosaceus*.

5

En una realización, el microorganismo fermentador de glucosa puede ser un *Gluconobacter*, tal como *Gluconobacter oxydans*. El *Gluconobacter*, y en particular *Gluconobacter oxydans*, es capaz de fermentar una serie de azúcares para formar un ácido orgánico. Por tanto, por ejemplo *Gluconobacter* y en particular *Gluconobacter oxydans* pueden ser capaces de fermentar una serie de azúcares incluyendo maltosa y glucosa para obtener ácido glucónico. Por tanto, en realizaciones de la invención donde el microorganismo fermentador de glucosa es un *Gluconobacter*, la etapa b) puede omitirse entonces de los procedimientos de la invención. Por consiguiente, *Gluconobacter* es un ejemplo de un microorganismo capaz de fermentar azúcar para formar un ácido orgánico.

El líquido puede incubarse con el microorganismo fermentador de glucosa de cualquier manera adecuada. En general, se efectúa la incubación en un envase cerrado o un recipiente cerrado. En una realización preferida, se efectúa la incubación en una o más cámaras definidas por dos membranas de intercambio iónico como se describe a continuación en la presente memoria en la sección AX-REED.

La incubación puede efectuarse durante cualquier cantidad de tiempo adecuada. En general, la incubación puede ser durante un intervalo de 12 h a 1 semana, por ejemplo durante un intervalo de 12 h a 48 h, tal como durante un intervalo de 12 h a 30 h, por ejemplo durante un intervalo de 20 a 28 h. En una realización de la invención donde se efectúan simultáneamente las etapas c) y d), se selecciona el tiempo de incubación para obtener un tiempo de retención deseado. El tiempo de incubación puede seleccionarse también para obtener un tiempo de contacto preferido como se describe a continuación en la presente memoria en la sección "Tiempo de contacto".

25

En particular, puede efectuarse la incubación hasta alcanzar un nivel de glucosa deseado. Por ejemplo, la etapa c) puede dar como resultado una reducción del nivel de glucosa de a como máximo 100 g/l, preferiblemente a como máximo 80 g/l, más preferiblemente a como máximo 60 g/l, aún más preferiblemente a como máximo 40 g/l.

La incubación puede efectuarse a cualquier temperatura adecuada. Preferiblemente, se selecciona la temperatura para que sea una temperatura apropiada para permitir el crecimiento del microorganismo fermentador de glucosa particular. En general, la temperatura estará en el intervalo de 15 a 40 °C, tal como en el intervalo de 20 a 35 °C, por ejemplo en el intervalo de 23 a 32 °C. Este puede ser el caso en particular cuando el microorganismo fermentador de glucosa es una bacteria acidoláctica tal como *Lactococcus lactis*.

35

#### **Procedimiento de producción de bebida con conversión enzimática de azúcar**

Es un aspecto de la invención proporcionar procedimientos para producir bebidas bajas tanto en azúcar como en alcohol. Esto se obtiene convirtiendo al menos parte del azúcar en el líquido de partida en un ácido orgánico y retirando al menos parte del ácido orgánico. El azúcar puede convertirse en un ácido orgánico con la ayuda de una enzima. Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

45 c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de azúcar para formar un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

50

Frecuentemente, los procedimientos comprenden también una etapa b) de conversión de cualquier azúcar que no sea glucosa en glucosa. En estas realizaciones, la etapa c) se relacionará con la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico.

55

En una realización de la invención, los procedimientos comprenden efectuar la etapa c). Por ejemplo, los procedimientos pueden comprender efectuar la etapa c) (ii). Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

60 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el

m micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y

5 c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

10 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

Dicha enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa en un ácido orgánico puede ser cualquiera de las enzimas o mezclas de enzimas descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Conversión enzimática de glucosa".

15

Dicho líquido de AX-REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final como se describe a continuación.

20 Estos procedimientos pueden comprender además la etapa e) y por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

25 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y

c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

30 d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido obteniendo así un líquido de AX-REED, mientras se retiene dicho al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,

35 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

40 Como se describe en otro lugar de la presente memoria, pueden efectuarse entonces las etapas d) y e) al menos de forma parcialmente simultánea, y por tanto en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

45 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y

c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido,

50 donde dicho orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y

e) al menos de forma parcialmente simultánea

55 retirar al menos parte de un catión del líquido de partida o del líquido parcialmente tratado con AX-REED, obteniendo así un líquido de REED, donde dicho líquido de REED retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

60 El líquido de CX-REED o líquido de REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final. Se prefiere que el líquido de CX-REED o el líquido de REED sea la bebida final o que la

bebida final se obtenga añadiendo uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED o líquido de REED.

Por tanto, el procedimiento puede comprender además una etapa f) de adición de uno o más compuestos adicionales al líquido de partida, el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED. En realizaciones de la invención que no contienen la etapa e), la etapa f) comprende entonces preferiblemente añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de AX-REED. En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y
- c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y
- d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- f) añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes, obteniendo así la bebida.

El procedimiento comprende también una etapa g) de adición de uno o más líquidos adicionales al líquido de AX-REED, o al líquido de CX-REED o al líquido de REED para obtener la bebida final. En particular, dichos líquidos adicionales pueden ser bebidas, de modo que la bebida final sea una mezcla entre el líquido de CX-REED y una bebida adicional o una mezcla entre el líquido de REED y una bebida adicional. Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y
- c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y
- d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes; y
- g) proporcionar un líquido adicional, por ejemplo una bebida, y mezclar dicho líquido de CX-REED con dicho líquido adicional, obteniendo así la bebida.

Dicho líquido adicional puede ser cualquiera de los líquidos adicionales anteriormente descritos en la presente memoria en la sección "Procedimiento de producción de bebidas fermentadas". Los procedimientos pueden ser útiles para preparar cerveza baja en alcohol, sidra baja en alcohol, vino bajo en alcohol y sidra baja en calorías como se describe anteriormente en la sección "Procedimiento de producción de bebidas fermentadas".

60

Está también comprendido en la presente invención que los procedimientos pueden comprender una etapa h) de procesamiento adicional del líquido de AX-REED o el líquido de CX-REED o el líquido de REED para obtener la bebida final. Dicho procesamiento adicional puede ser por ejemplo una etapa de incubación del líquido de AX-REED o el líquido de CX-REED o líquido de REED con uno o más microorganismos tales como levadura. Dichos procedimientos pueden comprender la etapa g) anteriormente descrita, y por tanto los procedimientos pueden comprender la incubación del líquido obtenido en la etapa g) con uno o más microorganismos tales como levadura. Los microorganismos para emplear en la etapa h) pueden ser en particular levadura, tal como levadura de panadería, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus*, anteriormente conocida como *S. carlsbergensis*. Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y
- b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e
- c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y
- d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales al líquido de CX-REED, preferiblemente uno o más compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo consistente en compuestos aromatizantes y conservantes; y
- h) incubar dicho líquido de AX-REED o dicho líquido de X-REED con uno o más microorganismos tales como levadura, opcionalmente seguido de la retirada de dicho microorganismo, obteniendo así la bebida.

Durante la etapa c), se genera un ácido orgánico y, durante la etapa d), se retira el menos algo de dicho ácido orgánico generado. Como se describe en otro lugar, las etapas c) y d) pueden efectuarse simultáneamente, y por tanto puede generarse ácido orgánico continuamente con la ayuda de dicha dichas enzimas, y al menos algo del ácido orgánico generado puede retirarse continuamente mediante dicho apilamiento de membranas de AX-REED. Aunque se retira al menos un 10 % del ácido orgánico, está contenido en la invención que se mantiene al menos algo del ácido orgánico generado en la bebida, y por tanto está comprendido en la invención que la bebida puede contener más ácido orgánico que el líquido de partida. Este es en particular el caso cuando el líquido de partida tiene un alto nivel de azúcar y un bajo nivel de ácidos orgánicos. Para alcanzar una relación apetecible entre azúcar y ácido orgánico, tal como cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico", puede ser preferible entonces que la bebida contenga más ácido orgánico que el líquido de partida. Por tanto, preferiblemente la bebida tiene una relación de azúcar a ácido orgánico como se describe a continuación en la presente memoria en la sección de "Relación de azúcar a ácido orgánico".

Los ácidos orgánicos pueden inhibir la actividad de ciertas enzimas. Por tanto, en realizaciones de la invención donde se efectúan simultáneamente la etapa c) y la etapa d), se prefiere retirar el ácido orgánico suficiente para que la enzima o enzimas mantengan al menos la mayoría de la actividad.

Se prefiere retirar al menos un 10 % del ácido orgánico generado durante la etapa d). Por tanto, por ejemplo, se retira preferiblemente en la etapa d) al menos un 15 %, por ejemplo al menos un 20 %, tal como al menos un 25 %, tal como al menos un 30 % del ácido orgánico generado en la etapa c). Dicho ácido orgánico puede ser cualquiera de los ácidos orgánicos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Ácido orgánico".

En particular, se prefiere retirar al menos un 10 % del ácido glucónico generado durante la etapa d). Por tanto, la etapa d) puede comprender en una realización preferida la retirada de al menos un 10 % del ácido glucónico, por ejemplo al menos un 15 % del ácido glucónico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido glucónico, tal como al menos un 25 % del ácido glucónico, tal como al menos un 30 % del ácido glucónico generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicha enzima o mezcla de enzimas catalizan la conversión de glucosa para formar ácido glucónico.

En particular, se prefiere retirar al menos un 10 % del ácido láctico generado durante la etapa d). Por tanto, la etapa

d) puede comprender en una realización preferida la retirada de al menos un 10 % del ácido láctico, por ejemplo al menos un 15 % del ácido láctico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido láctico, tal como al menos un 25 % del ácido láctico, tal como al menos un 30 % del ácido láctico generado en la etapa c). Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde dicha enzima o mezcla de enzimas catalizan la conversión de glucosa para formar ácido láctico.

En estas realizaciones de la invención, el micronutriente puede ser por ejemplo cualquiera de los micronutrientes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente"; y el azúcar puede ser por ejemplo cualquiera de los azúcares descritos en la sección "Azúcar", y la etapa d) puede efectuarse por ejemplo de cualquiera de los modos descritos en la sección "AX-REED", y la etapa e) puede efectuarse por ejemplo de cualquiera de los modos descritos en la sección "CX-REED". Dicha relación de azúcar a ácido orgánico puede ser cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico".

En particular, en realizaciones de la invención referentes a procedimientos de producción de bebidas con conversión enzimática de azúcar, se prefiere entonces seleccionar dicho micronutriente de entre el grupo consistente en minerales y vitaminas. De forma similar, en realizaciones de la invención referentes a procedimientos de producción de bebidas con conversión enzimática de glucosa, se prefiere entonces seleccionar dicho micronutriente de entre el grupo consistente en minerales y vitaminas, y en particular el grupo consistente en calcio, magnesio, hierro, vitamina B1 y vitamina B2. En particular, el micronutriente puede seleccionarse de entre el grupo de minerales y vitaminas descrito a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente".

El líquido de partida puede ser cualquier líquido útil para preparar una bebida. Se prefiere generalmente que el líquido de partida sea un producto natural. La expresión "producto natural" como se usa en la presente memoria hace referencia a un producto obtenido a partir de fuentes naturales por extracción en agua o por escurrido donde no se añaden productos químicos extra. Por tanto, en una realización el líquido de partida es un extracto, concentrado o un zumo de una planta o parte de planta donde no se ha añadido azúcar extra.

En realizaciones de la invención referentes a producir una bebida con conversión enzimática de azúcar, se prefiere que el líquido de partida tenga un nivel relativamente alto de uno o más azúcares, por ejemplo un alto nivel de uno o más de los azúcares descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Azúcar". Por tanto, el líquido de partida puede comprender por ejemplo más de un 10 %, por ejemplo más de un 9 %, tal como más de un 8 %, por ejemplo más de un 7 % de azúcar. Dichos porcentajes se dan como p/p.

En una realización de la invención, el líquido de partida es un líquido con un alto nivel de maltosa. Por tanto, el líquido de partida puede ser un líquido que contiene más de 40 g/l, tal como más de 50 g/l, por ejemplo más de 60 g/l de maltosa.

En particular, el líquido de partida puede ser un extracto de uno o más cereales. Dichos cereales pueden seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo, mijo, tritical, trigo sarraceno, fonio y quinona. Más preferiblemente, el cereal se selecciona de entre los grupos consistentes en cebada, trigo, centeno, avena, maíz y arroz, más preferiblemente el cereal es cebada.

El extracto puede ser un extracto del cereal per se, sin embargo, el cereal puede estar también malteado y el extracto puede ser un extracto del cereal malteado. Como se usa en la presente memoria, el término "malteado" hace referencia a los granos de cereal que se han sometido a remojo, se han dejado germinar y entonces han secado. Dicho secado puede ser por ejemplo secado en estufa.

Dicho extracto de cereal o cereal malteado es preferiblemente un extracto acuoso.

Por tanto, en una realización preferida de la invención, y en particular en realizaciones de la invención referentes a los procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar, el líquido de partida puede ser entonces un extracto de malta, tal como un extracto de malta de cebada. Más preferiblemente, el líquido de partida puede ser mosto. El líquido de partida puede ser también un extracto de una mezcla de malta de cebada y otros cereales.

En una realización particularmente preferida, el líquido de partida es mosto. Se entiende por el término "mosto" como se usa en la presente memoria un extracto líquido de malta. El mosto puede prepararse también incubando un extracto de cebada no malteada con una mezcla enzimática que hidroliza los componentes de la cebada. Además de dicha malta o extractos derivados de cebada, el mosto puede prepararse a partir de malta y componentes

adicionales, tales como material que contiene almidón adicional parcialmente convertido en azúcares fermentables. El mosto se obtiene en general por maceración, opcionalmente seguida de lavado.

5 El término "maceración" como se usa en la presente memoria hace referencia a la incubación de la malta molida en agua. La maceración se efectúa preferiblemente a una temperatura específica y en un volumen de agua específico. La maceración puede producirse en presencia de complementos, que se entiende que comprenden cualquier fuente de carbohidrato distinta de malta tal como, pero sin limitación, cebada no malteada, jarabes de cebada o maíz o arroz, como granos enteros o productos procesados como sémola, jarabes o almidón.

10 El término "lavado" como se usa en la presente memoria hace referencia a un proceso de extracción de azúcares residuales y otros compuestos de granos gastados después de macerar con agua caliente. El lavado se realiza típicamente en una cuba filtro, un filtro de maceración u otro aparato para permitir la separación del agua extraída de los granos gastados.

15 Se hace referencia generalmente al mosto obtenido después de maceración como "primer mosto", mientras que se hace referencia generalmente al mosto obtenido después de lavado como el "segundo mosto". Si no se especifica, el término mosto puede ser el primer mosto, segundo mosto o una combinación de ambos.

20 Por tanto, el líquido de partida puede ser mosto, tal como primer mosto, segundo mosto o una mezcla de los mismos.

25 Está comprendido también en la invención que el líquido de partida puede ser un extracto, un concentrado o un zumo de una planta o parte de planta que se ha tratado con una o más enzimas. Por ejemplo, dicho extracto, concentrado o zumo de una planta o parte de planta puede haberse tratado con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucosidasas, proteasas, pectinasas y celulasas. En realizaciones de la invención donde el líquido de partida es mosto, dicho líquido de partida puede haberse preparado empleando una etapa de tratamiento enzimático con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucosidasas, proteasas, pectinasas y celulasas, preferiblemente del grupo consistente en glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas, proteasas, pululaninas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, dextrinasas límite y  $\beta$ -glucosidasas. El tratamiento con glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasas puede considerarse como la etapa b) de los procedimientos de la invención. Dichas enzimas pueden emplearse en particular para degradar almidón para obtener azúcares tales como maltosa.

Sin embargo, en una realización se prefiere no añadir proteasas en ninguna etapa durante el procedimiento.

35 En ciertas realizaciones de la invención, el pH del líquido de partida puede ajustarse mediante la adición de base o ácido, tal como hidróxido de potasio o ácido láctico. Esto puede hacerse, por ejemplo, para iniciar el tratamiento enzimático a un pH donde la enzima tenga una buena actividad.

40 Los procedimientos de la invención pueden comprender por tanto varios tratamientos enzimáticos, p. ej. uno o más de los siguientes:

i) tratamiento con una o más enzimas para obtener un líquido de partida que comprende azúcar. Dichas enzimas pueden ser en particular enzimas capaces de catalizar la conversión de almidón para obtener azúcar. Se describen anteriormente en la presente memoria en esta sección ejemplos útiles de tales enzimas.

45 ii) Tratamiento con una o más enzimas capaces de catalizar la conversión de otros azúcares en glucosa, p. ej. enzimas capaces de catalizar la conversión de maltosa en glucosa. Este tratamiento enzimático puede constituir la etapa b) de los procedimientos de la invención. Se describen anteriormente en la presente memoria ejemplos útiles de tales enzimas en la sección "Conversión de azúcar en glucosa".

50 iii) Tratamiento con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico. Este tratamiento enzimático puede constituir la etapa c). Se describen anteriormente en la presente memoria ejemplos útiles de tales enzimas en la sección "Conversión enzimática de glucosa".

55 Estos tratamientos enzimáticos pueden efectuarse simultánea o secuencialmente. En particular, pueden efectuarse simultáneamente el tratamiento ii) y iii) que pueden constituir las etapas b) y c) de los procedimientos de la invención.

60 En una realización de la invención, el líquido de partida es un zumo de fruta o extracto que contiene un alto nivel de azúcar. En particular, el líquido de partida puede ser un zumo de fruta o extracto que contiene naturalmente un alto nivel de azúcar, tal como más de 40 g/l, tal como más de 50 g/l, por ejemplo más de 60 g/l de azúcar. Dicho zumo de fruta puede ser por ejemplo zumo de uva, zumo de pera o zumo de manzana. Los procedimientos de la invención

pueden usarse para producir una bebida apetecible con contenido de azúcar reducido en comparación con el zumo o extracto de fruta, mientras se retienen uno o más micronutrientes valiosos.

5 En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta, el líquido de partida comprenderá entonces altos niveles de maltosa, y en estas realizaciones de la invención, los procedimientos comprenden preferiblemente una etapa de conversión de al menos algo de dicha maltosa en glucosa.

Por consiguiente, es también un aspecto de la invención proporcionar procedimientos de preparación de una bebida, donde los procedimientos comprenden las etapas de

10

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y maltosa, donde dicho líquido de partida por ejemplo puede comprender o incluso consistir en un extracto y/o mosto de malta; y

b) convertir al menos algo de dicha maltosa en glucosa, por ejemplo por incubación con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa; y

15 c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,

20 donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED) como se describe a continuación en la presente memoria en la sección "AX-REED"

y opcionalmente el procedimiento comprende además una o ambas de las etapas e) y f) como se esboza anteriormente.

25 La etapa b) de conversión de maltosa en glucosa puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos anteriormente en la sección "Conversión de azúcar en glucosa", y en particular la etapa b) puede comprender poner en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa como se describe en la sección "Conversión de azúcar en glucosa".

30 La etapa c) de los procedimientos para producir una bebida con conversión enzimática de glucosa puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Conversión enzimática de glucosa".

La etapa b) y la etapa c) pueden efectuarse secuencialmente, efectuando primero la etapa b) y entonces la etapa c).

35 Sin embargo, está también comprendido en la invención que la etapa b) y la etapa c) pueden efectuarse simultáneamente o al menos de forma parcialmente simultánea. Por ejemplo, cuando se efectúa la etapa b) con la ayuda de una enzima como se describe en la sección "Conversión de azúcar en glucosa" a continuación en la presente memoria, puede añadirse entonces la enzima al líquido de partida junto con dicha enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico. Cuando se efectúa la etapa b) con la ayuda de un microorganismo tal como un microorganismo catabolizante de maltosa como se describe en la

40 sección "Conversión de azúcar en glucosa" a continuación en la presente memoria, puede incubarse entonces simultáneamente el líquido de partida con dicho microorganismo y con dicha enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para obtener un ácido orgánico. En realizaciones de la invención donde se efectúa la etapa b) con la ayuda de un microorganismo, se prefiere efectuar la etapa b) y la etapa c) simultáneamente.

45

Las etapas c) y d) pueden efectuarse también secuencialmente, efectuando primero la etapa c) y entonces la etapa d). Sin embargo, se prefiere efectuar la etapa c) y la etapa d) simultáneamente, o al menos en forma parcialmente simultánea. Por tanto, puede incubarse el líquido con dicha enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico y simultáneamente se retira el menos algo de dicho ácido orgánico del líquido. Por tanto, a medida que se produce el ácido orgánico por la reacción catalizada enzimáticamente, se retira entonces del líquido, asegurando un nivel bajo constante de dicho ácido orgánico en el líquido. Esto puede evitar la reducción o inhibición de la actividad enzimática debida a altos niveles de producto y/o debida a las condiciones ácidas.

55 Por consiguiente, las etapas b), c) y d) pueden efectuarse todas simultáneamente. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c) y d) simultáneamente.

La etapa d) puede efectuarse antes que la etapa e), sin embargo está contenido también en la invención que las etapas d) y e) pueden efectuarse simultáneamente.

60

En una realización preferida de la invención, se efectúan simultáneamente las etapas d) y e). Por tanto, en esta realización pueden efectuarse las etapas de realización b), c), d) y e) todas simultáneamente. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c), d) y e) simultáneamente. Las etapas d) y e) pueden efectuarse en particular simultáneamente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dichos apilamientos de membranas de AX-REED y dichos de CX-REED están conectados en paralelo.

En todavía otra realización muy preferida de la invención, se efectúan las etapas d) y e) de forma parcialmente simultánea. En esta realización, la etapa d) puede efectuarse por ejemplo durante un periodo de tiempo dado, después del cual se efectúan ambas etapas d) y e) simultáneamente. Por tanto, pueden retirarse uno o más iones ácidos del líquido mediante AX-REED durante un periodo de tiempo dado, después del cual se retiran ambos iones ácidos y al menos un catión respectivamente mediante AX-REED y CX-REED, donde se efectúan AX-REED y CX-REED simultáneamente. Por tanto, en esta realización pueden efectuarse las etapas de realización b), c), d) y e) todas al menos de forma parcialmente simultánea. Como alternativa, la etapa b) puede efectuarse primero, y pueden efectuarse entonces las etapas c), d) y e) al menos de forma parcialmente simultánea. Cuando las etapas d) y e) se efectúan al menos de forma parcialmente simultánea, esto se hace preferiblemente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dicho apilamiento de membranas de AX-REED y dicho de CX-REED están conectados en paralelo.

En una realización de la invención, se prefiere no añadir azúcar al líquido de partida y, además, se prefiere no añadir azúcar en ninguna etapa durante el procedimiento. Además, se prefiere no añadir azúcar a la bebida final.

En algunas realizaciones de la invención, los procedimientos no comprenden una etapa b), sino que en lugar de ello comprenden una etapa c) donde se convierte cualquier azúcar para formar un ácido orgánico con la ayuda de enzimas. Por tanto, los procedimientos pueden comprender una etapa c) de incubación del líquido de partida con una enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de azúcar para formar un ácido orgánico. Dicha enzima o mezcla de enzimas puede ser por ejemplo una enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de maltosa para formar un ácido orgánico. En particular, la enzima o mezcla de enzimas pueden ser capaces de catalizar la conversión de maltosa para formar ácido maltobiónico. Este es en particular el caso en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un alto nivel de maltosa, p. ej. cuando el líquido de partida comprende o incluso consiste en un extracto de cereal, p. ej. cuando el líquido de partida es mosto.

Está comprendido en la invención que cualquiera de los procedimientos puede comprender como última etapa la etapa i) de adición de CO<sub>2</sub> para obtener una bebida carbonatada.

### Conversión enzimática de glucosa

En realizaciones de la invención referentes a procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de glucosa, los procedimientos de la invención comprenden una etapa de incubación de un líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico.

Dicho líquido puede ser el líquido de partida. Dicho líquido puede ser también un líquido obtenido después de tratar el líquido de partida para convertir al menos algo del azúcar que no es glucosa en glucosa. Dicho líquido puede ser también el líquido de partida que, simultáneamente a la incubación con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico, se trata también para convertir al menos algo del azúcar que no es glucosa en glucosa.

Dicha enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico puede comprender cualquier enzima que sea capaz de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico.

En una realización preferida de la invención, la enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico comprende o incluso consiste en una glucosa oxidasa.

La glucosa oxidasa para usar con la presente invención es en general una enzima clasificada como EC 1.1.3.4. Por tanto, la glucosa oxidasa para usar con la presente invención es una oxidoreductasa que es capaz de catalizar la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y D-glucono-5-lactona. Esta en particular, la glucosa oxidasa para usar con la presente invención, es una enzima capaz de catalizar la siguiente reacción.

$\beta$ -D-glucosa + O<sub>2</sub> → D-glucono-1,5-lactona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La D-glucono-1,5-lactona se hidroliza en agua hasta ácido glucónico. Por tanto, en un entorno acuoso, la conversión de glucosa catalizada por glucosa oxidasa conduce a la formación de ácido glucónico. En los procedimientos de la invención, la enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico se emplean en general en un entorno acuoso, y por tanto la enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico pueden comprender o incluso consistir en glucosa oxidasa.

La glucosa oxidasa puede ser cualquier glucosa oxidasa útil. Por ejemplo, la glucosa oxidasa puede ser glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* o *Penicillium amagasakiense*. En una realización, la glucosa oxidasa es una glucosa oxidasa de SEQ ID NO: 10 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. La glucosa oxidasa puede comprender también o incluso consistir en los aa 23-605 de la SEQ ID NO: 10 o un homólogo funcional de los aa 23-605 de SEQ ID NO: 10 que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. La glucosa oxidasa puede ser también una glucosa oxidasa de SEQ ID NO: 11 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. Es un homólogo funcional de una glucosa oxidasa dada un polipéptido capaz de catalizar la reacción:



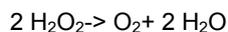
y que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada con una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de referencia.

La glucosa oxidasa puede ser también una de las glucosa oxidasas comercialmente disponibles, tal como Hyderase disponible en Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Nagoya, Japón. Es una ventaja de la Hyderase que comprende también actividad catalasa. Por tanto, la Hyderase contiene tanto actividad glucosa oxidasa como catalasa.

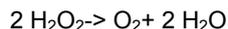
Además, pueden usarse las glucosa oxidasas descritas en los documentos GB1.373.562, US4.675.191 y US 20120114791 con la presente invención.

Como se señala anteriormente, la reacción catalizada por glucosa oxidasa pueden conducir también a la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En general, no es deseable que las bebidas contengan altos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y, por tanto, en realizaciones de la invención que implican el uso de glucosa oxidasa, se prefiere que los procedimientos comprendan también una etapa de retirada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por ejemplo, la enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico pueden contener también una actividad catalasa.

La catalasa para usar con la presente invención puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Por tanto, la catalasa puede ser una enzima clasificada como EC 1.11.1.6. En particular, la catalasa puede ser una enzima que cataliza la siguiente reacción:



La catalasa puede ser cualquier catalasa útil. Por ejemplo, la catalasa puede ser catalasa de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* o *Bos taurus* (en particular de hígado de *Bos taurus*). En una realización, la catalasa es una catalasa de SEQ ID NO: 12 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma. Es un homólogo funcional de una catalasa dada un polipéptido capaz de catalizar la reacción:



y que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada con una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de referencia.

Ha de entenderse que puede usarse cualquier glucosa oxidasa en el procedimiento de acuerdo con la invención, a condición de que la glucosa oxidasa exhiba una actividad y estabilidad razonables al pH y temperatura reinantes durante la conversión de la glucosa. Por tanto, pueden usarse tanto preparaciones de glucosa oxidasa solubles como inmovilizadas, aunque se prefieren habitualmente preparaciones de glucosa oxidasa solubles. Son válidas las mismas consideraciones para la catalasa, si se usa.

Se señala aquí que airear el líquido, p. ej. el líquido de partida, con oxígeno es ventajoso durante la conversión de glucosa en ácido glucónico. No se ha encontrado que la aireación sea perjudicial para el sabor de la bebida.

- 5 La temperatura durante la conversión enzimática de la glucosa puede ser, por ejemplo, de entre 10 y 40 °C, preferiblemente entre 10 y 30 °C.

Como se describe anteriormente en la presente memoria en la sección "Procedimiento para producir una bebida con conversión enzimática de azúcar", el ácido glucónico formado puede retirarse entonces continuamente mediante AX-  
10 REED. Por tanto, la reacción no se inhibe por acumulación de ácido glucónico.

En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, se suministra oxígeno continuamente al líquido incubado con la enzima o mezcla de enzimas que contiene una glucosa oxidasa. El suministro de oxígeno tiene una influencia beneficiosa notable sobre la tasa de reacción de la reacción enzimática. Por tanto, la  
15 introducción continua de oxígeno asegura una alta tasa de reacción. El oxígeno puede suministrarse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo puede suministrarse oxígeno mediante una bomba de aire, el medio más eficiente para introducir oxígeno en el líquido.

La enzima o mezcla de enzimas puede contener también, además de la glucosa oxidasa y la catalasa, actividades  
20 enzimáticas adicionales. Sin embargo, se prefiere generalmente no añadir glucosa isomerasa a ninguno de los líquidos durante los procedimientos de la invención. Por tanto, se prefiere no añadir ninguna enzima clasificada como EC 5.3.1.5 a ninguno de los líquidos durante los procedimientos de la invención.

Se prefiere también retirar el ácido glucónico generado durante los procedimientos de la invención por AX-REED en  
25 lugar de precipitación. Por tanto, se prefiere que los procedimientos de la invención no comprendan la adición de una sustancia formadora de una sal escasamente soluble de ácido glucónico, tal como carbonato de calcio.

En ciertas realizaciones de la invención, el líquido de AX-REED o líquido de CX-REED o líquido de REED puede someterse a una fermentación. En algunas realizaciones de la invención, sin embargo, se prefiere no someter  
30 ninguno del líquido de AX-REED, ni el líquido de CX-REED ni el líquido de REED a una fermentación alcohólica. Por tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos de la invención no comprenden una etapa de fermentación generadora de alcohol.

La conversión enzimática de glucosa se emprende preferiblemente de manera que se retire suficiente glucosa del  
35 líquido. Esto puede obtenerse por ejemplo ajustando la cantidad de enzima y/o el tiempo de incubación. El especialista será capaz de seleccionar una cantidad adecuada de enzima y un tiempo de incubación adecuado. En particular, se prefiere que la etapa c) de los procedimientos de la invención dé como resultado una reducción del nivel de glucosa de al menos un 20 %, preferiblemente de al menos un 30 %, más preferiblemente de al menos un 40 %, aún más preferiblemente de al menos un 50 %, todavía más preferiblemente de al menos un 60 %, aún más  
40 preferiblemente de al menos un 70 %.

#### **Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana**

Se describen procedimientos para la producción de una bebida sin fermentación bacteriana. Dichos procedimientos  
45 comprenden en general solo una etapa de retirada de ácidos orgánicos de un líquido de partida para obtener una bebida. Por consiguiente, estos procedimientos son principalmente aplicables a líquidos de partida que contienen ácido orgánico, es decir que contienen un alto nivel de uno o más ácidos orgánicos.

Por tanto, se describe un procedimiento de preparación de una bebida donde el procedimiento comprende las  
50 etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un ácido orgánico; y
- d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho  
al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,  
55 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

En general, el líquido de partida tiene al menos cierto dulzor y, por tanto, el líquido de partida contiene frecuentemente azúcar. Por ejemplo, el líquido de partida puede contener glucosa. Por tanto. Se describen  
60 procedimientos de producción de bebidas donde los procedimientos comprenden las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y
  - d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,
- 5 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membrana de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

Dicho líquido de AX-REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente hasta la bebida final.

- 10 Este procedimiento puede comprender además la etapa e), y por tanto se describe un procedimiento de preparación de una bebida donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y
- 15 d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene dicho al menos un 65 % de dicho
- 20 al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

Dicho líquido de CX-REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final.

- 25 Como se describe en otro lugar de la presente memoria, las etapas d) y e) pueden efectuarse de forma al menos parcialmente simultánea. Por tanto, se describe un procedimiento de preparación de una bebida donde el procedimiento comprende las etapas de

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y
- 30 d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido, donde dicho orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED); y
- e) retirar de forma al menos parcialmente simultánea al menos parte de un catión del líquido de partida o el líquido
- 35 tratado parcialmente por AX-REED, obteniendo así un líquido de REED, donde dicho líquido de REED retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

- 40 Dicho líquido de REED puede ser la bebida final o puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida final.

- Por tanto, este procedimiento puede contener también una etapa adicional f) de adición de uno o más compuestos adicionales al líquido de partida, el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED. En realizaciones que no contienen la etapa e), se prefiere entonces añadir el compuesto o compuestos adicionales al
- 45 líquido de AX-REED. El procedimiento puede comprender las etapas de:

- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y
- d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho
- 50 al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED),
- e) retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,
- 55 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y
- f) añadir uno o más compuestos adicionales, preferiblemente añadir uno o más compuestos aromatizantes y/o conservantes, obteniendo así la bebida.

- 60 El procedimiento comprende también una etapa g) de adición de uno o más líquidos adicionales al líquido de AX-

REED, o al líquido de CX-REED o al líquido de REED para obtener la bebida final. En particular, dichos líquidos adicionales pueden ser bebidas, de modo que la bebida final sea una mezcla entre el líquido de CX-REED y una bebida adicional o una mezcla entre el líquido de REED y una bebida adicional. Por tanto, se describe un procedimiento de preparación de una bebida donde el procedimiento comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y  
 d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED,  
 10 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED),  
 e) retirar al menos un 10 % de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,  
 15 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y  
 f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales, preferiblemente añadir uno o más compuestos aromatizantes y/o conservantes; y  
 g) proporcionar un líquido adicional, por ejemplo una bebida, p. ej. un zumo de fruta, y mezclar dicho líquido de CX-REED con dicho líquido adicional, obteniendo así la bebida.

20 En estas realizaciones, el líquido de partida contiene ya ácido orgánico y la etapa d) se refiere a retirar al menos algo de dicho ácido orgánico, reduciendo así el contenido de ácido del líquido de partida para obtener una bebida apetecible. Preferiblemente, la bebida tiene una relación de azúcar a ácido orgánico como se describe a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico", y por consiguiente se  
 25 prefiere retirar suficiente ácido orgánico para alcanzar dicha relación.

Por tanto, se retira durante la etapa d) al menos un 10 % de al menos un ácido orgánico, por ejemplo al menos un 15 % de al menos un ácido orgánico, por ejemplo al menos un 20 % de al menos un ácido orgánico, tal como al menos un 25 % de al menos un ácido orgánico, tal como al menos un 30 % de al menos un ácido orgánico. Más  
 30 preferiblemente, se retira durante la etapa d) al menos un 10 % de al menos dos ácidos orgánicos, por ejemplo al menos un 15 % de al menos dos ácidos orgánicos, por ejemplo al menos un 20 % de al menos dos ácidos orgánicos, tal como al menos un 25 % de al menos dos ácidos orgánicos, tal como al menos un 30 % de al menos dos ácidos orgánicos. Por ejemplo, se retira durante la etapa d) al menos un 10 % de todos los ácidos orgánicos, por ejemplo al menos un 15 % de todos los ácidos orgánicos, por ejemplo al menos un 20 % de todos los ácidos  
 35 orgánicos, tal como al menos un 25 % de todos los ácidos orgánicos, tal como al menos un 30 % de todos los ácidos orgánicos.

En una realización, se describe que se retira durante la etapa d) al menos un 10 % del ácido cítrico, por ejemplo al menos un 15 % del ácido cítrico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido cítrico, tal como al menos un 25 % del  
 40 ácido cítrico, tal como al menos un 30 % del ácido cítrico. Este es particularmente el caso cuando el líquido de partida comprende ácido cítrico.

En otra realización, se describe que se retira durante la etapa d) al menos un 10 % del ácido málico, por ejemplo al menos un 15 % del ácido málico, por ejemplo al menos un 20 % del ácido málico, tal como al menos un 25 % del  
 45 ácido málico, tal como al menos un 30 % de ácido málico. Este es particularmente el caso cuando el líquido de partida comprende ácido málico.

Dicho micronutriente puede ser cualquiera de los micronutrientes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutrientes". En particular, en realizaciones referentes a los procedimientos de producción de  
 50 bebidas sin fermentación bacteriana, se prefiere entonces seleccionar dicho micronutriente de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas y antioxidantes y en particular de entre el grupo de minerales, vitaminas y antioxidantes descrito a continuación en la presente memoria en la sección "Micronutriente".

El líquido de partida puede ser cualquier líquido útil para preparar una bebida. Se prefiere que el líquido de partida  
 55 sea un líquido que es útil como bebida aparte de tener un contenido demasiado alto de ácidos orgánicos. Se prefiere generalmente que el líquido de partida sea un producto natural. La expresión "producto natural" como se usa en la presente memoria hace referencia a un producto obtenido a partir de fuentes naturales por extracción en agua o por escurrido donde no se añaden productos químicos extra. Por tanto, en una realización el líquido de partida es un extracto o un zumo de una planta o parte de planta donde no se ha añadido azúcar extra.

60

Por tanto, en una realización el líquido de partida es un zumo de fruta, tal como un zumo de una fruta cítrica. La fruta cítrica puede seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en naranja, lima, pomelo, limón, mandarina, satsuma, toronja, lima australiana y kumquat. El líquido de partida puede ser zumo de limón. El líquido de partida puede ser también un zumo de bayas, tal como zumo de grosella. El líquido de partida puede ser también un zumo de verdura, tal como zumo de tomate o zumo de zanahoria.

En otra realización del líquido de partida, es un zumo de fruta fermentado. Por ejemplo, el líquido de partida puede seleccionarse de entre el grupo consistente en zumo de manzana fermentado y zumo de pera fermentado.

10 En todavía otra realización, el líquido de partida es un extracto de una fruta, por ejemplo el líquido de partida puede ser un extracto de una fruta seleccionada de entre el grupo consistente en rosa mosqueta, endrina, grosella y baya de cuervo.

Se describe también que el líquido de partida puede ser un extracto, un concentrado o un zumo de una planta o parte de planta que se ha tratado con una o más enzimas. Por ejemplo, dicho extracto, concentrado o zumo de una planta o parte de planta puede haberse tratado con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en glucosidas, proteasas, pectinasas y celulasas. En realizaciones donde el líquido de partida es un zumo de fruta, un extracto de fruta o un concentrado de fruta, el líquido de partida puede haberse preparado entonces empleando una etapa de tratamiento enzimático con una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo consistente en pectinasas y celulasas.

El líquido de partida puede ser también una mezcla de uno o más de los zumos, extractos y concentrados anteriormente mencionados.

25 El ácido orgánico puede ser cualquier ácido contenido en el líquido de partida. En particular, el ácido orgánico puede ser cualquiera de los ácidos orgánicos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Ácido orgánico". Preferiblemente, el ácido orgánico puede seleccionarse de entre el grupo consistente en ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido acético, ácido succínico, ácido isocítrico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido fumárico y ácido oxalacético. En realizaciones donde el líquido de partida es un zumo de fruta cítrica, el ácido orgánico puede ser entonces en particular ácido cítrico. En realizaciones donde el líquido de partida es zumo de manzana fermentado o zumo de pera fermentado, el ácido orgánico puede ser entonces en particular ácido málico.

Como se describe anteriormente en la presente memoria, es una ventaja de los procedimientos descritos en la presente memoria que las bebidas preparadas según los procedimientos sean bajas en calorías, y en particular bajas en azúcar. Por tanto, en realizaciones que no comprenden una etapa de fermentación, se prefiere entonces que el líquido de partida no tenga un alto nivel de azúcar. Por tanto, se prefiere que el líquido de partida contenga como máximo un 10 %, preferiblemente como máximo un 9 %, todavía más preferiblemente como máximo un 8 %, por ejemplo como máximo un 7 % de azúcar. Más preferiblemente, la concentración combinada de glucosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa en el líquido de partida es como máximo de un 10 %, preferiblemente como máximo un 9 %, todavía más preferiblemente como máximo un 8 %, por ejemplo como máximo un 7 %. Se prefiere también que el líquido de partida contenga como máximo un 10 %, preferiblemente como máximo un 9 %, todavía más preferiblemente como máximo un 8 %, por ejemplo como máximo un 7 % de glucosa. Dichos porcentajes se proporcionan todos como p/p.

45 La relación de azúcar a ácido orgánico puede ser cualquiera de las relaciones descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico".

La etapa f) comprende añadir uno o más compuestos adicionales. Dichos compuestos adicionales pueden seleccionarse preferiblemente de entre el grupo consistente en azúcares, compuestos aromatizantes, conservantes y agua.

Se prefiere que las bebidas preparadas mediante los procedimientos descritos en la presente memoria sean bajas en azúcar y por tanto, en realizaciones donde se añade azúcar, se prefiere que las bebidas resultantes contengan como máximo un 10 %, preferiblemente como máximo un 9 %, todavía más preferiblemente como máximo un 8 %, por ejemplo como máximo un 7 % de azúcar, preferiblemente como máximo un 10 %, preferiblemente como máximo un 9 %, todavía más preferiblemente como máximo un 8 %, por ejemplo como máximo un 7 % de glucosa.

El compuesto aromatizante puede ser cualquiera de los compuestos aromatizantes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Compuestos aromatizantes".

60

La etapa d) de los procedimientos descritos en esta sección puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "AX-REED".

La etapa e) de los procedimientos descritos en esta sección puede efectuarse de cualquiera de los modos descritos a continuación en la presente memoria en la sección "CX-REED".

Las etapas d) y e) pueden efectuarse simultánea o secuencialmente, sin embargo se efectúa preferiblemente la etapa d) antes que la etapa e).

10 Se describe que las etapas d) y e) pueden efectuarse simultáneamente. Las etapas d) y e) pueden efectuarse en particular simultáneamente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dichos apilamientos de membranas de AX-REED y dichos de CX-REED están conectados en paralelo.

15 Se describe que las etapas d) y e) pueden efectuarse de forma parcialmente simultánea. En esta realización, la etapa d) puede efectuarse por ejemplo durante un periodo de tiempo dado, después del cual se efectúan ambas etapas d) y e) simultáneamente. En particular, la etapa d) puede efectuarse hasta conseguir un pH predeterminado deseable para la bebida final, después de lo cual pueden efectuarse simultáneamente ambas etapas d) y e). Por tanto, pueden retirarse uno o más iones ácidos del líquido mediante AX-REED durante un periodo de tiempo dado,

20 después del cual se retiran ambos iones ácidos y al menos un catión respectivamente mediante AX-REED y CX-REED, donde se efectúan AX-REED y CX-REED simultáneamente. Cuando se efectúa AX-REED sola, los iones ácidos se retiran continuamente, aumentando así el pH. Cuando se efectúan AX-REED y CX-REED en paralelo, puede mantenerse entonces preferiblemente el pH relativamente estable. Por tanto, la AX-REED puede efectuarse hasta alcanzar un pH deseado, después de lo cual pueden efectuarse AX-REED y CX-REED en paralelo hasta

25 alcanzar una conductividad deseada. Cuando las etapas d) y e) se efectúan al menos de forma parcialmente simultánea, esto se hace preferiblemente usando un equipo de REED que contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dicho apilamiento de membranas de AX-REED y dicho de CX-REED están conectados en paralelo. Por consiguiente, se describen procedimientos para preparar una bebida, comprendiendo dichos procedimientos las etapas de

30

a) proporcionar un líquido de partida (p. ej., un zumo de fruta o un extracto de fruta) que comprende al menos un micronutriente, al menos un ácido orgánico y glucosa; y

d) retirar al menos un 10 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido,

35 donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED),

y donde dicho proceso se continúa hasta alcanzar un pH predeterminado,

e) retirar simultáneamente al menos parte de un ácido orgánico y al menos parte de un catión del líquido obtenido en la etapa d) mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo

40 así un líquido de REED,

donde

dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de

45 intercambio aniónico (AX-REED); y

dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED); y

donde dicho proceso se continúa hasta alcanzar una conductividad predeterminada,

50 f) añadir opcionalmente uno o más compuestos adicionales, preferiblemente añadir uno o más compuestos aromatizantes y/o conservantes; y

g) opcionalmente proporcionar un líquido adicional, por ejemplo una bebida, p. ej. un zumo de fruta, y mezclar dicho líquido de CX-REED con dicho líquido adicional.

55 Dicho pH predeterminado se selecciona preferiblemente para conseguir una bebida final con una relación deseable de azúcar a ácido orgánico. En particular, dicha relación de azúcar a ácido orgánico puede ser cualquiera de las relaciones de azúcar a ácido orgánico descritas a continuación en la presente memoria en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico". En realizaciones referentes a bebidas relativamente ácidas, tales como zumo de limón, dicho pH predeterminado puede estar entonces en el intervalo de 3 a 5, tal como en el intervalo de 3 a 4, por

60 ejemplo pH aprox. 3,5.

La conductividad predeterminada puede ser por ejemplo una conductividad en el intervalo de 3 a 5, preferiblemente en el intervalo de 3 a 4, tal como aprox. 3,5.

5 Se prefiere también que el pH no supere pH 4 en ningún momento durante el procedimiento, más preferiblemente que el pH no supere pH 4,5 en ningún momento durante el procedimiento, todavía más preferiblemente que el pH no supere pH 5 en ningún momento durante el procedimiento. En una realización, el pH no supera pH 3,5 en ningún momento durante el procedimiento. Este puede ser en particular el caso cuando el líquido de partida es un zumo o extracto de fruta o baya.

10

Se prefiere también que el pH no sea significativamente mayor que dicho pH predeterminado en ningún momento durante el proceso. Por tanto, el pH es preferiblemente no más de un 20 % mayor, preferiblemente no más de un 15 % mayor que el pH predeterminado en cualquier momento durante el proceso. Esto puede asegurarse, por ejemplo, ejecutando la CX-REED en paralelo con la AX-REED.

15

El término "aprox." se usa en la presente memoria para indicar  $\pm 10 \%$ , preferiblemente  $\pm 5 \%$ .

### Compuesto de aroma

20 Es una ventaja de los procedimientos de la invención retener generalmente uno o más compuestos de aroma presentes en el líquido de partida en el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED, el líquido de REED y las bebidas finales preparadas mediante los procedimientos. Por tanto, el líquido de REED retiene un compuesto o compuestos de aroma del líquido de partida, y por tanto también la bebida final retiene un compuesto o compuestos de aroma del líquido de partida. Cuál compuesto de aroma esté presente en la bebida final dependerá por supuesto

25 de los compuestos de aroma presentes en el líquido de partida. Es una ventaja de la presente invención que la bebida final puede retener tener un sabor similar al líquido de partida, pero con un contenido reducido de ácido y/o azúcar.

En realizaciones de la invención que no comprenden una etapa c), la bebida final será entonces en general similar al

30 líquido de partida, excepto por ser menos ácida. Como se describe anteriormente, el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED, el líquido de REED y las bebidas finales preparadas mediante los procedimientos de la invención pueden retener al menos un micronutriente, y preferiblemente varios micronutrientes. Además, el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED, el líquido de REED y/o las bebidas finales retienen también compuestos de aroma.

35 Por tanto, en una realización la invención se refiere a un procedimiento de producción de una bebida que comprende las etapas de:

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un compuesto de aroma y al menos un ácido orgánico; y

40 d) retirar al menos un 15 % de dicho al menos un ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene dicho al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente y al menos un 65 % de dicho al menos un compuesto de aroma en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

45 En una realización, la invención se refiere también a un procedimiento de producción de una bebida que comprende las etapas de

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un compuesto de aroma y al menos un azúcar; y

50 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente y al menos un 65 % de dicho al menos un compuesto de aroma en dicho líquido,

55 obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

Además, la invención se refiere a un procedimiento de producción de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

60

a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente, al menos un compuesto de aroma y al menos un azúcar; y

b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa por ejemplo poniendo en contacto el líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la conversión del azúcar particular en cuestión en glucosa; y

c) incubar dicho líquido con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

d) retirar al menos un 15 % de dicho ácido orgánico de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente y al menos un 65 % de dicho al menos un compuesto de aroma en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

Todos los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en esta sección "Compuestos de aroma" pueden contener además una etapa e).

e) Retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente y al menos un 65 % de dicho al menos un compuesto de aroma en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED,

donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

Todos los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en esta sección "Compuestos de aroma" pueden corresponder a cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en las secciones "Procedimiento de producción de una bebida", "Procedimientos de producción de una bebida fermentada", "Procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar" y "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", excepto porque el líquido de partida comprende además al menos un compuesto de aroma y se retiene al menos un 65 % de dicho compuesto de aroma durante ambos tratamientos de AX-REED y CX-REED. Por tanto, en relación con los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en esta sección "Compuestos de aroma", pueden efectuarse las etapas a), b), c), d) y e) de cualquiera de los modos descritos anteriormente en la presente memoria en las secciones "Procedimiento de producción de una bebida", "Procedimientos de producción de una bebida fermentada", "Procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar" y "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", siendo la única diferencia que el líquido de partida debe comprender al menos un compuesto de aroma y que se retiene al menos un 65 % de dicho compuesto de aroma en el líquido de AX-REED y/o el líquido de CX-REED y/o el líquido de REED.

Por tanto, los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en esta sección "Compuestos de aroma" pueden contener también una o más de las etapas f), g), h) e i) como se describen en la presente memoria en las secciones "Procedimiento de producción de una bebida", "Procedimientos de producción de una bebida fermentada", "Procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar" y "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana".

La etapa d) puede comprender retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido. En particular, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 80 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido.

Por tanto, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 90 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido. Por ejemplo, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres compuestos de aroma diferentes en dicho líquido. Por tanto, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en dicho líquido.

Los procedimientos de la invención pueden comprender también una etapa de e) retirar al menos una parte de un catión del líquido de AX-REED o del líquido de partida o del líquido parcialmente tratado con AX-REED, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido. En particular, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, el líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de partida, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido. Por tanto, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, el

líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de partida, mientras se retiene al menos un 90 % de al menos un compuesto de aroma en dicho líquido.

5 Por ejemplo, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, el líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de partida, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres compuestos de aroma diferentes en dicho líquido. Por tanto, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, el líquido de partida o el líquido parcialmente tratado con AX-REED, mientras que retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres compuestos de aroma diferentes en dicho líquido.

10 En ciertas realizaciones de la invención, se efectúan las etapas d) y e) de forma al menos parcialmente simultánea. Puede hacerse referencia al líquido resultante en estas realizaciones como "líquido de REED". Se prefiere que el líquido de REED retenga al menos un 65 % de al menos un compuesto de aroma presente en el líquido de partida.

15 En particular las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos un compuesto de aroma en el líquido de REED.

20 Por tanto, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 90 % de al menos un compuesto de aroma en el líquido de REED.

25 Por ejemplo, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión de líquido de partida, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres compuestos de aroma diferentes en el líquido de REED.

30 Por tanto, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 10 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres compuestos de aroma en el líquido de REED.

35 El compuesto de aroma puede ser cualquier compuesto de aroma que sea deseable mantener en la bebida final. En general, el compuesto de aroma es un compuesto que contribuye significativamente a la características de sabor del líquido de partida. El especialista sabrá cuáles compuestos de aroma contribuyen a las características de sabor de un líquido de partida dado.

40 El compuesto de aroma es un compuesto químico que tiene un olor o efluvio. Un compuesto químico tiene un olor o efluvio cuando es suficientemente volátil para transportarse al sistema olfativo en la parte superior de la nariz. Generalmente, el compuesto de aroma es un compuesto orgánico con un peso molecular de menos de 300.

45 El compuesto de aroma puede ser por ejemplo un éster. Los ejemplos no limitantes de compuestos de aroma que son ésteres incluyen acetato de geranilo, formiato de metilo, propionato de metilo, propanoato de metilo, butirato de metilo, butanoato de metilo, butirato de etilo, butanoato de etilo, acetato de isoamilo, butirato de pentilo, butanoato de pentilo, pentanoato de pentilo, acetato de octilo, acetato de bencilo, antranilato de etilo, fructona, acetato de hexilo, metilfenilglicidato de etilo.

50 El compuesto de aroma puede ser también un terpeno o un terpenoide. Los terpenos son moléculas consistentes en unidades ligadas covalentemente de isopreno, y por tanto los terpenos tienen la fórmula molecular  $(C_5H_8)_n$ , donde n es el número de unidades de isopreno ligadas. Los terpenoides son terpenos que están modificados químicamente, tal como por oxidación o transposición del esqueleto carbonado.

55 Los ejemplos no limitantes de compuestos de aroma que son terpenos o terpenoides lineales incluyen geraniol, nerol, citral, lemonal, geranial, neral, citronelal, citronelol o linalool. Los ejemplos no limitantes de compuestos de aroma que son terpenos o terpenoides cíclicos incluyen limoneno o tujona.

El compuesto de aroma puede ser por ejemplo un compuesto aromático. En particular, el compuesto de aroma puede ser un compuesto aromático consistente en un anillo aromático de 6 miembros sustituido con uno o más sustituyentes. Los ejemplos no limitantes de compuestos de aroma que son compuestos aromáticos incluyen benzaldehído, cinamaldehído, etilmaltol, vainillina, anisol, anetol, estragol y timol.

Otros ejemplos no limitantes de compuestos de aroma incluyen furaneol, 1-hexanol, mentol, isovaleraldehído, aldehído anísico, dihidrojazmona, gamma-decalactona, gamma-nonolactona, delta-octalactona, lactona de jazmín,

lactona de massoia, lactona de vino, sotolona, mercaptano de toronja, furan-2-ilmetanotiol, fosfina o nerolina.

### Ácido orgánico

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido orgánico" hace referencia a cualquier ácido carboxílico. Preferiblemente, el ácido orgánico de acuerdo con la invención es alquílico  $C_{1-3}$  o alquenílico  $C_{1-3}$ , donde dicho alquilo  $C_{1-3}$  o alquenilo  $C_{1-3}$  está sustituido con n grupos -COOH, m grupos -OH y q grupos =O, donde n es un entero en el intervalo de 1 a 3, m es un entero en el intervalo de 0 a 2 y q es un entero en el intervalo de 0 a 1.

10 Preferiblemente, el ácido orgánico puede ser propilo sustituido con

1) 1 a 3 grupos -COOH, tal como con 3 grupos -COOH; y

2) 0 a 1 grupos -OH, tal como con 1 grupo -OH

o

15 el ácido orgánico puede ser etilo sustituido con

1) 1 a 2 grupos -COOH; y

2) 0 a 2 grupos -OH.

Preferiblemente, la expresión "ácido orgánico" como se usa en la presente memoria hace referencia a ácido láctico, 20 ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido acético, ácido succínico, ácido isocítrico, ácido  $\alpha$ -cetoglutámico, ácido fumárico y ácido oxalacético.

En una realización muy preferida de la invención, la expresión "ácido orgánico" como se usa en la presente memoria hace referencia a ácido láctico.

25

### Azúcar

Como se usa en la presente memoria, el término "azúcar" hace referencia colectivamente a monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.

30

Los monosacáridos tienen en general la fórmula química  $C_x(H_2O)_y$ , donde x es 3 a 7. Por tanto, los monosacáridos de acuerdo con la invención pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en triosa, tetrosa, pentosa, hexosa y heptosa. Preferiblemente el monosacárido es una hexosa.

35 Los disacáridos son dímeros de monosacáridos y los trisacáridos son trímeros de monosacáridos.

Preferiblemente, el término "azúcar" como se usa en la presente memoria hace referencia a fructosa, maltosa, maltotriosa, lactosa, sacarosa y glucosa.

### 40 Relación de azúcar a ácido orgánico

De forma interesante, los inventores han encontrado que ciertas relaciones de azúcar a ácidos orgánicos proporcionan bebidas que son particularmente apetecibles.

45 Por consiguiente, se prefiere que las bebidas preparadas mediante los procedimientos de la presente invención tengan una relación de azúcar a ácido orgánico en el intervalo de 1:2 a 60:1. En particular, la relación de azúcar a ácido orgánico puede estar en el intervalo de 5,5:1 a 10:1, más preferiblemente en el intervalo de 6:1 a 10:1, tal como en el intervalo de 7:1 a 9:1, por ejemplo en el intervalo de 8:1 a 9:1. La relación se calcula como concentración total de azúcar en g/l a concentración total de ácidos orgánicos en g/l.

50

Frecuentemente, una bebida puede ser apetecible cuando comprende una cantidad mínima de azúcar, mientras que añadir más azúcar no mejora el sabor. Por tanto, en general se prefiere que las bebidas de la invención comprendan el menor azúcar posible, pero seguir siendo apetecibles. Por tanto, las relaciones dadas en la presente memoria se refieren en general a bebidas que contienen el menor contenido de azúcar posible, pero siguen percibiéndose

55 apetecibles.

Para bebidas preparadas mediante procedimientos que incluyen la etapa c), la relación de azúcar a ácido orgánico en las bebidas puede estar entonces en el intervalo de 20:1 a 60:1, por ejemplo en el intervalo de 25:1 a 55:1. Sin embargo, se prefiere que la relación de azúcar a ácido orgánico esté en el intervalo de 5,5:1 a 10:1, más 60 preferiblemente en el intervalo de 6:1 a 10:1, tal como en el intervalo de 7:1 a 9:1, por ejemplo en el intervalo de 8:1

a 9:1. Este es en particular en caso cuando se preparan bebidas a partir de un líquido de partida que comprende un extracto y/o mosto de malta.

5 Para bebidas preparadas mediante procedimientos que no incluyen la etapa c), se prefiere entonces que la relación de azúcar a ácido orgánico esté en el intervalo de 1:2 a 10:1, tal como en el intervalo de 1:1,5 a 5:1, por ejemplo en el intervalo de 1,2:1 a 1:1,2. Este es en particular el caso cuando se preparan las bebidas a partir de un líquido de partida que comprende zumo de fruta o extracto de fruta, por ejemplo un zumo de fruta cítrica.

10 En particular, la relación de azúcar a ácidos orgánicos puede ser la relación de

I. la concentración total en g/l de monosacáridos y disacáridos a

II. la concentración total en g/l de ácidos orgánicos, que son alquílicos  $C_{1-3}$  o alquenílicos  $C_{-1,3}$ , donde dicho alquilo  $C_{1-3}$  o alqueno  $C_{-1,3}$  está sustituido con n grupos -COOH, m grupos -OH y q grupos =O, donde n es un entero en el intervalo de 1 a 3, m es un entero en el intervalo de 0 a 2 y q es un entero en el intervalo de 0 a 1.

15 Por ejemplo, la relación de azúcar a ácido orgánico puede ser la relación de

I. la concentración total en g/l de fructosa, maltosa, lactosa, sacarosa y glucosa a

20 II. la concentración total en g/l de ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido acético, ácido succínico, ácido isocítrico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido fumárico y ácido oxalacético.

En una realización de la invención, la relación de azúcar a ácido orgánico puede ser la relación de

I. la concentración total en g/l de glucosa a

25 II. la concentración total en g/l de ácido láctico.

En estas realizaciones de la invención, se prefiere que la relación de glucosa a ácido láctico esté en el intervalo de 5:1 a 10:1, más preferiblemente en el intervalo de 6:1 a 9:1, tal como en el intervalo de 7:1 a 8:1. Este es en particular el caso para procedimientos de la invención que comprenden una etapa c) y/o para procedimientos de la

30 invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta.

### Micronutriente

35 El término "micronutriente" como se usa en la presente memoria hace referencia a nutrientes requeridos por los seres humanos en pequeñas cantidades que el organismo mismo no puede producir. Por tanto, el término micronutriente no pretende incluir azúcares, proteínas y grasas, ni otros nutrientes que contienen calorías.

40 El micronutriente de acuerdo con la invención se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes.

45 Los procedimientos de la invención pueden comprender una etapa d) de retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos del líquido, mientras se retiene al menos algo de un micronutriente. En relación con cualquiera de los procedimientos de producción de una bebida descritos en la presente memoria, y en particular en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de bebida fermentada" y en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de bebidas con conversión enzimática de azúcar" y en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", la etapa d) puede ser como sigue:

50 La etapa d) comprende retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un micronutriente en dicho líquido,

donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

55 En particular, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

60 Por tanto, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido, mientras se retiene al menos un 90 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ion ácido se

retira mediante apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

Por ejemplo, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en dicho líquido,

donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

10 Por tanto, la etapa d) puede comprender retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos de dicho líquido, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED).

15 Los procedimientos de la invención pueden comprender también una etapa de e) retirar al menos un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene al menos algo de un micronutriente. En relación con cualquiera de los procedimientos de producción de una bebida descritos en la presente memoria, y en particular en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de bebida fermentada" y en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de bebidas con conversión enzimática de azúcar" y en relación con cualquiera de los procedimientos descritos en la sección "Procedimiento de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", la etapa e) puede ser como sigue:

La etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de al menos un micronutriente en dicho líquido,

25 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

En particular, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene dicho al menos un 80 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

Por tanto, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene dicho al menos un 90 % de al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

Por ejemplo, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

Por tanto, la etapa e) puede comprender retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED).

En ciertas realizaciones de la invención, se efectúan las etapas d) y e) de forma al menos parcialmente simultánea. Puede hacerse referencia al líquido resultante en estas realizaciones como "líquido de REED". Se prefiere que el líquido de REED retenga al menos un 65 % de al menos un micronutriente presente en el líquido de partida.

50 En particular las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos un micronutriente en el líquido de REED.

Por tanto, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 90 % de al menos un micronutriente en el líquido de REED.

Por ejemplo, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión de líquido de partida, mientras se retiene al menos un 65 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes diferentes en el líquido de REED.

Por tanto, las etapas d) y e) pueden comprender conjuntamente retirar al menos un 15 % de uno o más iones ácidos y al menos parte de un catión del líquido de partida, mientras se retiene al menos un 80 % de al menos dos, tal como al menos tres micronutrientes en el líquido de REED.

5

Cuando el micronutriente es una sal, puede ser por ejemplo fosfato o yoduro.

Cuando el micronutriente es un mineral, puede seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en potasio, hierro, calcio, cobalto, cromo, cobre, manganeso, magnesio, selenio, cinc, molibdeno y silicio. En realizaciones de la invención cuando el micronutriente es un mineral, se prefiere que dicho mineral sea un mineral cuya ingesta es beneficiosa para la salud humana. Por consiguiente, se prefiere que el micronutriente sea un mineral seleccionado de entre el grupo consistente en calcio, magnesio, hierro y sílice. En algunas realizaciones, se prefiere seleccionar el mineral de entre el grupo consistente en calcio, magnesio y hierro.

10

15 Cuando el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta, entonces el micronutriente puede ser en particular calcio, magnesio, potasio, silicio, hierro o cinc, más preferiblemente el micronutriente puede ser calcio, magnesio o hierro. Por tanto, se prefiere que al menos uno más preferiblemente al menos 2, aún más preferiblemente al menos 3 o todavía más preferiblemente todos de calcio, magnesio y hierro estén retenidos en el líquido durante la retirada de iones ácidos, y en realizaciones de la invención que contienen una etapa e), también durante la retirada de un catión.

20

Los micronutrientes pueden ser también vitaminas. Cuando el micronutriente es una vitamina, dicha vitamina puede seleccionarse preferiblemente de entre el grupo consistente en vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>3</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina E y vitamina K. En particular, el micronutriente puede seleccionarse de entre el grupo consistente en vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub>.

25

Cuando el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta, entonces el micronutriente puede ser en particular vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>3</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina E o vitamina K. Por tanto, se prefiere que al menos una más preferiblemente al menos 2, aún más preferiblemente al menos 3, todavía más preferiblemente al menos todas de vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>3</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina E o vitamina K se retengan en el líquido durante la retirada de iones ácidos, y en realizaciones de la invención que contienen una etapa e), también durante la retirada de un catión.

30

En realizaciones de la invención que implican una fermentación bacteriana, el micronutriente no es entonces preferiblemente una vitamina. En dicha realización, se prefiere que el micronutriente sea un mineral, tal como cualquiera de los minerales anteriormente mencionados.

35

En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta y donde los procedimientos no implican una fermentación bacteriana, p. ej. en cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en las secciones "Procedimiento de producción de bebidas con conversión enzimática de azúcar" y "Procedimientos de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", el micronutriente puede seleccionarse entonces por ejemplo de entre el grupo consistente en minerales y vitaminas. Dichos minerales pueden ser por ejemplo cualquiera de los minerales descritos anteriormente en la presente memoria. Las vitaminas pueden ser cualquiera de las vitaminas descritas anteriormente en la presente memoria, pero preferiblemente dichas vitaminas se seleccionan de entre el grupo consistente en vitamina B<sub>1</sub> y vitamina B<sub>2</sub>. Por tanto, en estas realizaciones se prefiere que se retenga al menos un 65 % de la vitamina B<sub>1</sub> en el líquido después de la etapa d). Se prefiere además que se retenga al menos un 65 % de la vitamina B<sub>1</sub> en el líquido después de la etapa e). Por tanto, se prefiere que la bebida final comprenda al menos un 65 % de la vitamina B<sub>1</sub> presente en el líquido de partida. Además, en estas realizaciones se prefiere que se retenga al menos un 65 % de la vitamina B<sub>2</sub> en el líquido después de la etapa d). Se prefiere además que se retenga al menos un 65 % de la vitamina B<sub>2</sub> en el líquido después de la etapa e). Por tanto, se prefiere que la bebida final comprenda al menos un 65 % de la vitamina B<sub>2</sub> presente en el líquido de partida.

45

50

En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta y donde los procedimientos no implican una fermentación bacteriana, p. ej. en cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria en las secciones "Procedimiento de producción de bebidas con conversión enzimática de azúcar" y "Procedimientos de producción de una bebida sin fermentación bacteriana", se prefiere entonces retener al menos un 65 % de al menos 2, más preferiblemente al menos 3, todavía más preferiblemente de todos los micronutrientes seleccionados de entre el grupo consistente en calcio, magnesio, hierro, vitamina B<sub>1</sub> y vitamina B<sub>2</sub> en el líquido durante la retirada de iones ácidos y, en realizaciones de la invención que contienen una

55

60

etapa e), también durante la retirada de un catión.

El micronutriente puede ser también antioxidantes tales como polifenoles. Dicho polifenol puede ser por ejemplo un flavonoide, tal como quercetina o catequina o una antocianina.

5

En una realización, es un micronutriente el nivel total de antioxidantes determinado usando un procedimiento de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Por tanto, se prefiere que la bebida final comprenda al menos un 65 % del nivel total de antioxidantes contenidos en el líquido de partida, donde el nivel total de antioxidantes se determina por el procedimiento de ORAC. En particular, el nivel total de antioxidantes puede determinarse usando ORAC-FL, preferiblemente como se describe en Dávalos et al, 2004, J.Agric.Food Chem., 52, pág. 48-54.

15 Cuando el líquido de partida comprende o consiste en un zumo de fruta y los procedimientos no implican una etapa de fermentación, se prefiere entonces que el micronutriente pueda ser en particular un mineral, una vitamina y/o un antioxidante. El mineral puede ser entonces en particular calcio, magnesio, sílice y/o hierro. Por tanto, se prefiere que al menos uno más preferiblemente al menos 2, aún más preferiblemente al menos 3 o todavía más preferiblemente todos de calcio, magnesio sílice y hierro estén retenidos en el líquido durante la retirada de iones ácidos, y en realizaciones de la invención que contienen una etapa e), también durante la retirada de un catión. En estas realizaciones, se prefiere también que la bebida final comprenda al menos un 65 % del nivel total de 20 antioxidantes contenidos en el líquido de partida.

Los procedimientos de acuerdo con la invención comprenden la retirada de iones ácidos y opcionalmente cationes, mientras se retiene al menos un micronutriente en el líquido y por tanto está presente en la bebida final. La expresión "retener dicho al menos un micronutriente" como se usa en la presente memoria significa que la 25 concentración de dicho al menos un micronutriente no ha disminuido más de un 10 %, por ejemplo la concentración de dicho micronutriente no ha disminuido más de un 5 % durante la ejecución de la etapa d), o en realizaciones de la invención que comprenden la etapa e), durante la ejecución entonces de las etapas d) y e). Aún más preferiblemente, "retener dicho al menos un micronutriente" significa que la concentración de dicho micronutriente es la misma o mayor después del desempeño de la etapa d) en comparación con el nivel de dicho micronutriente en el 30 líquido de partida. En realizaciones de la invención que comprenden la etapa e), se prefiere entonces que la expresión "retener dicho al menos un micronutriente" signifique que la concentración de dicho micronutriente es la misma o mayor después del desempeño de las etapas d) y e) en comparación con el nivel de dicho micronutriente en el líquido de partida.

35 Se prefiere que retener el nivel de al menos un micronutriente, preferiblemente de al menos dos micronutrientes, aún más preferiblemente de al menos 3 micronutrientes, tal como al menos 4 micronutrientes, por ejemplo al menos 5 micronutrientes, tal como al menos 6 micronutrientes durante los procedimientos de la invención.

Más preferiblemente, se prefiere retener el nivel de al menos un micronutriente, preferiblemente al menos dos 40 micronutrientes, aún más preferiblemente al menos 3 micronutriente durante los procedimientos de la invención, donde dichos micronutrientes se seleccionan de entre el grupo consistente en fosfato, yodo, potasio, hierro, calcio, cobalto, cromo, cobre, manganeso, magnesio, selenio, cinc, molibdeno, silicio, vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina E y vitamina K.

45 En una realización preferida de la invención, se retiene el nivel de al menos un micronutriente, preferiblemente de al menos dos micronutrientes, aún más preferiblemente al menos 3 micronutrientes durante los procedimientos de la invención, donde dichos micronutrientes se seleccionan de entre el grupo consistente en calcio, magnesio, potasio, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub>.

50 En una realización preferida de la invención, el líquido de partida comprende un extracto y/o mosto de malta y se retiene el nivel de al menos un micronutriente, preferiblemente al menos dos micronutrientes, aún más preferiblemente al menos 3 micronutrientes durante los procedimientos de la invención, donde dicho micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en calcio, magnesio, potasio, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub>.

55 En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un alto nivel de vitamina C, un micronutriente puede ser entonces vitamina C. Se prefiere retener al menos un 40 %, tal como al menos un 45 % de la vitamina C del líquido de partida en la bebida final. Por tanto, en realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende al menos 100 mg/l, tal como al menos 200 mg/l, por ejemplo al menos 300 mg/l, se prefiere entonces retener al menos un 40 %, tal como al menos un 45 %, de la vitamina C del líquido de partida en el líquido de CX- 60 REED o líquido de REED.

**AX-REED**

- Los procedimientos de la invención contienen una etapa de retirada de uno o más iones ácidos del líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED). Esta etapa se designa como etapa d) anteriormente en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, la expresión "retirar un ácido orgánico" hace referencia a retirar el ion ácido de dicho ácido orgánico.
- 10 La etapa d) implica retirar uno o más iones ácidos de dicho líquido, mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas
- 15 i) al menos una celda que consiste en:
1. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y
  2. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara para el líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas
- 20 ii) un conjunto de membranas terminales  
 iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
 iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas y donde la retirada implica las etapas de
- 25 i) insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; y  
 ii) insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y  
 iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
 iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.
- 30 En general, la etapa d) implica retirar al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15 %, por ejemplo al menos un 20 %, tal como al menos un 25 %, tal como al menos un 30 % de uno o más iones ácidos.
- Puede hacerse referencia a esta etapa como tratamiento de AX-REED. Puede hacerse referencia al líquido obtenido después del tratamiento de AX-REED como "líquido de AX-REED" en la presente memoria. En ciertas realizaciones de la invención, la etapa d) es entonces la última etapa del procedimiento, y en estas realizaciones el líquido obtenido después de tratamiento de AX-REED es la bebida. En otras realizaciones de la invención, el procedimiento implica además una etapa e) de retirar al menos parte de un catión del líquido, mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED). Puede hacerse referencia a esto también como tratamiento de CX-REED. Puede hacerse referencia colectivamente a las etapas d) y e) como "tratamiento de REED" en la presente memoria.
- 35 Frecuentemente, las etapas d) y e) pueden efectuarse usando solo un aparato, al que puede hacerse referencia como "equipo de REED" en la presente memoria. El equipo de REED para usar con la presente invención puede configurarse en general para efectuar la etapa d) y la etapa e) en compartimentos separados. La expresión "equipo de REED" como se usa en la presente memoria comprende al menos un apilamiento de membranas de AX-REED. Preferiblemente, un equipo de REED según la presente invención comprende al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos un apilamiento de membranas de CX-REED.
- 45 Por tanto, las etapas d) y e) pueden efectuarse simultánea o secuencialmente, y preferiblemente ambas etapas d) y e) se efectúan usando equipo un REED configurado para efectuar ambas etapas d) y e). Se muestra una visión general de un equipo de REED adecuado en la figura 1 y en la figura 4, que ilustra una configuración de REED que puede preferirse en varias realizaciones de la presente invención. Sin embargo, es posible efectuar las etapas d) y e) usando equipos de REED separados, a los que puede hacerse referencia entonces como equipo de AX-REED y equipo de CX-REED, respectivamente.
- 50 Por tanto, el equipo de REED de acuerdo con la invención comprende preferiblemente al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos un apilamiento de membranas de CX-REED, que puede ser cualquiera de los apilamientos de membranas de AX-REED descritos a continuación en la presente memoria en esta sección y
- 60

cualquiera de los apilamientos de membranas de CX-REED descritos a continuación en la presente memoria en la sección de CX-REED. Aún más preferiblemente, el equipo de REED contiene al menos un apilamiento de membranas de AX-REED y al menos uno de CX-REED, donde dichos apilamientos de membranas de AX-REED y CX-REED están conectados en paralelo. Por tanto, el equipo de REED puede contener unos apilamientos de membrana de AX-REED y unos apilamientos de membrana de CX-REED conectados en paralelo.

10 Cuando se disponen dos o más apilamientos de REED en paralelo, el fluido tratado, es decir el líquido de partida desde un apilamiento de REED, no se conduce directamente al siguiente apilamiento de REED, como sería el caso si los dos apilamientos estuvieran conectados en serie.

10 Un sistema paralelo puede tener por ejemplo una AX-REED y una CX-REED conectadas a un depósito y/o tanque con un líquido de partida. La AX-REED recibe líquido de partida del depósito y/o tanque y se devuelve dicho líquido de partida al depósito y/o sistema después de tratarse en el apilamiento de AX-REED. Simultáneamente, o en otro momento, la CX-REED recibe líquido de partida o líquido parcialmente tratado con AX-REED o líquido de AX-REED del depósito y/o tanque y se devuelve dicho líquido al depósito y/o tanque después de tratarse en el apilamiento de CX-REED. Se entiende que el líquido puede recircularse al apilamiento de AX-REED y/o CX-REED desde el tanque. Tal líquido recirculado será en principio líquido tratado parcialmente con AX-REED y/o CX-REED. Por razones de simplicidad, puede hacerse referencia a las cámaras de apilamiento de membranas de AX-REED y CX-REED como "cámara para líquido de partida" aunque pueda introducirse también líquido parcialmente tratado con AX-REED y/o CX-REED en estas cámaras.

25 El equipo de REED puede comprender como alternativa más apilamientos de membranas de AX-REED que apilamientos de CX-REED, o el equipo de REED puede comprender más apilamientos de membranas de CX-REED que apilamientos de AX-REED. El número relativo de apilamientos de membranas de AX-REED/apilamientos de membranas de CX-REED puede variar para regular cuánto de un primer componente se retira del líquido respecto a cuánto de un segundo componente se retira del líquido. La relación entre primer componente retirado y segundo componente retirado puede ajustarse también proporcionando apilamientos de membranas de AX-REED y apilamientos de membranas de CX-REED de diferentes tamaños.

30 Un apilamiento de REED comprende al menos una cámara para líquido de partida y al menos dos cámaras para líquido de diálisis. La cámara o cámaras que contienen líquido de partida y las cámaras que contienen líquido de diálisis están dispuestas alternadamente lado con lado, es decir, un apilamiento de REED comprende al menos tres cámaras adyacentes activas: una cámara para líquido de diálisis, una cámara para líquido de partida y una cámara para líquido de diálisis. Cada interfase entre una cámara para líquido de partida y una cámara para líquido de diálisis está formada por membrana de intercambio aniónico, cuyas membranas de intercambio en los apilamientos de AX-REED son membranas de intercambio aniónico y en los apilamientos de CX-REED son membranas de intercambio catiónico.

40 Cada apilamiento de REED comprende también dos membranas terminales que definen una cámara de electrodo en cada extremo del apilamiento de REED, es decir, un apilamiento de REED con dos membranas terminales comprende al menos cinco cámaras adyacentes: una cámara de electrodo, una cámara para líquido de diálisis, una cámara para líquido de partida, una cámara para líquido de diálisis y una cámara de electrodo.

45 Ha de entenderse que, en realizaciones en que la etapa e) se efectúa después de la etapa d), en lo que atañe al apilamiento de membranas de CX-REED, la "cámara para líquido de partida" está de hecho llena con líquido de AX-REED. Además, ha de entenderse que, después de ejecutar AX-REED o CX-REED durante un tiempo, el líquido en la cámara para líquido de partida puede ser entonces líquido de partida parcialmente tratado con REED. En realizaciones donde el tratamiento con AX-REED se efectúa solo durante un tiempo seguido de AX-REED y CX-REED simultáneas en paralelo, el líquido insertado en la "cámara para líquido de partida" del apilamiento de membranas de CX-REED es de hecho líquido de partida parcialmente tratado con AX-REED. Por razones de simplicidad, se hace referencia a la cámara no obstante como "cámara para líquido de partida".

50 Cada cámara de electrodo puede estar formada por una membrana terminal y una pared terminal del apilamiento de REED.

55 En un apilamiento de REED con siete cámaras adyacentes, dos cámaras de electrodo y cinco cámaras activas se disponen como: una cámara de electrodo, una cámara para líquido de diálisis, una cámara para líquido de partida, una cámara para líquido de diálisis, una cámara para líquido de partida, una cámara para líquido de diálisis y una cámara de electrodo.

60

La Fig. 4 muestra un equipo de REED ejemplar 1 de acuerdo con la presente invención, dicho equipo de REED comprende un apilamiento de AX-REED 2 dispuesto en paralelo con un apilamiento de CX-REED 3. Ambos apilamientos de AX-REED y CX-REED están conectados con un tanque 4 que contiene el líquido por la tubería 5 y con un sistema de fluido 6a y 6b, que proporciona y conduce líquidos de diálisis hacia y desde los apilamientos de REED. El sistema de fluido 6a es para proporcionar el líquido de diálisis para usar con AX-REED, mientras que el sistema de fluido 6b es para proporcionar el segundo líquido de diálisis. Al inicio del proceso, el tanque 4 contiene el líquido de partida, más adelante el tanque contiene el líquido parcialmente tratado con AX-REED y/o tratado con CX-REED. Al final del proceso, el tanque 4 contiene el líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED.

10 El apilamiento de AX-REED comprende un primer electrodo 7 y segundo 8 dispuestos para proporcionar un campo eléctrico a través de cinco cámaras activas entre los electrodos, es decir a través de las cámaras alternadas con líquido de diálisis 9 y líquido de partida 10 formadas por las membranas. En el presente apilamiento ejemplar, las cámaras alternadas están formadas por

- 15 • una membrana terminal 11a que define por un lado una primera cámara de electrodo 7a y por el lado opuesto una primera cámara 9 para líquido de diálisis,
- una primera membrana de intercambio aniónico 12a que, junto con la primera membrana terminal, define la primera cámara,
- 20 • una segunda membrana de intercambio aniónico 12b que, junto con la primera membrana de intercambio aniónico, forma una segunda cámara 10a para líquido de partida,
- una tercera membrana de intercambio aniónico 12c que, junto con la segunda membrana de intercambio aniónico, forma la tercera cámara 9b para líquido de diálisis,
- una cuarta membrana de intercambio aniónico 12d que, junto con la tercera membrana de intercambio aniónico,
- 25 forma la cuarta cámara 10b para líquido de diálisis,
- una segunda membrana terminal 11b que, junto con la cuarta membrana de intercambio aniónico, forma una quinta cámara 9c para líquido de diálisis.

El primer y segundo electrodos se disponen en una primera cámara de electrodo 7a y segunda 8a respectivamente.

30 Dicha primera cámara de electrodo está definida por una primera pared terminal (indicada por línea de puntos) y la primera membrana terminal y dicha segunda cámara de electrodo está definida por la segunda pared terminal (también indicada por línea de puntos) y la segunda membrana terminal.

Las membranas de intercambio 12a-12d pueden ser preferiblemente de mismo tipo, así como las dos membranas 35 terminales pueden ser también idénticas.

De forma similar, el apilamiento de CX-REED comprende dos electrodos 13 y 14, uno a cada lado de unos apilamientos de membrana, siendo dichos apilamientos de membranas una primera membrana terminal 15a, cuatro membranas de intercambio catiónico 16a-16d y una segunda membrana terminal 15b. Dichas membranas, junto con 40 las paredes terminales, forman una primera cámara de electrodo 13a, una primera cámara para líquido de diálisis 17a, una primera cámara para líquido de partida 18a, una segunda cámara para líquido de diálisis 17b, una segunda cámara para líquido de partida 18b, una tercera cámara para líquido de diálisis 17c y una segunda cámara de electrodo 14a.

45 En el presente ejemplo, el líquido de diálisis puede ser cualquiera de los líquidos de diálisis para usar con AX-REED descritos en esta sección, y el segundo líquido de diálisis puede ser cualquiera de los segundo líquidos de diálisis descritos en la sección "CX-REED".

50 Está también comprendido en la presente invención que las etapas b), c), d) y e) pueden efectuarse simultáneamente. Esto puede hacerse por ejemplo en el equipo de REED. Está también comprendido en la invención que las etapas c), d) y e) se efectúan simultáneamente. Esto puede hacerse por ejemplo en el equipo de REED. En particular, esto puede hacerse usando un equipo de REED que contiene unos apilamientos de membrana de AX-REED y unos apilamientos de membrana de CX-REED conectados en paralelo.

55 El equipo de REED puede contener también más un apilamiento de membranas de AX-REED conectados en serie, donde dichos apilamientos de membranas de AX-REED están conectados en paralelo con al menos un apilamiento de membranas de CX-REED. El equipo de REED puede contener también más de un apilamiento de membranas de AX-REED conectados en serie, y más de un apilamiento de membranas de CX-REED conectados en serie, donde dichos apilamientos de membranas de AX-REED y apilamientos de membranas de CX-REED están conectados 60 entre sí en paralelo.

En algunas realizaciones de la invención, los procedimientos no comprenden las etapas b) y c), en cuyo caso la etapa d) se efectúa generalmente después de la etapa a). En otras realizaciones de la invención, los procedimientos no comprenden las etapas b) y c) pero comprenden una etapa e), en cuyo caso la etapa d) se efectúa generalmente después de la etapa a) y antes que la etapa e), donde las etapas d) y e) pueden repetirse p número de veces, siendo p un entero en el intervalo de 1 a 5.

La etapa d) de los procedimientos de la invención implica el uso de uno o más apilamientos de membranas de AX-REED, donde cada uno de dichos apilamientos de membranas contiene

v) al menos una celda que consiste en:

1. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y
2. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara para el líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas

v) un conjunto de membranas terminales

vi) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos

vii) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dichos apilamientos de membrana.

Por tanto, independientemente de si los iones de campo eléctrico serán capaces de moverse desde la cámara que define el líquido de partida a cualquiera de las cámaras para el líquido de diálisis.

Cada apilamiento de membranas de AX-REED puede comprender más de una celda como se identifica anteriormente. Por ejemplo, cada apilamiento de membranas de AX-REED puede comprender en el intervalo de 2 a 100 celdas, tal como en el intervalo de 2 a 50 celdas, tal como en el intervalo de 2 a 25 celdas.

La retirada del ion ácido implica típicamente las etapas de

- i) insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; y
- ii) insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y
- iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;
- iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

La AX-REED puede efectuarse en circulación, lo que significa que, después de la incubación del líquido de partida en dicha cámara, el líquido resultante puede retirarse de la cámara e insertarse más tarde en otra cámara para líquido de partida o incluso en la misma cámara para líquido de partida. Cuando se inserta en la misma cámara, frecuentemente entonces el líquido de diálisis en dichas dos cámaras adicionales se ha intercambiado por un líquido de diálisis reciente.

Cuando se emplea más de un apilamiento de membranas, el líquido de partida puede insertarse en cada una de las cámaras para líquido de partida separadamente. Como alternativa, pueden estar conectadas algunas o todas dichas cámaras, de modo que puedan alimentarse simultáneamente algunas o todas las cámaras. De forma similar, el líquido de diálisis puede insertarse en cada una de las cámaras para líquido de diálisis separadamente. Como alternativa, pueden estar conectadas algunas o todas dichas cámaras, de modo que se alimenten simultáneamente algunas o todas las cámaras.

El ion ácido para retirar puede ser, por ejemplo, el anión de cualquier ácido orgánico, por ejemplo el anión de cualquiera de los ácidos orgánicos descritos anteriormente en la presente memoria en la sección "Ácido orgánico".

Durante la retirada de dicho ion ácido, las dos membranas que rodean la cámara para líquido de partida facilitan el transporte de iones fuera del líquido de partida o al líquido de partida desde el líquido de diálisis.

La dirección del campo eléctrico se cambia a intervalos. Cada inversión de la dirección del campo eléctrico da como resultado un restablecimiento a corto plazo de los perfiles de polarización de los iones afectados en la superficie y dentro de las membranas, a medida que las dos membranas que rodean cada compartimento de alimentación intercambian funciones. Esto causa una inversión a corto plazo del proceso de separación a medida que los iones que se han retirado anteriormente se hacen retroceder a la solución de alimentación hasta restablecer los perfiles de

membrana. Es ventajoso mantener los intervalos entre inversiones de corriente en un apilamiento de REED cualquiera todo el tiempo que permita la acumulación de suciedad, ya que cada inversión introduce un corta pausa de separación e introduce una pequeña inestabilidad de proceso.

- 5 Los procedimientos de la invención pueden implicar el uso de más de un apilamiento de membranas de AX-REED. Los apilamientos de membranas pueden apilarse (comúnmente separados por espaciadores de membrana) uno sobre otro o uno al lado de otro hasta conseguir suficiente área de separación de membrana. Con fines de manejo, operativos y de mantenimiento viables, los apilamientos de membrana pueden funcionar en varios apilamientos de membrana separados de tamaño práctico, cada uno con su propio conjunto de conexiones de flujo y electrodos, pero con la misma función de separación. Estos apilamientos funcionan conjuntamente en paralelo o en serie o alguna combinación de los mismos como parte del mismo sistema de separación. Es ventajoso funcionar con múltiples apilamientos de membranas de AX-REED cuando se usa más de un conjunto de electrodos. El número de apilamientos de membranas de AX-REED puede variar por tanto de 2 a varios cientos, dependiendo del proceso en cuestión, pero está típicamente en el intervalo de 2-50 apilamientos de membranas de AX-REED, más típicamente en el intervalo de 4-20 apilamientos de membranas.

- El líquido de diálisis para usar con AX-REED de acuerdo con la invención puede ser cualquier solución alcalina. Típicamente, es una solución acuosa de un catión-OH, donde dicho catión puede ser típicamente el catión de un metal. Por ejemplo, el líquido de diálisis puede comprender una o más bases seleccionadas de entre el grupo consistente en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , KOH y NaOH, preferiblemente el grupo consistente en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  y KOH. El líquido de diálisis contendrá típicamente dicha base a una concentración en el intervalo de 5 a 80 %, preferiblemente en el intervalo de 10 a 70 %, más preferiblemente en el intervalo de 20 a 60 %, por ejemplo en el intervalo de 30 a 50 %. En ciertas realizaciones, dicha base se usa a una concentración en el intervalo de 5 a 20 %. Este puede ser en particular el caso cuando el líquido de diálisis se usa solo una vez. Todos los porcentajes se proporcionan como p/p.

- En el caso de AX-REED, se extraen los iones ácidos mediante una membrana de intercambio aniónico en cada celda del apilamiento de membranas de AX-REED, mientras que entran típicamente iones hidróxido a través de la membrana de intercambio aniónico opuesta. Cuando se invierte la dirección del campo eléctrico, los iones ácidos extraídos dentro de la primera membrana mencionada se hacen retroceder al líquido de partida, antes de que los iones hidróxido empiecen a entrar en el líquido de partida. Por tanto, en el corto periodo de tiempo hasta restablecer el perfil de hidróxido a través de la membrana que se había usado anteriormente para extraer iones ácidos, no se observa control del pH. La longitud de la fase temporal después de cada inversión de corriente hasta que se regenera el control del pH depende de diversas condiciones de proceso y propiedades de membrana; típicamente, lleva entre 10-90 segundos antes que el proceso funcione de nuevo con un control óptimo de parámetros de proceso. Esto se registra como un cambio repentino en el parámetro de proceso, p. ej. pH, que debe entonces regularse de vuelta al punto establecido deseado. Para diseminar los efectos de la inestabilidad y reducir el impacto global de las inversiones de corriente con más de un apilamiento de membranas, se efectúan preferiblemente de forma asincrónica las inversiones del campo eléctrico en cada apilamiento separado. Por tanto, se prefiere que la invención emplee más de un apilamiento de membranas de AX-REED y que el campo eléctrico se invierta de forma asincrónica en cada apilamiento separado. Aunque los intervalos para reservar el campo eléctrico de cada apilamiento son típicamente de longitud similar, el ritmo de las inversiones se dispersa para un mejor efecto de estabilidad del proceso.

- 45 En una realización de la invención, se invierte la dirección del campo eléctrico en cualquier primer apilamiento de membranas sustancialmente a intervalos de dispersión regulares respecto a las inversiones para cualquier segundo o adicional apilamiento de membranas.

- La longitud del intervalo entre inversiones de corriente para un apilamiento se elige típicamente con respecto a la acumulación de suciedad de membrana. Típicamente, dicho intervalo en un apilamiento de REED cualquiera pueden estar en el intervalo de 5-6000 segundos, preferiblemente 8-3000 segundos, más preferiblemente 10-2000 segundos y aún más preferiblemente 100-1500 segundos.

- En otra realización de la invención, se invierte la dirección del campo eléctrico en cualquier primer apilamiento de membranas a intervalos de dispersión de longitud sustancialmente uniforme respecto a la inversiones para cualquier segundo o adicional apilamiento de membranas para maximizar el tiempo entre una inversión de corriente de cualquier primer apilamiento de REED y cualquier segundo o adicional apilamiento de REED en el mismo proceso. Con la misma longitud de intervalo de dispersión entre inversiones de corriente, es decir cuando estas inversiones se dispersan uniformemente, el biorreactor conectado experimentará un impacto reducido, pero mucho más a menudo.

En una realización de la invención, se ajusta la intensidad del campo eléctrico aplicado en respuesta al pH, concentración del ion diana o conductividad de dicha composición líquida. Al aumentar la intensidad del campo eléctrico, aumenta el intercambio iónico en el sistema de REED, y viceversa. Las medidas en línea, casi en línea (p. ej., retardadas en el tiempo) o secundarias (p. ej., usando medidas de conductividad o turbidez en línea para estimar la concentración de ion diana) de los parámetros del proceso que se regulan son entradas de un mecanismo de regulación de control, p. ej. software de control de PID, que a su vez regula la salida de las fuentes de alimentación de los electrodos de REED.

10 La inversión de corriente no es el único efecto que puede introducir desviaciones en el control de proceso. Para un control óptimo de los parámetros de proceso, puede ser ventajoso controlar la concentración de diversos iones en el líquido de diálisis así como el flujo y temperatura y el modo de funcionamiento. Con respecto a la temperatura, en realizaciones de la invención donde se efectúan simultáneamente las etapas c) y d), la temperatura se selecciona entonces típicamente para permitir el crecimiento de dicho microorganismo fermentador de glucosa.

15 Si se usan múltiples apilamientos, es posible configurar el flujo del líquido de diálisis en modo paralelo o en serie con o sin bombas auxiliares entre apilamientos, de forma similar que con el líquido de partida.

En realizaciones de la invención donde los procedimientos comprenden la etapa c), la REED de intercambio aniónico (AX-REED) sirve en general para reemplazar los ácidos orgánicos producidos por iones hidróxido y, por tanto, contrarrestar la reducción de pH por la formación de ácido. Mediante la regulación de la AX-REED, el intercambio de hidróxido puede mantener el pH durante la fermentación sin necesidad de adición de neutralizante.

20 En realizaciones de la invención donde los procedimientos no comprenden la etapa c), la AX-REED sirve entonces en general para reemplazar los ácidos orgánicos ya presentes en el líquido de partida por iones hidróxido, y por tanto aumentar el pH de la solución de partida.

En el contexto de esta invención, el término "inversión del campo eléctrico" o "inversión de corriente" significa el cambio de la polaridad de los electrodos de REED, dando como resultado la inversión de la dirección de la corriente continua eléctrica, lo que facilita la migración de iones a través de las membranas de intercambio iónico.

30 Las membranas de intercambio aniónico pueden ser cualquier membrana de intercambio aniónico útil. El tamaño de las membranas puede seleccionarse para conseguir un tiempo de retención adecuado. Para calcular el tiempo de retención, es de interés el área total de las membranas aniónicas usadas. Por consiguiente, si el procedimiento emplea el uso de muchos apilamientos de membranas y/o si cada apilamiento de membranas contiene muchas celdas, entonces puede reducirse el área de cada membrana.

Los ejemplos no limitantes de membranas de intercambio aniónico útiles incluyen Ionic AR103 (GE, EE. UU.), Neosepta ASM (Astom Corp., Japón), Fumatech FAB (anión)(Fumatech, Alemania) o Nafion N117 (anión)(Dupont).

40 Se describen también ejemplos no limitantes de procedimientos y equipos útiles para efectuar AX-REED en las solicitudes de patente europea EP 1347823, EP2349541 y EP2349540, todas las cuales se incorporan como referencia a la presente memoria.

#### 45 **CX-REED**

En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención comprenden además la etapa e), donde la etapa e) comprende retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED, mientras que se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas

i) al menos una celda que consiste en:

55 a. dos membranas de intercambio catiónico que definen una cámara para el líquido de AX-REED; y  
b. dos cámaras adicionales para un segundo líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de AX-REED en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas,

60 ii. un conjunto de membranas terminales,

iii. medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos,  
iv. medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dichos apilamientos de membrana y donde la retirada implica las etapas de

- 5 i) insertar el líquido de AX-REED (es decir, el líquido obtenido después del tratamiento con AX-REED) en la cámara para el líquido de AX-REED; y  
ii) insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para líquido de diálisis; y  
iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
iv) incubar dicho líquido de AX-REED en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

10 En realizaciones de la invención donde se efectúan simultáneamente AX-REED y CX-REED en paralelo, entonces al inicio del procedimiento el líquido para tratar por CX-REED es de hecho el líquido de partida. Por tanto, el apilamiento de membranas de CX-REED puede contener entonces

15 v) al menos una celda que consiste en:

- a. dos membranas de intercambio catiónico que definen una cámara para el líquido de partida; y  
b. dos cámaras adicionales para un segundo líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales  
20 pueden estar conectadas,

v. un conjunto de membranas terminales,  
vi. medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos,  
vii. medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dichos apilamientos de membrana,

25 y donde la retirada implica las etapas de

- i) insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de AX-REED; y  
ii) insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para líquido de diálisis; y  
30 iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

En algunas realizaciones, se efectúa la AX-REED primero y se efectúan entonces la AX-REED y CX-REED  
35 simultáneamente en paralelo. En estas realizaciones, se inserta entonces al inicio del tratamiento de CX-REED el líquido de AX-REED parcialmente tratado en la cámara para líquido de partida o la cámara para líquido de AX-REED. Por razones de simplicidad, puede hacerse referencia entonces no obstante a la cámara como cámara para líquido de partida o cámara para líquido de AX-REED.

40 Como se describe anteriormente, los procedimientos de la invención contienen una etapa de retirada de uno o más iones ácidos del líquido mediante unos apilamientos de membrana de AX-REED a un líquido de diálisis que contiene típicamente una base. Esto puede dar como resultado que el catión básico se transfiera del líquido de diálisis al líquido de partida y por lo tanto el procedimiento puede contener la etapa e), donde se retira el menos algo de dicho catión del líquido.

45 Puede hacerse referencia a esta etapa también como tratamiento de CX-REED. Como se describe anteriormente, puede efectuarse la etapa e) usando un equipo de REED. Se hace referencia en la presente memoria al líquido resultante de la etapa d) del procedimiento de la invención como "líquido de AX-REED". El líquido de AX-REED puede usarse como líquido de partida para la etapa e). Como alternativa, puede usarse un líquido tratado  
50 parcialmente con AX-REED como líquido de partida para la etapa e). También es posible que el líquido de partida para la etapa d) sea también el líquido de partida para la etapa e), cuando se efectúan simultáneamente la etapa d) y e).

La etapa e) de los procedimientos de la invención implica el uso de uno o más apilamientos de membranas de CX-  
55 REED, donde cada uno de dichos apilamientos de membranas contiene

v) al menos una celda que consiste en:

1. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de AX-REED, el líquido tratado parcialmente con AX-REED o el líquido de partida; y  
60 2. dos cámaras adicionales para un segundo líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están

colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas

viii) un conjunto de membranas terminales

- 5 ix) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
 x) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas.

Por tanto, independientemente de si los iones de campo eléctrico serán capaces de moverse desde la cámara que define el líquido de AX-REED, el líquido tratado parcialmente con AX-REED o el líquido de partida a cualquiera de  
 10 las cámaras para el segundo líquido de diálisis.

Cada apilamiento de membranas de CX-REED puede comprender más de una celda como se identifica anteriormente. Por ejemplo, cada apilamiento de membrana de CX-REED puede comprender en el intervalo de 2 a 100 celdas, tal como en el intervalo de 2 a 50 celdas, tal como en el intervalo de 2 a 25 celdas.

15 La retirada del catión implica típicamente las etapas de

- i) insertar el líquido de AX-REED, el líquido tratado parcialmente con AX-REED o el líquido de partida en la cámara para líquido de partida, donde dicho líquido de AX-REED se obtiene por tratamiento con AX-REED del líquido de  
 20 partida como se describe anteriormente en la sección "AX-REED", y  
 ii) insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para segundo líquido de diálisis, donde el segundo líquido de diálisis puede ser cualquiera de los segundos líquidos de diálisis descritos a continuación en la presente memoria; y  
 iii) aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
 25 iv) incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos.

La CX-REED puede efectuarse en circulación, lo que significa que después de la incubación del líquido de AX-REED, el líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de partida en dicha cámara, el líquido resultante  
 30 puede retirarse de la cámara e insertarse más tarde en otra cámara para líquido de AX-REED, líquido parcialmente tratado con AX-REED o líquido de partida, o incluso en la misma cámara para líquido de AX-REED o líquido de partida. Cuando se inserta en la misma cámara, frecuentemente entonces el segundo líquido de diálisis en dichas dos cámaras adicionales se ha cambiado por un segundo líquido de diálisis reciente.

35 El catión para retirar puede ser por ejemplo cualquier catión, pero será típicamente uno o más cationes introducidos en el líquido de AX-REED desde el líquido de diálisis durante el tratamiento con AX-REED. Por tanto, el catión puede ser por ejemplo cualquiera de los cationes de una base que pueden incluirse en el líquido de diálisis como se describe anteriormente en la presente memoria en la sección "AX-REED".

40 Durante la retirada de dicho catión, las dos membranas que rodean la cámara para líquido de AX-REED o líquido de partida facilitan el transporte de iones fuera del líquido de AX-REED o al líquido de AX-REED desde el segundo líquido de diálisis.

45 La dirección del campo eléctrico se cambia a intervalos de manera similar a la descrita anteriormente en la presente memoria para AX-REED.

Los procedimientos de la invención pueden implicar el uso de más de un apilamiento de membranas de CX-REED. Los apilamientos de membrana pueden apilarse (comúnmente separados por espaciadores de membrana) uno sobre otro o uno al lado de otro hasta conseguir suficiente área de separación de membrana para obtener un tiempo  
 50 de retención deseado. Con fines de manejo, operativos y de mantenimiento viables, los apilamientos de membrana pueden funcionar en varios apilamientos de membrana separados de tamaño práctico, cada uno con su propio conjunto de conexiones de flujo y electrodos, pero con la misma función de separación. Estos apilamientos funcionan conjuntamente en paralelo o en serie o alguna combinación de los mismos como parte del mismo sistema de separación. Es ventajoso funcionar con múltiples apilamientos de membranas de CX-REED cuando se usan más  
 55 de un conjunto de electrodos. El número de apilamientos de membranas de CX-REED puede variar por tanto de 2 a varios cientos, dependiendo del proceso en cuestión, pero están típicamente en el intervalo de 2-50 apilamientos de membranas de CX-REED, más típicamente en el intervalo de 4-20 apilamientos de membranas.

60 El segundo líquido de diálisis para usar con CX-REED de acuerdo con la invención puede ser cualquier solución ácida. Típicamente, es una solución acuosa de un H-anión, donde el anión es típicamente un anión inorgánico. Por

tanto, por ejemplo el segundo líquido de diálisis puede comprender uno o más ácidos seleccionados de entre el grupo consistente en  $H_3PO_4$ ,  $HNO_3$  y  $H_2SO_4$ . Preferiblemente, el segundo líquido de diálisis comprende  $H_3PO_4$ . El segundo líquido de diálisis contendrá típicamente dicho ácido a una concentración en el intervalo de 5 a 90 %, preferiblemente en el intervalo de 10 a 90 %, más preferiblemente en el intervalo de 20 a 80 %, aún más preferiblemente en el intervalo de 30 a 80 %, por ejemplo en el intervalo de 40 a 80 %, por ejemplo en el intervalo de 50 a 80 %, por ejemplo en el intervalo de 60 a 80 %. Los porcentajes se proporcionan como p/p.

En el caso de CX-REED, se extraen los cationes mediante una membrana de intercambio catiónico de cada celda del apilamiento o apilamientos de membranas de CX-REED, mientras que entran típicamente iones  $H^+$  a través de la membrana de intercambio catiónico opuesta. Cuando se invierte la dirección del campo eléctrico, los cationes extraídos dentro de la primera membrana mencionada se hacen retroceder al líquido de AX-REED, antes de que los iones  $H^+$  empiecen a entrar en el líquido de AX-REED. Para diseminar los efectos de la inestabilidad y reducir el impacto global de las inversiones de corriente con más de un apilamiento de membranas, se efectúan preferiblemente de forma asincrónica las inversiones del campo eléctrico en cada apilamiento separado. Por tanto, se prefiere que la invención emplee más de un apilamiento de membranas de CX-REED y que el campo eléctrico se invierta de forma asincrónica en cada apilamiento separado. Aunque los intervalos para reservar el campo eléctrico de cada apilamiento son típicamente de longitud similar, el ritmo de las inversiones se dispersa para un mejor efecto de estabilidad del proceso.

En una realización de la invención, se invierte la dirección del campo eléctrico en cualquier primer apilamiento de membranas sustancialmente a intervalos de dispersión regulares respecto a las inversiones para cualquier segundo o adicional apilamiento de membranas.

La longitud del intervalo entre inversiones de corriente para un apilamiento se elige típicamente con respecto a la acumulación de suciedad de membrana. Típicamente, dicho intervalo en un apilamiento de CX-REED cualquiera pueden estar en el intervalo de 5-6000 segundos, preferiblemente 8-3000 segundos, más preferiblemente 10-2000 segundos y aún más preferiblemente 100-1500 segundos.

En otra realización de la invención, se invierte la dirección del campo eléctrico en cualquier primer apilamiento de membranas a intervalos de dispersión de longitud sustancialmente uniformes respecto a las inversiones para cualquier segundo o adicional apilamiento de membranas para maximizar el tiempo entre una inversión de corriente de cualquier primer apilamiento de CX-REED y cualquier segundo o adicional apilamiento de CX-REED en el mismo proceso. Con la misma longitud de intervalo de dispersión entre inversiones de corriente, es decir cuando estas inversiones se dispersan uniformemente, el biorreactor conectado experimentará un impacto reducido, pero mucho más a menudo.

En una realización de la invención, se ajusta la intensidad del campo eléctrico aplicado en respuesta al pH, concentración del ion diana o conductividad de dicha composición líquida. Al aumentar la intensidad del campo eléctrico, el intercambio iónico aumenta en el sistema de CX-REED, y viceversa. Las medidas en línea, casi en línea (p. ej., retardadas en el tiempo) o secundarias (p. ej., usando medidas de conductividad o turbidez en línea para estimar la concentración de ion diana) de los parámetros del proceso que se regulan son entradas de un mecanismo de regulación de control, p. ej. software de control de PID, que a su vez regula la salida de las fuentes de alimentación a los electrodos de CX-REED.

La inversión del campo eléctrico no es el único efecto que puede introducir desviaciones en el control de proceso. Para un control óptimo de los parámetros de proceso, puede ser ventajoso controlar la concentración de diversos iones en el segundo líquido de diálisis así como el flujo y temperatura y el modo de funcionamiento.

Si se usan múltiples apilamientos, es posible configurar el flujo del segundo líquido de diálisis en modo paralelo o en serie con o sin bombas auxiliares entre apilamientos, de forma similar que con el líquido de AX-REED.

En general, la REED de intercambio catiónico (CX-REED) sirve para reemplazar cationes por iones de hidrógeno.

Las membranas de intercambio catiónico pueden ser cualquier membrana de intercambio catiónico útil. El tamaño de las membranas puede seleccionarse para conseguir un tiempo de retención adecuado. Para calcular el tiempo de retención, es de interés el área total de las membranas aniónicas usadas. Por consiguiente, si el procedimiento emplea el uso de muchos apilamientos de membranas y/o si cada apilamiento de membranas contiene muchas celdas, entonces puede reducirse el área de cada membrana.

Los ejemplos no limitantes de membranas de CX útiles incluyen Nafion N117 (catión)(Dupont) y Fumatech FAB (catión)(Fumatech, Alemania).

Se describen también ejemplos no limitantes de procedimientos y equipos útiles para efectuar AX-REED en las solicitudes de patente europea EP 1347823, EP2349541 y EP2349540, todas las cuales se incorporan como referencia a la presente memoria.

5 En general, la CX-REED se efectúa para retirar al menos parte de un catión de un líquido, y en particular del líquido de AX-REED. La CX-REED se efectúa durante un tiempo suficiente para retirar una cantidad deseada de dicho al menos un catión. En una realización preferida de la invención, se efectúa la etapa e) de manera que el líquido de CX-REED producido tenga una conductividad de como máximo 7 mS/cm, preferiblemente como máximo 6 mS/cm, 10 aún más preferiblemente como máximo 5 mS/cm, por ejemplo en el intervalo de 3 a 5 mS/cm. Si el líquido tiene una mayor conductividad, entonces puede continuarse la CX-REED hasta que el líquido de CX-REED tenga la conductividad deseada. En general, es menos deseable una conductividad mayor de 5 mS/cm en el líquido de CX-REED, porque esta puede causar un sabor salado. Cuando se efectúan simultáneamente las etapas d) y e), se prefiere efectuar la etapa e) de manera que el líquido de REED producido tenga una conductividad de como máximo 15 7 mS/cm, preferiblemente como máximo 6 mS/cm, aún más preferiblemente como máximo 5 mS/cm, por ejemplo en el intervalo de 3 a 5 mS/cm. Si el líquido tiene una mayor conductividad, entonces puede continuarse la CX-REED hasta que el líquido de REED tenga la conductividad deseada. En general, es menos deseable una conductividad mayor de 5 mS/cm en el líquido de REED, porque esta puede causar un sabor salado.

20 En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un extracto de cereal, se prefiere entonces efectuar la etapa e) de manera que el líquido de CX-REED o líquido de REED producido tenga una conductividad de como máximo 7 mS/cm, preferiblemente como máximo 6 mS/cm, aún más preferiblemente como máximo 5 mS/cm, todavía más preferiblemente en el intervalo de 3 a 5 mS/cm, tal como en el intervalo de 4 a 5 mS/cm, por ejemplo aprox. 4,5.

25 En realizaciones de la invención donde el líquido de partida comprende un zumo de fruta o extracto de fruta, en general se prefiere entonces que la conductividad sea baja. Por tanto, en estas realizaciones se prefiere efectuar la etapa e) de manera que el líquido de CX-REED o líquido de REED producido tenga una conductividad de como máximo 6 mS/cm, preferiblemente como máximo 5 mS/cm, aún más preferiblemente como máximo 4 mS/cm, 30 todavía más preferiblemente en el intervalo de 2 a 4 mS/cm, tal como en el intervalo de 3 a 4 mS/cm, por ejemplo aprox. 3,5.

#### Tiempo de contacto

35 El tiempo de contacto es una cifra que es útil para gestionar el proceso de REED. de acuerdo con la invención, el tiempo de contacto en relación con AX-REED se calcula como

$$\text{(Área total de membranas de intercambio aniónico (cm}^2\text{)/volumen de líquido de partida (cm}^3\text{)) x tiempo (h)}$$

40 El área total de una membrana de intercambio aniónico es el área total de todas las membranas de intercambio aniónico de todas las celdas en todos los apilamientos de membranas usados para AX-REED. El tiempo de contacto debería seleccionarse para llegar a una bebida con una relación apetecible de azúcar a ácido orgánico. Preferiblemente, la relación de azúcar a ácido orgánico de las bebidas de la invención es la relación descrita en la sección "Relación de azúcar a ácido orgánico" de la presente memoria.

45 En realizaciones de la invención, cuando los procedimientos comprenden la etapa c), se prefiere generalmente entonces que el tiempo de contacto sea relativamente largo, mientras que el tiempo de contacto puede ser mucho más corto en realizaciones de la invención que carecen de etapa c).

50 Además, un tiempo de contacto largo puede conducir desgraciadamente a la acumulación de sabores desagradables y por consiguiente el tiempo de contacto preferiblemente no debería ser demasiado largo.

En una realización de la invención, el tiempo de contacto en relación con AX-REED está en el intervalo de 0,5 a 100 h, tal como 1 a 50 h, por ejemplo 1 a 10 h. En realizaciones de la invención referentes a cualquiera de los 55 procedimientos descritos en las secciones "Procedimiento de producción de una bebida fermentada" y "Procedimientos de producción de una bebida con conversión enzimática de azúcar", el tiempo de contacto puede estar en general en el intervalo de 5 a 10 h.

De acuerdo con la invención, el tiempo de contacto en relación con CX-REED se calcula como

60

**(Área total de membranas de intercambio catiónico (cm<sup>2</sup>)/volumen de líquido de AX-REED (cm<sup>3</sup>)) x tiempo (h)**

El área total de una membrana de intercambio catiónico es el área total de todas las membranas de intercambio catiónico de todas las celdas en todos los apilamientos de membranas usados para CX-REED. El tiempo de contacto de CX-REED es en general mucho menor que el tiempo de contacto para AX-REED.

En una realización de la invención, el tiempo de contacto en relación con CX-REED está en el intervalo de 0,01 a 10, tal como 0,05 a 5, por ejemplo 0,1 a 1.

**10 Compuesto adicional**

Los procedimientos de la invención pueden comprender una etapa f) de adición de uno o más compuestos adicionales. El compuesto adicional puede ser por ejemplo un compuesto aromatizante, un conservante o un ingrediente funcional.

15

El compuesto aromatizante puede ser cualquiera de los compuestos aromatizantes descritos a continuación en la presente memoria en la sección "Compuestos aromatizantes".

Los ingredientes funcionales pueden ser cualquier ingrediente añadido para obtener una función dada. Preferiblemente, un ingrediente funcional vuelve la bebida más saludable. Los ejemplos no limitantes de ingredientes funcionales incluyen fibras solubles, proteínas, vitaminas o minerales añadidos.

20

El conservante puede ser cualquier conservante de pureza alimentaria, por ejemplo puede ser ácido benzoico, ácido sórbico o sales de los mismos.

25

El compuesto adicional puede ser también CO<sub>2</sub>. En particular, puede añadirse CO<sub>2</sub> para obtener una bebida carbonatada.

**Compuesto aromatizante**

30

El compuesto aromatizante para usar con la presente invención puede ser cualquier compuesto aromatizante útil. El compuesto aromatizante puede seleccionarse por ejemplo de entre el grupo consistente en aromas, extractos vegetales, concentrados vegetales, partes de planta e infusiones de hierbas.

Por tanto, el compuesto aromatizante puede ser por ejemplo un aroma. Los aromas son típicamente compuestos orgánicos, por ejemplo pueden ser metabolitos secundarios vegetales. El aroma puede ser cualquier aroma, por ejemplo un aroma de fruta o aroma de vainilla.

35

El extracto vegetal puede ser por ejemplo un extracto de hierbas. Los ejemplos no limitantes de extractos de hierbas incluyen un extracto de té verde, té negro, Rooibos, menta piperita o lúpulos. El extracto vegetal puede ser también un extracto floral. Los ejemplos no limitantes de extractos florales incluyen hibisco, manzanilla, flor de saúco, lavanda o flor de tilo.

40

El extracto vegetal puede ser también un extracto frutal. Las partes de planta pueden ser por ejemplo hierbas secas o frescas, tales como gránulos de lúpulo, flores o frutas secas o frescas.

45

El concentrado vegetal puede ser un concentrado de fruta, por ejemplo un zumo de fruta que se ha concentrado por la retirada de agua.

Los ejemplos no limitantes de frutas útiles para aroma de fruta, extracto de fruta o concentrado de fruta incluyen naranja, manzana, plátano, limón, maracuyá, mango, piña, peras, kumquats o pomelo. El compuesto aromatizante puede ser también tónico.

50

**Listado de secuencias**

55

SEQ NO:1	ID	Secuencia aminoacídica de glucano 1,4-alfa-glucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>
SEQ NO: 2	ID	Secuencia aminoacídica de glucano 1,4-alfa-glucosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (cepa ATCC 42149/RIB 40)
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de glucano 1,4-alfa-glucosidasa de <i>Rhizopus oryzae</i>

NO: 3		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de alfa-amilasa de <i>Aspergillus niger</i>
NO: 4		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de alfa-amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>
NO: 5		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de alfa-amilasa de <i>Rhizopus oryzae</i>
NO: 6		
SEQ	ID	Secuencia aminocídica de pululanasa de <i>Bacillus subtilis</i>
NO: 7		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de pululanasa de <i>Bacillus cereus</i> (cepa ZK/E33L).
NO: 8		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de pululanasa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (cepa ATCC 700396/NCK56/N2/NCFM)
NO: 9		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
NO: 10		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de glucosa oxidasa de <i>Penicillium amagasakiense</i>
NO: 11		
SEQ	ID	Secuencia aminoacídica de catalasa de <i>Aspergillus niger</i>
NO: 12		

### Ejemplos

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben considerarse como 5 limitantes de la invención.

#### Ejemplo 1

- Se produjo mosto estándar de 14,85 % de P como se describe a continuación en la presente memoria en el Ejemplo 10 3. Se fermentaron 7,5 l de mosto estándar a 30 °C con una mezcla de *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactococcus lactis* en una plataforma REED (Jurag Separation, Dinamarca). La plataforma REED estaba equipada con unos apilamientos de membrana tanto de AX-REED como CX-REED. Después de fermentación hasta un punto final de pH 3,9, se dejó reposar el fermento a 4 °C durante 36 horas, después de lo cual se decantó el grueso del líquido de las bacterias sedimentadas. Se realizaron pruebas similares con cada una de las bacterias solas. Se filtraron los 15 sobrenadantes a través de un filtro Seitz EK, se carbonataron, se pasteurizaron y se evaluó su sabor. Se recolectaron bacterias acidolácticas por centrifugación del sedimento a 8000 rpm durante 10 minutos, y se dejaron entonces durante 36 horas adicionales antes de repetir la fermentación controlada por REED. Se representa el consumo de maltosa y glucosa por las bacterias en la primera y segunda fermentaciones en la figura 2.
- 20 Aunque el contenido de maltosa del mosto difería en las dos fermentaciones, así que los puntos iniciales y finales estaban desplazados, el desempeño de las bacterias era muy similar en ambos casos, a pesar de que el inóculo de la segunda se había cosechado y almacenado a pH bajo durante 72 horas. Esta capacidad de metabolizar maltosa muestra que *Lactobacillus sanfranciscensis* es considerablemente resistente al tratamiento que recibía. El descenso de velocidad con que se retiraba glucosa de la segunda fermentación sugiere que *Lactococcus lactis* es más 25 sensible a estas condiciones.

Se ha publicado la secuencia genómica de *Lactobacillus sanfranciscensis*, y revela que este organismo está completamente desprovisto de proteasas extracelulares. De forma interesante, el sabor obtenido por mosto fermentado con *Lactobacillus sanfranciscensis* carece de las notas de peptona indeseadas características de otras 30 fermentaciones acidolácticas.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo describe la producción de un proceso de fermentación para mosto que no produce alcohol, pero ajusta 35 el desequilibrio de dulzor a acidez en este material bruto, produciendo una base de bebida refrescante que es rica en vitaminas y minerales naturales y baja en calorías.

La base de bebida resultante puede usarse como bebida per se o pueden añadirse diversos compuestos aromatizantes antes del consumo.

40

Se cultivó *Lactobacillus sanfranciscensis* en medio que contiene maltosa como única fuente de carbono. Se marcó la maltosa con RMN-<sup>13</sup>C Se mostró que *Lactobacillus sanfranciscensis* era incapaz de formar metabolitos glicolíticos a partir de glucosa cuando se transfería inmediatamente a esta fuente de carbono. *Lactococcus lactis*, que no puede crecer en maltosa, cuando se le alimenta glucosa marcada con <sup>13</sup>C produce rápidamente señales de RMN que son atribuibles a metabolitos glicolíticos.

La provisión de maltosa marcada con <sup>13</sup>C en el extremo reductor a una mezcla de *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactococcus lactis* produciría por lo tanto solo un espectro de RMN atribuible a metabolitos glicolíticos si la glucosa liberada a partir de maltosa por fosforólisis en *Lactobacillus sanfranciscensis* se metaboliza por *Lactococcus lactis*. Esto se confirmó por el experimento, que procuraba un espectro de RMN atribuible a metabolitos glicolíticos.

### Ejemplo 3

#### Producción de mosto

Se produjo un mosto estándar de 14,5 % de P a partir de 39,8 kg de malta Pilsner estándar, que se maceró con 108,4 l de agua para cerveza estándar a 65 °C. Justo después de mezclar la malta molida con agua, se añadió una preparación enzimática comercial que contiene una actividad arabinoxilanasas para facilitar la filtración del mosto acabado. Se añadió también cloruro de calcio en este paso y se ajustó el pH a aprox. 5,4 mediante la adición de ácido fosfórico. Después de 60 minutos a 65 °C, se aumentó gradualmente la temperatura a 78 °C durante un periodo de 15 minutos y se mantuvo finalmente a 78 °C durante 5 minutos. Se filtró entonces el macerado y se lavó, dando como resultado un volumen total de 212 l antes de hervir. Se ajustó el mosto a pH aprox. 5,2 por adición de ácido fosfórico y se añadió cloruro de calcio. Se hirvió entonces el mosto 70 minutos. Durante este periodo, se evaporó aprox. un 5 % de agua, dejando 200 l de mosto hervido. Después de un proceso de centrifugación para retirar sedimentos, se llenaron con mosto hervido barriles y se mantuvieron a 5 °C hasta procesamiento de REED. Se hace referencia a este mosto, y a los mostos producidos esencialmente del mismo modo, como "mosto estándar". Se muestran en la tabla 2 los contenidos de azúcares fermentables y ácidos orgánicos en el mosto estándar.

Se efectuó la detección y cuantificación de 5 carbohidratos fermentables (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa) por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) usando DIONEX ICS-3000 (ThermoScientific) conectado con un PC equipado con el software Chromeleon. Se ionizan los grupos hidroxilo de carbohidratos a iones oxonio a pH 12-14, lo que permite la separación de carbohidratos por cromatografía de intercambio aniónico. Se efectúa entonces la detección por detección electroquímica por pulsos (PED) (detección amperométrica por pulsos (PAD)) usando amperometría integrada. Se permitió la cuantificación mediante el uso de patrones de calibración de pureza HPLC: glucosa (Sigma G-8270), fructosa (Sigma F-0127), sacarosa (Sigma S-9378), maltosa (Sigma M-5885) y maltotriosa (Sigma M-8378).

Se determinaron los ácidos orgánicos usando HPLC equipada con una "columna de ácido orgánico Prevail" de 150 x 4,6 mm. Se efectuó la detección UV a 210 nm. Se usó 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 2,5 como fase móvil. Se usó acetonitrilo como fase orgánica. Se realizó la separación linealmente con 100 % de fase móvil (tiempo de separación total 7,5 min).

#### Fermentación de REED

Se añadieron 250 g de ácido láctico al 80 % y 237 g de hidróxido de potasio al 46 % a 37,5 l de mosto estándar para aumentar pH y conductividad en el líquido de partida. Se inoculó este líquido de partida con cultivos puros congelados comerciales de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus sanfranciscensis* (200 g y 400 g, respectivamente) y se dejaron fermentar a 30 °C. Se retiraron los ácidos producidos durante la fermentación por el equipo de REED, configurado con membranas de AX AR103/Nafion N117 (12 pares de celdas, 2 mm de grosor, 915 cm<sup>2</sup> de áreas activas por par de celdas) y membranas de CX Nafion N117/Fumatech (10 pares de celdas, 2 mm de grosor, 915 cm<sup>2</sup> de área activa por par de celdas). El líquido de diálisis de AX-REED era KOH (al 46 %). El segundo líquido de diálisis de CX-REED era H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (al 75 %). Ambos líquidos de diálisis se pasaron solo una vez por el sistema (pasada única). Se conectaron en paralelo los apilamientos de membranas de AX-REED y CX-REED, sin embargo el apilamiento de membranas de CX-REED funcionaba solo en la última parte del proceso. Se muestra en la figura 1 una visión general del equipo de REED. Se terminó la fermentación después de 25 horas, cuando el líquido tenía un equilibrio agradable entre dulzor y acidez. Los resultados analíticos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

	Mosto estándar	Producto de REED
--	----------------	------------------

<i>Azúcares, g/l:</i>		
Glucosa	9,4	Trazas
Fructosa	Trazas	0
Sacarosa	5,0	0
Maltosa	65,3	21,7
Maltotriosa	15,1	7,2
<i>Ácidos orgánicos, mg/l:</i>		
Tartárico	74	0
Málico	43	7
Láctico	0	484
Acético	126	15
Cítrico	539	0
Succínico	475	113
Propiónico	0	0
<i>pH:</i>	5,20	4,37

#### Ejemplo 4

Se produjo un mosto de 14,5 % de P con un alto contenido de glucosa macerando una malta Pilsner estándar junto con enzimas de cerveza comerciales. Se maceraron 43,8 kg de malta Pilsner con 131 l de agua de cerveza estándar a 63 °C. Justo después de mezclar la malta molida con agua, se añadieron preparaciones enzimáticas comerciales que contienen actividades alfa-glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y dextrinasa límite, que son capaces de convertir carbohidratos y oligosacáridos en glucosa. Se añadió también cloruro de calcio y se ajustó el pH a aprox. 5,2 por adición de ácido fosfórico. Después de 30 minutos a 63 °C, se aumentó la temperatura a 70 °C a una tasa de 1 °C/minuto, se mantuvo a 70 °C durante 60 minutos, se aumentó a 78 °C a una tasa de 1 °C/minuto y finalmente se mantuvo a 78 °C durante 5 minutos. Se filtró entonces el macerado y se lavó, dando como resultado un volumen total de 233 l antes de hervir. Se ajustó el mosto dulce a pH aprox. 5,2 por adición de ácido fosfórico y se añadió cloruro de calcio. Se hirvió entonces el mosto 70 minutos. Durante este periodo, se evaporó aprox. un 5 % de agua, dejando 220 l de mosto hervido. Después de un proceso de centrifugación para retirar sedimentos, se llenaron con mosto hervido barriles y se mantuvieron a 5 °C hasta procesamiento de REED. Se hace también referencia a este mosto, y a los mostos producidos esencialmente del mismo modo, como "mosto de glucosa". Se determinaron los contenidos de azúcar y ácidos orgánicos en el mosto de glucosa como se describe en el Ejemplo 3 y se muestran los resultados en la tabla 3.

#### 20 Fermentación de REED

Se añadieron 39,4 l de mosto de glucosa preparado como se describe anteriormente y 250 g de ácido láctico al 80 % y 227 g de hidróxido de potasio al 46 % para aumentar pH y conductividad en el líquido de partida. Se inoculó este líquido de partida con 260 g de un cultivo puro congelado comercial de *Lactococcus lactis* y se dejó fermentar a 25 °C. Se retiraron los ácidos producidos durante la fermentación por el equipo de REED, configurado con un apilamiento de membranas de AX-REED y un apilamiento de membranas de CX-REED como sigue:  
Apilamiento de membranas de AX-REED:

- 12 pares de celdas
- 30 Membranas: Ionics AR103, Nafion N117  
Área de membrana total: 10980 cm<sup>2</sup>
- Apilamiento de membranas de CX-REED:  
10 pares de celdas  
Membranas: Nafion N117, Fumatech FAB
- 35 Área de membrana total 9150 cm<sup>2</sup>

El líquido de diálisis de AX-REED era KOH (al 46 %). El segundo líquido de diálisis de CX-REED era H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (al 75 %). Ambos líquidos de diálisis se pasaron solo una vez por el sistema (pasada única). Se conectaron en paralelo los apilamientos de membranas de AX-REED y CX-REED, sin embargo el apilamiento de membranas de CX-REED funcionaba solo en la última parte del proceso. Se terminó la fermentación después de 23 horas, cuando el líquido resultante (líquido de REED) tenía un equilibrio agradable entre dulzor y acidez. Los resultados analíticos del producto de REED se muestran en la tabla 3.

Después de la fermentación de REED, se aromatizó parte del líquido de REED mediante la adición de gránulos de

una variedad de lúpulo aromático. Se dejaron los gránulos en el líquido a 14 °C durante 20 horas y entonces se retiraron. El líquido aromatizado tenía un aroma a lúpulo agradable y característico.

Tabla 3

	Mosto de glucosa	Líquido de REED
<i>Azúcares, g/l:</i>		
Glucosa	141,4	22,2
Fructosa	Trazas	Trazas
Sacarosa	5,7	3,5
Maltosa	Trazas	Trazas
Maltotriosa	0	0
<i>Ácidos orgánicos, mg/l:</i>		
Tartárico	29	0
Málico	6	0
Láctico	0	773
Acético	116	0
Cítrico	485	0
Succínico	348	11
Propiónico	0	0
pH:	5,20	4,35

5

### Ejemplo 5

Se prepararon mostos de glucosa esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 y se sometieron a fermentación de REED también esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 con las siguientes modificaciones. No se añadió ácido láctico al mosto de glucosa y solo 200 g de KOH. En el ensayo 40, se terminó la fermentación después de 22,5 horas. En el ensayo 54, se terminó la fermentación después de 24,5 horas, cuando el nivel de glucosa era de aprox. 40 g/l. En el ensayo 55, se terminó la fermentación después de 50 horas, cuando el nivel de glucosa era de 5 g/l. En los ensayos individuales, se determinaron el contenido de mineral del mosto de glucosa y de los productos de fermentaciones de REED (líquidos de REED) y se calculó la recuperación porcentual. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Como puede verse, se mantiene el nivel tanto de calcio y magnesio como de hierro después de fermentación de REED durante hasta 50 horas.

Tabla 9 Recuperación de mineral porcentual después de fermentación de REED

n° de ensayo	Ca	% de recuperación Mg	Fe
40	96	69	95
54	92	68	91
55	116	82	109

### 20 Ejemplo 6

Para establecer un equilibrio agradable entre dulzor y acidez en una bebida, se realizó una fermentación asistida por REED, donde se fermentó el mosto de glucosa, preparado esencialmente como se describe en el Ejemplo 4, con *Lactococcus lactis* en el equipo de REED esencialmente como se describe en el Ejemplo 4, excepto por las siguientes modificaciones. No se añadió ácido láctico al mosto de glucosa y solo 200 g de KOH. Se llevó a cabo la fermentación hasta que el contenido de glucosa en el líquido resultante (el líquido de REED) era muy bajo, aprox. 2 g/l, y el contenido de ácido láctico era de aprox. 5 g/l. El líquido contenía también cantidades minoritarias de fructosa (< 1 g/l), sacarosa (aprox. 3 g/l), maltosa (aprox. 2 g/l) y maltotriosa (< 1 g/l). Por tanto, el contenido de azúcar total de la base resultante era de aprox. 7 g/l. Esta base tenía un aroma neutro.

30

Se prepararon tres bebidas, diferentes en dulzor pero por lo demás prácticamente idénticas, a partir de la base añadiendo glucosa para obtener concentraciones finales de 22, 37 y 52 g/l. Para aromatizar las bebidas, se añadieron gránulos de lúpulo a una dosis de 2 g/l y se dejaron en los líquidos durante 24 horas a 5-8 °C. Se retiraron entonces los gránulos de lúpulo y se carbonizaron las bebidas.

35

Se cataron entonces las tres bebidas por un total de 75 personas. 34 personas eran mujeres y 41 eran hombres; 33 eran de 20-40 años de edad y 42 eran de 41-65 años de edad. En la sesión de cata, se sirvieron las tres muestras al mismo tiempo a cada persona. Se pidió a los participantes evaluar las tres bebidas como "refrescos aromatizados con lúpulo no alcohólicos para adultos", se les informó sobre el contenido de glucosa de las bebidas y se les pidió

entonces seleccionar su favorita. Esta encuesta mostró una preferencia muy clara por la bebida con un contenido de glucosa de 37 g/l. 41 personas prefirieron 37 g/l, mientras que 18 prefirieron 22 g/l y 16 prefirieron 57 g/l. Esta preferencia no estaba influenciada significativamente por la edad o el género. Se muestran los resultados en la Figura 5.

5

Se evaluaron también las tres bebidas por un panel de cata entrenado para evaluación de cerveza. Se pidió a los panelistas puntuar los "atributos aromáticos de cerveza" en una escala de 0-5, donde 0 indica ausencia de aroma y 5 un aroma muy intenso. Se pidió también a los panelistas asignar una puntuación de aroma total para cada bebida en una escala de 0-9, donde 0 es imbebible y 9 es excelente. El panel dio puntuaciones casi iguales para glucosa 22 g/l y 37 g/l, pero la glucosa 52 g/l se juzgó como notablemente sobreendulzada. Las bebidas con 22 g/l y 37 g/l de azúcar se consideraron también significativamente mejores en la prueba de aroma total. Por tanto, las puntuaciones de aroma total para 22, 37 y 52 g/l de glucosa fueron de 6,0, 6,1 y 5,5, respectivamente.

### Ejemplo 7

15

Este ejemplo demuestra el sabor particularmente agradable de una bebida preparada por fermentación bacteriana asistida por REED de mosto de glucosa. Se fermentó mosto de glucosa, preparado esencialmente como se describe en el ejemplo 4, con *Lactococcus lactis* en un equipo de REED esencialmente como se describe en el Ejemplo 4, excepto porque se interrumpió la fermentación cuando el contenido de glucosa del líquido era de aprox. 37 g/l, el contenido de ácido láctico era de 6,7 g/l y el pH era de 4,35. No se añadió tampoco ácido láctico al mosto de glucosa y solo 200 g de KOH. El líquido contenía también cantidades minoritarias de fructosa (< 1 g/l), sacarosa (aprox. 3 g/l), maltosa (aprox. 3 g/l) y maltotriosa (< 1 g/l). Esta base tenía un leve dulzor y una leve acidez. Para aromatizar el líquido, se añadieron gránulos de lúpulo a una dosis de 2 g/l y se dejaron en el líquido durante 24 horas a 5-8 °C. Se retiraron entonces los gránulos de lúpulo y se carbonizó el líquido. Se llamó a esta bebida A.

20

Se preparó otra bebida a partir de mosto de glucosa, preparado esencialmente como se describe en el ejemplo 4. Para obtener un pH, dulzor y acidez comparables con la bebida basada en REED, se diluyó el mosto de glucosa con agua y se añadió una mezcla de ácido láctico y lactato de calcio. Se aromatizó entonces la combinación con gránulos de lúpulo como se describe anteriormente y finalmente se carbonizó. Se llamó a esta bebida B.

25

Se compararon las dos bebidas por paneles de cata entrenados en la evaluación de cerveza. Se presentó a los panelistas un vaso de cada bebida y se les pidió puntuar los "atributos de aroma de cerveza" para cada una de las dos bebidas en una escala de 0-5, donde 0 designa ausencia de un aroma específico y 5 designa un aroma muy intenso. Finalmente, se pidió también a los panelistas dar una puntuación de aroma total para cada bebida en una escala de 0-9, donde 0 es imbebible y 9 es excelente.

30

La Tabla 10 muestra los contenidos de azúcares fermentables y ácidos orgánicos en la bebida A y la bebida B. Es evidente que las dos bebidas contienen prácticamente las mismas cantidades totales de azúcares fermentables y ácidos orgánicos. Sin embargo, debido al contenido natural de ácido tartárico, málico, acético, cítrico y succínico en el mosto, las composiciones ácidas de las dos bebidas no son completamente idénticas.

35

La Figura 6 muestra los perfiles de aroma de la bebida. La bebida A puntuó significativamente más que la bebida B en frescura, bebilidad, aromático, estérico, floral y equilibrio. El dulzor y acidez percibidos de la bebida A eran también algo mayores que en la bebida B. En contraposición, la bebida B puntuaba más en aromas menos deseables tales como malteado, granulado, a caramelo y quemado que la bebida A. La puntuación de aroma total para la bebida A era de 7,1, que es significativamente mayor que la puntuación de aroma total para la bebida B que era de 5,9.

40

Además, se presentaron a un panel de cata de 19 las bebidas en una prueba triangular. En las pruebas triangulares, se presenta a cada panelista 3 muestras, dos de las cuales son idénticas. Los 19 fueron capaces de identificar cuáles muestras eran idénticas, demostrando por tanto una diferencia significativa en el sabor de la bebida A y B. 13 de los panelistas identificaron la bebida A como la bebida preferida y 1 encontró las bebidas A y B igualmente buenas.

45

50

55

**Tabla 10.** Composición de la bebida A y la bebida B.

		Bebida A	Bebida B
<i>Azúcares fermentables (g/l)</i>	Glucosa	36,9	38,9
	Fructosa	0,6	0,7
	Sacarosa	2,7	1,2
	Maltosa	3,0	1,8
	Maltotriosa	0	0
	<i>Azúcares fermentables totales</i>	<u>43,3</u>	<u>42,6</u>
<i>Ácidos orgánicos (g/l)</i>	Tartárico	0	0,2
	Málico	0	0,1
	Láctico	6,7	5,8
	Acético	0	0,3
	Cítrico	0	0,1
	Succínico	0	0,4
	<i>Ácidos orgánicos totales</i>	<u>6,7</u>	<u>6,9</u>
	<i>pH</i>	<u>4,35</u>	<u>4,35</u>

**Ejemplo 8**

- 5 Se transfirieron 50 l de mosto de glucosa preparado esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 a un tanque de un equipo de REED (correspondiente a 4 en la figura 4). Se configuró el equipo de REED con membranas de AX Ionics AR103/Nafion N117 y membranas de CX Nafion N117/Fumatech FAB. Se conectaron los apilamientos de membranas de AX-REED y CX-REED en paralelo. Se añadió una preparación enzimática que contenía actividad tanto glucosa oxidasa como catalasa al mosto de glucosa a una dosis de 2 g/l. Para oxigenar el mosto, se burbujó
- 10 aire enriquecido en oxígeno (aprox. 52 % de oxígeno) a través del mosto mediante un difusor de gas enlazado con un tubo. Se insertó el tubo con el difusor en el tanque a través de un orificio de ventilación en la parte superior del tanque y se ajustó la longitud del tubo para colocar el difusor cerca del fondo del tanque. A lo largo del tratamiento enzimático, se suministró oxígeno a través del difusor de gas.
- 15 Se repitió el experimento dos veces, los experimentos individuales se nombran en la presente memoria ensayo 48 y ensayo 49. En el ensayo 48, se ejecutó el tratamiento enzimático y tratamiento con REED durante 21,5 horas a 30 °C. En el ensayo 49, se ejecutó el tratamiento enzimático y tratamiento con REED durante 23 horas a 13 °C. Se añadió lactato de calcio al inicio del ensayo 49 para aumentar el contenido de calcio en el líquido de REED. Es deseable un alto contenido de calcio desde un punto de vista nutricional.
- 20 Se determinó el contenido de vitaminas y el contenido de minerales en el mosto de glucosa y en el producto obtenido después de tratamiento enzimático. Se muestran los resultados en las Tablas 11 y 12. No se calculó la recuperación de Ca para el ensayo n° 49 porque se añadió deliberadamente lactato de Ca al inicio del proceso.

25

**Tabla 11** Vitaminas B1 y B2 en el ensayo 48

	<b>B1, tiamina</b>	<b>B2, riboflavina</b>
<b>Inicio del proceso</b>	392 µg/l	217 µg/l
(mosto de glucosa)		
<b>Final del proceso</b>	294 µg/l	171 µg/l
(líquido después de tratamiento enzimático)		
<b>Recuperación</b>	75 %	79 %

**Tabla 12**

n° de ensayo	% de recuperación		
	Ca	Mg	Fe
48	122	89	151
49	-	99	129

**Ejemplo 9**

30

Se adquirió zumo de manzana preparado a partir de concentrado en un supermercado local. Se sometió el zumo de manzana a una fermentación de REED esencialmente como se describe en el Ejemplo 4; sin embargo con las siguientes modificaciones: Se usaron 52 l de zumo de manzana en lugar de mosto de glucosa, se añadieron 170 g de hidróxido de potasio al 46 % al inicio de la fermentación para aumentar el pH a 4,5, la temperatura de

fermentación era de 30 °C y se terminó la fermentación de REED después de 45 horas. Se hace referencia también al líquido resultante como líquido de REED.

Se determinó el contenido de azúcar en zumo de manzana y en el líquido de REED como se describe en el Ejemplo 3 y se muestran los resultados en la Tabla 15. Se incluyen también en la Tabla 15 los resultados de ácidos orgánicos en el líquido de REED, determinados como se describe en el Ejemplo 3. Según Eisele y Drake (2005), Journal of Food Composition and Analysis 18: 213-221, el contenido de ácido málico en zumo de manzana está en el intervalo de 1,9-17,4 g/l, con una media de 8,5 g/l; los contenidos de otros ácidos orgánicos son típicamente < 1 g/l. Es evidente que el líquido de REED tiene un contenido de azúcar reducido, y los contenidos de ácidos orgánicos difieren de los contenidos típicos en zumo de manzana.

**Tabla 15**

	Zumo de manzana	Líquido de REED
Glucosa, g/l	23,8	11,5
Fructosa, g/l	58,7	35,4
Sacarosa, g/l	12,7	10,9
Azúcares fermentables totales, g/l	95,2	57,8
Ácido málico, g/l	n.d.	0,6
Ácido láctico, g/l	n.d.	2,1
pH	3,4	3,8

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Carlsberg Breweries A/S
- <120> Procedimiento para producir bebidas por retirada de ácido
- <130> P2405PC00
- <160> 12
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 640
- <212> PRT
- <213> Aspergillus niger
- 25 <400> 1

ES 2 701 765 T3

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly  
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser  
 20 25 30

Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala  
 35 40 45

Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser  
 50 55 60

Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr  
 85 90 95

Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val  
 100 105 110

Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu  
 115 120 125

Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp  
 130 135 140

Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile  
 145 150 155 160

Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr  
 165 170 175

ES 2 701 765 T3

Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln  
 180 185 190

Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser  
 195 200 205

Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser  
 210 215 220

Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln  
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe  
 245 250 255

Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr  
 260 265 270

Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp  
 275 280 285

Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu  
 290 295 300

Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser  
 305 310 315 320

Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr  
 325 330 335

Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu  
 340 345 350

Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr  
 355 360 365

Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr  
 370 375 380

Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala  
 385 390 395 400

Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala  
 405 410 415

Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu  
 420 425 430

ES 2 701 765 T3

Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr  
 435 440 445

Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr  
 450 455 460

Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly  
 465 470 475 480

Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr  
 485 490 495

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr  
 500 505 510

Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr  
 515 520 525

Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp  
 530 535 540

Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser  
 545 550 555 560

Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser  
 565 570 575

Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr  
 580 585 590

Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser  
 595 600 605

Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val  
 610 615 620

Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg  
 625 630 635 640

<210> 2  
 <211> 612  
 5 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae

<400> 2

Met Val Ser Phe Ser Ser Cys Leu Arg Ala Leu Ala Leu Gly Ser Ser  
 1 5 10 15

10

ES 2 701 765 T3

Val Leu Ala Val Gln Pro Val Leu Arg Gln Ala Thr Gly Leu Asp Thr  
 20 25 30  
 Trp Leu Ser Thr Glu Ala Asn Phe Ser Arg Gln Ala Ile Leu Asn Asn  
 35 40 45  
 Ile Gly Ala Asp Gly Gln Ser Ala Gln Gly Ala Ser Pro Gly Val Val  
 50 55 60  
 Ile Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asp Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr  
 65 70 75 80  
 Arg Asp Ser Gly Leu Val Met Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Gly  
 85 90 95  
 Gly Asp Ala Asp Leu Leu Pro Ile Ile Glu Glu Phe Ile Ser Ser Gln  
 100 105 110  
 Ala Arg Ile Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly  
 130 135 140  
 Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Met Ile Ser Phe Gly Glu Trp Leu Val Glu Asn Gly His Thr Ser Ile  
 165 170 175  
 Ala Thr Asp Leu Val Trp Pro Val Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val  
 180 185 190  
 Ala Gln Tyr Trp Ser Gln Ser Gly Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Gln  
 195 200 205  
 Gly Thr Ser Phe Phe Thr Val Ala Val Ser His Arg Ala Leu Val Glu  
 210 215 220  
 Gly Ser Ser Phe Ala Lys Thr Val Gly Ser Ser Cys Pro Tyr Cys Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Ala Pro Gln Val Arg Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly  
 245 250 255  
 Ser Tyr Ile Gln Ala Asn Phe Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ile  
 260 265 270

ES 2 701 765 T3

Asn Thr Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Gln Ala Thr Cys  
 275 280 285

Asp Asp Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His  
 290 295 300

Lys Val Val Thr Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Ala Ile Asn Ser Gly  
 305 310 315 320

Arg Ala Glu Asn Gln Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser  
 325 330 335

Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Thr Thr Leu Ala Ala Ala Glu  
 340 345 350

Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Ile Gly Ser Leu Ala  
 355 360 365

Ile Thr Asp Val Ser Leu Pro Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Ser Ala  
 370 375 380

Ala Thr Gly Thr Tyr Ala Ser Ser Thr Thr Val Tyr Lys Asp Ile Val  
 385 390 395 400

Ser Ala Val Lys Ala Tyr Ala Asp Gly Tyr Val Gln Ile Val Gln Thr  
 405 410 415

Tyr Ala Ala Ser Thr Gly Ser Met Ala Glu Gln Tyr Thr Lys Thr Asp  
 420 425 430

Gly Ser Gln Thr Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu  
 435 440 445

Leu Thr Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ala Val Val Pro Ala Pro Trp Gly  
 450 455 460

Glu Thr Ala Ala Thr Ser Ile Pro Ser Ala Cys Ser Thr Thr Ser Ala  
 465 470 475 480

Ser Gly Thr Tyr Ser Ser Val Val Ile Thr Ser Trp Pro Thr Ile Ser  
 485 490 495

Gly Tyr Pro Gly Ala Pro Asp Ser Pro Cys Gln Val Pro Thr Thr Val  
 500 505 510

Ser Val Thr Phe Ala Val Lys Ala Thr Thr Val Tyr Gly Glu Ser Ile

ES 2 701 765 T3

```

                    515                520                525

Lys Ile Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Ser Trp Asn Pro Ser Ser
   530                535                540

Ala Thr Ala Leu Asn Ala Asp Ser Tyr Thr Thr Asp Asn Pro Leu Trp
   545                550                555                560

Thr Gly Thr Ile Asn Leu Pro Ala Gly Gln Ser Phe Glu Tyr Lys Phe
                    565                570                575

Ile Arg Val Gln Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg
                    580                585                590

Lys Tyr Thr Val Pro Ser Thr Cys Gly Val Lys Ser Ala Val Gln Ser
   595                600                605

Asp Val Trp Arg
   610

```

<210> 3  
 <211> 604  
 5 <212> PRT  
 <213> Rhizopus oryzae  
 <400> 3

```

Met Gln Leu Phe Asn Leu Pro Leu Lys Val Ser Phe Phe Leu Val Leu
  1                5                10                15

Ser Tyr Phe Ser Leu Leu Val Ser Ala Ala Ser Ile Pro Ser Ser Ala
                20                25                30

Ser Val Gln Leu Asp Ser Tyr Asn Tyr Asp Gly Ser Thr Phe Ser Gly
                35                40                45

Lys Ile Tyr Val Lys Asn Ile Ala Tyr Ser Lys Lys Val Thr Val Ile
   50                55                60

Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Asn Trp Asn Asn Asn Gly Asn Thr Ile Ala
   65                70                75                80

Ala Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Tyr Trp Thr
                85                90                95

Phe Ser Ala Ser Ile Asn Gly Ile Lys Glu Phe Tyr Ile Lys Tyr Glu
                100                105                110

Val Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Asp Asn Asn Asn Ser Ala Asn Tyr Gln

```

10

ES 2 701 765 T3

			115						120							125			
Val	Ser	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr				
	130								135							140			
Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Glu	Pro				
	145									150				155					160
Ala	Thr	Phe	Pro	Thr	Gly	Asn	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Trp	Ile	Lys	Lys				
						165										170			175
Gln	Glu	Gly	Ile	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Arg	Asn	Ile	Asn	Pro	Pro				
																180			185
Gly	Ser	Ala	Thr	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala	Gly	Pro				
																190			195
Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Thr	Arg	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Asn	Val				
																200			205
Ile	Val	Tyr	Glu	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Thr	Ile	Leu				
																210			215
Asn	Val	Leu	Lys	Asp	Tyr	Val	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Gln	Ser	Thr				
																220			225
Ser	Thr	Val	Cys	Asn	Cys	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Asn	Pro	Asp	Ala				
																230			235
Ser	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Asn	Asp	Gly	Pro	Ala				
																240			245
Glu	Arg	Ala	Thr	Thr	Phe	Ile	Leu	Phe	Ala	Asp	Ser	Tyr	Leu	Thr	Gln				
																250			255
Thr	Lys	Asp	Ala	Ser	Tyr	Val	Thr	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Ala	Ile	Phe				
																260			265
Lys	Asp	Leu	Asp	Tyr	Val	Val	Asn	Val	Trp	Ser	Asn	Gly	Cys	Phe	Asp				
																270			275
Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Val	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Met	Val	Met				
																280			285
Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys	Arg	Asn	Gly	Asp				
																290			295

ES 2 701 765 T3

Ser Thr Arg Ala Ser Thr Tyr Ser Ser Thr Ala Ser Thr Ile Ala Asn  
 370 375 380

Lys Ile Ser Ser Phe Trp Val Ser Ser Asn Asn Trp Ile Gln Val Ser  
 385 390 395 400

Gln Ser Val Thr Gly Gly Val Ser Lys Lys Gly Leu Asp Val Ser Thr  
 405 410 415

Leu Leu Ala Ala Asn Leu Gly Ser Val Asp Asp Gly Phe Phe Thr Pro  
 420 425 430

Gly Ser Glu Lys Ile Leu Ala Thr Ala Val Ala Val Glu Asp Ser Phe  
 435 440 445

Ala Ser Leu Tyr Pro Ile Asn Lys Asn Leu Pro Ser Tyr Leu Gly Asn  
 450 455 460

Ser Ile Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Asn Gly Asn Gly Asn Ser  
 465 470 475 480

Gln Gly Asn Ser Trp Phe Leu Ala Val Thr Gly Tyr Ala Glu Leu Tyr  
 485 490 495

Tyr Arg Ala Ile Lys Glu Trp Ile Gly Asn Gly Gly Val Thr Val Ser  
 500 505

Ser Ile Ser Leu Pro Phe Phe Lys Lys Phe Asp Ser Ser Ala Thr Ser  
 515 520 525

Gly Lys Lys Tyr Thr Val Gly Thr Ser Asp Phe Asn Asn Leu Ala Gln  
 530 535 540

Asn Ile Ala Leu Ala Ala Asp Arg Phe Leu Ser Thr Val Gln Leu His  
 545 550 555 560

Ala His Asn Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Phe Asp Arg Thr Thr Gly  
 565 570 575

Leu Ser Thr Gly Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser His Ala Ser Leu Ile  
 580 585 590

Thr Ala Ser Tyr Ala Lys Ala Gly Ala Pro Ala Ala  
 595 600

<210> 4  
 <211> 484  
 5 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger  
 <400> 4

ES 2 701 765 T3

Leu Ser Ala Ala Ser Trp Arg Thr Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr Ala Thr Cys Asn Thr  
 20 25 30  
 Gly Asn Glu Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln Gly Ile Ile Asp His  
 35 40 45  
 Leu Asp Tyr Ile Glu Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Ser Pro  
 50 55 60  
 Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp Gly Glu Ala Tyr His  
 65 70 75 80  
 Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn Ser Asn Phe Gly Thr  
 85 90 95  
 Ala Asp Asn Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu His Ala Arg Gly Met  
 100 105 110  
 Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asp His Met Gly Tyr Ala Gly Asn  
 115 120 125  
 Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro Phe Asp Ser Ser Ser  
 130 135 140  
 Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp Asp Asn Leu Thr Met  
 145 150 155 160  
 Val Glu Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val Ser Leu Pro Asp Leu  
 165 170 175  
 Asp Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp Tyr Asp Trp Val Ala  
 180 185 190  
 Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu Arg Ile Asp Ser Val  
 195 200 205  
 Leu Glu Val Gln Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr Asn Lys Ala Ser Gly  
 210 215 220  
 Val Tyr Cys Val Gly Glu Ile Asp Asn Gly Asn Pro Ala Ser Asp Cys  
 225 230 235 240

ES 2 701 765 T3

Pro Tyr Gln Lys Val Leu Asp Gly Val Leu Asn Tyr Pro Ile Tyr Trp  
 245 250 255

Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ile Ser Asn Leu  
 260 265 270

Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys Ser Asp Pro Thr Leu  
 275 280 285

Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Ala Lys Tyr  
 290 295 300

Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu Ser Tyr Ile Phe Leu  
 305 310 315 320

Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu Glu Gln His Tyr Ala  
 325 330 335

Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr Trp Leu Ser Gly Tyr  
 340 345 350

Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala Thr Thr Asn Ala Ile  
 355 360 365

Arg Lys Leu Ala Ile Ala Ala Asp Ser Ala Tyr Ile Thr Tyr Ala Asn  
 370 375 380

Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala Met Ala Lys Gly Thr  
 385 390 395 400

Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn Lys Gly Ser Ser Gly  
 405 410 415

Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Ser Gly Thr  
 420 425 430

Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val Thr Val Asp Ser Ser  
 435 440 445

Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu Pro Arg Val Leu Leu  
 450 455 460

Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys Gly Gly Ser Gly Arg  
 465 470 475 480

Leu Tyr Val Glu

<210> 5  
 <211> 499  
 5 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae

ES 2 701 765 T3

<400> 5

Met Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Gln Val Ala  
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile  
 20 25 30

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr  
 35 40 45

Ala Thr Cys Asn Thr Ala Asp Arg Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln  
 50 55 60

Gly Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala  
 65 70 75 80

Ile Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr  
 85 90 95

Gly Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn  
 100 105 110

Glu Asn Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu  
 115 120 125

His Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met  
 130 135 140

Gly Tyr Asp Gly Ala Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Gln Asp Tyr Phe His Pro Phe Cys Leu Ile Gln Asn Tyr  
 165 170 175

Glu Asp Gln Thr Gln Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val  
 180 185 190

Ser Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp  
 195 200 205

Tyr Asp Trp Val Gly Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu  
 210 215 220

5

ES 2 701 765 T3

Arg Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr  
 225 230 235 240

Asn Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp  
 245 250 255

Pro Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn  
 260 265 270

Tyr Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly  
 275 280 285

Ser Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys  
 290 295 300

Pro Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro  
 305 310 315 320

Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala  
 325 330 335

Ala Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln  
 340 345 350

Glu Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr  
 355 360 365

Trp Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala  
 370 375 380

Ser Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe  
 385 390 395 400

Val Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala  
 405 410 415

Met Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn  
 420 425 430

Lys Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly  
 435 440 445

Tyr Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val  
 450 455 460

Thr Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu



ES 2 701 765 T3

180 185 190

Ile Val Ser Lys Leu Asn Ser Ile Val Ser Gly Trp Val Ser Asp Tyr  
 195 200 205

Gly Phe Asp Gly Leu Arg Ile Asp Thr Val Lys His Val Arg Lys Asp  
 210 215 220

Phe Trp Asp Gly Tyr Val Ser Ala Ala Gly Val Phe Ala Thr Gly Glu  
 225 230 235 240

Val Leu Ser Gly Asp Val Ser Tyr Val Ser Pro Tyr Gln Gln His Val  
 245 250 255

Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Tyr Asp Val Phe  
 260 265 270

Thr Lys Ser Arg Thr Met Ser Arg Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asp Ile  
 275 280 285

Lys Asn Gly Asn Phe Lys Asn Ile Asp Val Leu Val Asn Phe Ile Asp  
 290 295 300

Asn His Asp Gln Pro Arg Leu Leu Ser Lys Ala Asp Gln Ser Leu Val  
 305 310 315 320

Lys Asn Ala Leu Ala Tyr Ser Phe Met Val Gln Gly Ile Pro Val Leu  
 325 330 335

Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Ser Phe Lys Gly Gly Asn Asp Pro Asn Asn  
 340 345 350

Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Gly Tyr Ser Thr Thr Ser Asp Met Tyr  
 355 360 365

Lys Phe Val Thr Thr Leu Val Lys Ala Arg Lys Gly Ser Asn Ser Thr  
 370 375 380

Val Asn Met Gly Ile Ala Gln Thr Asp Asn Val Tyr Val Phe Gln Arg  
 385 390 395 400

Gly Gly Ser Leu Val Val Val Asn Asn Tyr Gly Gln Gly Ser Thr Asn  
 405 410 415

Thr Ile Thr Val Lys Ala Gly Ser Phe Ser Asn Gly Asp Thr Leu Thr  
 420 425 430

ES 2 701 765 T3

Asp Val Phe Ser Asn Lys Ser Val Thr Val Gln Asn Asn Gln Ile Thr  
 435 440 445

Phe Gln Leu Gln Asn Gly Asn Pro Ala Ile Phe Gln Lys Asn  
 450 455 460

<210> 7

<211> 718

5 <212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 7

Met Val Ser Ile Arg Arg Ser Phe Glu Ala Tyr Val Asp Asp Met Asn  
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Val Leu Ile Pro Ala Glu Gln Lys Glu Ile Met Thr Pro  
 20 25 30

Pro Phe Arg Leu Glu Thr Glu Ile Thr Asp Phe Pro Leu Ala Val Arg  
 35 40 45

Glu Glu Tyr Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Lys Tyr Val Cys Val Ser Asp  
 50 55 60

His Pro Val Thr Phe Gly Lys Ile His Cys Val Arg Ala Ser Ser Gly  
 65 70 75 80

His Lys Thr Asp Leu Gln Ile Gly Ala Val Ile Arg Thr Ala Ala Phe  
 85 90 95

Asp Asp Glu Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Gly Ala Val Tyr Thr Ala  
 100 105 110

Asp His Thr Val Phe Lys Val Trp Ala Pro Ala Ala Thr Ser Ala Ala  
 115 120 125

Val Lys Leu Ser His Pro Asn Lys Ser Gly Arg Thr Phe Gln Met Thr  
 130 135 140

Arg Leu Glu Lys Gly Val Tyr Ala Val Thr Val Thr Gly Asp Leu His  
 145 150 155 160

Gly Tyr Glu Tyr Leu Phe Cys Ile Cys Asn Asn Ser Glu Trp Met Glu  
 165 170 175

Thr Val Asp Gln Tyr Ala Lys Ala Val Thr Val Asn Gly Glu Lys Gly  
 180 185 190

10

ES 2 701 765 T3

Val Val Leu Arg Pro Asp Gln Met Lys Trp Thr Ala Pro Leu Lys Pro  
 195 200 205

Phe Ser His Pro Val Asp Ala Val Ile Tyr Glu Thr His Leu Arg Asp  
 210 215 220

Phe Ser Ile His Glu Asn Ser Gly Met Ile Asn Lys Gly Lys Tyr Leu  
 225 230 235 240

Ala Leu Thr Glu Thr Asp Thr Gln Thr Ala Asn Gly Ser Ser Ser Gly  
 245 250 255

Leu Ala Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Thr His Val Glu Leu Leu Pro  
 260 265 270

Val Asn Asp Phe Ala Gly Val Asp Glu Glu Lys Pro Leu Asp Ala Tyr  
 275 280 285

Asn Trp Gly Tyr Asn Pro Leu His Phe Phe Ala Pro Glu Gly Ser Tyr  
 290 295 300

Ala Ser Asn Pro His Asp Pro Gln Thr Arg Lys Thr Glu Leu Lys Gln  
 305 310 315 320

Met Ile Asn Thr Leu His Gln His Gly Leu Arg Val Ile Leu Asp Val  
 325 330 335

Val Phe Asn His Val Tyr Lys Arg Glu Asn Ser Pro Phe Glu Lys Thr  
 340 345 350

Val Pro Gly Tyr Phe Phe Arg His Asp Glu Cys Gly Met Pro Ser Asn  
 355 360 365

Gly Thr Gly Val Gly Asn Asp Ile Ala Ser Glu Arg Arg Met Ala Arg  
 370 375 380

Lys Phe Ile Ala Asp Cys Val Val Tyr Trp Leu Glu Glu Tyr Asn Val  
 385 390 395 400

Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Leu Gly Ile Leu Asp Ile Asp Thr Val  
 405 410 415

Leu Tyr Met Lys Glu Lys Ala Thr Lys Ala Lys Pro Gly Ile Leu Leu  
 420 425 430

Phe Gly Glu Gly Trp Asp Leu Ala Thr Pro Leu Pro His Glu Gln Lys  
 435 440 445

ES 2 701 765 T3

Ala Ala Leu Ala Asn Ala Pro Arg Met Pro Gly Ile Gly Phe Phe Asn  
450 455 460

Asp Met Phe Arg Asp Ala Val Lys Gly Asn Thr Phe His Leu Lys Ala  
465 470 475 480

Thr Gly Phe Ala Leu Gly Asn Gly Glu Ser Ala Gln Ala Val Met His  
485 490 495

Gly Ile Ala Gly Ser Ser Gly Trp Lys Ala Leu Ala Pro Ile Val Pro  
500 505 510

Glu Pro Ser Gln Ser Ile Asn Tyr Val Glu Ser His Asp Asn His Thr  
515 520 525

Phe Trp Asp Lys Met Ser Phe Ala Leu Pro Gln Glu Asn Asp Ser Arg  
530 535 540

Lys Arg Ser Arg Gln Arg Leu Ala Ala Ala Ile Ile Leu Leu Ala Gln  
545 550 555 560

Gly Val Pro Phe Ile His Ser Gly Gln Glu Phe Phe Arg Thr Lys Gln  
565 570 575

Gly Val Glu Asn Ser Tyr Gln Ser Ser Asp Ser Ile Asn Gln Leu Asp  
580 585 590

Trp Asp Arg Arg Glu Thr Phe Lys Glu Asp Val His Tyr Ile Arg Arg  
595 600 605

Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ala His Pro Ala Phe Arg Leu Arg Ser Ala  
610 615 620

Ala Asp Ile Gln Arg His Leu Glu Cys Leu Thr Leu Lys Glu His Leu  
625 630 635 640

Ile Ala Tyr Arg Leu Tyr Asp Leu Asp Glu Val Asp Glu Trp Lys Asp  
645 650 655

Ile Ile Val Ile His His Ala Ser Pro Asp Ser Val Glu Trp Arg Leu  
660 665 670

Pro Asn Asp Ile Pro Tyr Arg Leu Leu Cys Asp Pro Ser Gly Phe Gln  
675 680 685

Glu Asp Pro Thr Glu Ile Lys Lys Thr Val Ala Val Asn Gly Ile Gly  
690 695 700

Thr Val Ile Leu Tyr Leu Ala Ser Asp Leu Lys Ser Phe Ala  
705 710 715

ES 2 701 765 T3

<211> 850  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus cereus (cepa ZK/E33L)

5 <400> 8

```

Met Thr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ser Val Leu Leu Leu Thr Ile Ile
1                               10                          15

Val Met Leu Ser Ser Val Tyr Ser Phe Gln Asn Val Lys Ala Val Ser
                20                          25                          30

Asn Ser Lys Thr Thr Glu Val Ile Ile His Tyr Lys Glu Gln Ser Gly
                35                          40                          45

Asn Thr Lys Asp Trp Asn Leu Trp Ile Trp Gly Glu Asn Ser Asn Gly
                50                          55                          60

Lys Ser Tyr Glu Phe Thr Gly Glu Asp Glu Phe Gly Lys Tyr Ala Lys
65                          70                          75                          80

Ile Asn Ile Asp Gly Asp Tyr Asn Arg Leu Gly Phe Ile Ile Arg Thr
                85                          90                          95

Ser Glu Trp Glu Lys Asp Gly Gly Asp Arg Trp Ile Glu Asn Ile Lys
                100                         105                         110

Asp Gly Arg Ala Glu Val Trp Ile Leu Ser Gly Asp Glu Lys Val Tyr
                115                         120                         125

Asn Ser Lys Pro Ser Ser Asp Leu Ser Ile Gln Lys Ala Thr Ile Asp
                130                         135                         140

Ser Phe His Glu Ile Thr Val Thr Thr Asn Val Pro Phe His Ile Lys
145                         150                         155                         160

Glu Lys Lys Ile Glu Met Glu Gly Ile Lys Ile Lys Ser Ile Ser Pro
                165                         170                         175

Tyr Asp Ile Asn Ser Gly Asp Ile Thr Asn Lys Val Lys Ile Ile Thr
                180                         185                         190

Asp Gln Lys Ile Asp Leu Lys Gln Thr Tyr Lys Val Lys Ile Glu Asn
                195                         200                         205
    
```

ES 2 701 765 T3

Leu Ala Asp Thr Asn Thr Glu Ile Gly Lys Val Ile Arg Thr Glu Glu  
 210 215 220

Phe Asp Lys Leu Phe Tyr Tyr Gly Gly Asn Asp Leu Gly Asn Ile Tyr  
 225 230 235 240

Thr Pro Gln His Thr Lys Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Glu  
 245 250 255

Ala Lys Leu Val Thr Tyr Lys Lys Trp Asn Asp Lys Ile Gly Thr Glu  
 260 265 270

Ile Asn Met Gln Gln Gly Glu Lys Gly Thr Trp Lys Ala Glu Leu Lys  
 275 280 285

Gly Asn Gln Lys Gly Leu Tyr Tyr Thr Tyr Lys Val Lys Ile Gly Asp  
 290 295 300

Lys Trp Thr Glu Ala Val Asp Pro Tyr Ala Arg Ala Ala Ser Val Asn  
 305 310 315 320

Gly Asp Lys Gly Ala Val Val Asp Leu Glu Glu Thr Asn Pro Lys Arg  
 325 330 335

Trp Asn Thr Asn Lys Lys Pro Lys Leu Lys Asn Pro Glu Asp Ala Ile  
 340 345 350

Ile Tyr Glu Leu His Val Arg Asp Leu Ser Ile Gln Pro Glu Ser Gly  
 355 360 365

Ile Lys Gln Lys Gly Lys Tyr Leu Gly Val Thr Glu Lys Gly Thr Lys  
 370 375 380

Gly Pro Glu Gly Val Lys Thr Gly Leu Asp His Met Lys Asp Leu Gly  
 385 390 395 400

Val Thr His Val Gln Leu Leu Pro Ile Phe Asp Tyr Ala Ser Val Asn  
 405 410 415

Glu Glu Lys Val Asn Glu Pro Gln Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Lys  
 420 425 430

Asn Phe Asn Val Pro Glu Gly Ser Tyr Ser Thr Asn Pro Tyr Glu Pro  
 435 440 445

Thr Val Arg Ile Thr Glu Leu Lys Gln Met Ile Gln Thr Leu His Asp

ES 2 701 765 T3

450						455									460
Asn 465	Asn	Leu	Arg	Val	Val	Met	Asp	Val	Val	Tyr	Asn	His	Met	Tyr	Asn 480
					470					475					
Ala	Ala	Glu	Ser	Asn	Phe	His	Lys	Leu	Val	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Arg 495
				485					490						
Tyr	Asn	Glu	Asp	Gly	Thr	Phe	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Val	Gly	Asn	Asp 510
			500					505					510		
Thr	Ala	Ser	Glu	Arg	Lys	Met	Met	Arg	Lys	Phe	Met	Ile	Asp	Ser	Val 525
		515					520					525			
Thr	Tyr	Trp	Ala	Lys	Glu	Tyr	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu 540
	530					535					540				
Met	Gly	Ile	His	Asp	Tyr	Glu	Thr	Met	Asn	Glu	Ile	Arg	Lys	Ala	Val 560
545					550					555					
Asn	Gln	Ile	Asp	Pro	Ser	Ile	Ile	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Trp	Asp	Leu 575
				565					570						
Asn	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Asn	Gln	Lys	Asn	Ala	Glu 590
			580					585							
Lys	Met	Lys	Gly	Ile	Ala	His	Phe	Asn	Asp	Asn	Ile	Arg	Asp	Gly	Leu 605
		595					600					605			
Lys	Gly	Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Gly	Phe	Val	Asn	Gly	Lys 620
	610					615						620			
Glu	Asn	Met	Glu	Asp	Arg	Ile	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Asp 640
625					630					635					
Tyr	Asp	Thr	Asn	Ser	Ser	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Glu	Gln	Val	Leu	Thr 655
				645					650						
Tyr	Val	Glu	Ala	His	Asp	Asn	His	Thr	Leu	Trp	Asp	Lys	Leu	Glu	Leu 670
			660					665							
Thr	Asn	Pro	Gly	Asp	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Gln	Met	His	Lys	Leu 685
		675					680					685			
Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Pro	Phe	Leu	His	Ala 700
690						695					700				

ES 2 701 765 T3

Gly Gln Glu Phe Met Arg Thr Lys Tyr Gly Asp His Asn Ser Tyr Lys  
705 710 715 720

Ser Pro Asp Ser Ile Asn Gln Met Asp Trp Leu Arg Arg Ala Ala Phe  
725 730 735

Asn Asn Glu Val Asp Tyr Met Lys Gly Leu Ile Glu Leu Arg Lys Lys  
740 745 750

Tyr Pro Ala Phe Arg Met Thr Ser Ala Glu Gln Ile Lys Thr His Val  
755 760 765

Ser Phe Ile Asp Ala Pro Lys Asn Thr Val Ala Tyr Thr Ile Glu Gly  
770 775 780

Asn Lys Asn Glu Tyr Phe Thr Val Ala His Asn Ala Asn Arg Glu Ser  
785 790 795 800

Val Glu Ile Ser Leu Pro Ser Lys Gly Pro Trp Lys Val Leu Val Asp  
805 810 815

Gly Lys Gln Ala Gly Ser Lys Pro Leu Tyr Val Val His Asp Asn Lys  
820 825 830

Ile Lys Val Pro Ala Leu Ser Ser Leu Val Leu Lys Thr Glu Lys Pro  
835 840 845

Ile Lys  
850

<210> 9

<211> 589

5 <212> PRT

<213> Lactobacillus acidophilus (cepa ATCC 700396/NCK56/N2/NCFM)

<400> 9

Met Lys Ile Thr Tyr Asp Ser Trp Gln Glu Gln Tyr Lys Asn Pro Phe  
1 5 10 15

Gly Ala Val Lys Ala Gly Asn Thr Val Lys Trp Ser Ile Lys Ile Asp  
20 25 30

Gln Val Ile Gln Gly Ala Val Leu Trp Leu Thr Lys Ser Arg Glu Thr  
35 40 45

Pro Val Ala Tyr Pro Met Asn Tyr Asp Glu Gln Thr Lys Met Tyr Thr  
50 55 60

10

ES 2 701 765 T3

Thr Gln Val Lys Ile Gly Thr Ser Gly Leu Tyr Asn Tyr Tyr Phe Ala  
 65 70 75 80

Leu Gln Gln Asn Asn Gln Ile Val Tyr Ile Asp Gln Gly Leu Phe Gly  
 85 90 95

Lys Gly His Val Thr Lys Ser Asp His Asp Leu Arg Gln Phe Gln Leu  
 100 105 110

Thr Cys Tyr Asp Ile Ala Thr Pro Arg Ile Asp Trp Tyr Gln Lys Gly  
 115 120 125

Ile Val Tyr Gln Ile Phe Pro Asp Arg Phe Ala Asn Gly Asn Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Glu Val Ile Gly Lys Lys Arg Asn Ser Phe Ile Tyr Ala Thr Lys  
 145 150 155 160

Glu Asp Ile Pro Tyr Tyr Ile Lys Asn Ser Glu Gly Ala Ile Val Arg  
 165 170 175

Trp Asp Phe Phe Gly Gly Asn Leu Thr Gly Ile Arg Lys Lys Ile Pro  
 180 185 190

Tyr Leu Lys Gln Leu Gly Val Thr Val Leu Tyr Leu Asn Pro Ile Phe  
 195 200 205

Leu Ala Lys Ser Asn His Arg Tyr Asp Thr Thr Asp Phe Met Lys Ile  
 210 215 220

Asp Pro Met Leu Gly Asp Glu Lys Asp Leu Ala Asp Leu Ile Arg Glu  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asn Asn Met His Leu Ile Leu Asp Gly Val Phe Asn His  
 245 250 255

Val Gly Phe Asp Ser Ile Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asp Lys Asn  
 260 265 270

Ser Asn Tyr Arg Ser Trp Phe Asn Phe Gln Asp Tyr Pro Asn Lys Tyr  
 275 280 285

Gln Ser Trp Trp Gly Val Lys Ser Leu Pro Thr Val Asn Lys Asp Asn  
 290 295 300

Ser Glu Tyr Gln Asn Leu Val Tyr Gly Asp His Gly Val Leu Ala Lys  
 305 310 315 320

ES 2 701 765 T3

Trp Lys Val Asp Gly Trp Arg Leu Asp Val Ala Asp Glu Leu Pro Met  
 325 330 335

Asp Phe Leu Arg Asn Ile Arg Asn Arg Leu Ile Lys Glu Asn Cys Pro  
 340 345 350

Ile Leu Ile Gly Glu Val Trp Glu Asp Ala Ser Asn Lys Phe Val Asn  
 355 360 365

Gly Glu Tyr Arg Thr Tyr Thr Ala Gly Asp Asn Leu Met Gly Val Met  
 370 375 380

Asn Tyr Pro Ile Arg Asn Phe Ile Ile Ser Leu Leu Ser Ala Gln Asp  
 385 390 395 400

Ser Thr Ile Glu Ile Glu Ala Met Asn Asp Leu Ala Leu Leu Ile Glu  
 405 410 415

Asn Tyr Pro Thr Asp Phe Leu His Asn Cys Leu Asn Asn Ile Gly Thr  
 420 425 430

His Asp Thr Val Arg Ile Lys Thr Val Leu Asn Lys Asn Asp Asn Leu  
 435 440 445

Val Met Met Ala Phe Gly Leu Leu Phe Met Met Pro Gly Val Pro Cys  
 450 455 460

Ile Tyr Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Asp  
 465 470 475 480

Asn Arg Arg Tyr Phe Leu Trp Gly His Glu Asp Lys Lys Leu Ile Asp  
 485 490 495

Cys Val Ser Ser Trp Thr Lys Ile Arg Lys Gln Asn Pro Val Leu Val  
 500 505 510

Asn Gly Lys Ile Gly Phe Val His Leu Ser Ala Gly Val Asn Ser Ile  
 515 520 525

Val Arg Tyr Asn Asp Gln Glu Met Ile Met Tyr Cys Val Asn Cys Thr  
 530 535 540

Asn Glu Asp Val Ile Pro Leu Arg Glu Lys Tyr Ser Phe Tyr Trp Leu  
 545 550 555 560

Pro Ser Ile Ile Ile Asp Lys Ile Lys Asp Thr Leu Asp Gln Ile Gln  
 565 570 575

Leu Lys Ala Gln Thr Asp Phe Ile Lys Lys Ile Ser Leu  
 580 585

<210> 10  
 5 <211> 605

ES 2 701 765 T3

<212> PRT  
 <213> Aspergillus niger

<400> 10

5

```

Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala
 1                               5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr
                20                25                30

Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly
                35                40                45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro
 50                55                60

Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg
 65                70                75                80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser
                85                90                95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln
                100                105                110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val
 115                120                125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp
 130                135                140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala
 145                150                155                160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile
                165                170                175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr
                180                185                190

Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val
 195                200                205
  
```

ES 2 701 765 T3

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val  
 260 265 270

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp





ES 2 701 765 T3

Leu Leu Asp Leu Pro Val Gly Ile Asn Met Gln Asp Gln Thr Thr Thr  
 325 330 335  
 Thr Val Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala  
 340 345 350  
 Val Phe Phe Ala Asn Phe Thr Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Pro Gln  
 355 360 365  
 Ala Arg Asp Leu Leu Asn Thr Lys Leu Asp Gln Trp Ala Glu Glu Thr  
 370 375 380  
 Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Val Thr Ala Leu Lys Val Gln Tyr  
 385 390 395 400  
 Glu Asn Tyr Arg Asn Trp Leu Leu Asp Glu Asp Val Ala Phe Ala Glu  
 405 410 415  
 Leu Phe Met Asp Thr Glu Gly Lys Ile Asn Phe Asp Leu Trp Asp Leu  
 420 425 430  
 Ile Pro Phe Thr Arg Gly Ser Val His Ile Leu Ser Ser Asp Pro Tyr  
 435 440 445  
 Leu Trp Gln Phe Ala Asn Asp Pro Lys Phe Phe Leu Asn Glu Phe Asp  
 450 455 460  
 Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Ser Lys Leu Ala Arg Asp Leu Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Gln Gly Ala Met Lys Glu Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Leu Pro Gly Tyr  
 485 490 495  
 Asn Leu Val Gln Asn Ala Thr Leu Ser Gln Trp Ser Asp Tyr Val Leu  
 500 505 510  
 Gln Asn Phe Arg Pro Asn Trp His Ala Val Ser Ser Cys Ser Met Met  
 515 520 525  
 Ser Arg Glu Leu Gly Gly Val Val Asp Ala Thr Ala Lys Val Tyr Gly  
 530 535 540  
 Thr Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Val  
 545 550 555 560  
 Ser Ser His Val Met Thr Ile Phe Tyr Gly Met Ala Leu Lys Val Ala  
 565 570 575  
 Asp Ala Ile Leu Asp Asp Tyr Ala Lys Ser Ala  
 580 585

ES 2 701 765 T3

<210> 12  
 <211> 730  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger

5

<400> 12

```

Met Arg His Phe Trp Leu Leu Pro Ala Val Ala Gly Ile Ala Gly Ala
 1                    5                      10                15

Gln Cys Pro Tyr Leu Ser Gly Glu Met Ser Phe Thr Gln Glu Gln Asp
 20                      25                30

Asn Ala Gly Asp Thr Ile Glu Val Thr Glu Gln Pro Ile Asp Asn Thr
 35                      40                45

Leu Tyr Val Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Met Thr Thr Asp Phe Gly Thr
 50                      55                60

Pro Ile Ser Asp Gln Thr Ser Leu Lys Ala Gly Pro Arg Gly Pro Thr
 65                      70                75                80

Leu Leu Glu Asp Phe Ile Phe Arg Gln Lys Leu Gln Arg Phe Asp His
 85                      90                95

Glu Arg Val Pro Glu Arg Val Val His Ala Arg Gly Ala Gly Ala Tyr
 100                     105                110

Gly Thr Phe Lys Ser Tyr Ala Asp Trp Ser Asn Val Thr Ala Ala Asp
 115                     120                125

Phe Leu Ser Ala Asn Asp Lys Glu Thr Pro Met Phe Cys Arg Phe Ser
 130                     135                140

Thr Val Val Gly Phe Arg Gly Ser Val Asp Thr Ala Arg Asp Val His
 145                     150                155                160

Gly His Ala Cys Arg Phe Tyr Thr Asp Glu Gly Asn Tyr Asp Ile Val
 165                     170                175

Gly Ile Asn Phe Ala Pro Phe Phe Ile Gln Asp Ala Ile Gln Phe Pro
 180                     185                190

Asp Leu Val His Ala Ile Lys Pro Met Pro Asn Asn Glu Ile Pro Gln
 195                     200                205
    
```

ES 2 701 765 T3

Ala Ala Thr Ala His Thr Ser Ala Trp Asp Phe Phe Ser Gln Gln Ser  
 210 215 220

Thr Ala Leu His Ser Ala Leu Trp Leu Met Ser Gly Asn Gly Ile Pro  
 225 230 235 240

Arg Ser Phe Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Val His Ser Phe Arg Phe  
 245 250 255

Val Ala Ala Asn Gly Thr Ser Lys Val Val Arg Thr Pro Trp Lys Ser  
 260 265 270

Gln Gln Gly Val Ala Ser Leu Val Trp Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ala  
 275 280 285

Gly Lys Asn Ser Asp Tyr His Arg Gln Asp Leu Tyr Asn Ala Met Pro  
 290 295 300

Asn Gly His Tyr Pro Lys Tyr Glu Leu Gln Ala Gln Ile Met Asp Glu  
 305 310 315 320

Ala Asp Met Leu Arg Phe Gly Phe Asp Leu Leu Asp Pro Thr Lys Leu  
 325 330 335

Val Pro Glu Glu Val Val Pro Tyr Thr Pro Leu Gly Met Met Glu Leu  
 340 345 350

Asn Ala Asn Pro Thr Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln Ala Gly Phe  
 355 360 365

Gln Pro Gly His Val Val Pro Gly Ile Asp Phe Thr Asp Asp Pro Leu  
 370 375 380

Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Leu Thr Arg His  
 385 390 395 400

Gly Gly Pro Asn Phe Glu Gln Ile Pro Val Asn Arg Pro Arg Lys Pro  
 405 410 415

Val His Asn Asn Asn Arg Asp Gly Phe Gly Gln Gln Gln Ile Pro Thr  
 420 425 430

Asn Asn Trp Ala Tyr Thr Pro Asn Ser Met Ser Asn Gly Tyr Pro Met  
 435 440 445

Gln Ala Asn Gln Thr Gln Gly His Gly Phe Phe Thr Ala Pro Tyr Arg  
 450 455 460

ES 2 701 765 T3

Tyr Ala Ser Gly His Leu Val Arg Gln Thr Ser Pro Thr Phe Asn Asp  
 465 470 475 480  
 His Trp Ser Gln Pro Ala Met Phe Trp Asn Ser Leu Ile Pro Ala Glu  
 485 490 495  
 Gln Gln Met Val Val Asn Ala Ile Val Phe Glu Asn Ser Lys Val Asn  
 500 505 510  
 Ser Pro His Val Arg Lys Asn Val Val Asn Gln Leu Asn Met Val Asn  
 515 520 525  
 Asn Asn Leu Ala Val Arg Val Ala Arg Gly Leu Gly Leu Asp Glu Pro  
 530 535 540  
 Ser Pro Asn Pro Thr Tyr Tyr Thr Ser Asn Lys Thr Ser Asn Val Gly  
 545 550 555 560  
 Thr Phe Gly Lys Pro Leu Leu Ser Ile Glu Gly Leu Gln Val Gly Phe  
 565 570 575  
 Leu Ala Ser Asn Ser His Pro Glu Ser Ile Lys Gln Gly Gln Ala Met  
 580 585 590  
 Ala Ala Gln Phe Ser Ala Ala Gly Val Asp Leu Asn Ile Val Thr Glu  
 595 600 605  
 Ala Tyr Ala Asp Gly Val Asn Thr Thr Tyr Ala Leu Ser Asp Ala Ile  
 610 615 620  
 Asp Phe Asp Ala Leu Ile Ile Ala Asp Gly Val Gln Ser Leu Phe Ala  
 625 630 635 640  
 Ser Pro Ala Leu Ala Asn Gln Met Asn Ser Thr Ala Thr Ser Thr Leu  
 645 650 655  
 Tyr Pro Pro Ala Arg Pro Phe Gln Ile Leu Val Asp Ser Phe Arg Tyr  
 660 665 670  
 Gly Lys Pro Val Ala Ala Val Gly Ser Gly Ser Val Ala Leu Lys Asn  
 675 680 685  
 Ala Gly Ile Asp Ser Ser Arg Ser Gly Val Tyr Thr Gly Ser Ser Glu  
 690 695 700  
 Thr Thr Glu Lys Ile Ala Lys Glu Val Leu Glu Gly Leu Tyr Thr Phe

ES 2 701 765 T3

705

710

715

720

Arg Phe Val Asp Arg Phe Ala Leu Asp Glu  
725 730

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de
- 5 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y  
c) incubar dicho líquido con
- (i) uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico y/o  
10 (ii) con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y/o  
iii) con uno o más microorganismos fermentadores de azúcar capaces de fermentar azúcar hasta un ácido orgánico y/o  
iv) con una enzima o una mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de azúcar para formar un ácido  
15 orgánico; y
- d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de  
20 intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas
- i) al menos una celda que consiste en:
- a) dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y  
25 b) dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas
- ii) un conjunto de membranas terminales  
30 iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas
- y donde la retirada implica las etapas de
- 35 I. insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; e  
II. insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y  
III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
IV. incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a  
40 intervalos,
- donde las etapas c) y d) se efectúan de forma al menos parcialmente simultánea, y donde dicho líquido de AX-REED es la bebida o dicho líquido de AX-REED puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida.
- 45 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el procedimiento es un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de
- a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y al menos un azúcar, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y  
50 b) si dicho azúcar no es glucosa, convertir al menos algo de dicho azúcar en glucosa; e  
c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; o incubar dicho líquido con una enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y  
d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido mientras se retiene al menos  
55 un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ácido orgánico se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas
- i) al menos una celda que consiste en:
- 60

- a. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y
- b. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas

5

- ii) un conjunto de membranas terminales
- iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos
- iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

10 y donde la retirada implica las etapas de

- I. insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; e
- II. insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y
- III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

15 IV. incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos

y donde dicho líquido de AX-REED puede ser la bebida o dicho líquido de AX-REED puede procesarse adicionalmente para obtener dicha bebida.

20

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el procedimiento es un procedimiento de preparación de una bebida, donde el procedimiento comprende las etapas de

25 a) proporcionar un líquido de partida que comprende al menos un micronutriente y maltosa, donde el micronutriente se selecciona de entre el grupo consistente en minerales, vitaminas, sales y antioxidantes; y

b) convertir al menos algo de dicha maltosa en glucosa; y

c) incubar dicho líquido con uno o más microorganismos fermentadores de glucosa capaces de fermentar glucosa hasta un ácido orgánico; o incubar dicho líquido con una enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa para formar un ácido orgánico; y

30 d) retirar al menos un 15 % del ácido orgánico generado en la etapa c) de dicho líquido mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de AX-REED, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas

35 i) al menos una celda que consiste en:

a. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y

40 b. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas

ii) un conjunto de membranas terminales

iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos

iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

45 y donde la retirada implica las etapas de

I. insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; e

II. insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y

III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

50 IV. incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos

y donde el líquido de AX-REED puede ser la bebida o el líquido de AX-REED puede procesarse adicionalmente para obtener dicha bebida.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde se efectúan las etapas c) y d) simultáneamente, donde se efectúan las etapas c) y d) en un equipo de REED.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el líquido de partida comprende un extracto de un cereal y/o un extracto y/o mosto de malta y/o un zumo de fruta con un alto contenido de azúcar, tal como zumo de manzana o zumo de pera.

60

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la etapa b) comprende convertir dicha maltosa en glucosa mediante la puesta en contacto de dicho líquido de partida con una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de maltosa a glucosa, por ejemplo con una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa, por ejemplo con una glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y homólogos funcionales de las mismas que comparten al menos un 70 % de identidad de secuencia con la misma.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la etapa b) comprende convertir dicha maltosa en glucosa mediante la puesta en contacto de dicho líquido de partida con un microorganismo catabolizante de maltosa capaz de convertir maltosa en glucosa, donde dicho microorganismo catabolizante de maltosa es por ejemplo *Lactobacillus sanfransiscensis*.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el microorganismo fermentador de glucosa es una bacteria acidoláctica tal como *Lactococcus lactis*.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la enzima o mezcla de enzimas es capaz de catalizar la conversión de maltosa en ácido maltobiónico.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la enzima o mezcla de enzimas capaces de catalizar la conversión de glucosa comprende glucosa oxidasa, tal como glucosa oxidasa de SEQ ID NO: 10 o un homólogo funcional de la misma que comparte al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 % de identidad de secuencia con la misma.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende además una etapa e), donde la etapa e) comprende retirar al menos parte de un catión del líquido de AX-REED mientras se retiene al menos un 65 % de dicho al menos un micronutriente en dicho líquido, obteniendo así un líquido de CX-REED, donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas

i) al menos una celda que consiste en:

a. dos membranas de intercambio catiónico que definen una cámara para el líquido de AX-REED; y  
b. dos cámaras adicionales para un segundo líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de AX-REED en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas,

ii) un conjunto de membranas terminales  
iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

y donde la retirada implica las etapas de

I. insertar el líquido AX-REED en la cámara para el líquido de AX-REED; y  
II. insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y  
III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
IV. incubar dicho líquido de AX-REED en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos  
donde dicho líquido de CX-REED puede ser la bebida o dicha CX-REED puede procesarse adicionalmente para obtener la bebida.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde el procedimiento comprende una etapa d) y una etapa e) que se efectúan de forma al menos parcialmente simultánea, donde la etapa d) comprende retirar al menos algo de dicho ácido orgánico de dicho líquido, donde dicho ion ácido se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio aniónico (AX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas

i) al menos una celda que consiste en:

a. dos membranas de intercambio aniónico que definen una cámara para el líquido de partida; y

b. dos cámaras adicionales para un líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida en lados opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas

- 5 ii) un conjunto de membranas terminales  
 iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
 iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

y donde la retirada implica las etapas de

10

- I. insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; e  
 II. insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y  
 III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
 IV. incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a

15 intervalos

y

la etapa e) comprende retirar al menos parte de un catión del líquido de partida o del líquido parcialmente tratado  
 20 con AX-REED, obteniendo así un líquido de REED,  
 donde dicho catión se retira mediante un apilamiento de membranas de diálisis electropotenciada inversa de intercambio catiónico (CX-REED), conteniendo dicho apilamiento de membranas

i) al menos una celda que consiste en:

25

- a. dos membranas de intercambio catiónico que definen una cámara para el líquido de partida o líquido tratado parcialmente con AX-REED; y  
 b. dos cámaras adicionales para un segundo líquido de diálisis, donde dichas dos cámaras adicionales están colocadas adyacentes a la cámara del líquido de partida o líquido parcialmente tratado con AX-REED en lados  
 30 opuestos y donde dichas dos cámaras adicionales pueden estar conectadas,

ii) un conjunto de membranas terminales

- iii) medios para aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas mediante al menos dos electrodos  
 iv) medios para invertir la dirección de campo eléctrico en dicho apilamiento de membranas

35

y donde la retirada implica las etapas de

I. insertar el líquido de partida o el líquido tratado parcialmente con AX-REED en la cámara para líquido de partida o líquido parcialmente tratado con AX-REED; y

40

- II. insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y  
 III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;  
 IV. incubar dicho líquido de partida o líquido parcialmente tratado con AX-REED en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos

45 donde las etapas d) y e) se efectúan de forma al menos parcialmente simultánea, y

donde el apilamiento de membranas de AX-REED está conectado con el de CX-REED

en paralelo, y donde se retiene al menos un 65 % del al menos un micronutriente en el líquido de REED.

50

13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación de azúcar a ácido orgánico en la bebida está en el intervalo de 6:1 a 10:1.

14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha  
 55 bebida contiene como máximo 45 g/l, preferiblemente como máximo 40 g/l, tal como máximo 37 g/l de azúcar.

15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bebida contiene en el intervalo de 3 a 10 g/l de ácido orgánico, tal como en el intervalo de 4 a 7 g/l de ácido orgánico.

60 16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el

procedimiento comprende una etapa adicional f), donde la etapa f) comprende añadir uno o más compuestos adicionales al líquido de partida y/o líquido de AX-REED y/o al líquido durante el procedimiento y/o a la bebida y/o el procedimiento comprende además una etapa g) de adición de uno o más líquidos adicionales al líquido de AX-REED, el líquido de CX-REED o el líquido de REED, obteniendo así la bebida.

5

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende además una etapa h) de incubación de líquido de AX-REED, líquido de CX-REED o líquido de REED con uno o más microorganismos.

10 18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la retirada de iones ácidos comprende las etapas de

I. insertar el líquido de partida en la cámara para el líquido de partida; e  
II. insertar un líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y

15 III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

IV. incubar dicho líquido de partida en dicha cámara, a través de la cual se invierte la dirección de campo eléctrico a intervalos, obteniendo así un líquido parcialmente tratado con AX-REED;

V. circular el líquido parcialmente tratado con AX-REED a un tanque,

VI. insertar el líquido parcialmente tratado con AX-REED a la cámara para líquido de partida,

20 VII. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

VIII. incubar dicho líquido tratado parcialmente con AX-REED en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos,

IX. opcionalmente repetir las etapas VI a VIII.

25 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la retirada de iones catiónicos comprende las etapas de

I. insertar el líquido de partida, el líquido parcialmente tratado con AX-REED o el líquido de AX-REED en la cámara para líquido de partida o líquido de AX-REED; y

30 II. insertar un segundo líquido de diálisis en las dos cámaras adicionales para el líquido de diálisis; y

III. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

IV. incubar dicho líquido de partida, líquido tratado parcialmente con AX-REED o líquido de AX-REED en dicha cámara, a través de la cual se invierte la dirección de campo eléctrico a intervalos, obteniendo así un líquido parcialmente tratado con CX-REED;

35 V. circular el líquido parcialmente tratado con CX-REED a un tanque,

VI. insertar el líquido parcialmente tratado con CX-REED en la cámara para líquido de AX-REED,

VII. aplicar un campo eléctrico sobre el apilamiento de membranas;

VIII. incubar dicho líquido tratado parcialmente con CX-REED en dicha cámara, a través de la cual la dirección del campo eléctrico se invierte a intervalos,

40 IX. opcionalmente repetir las etapas VI a VIII.

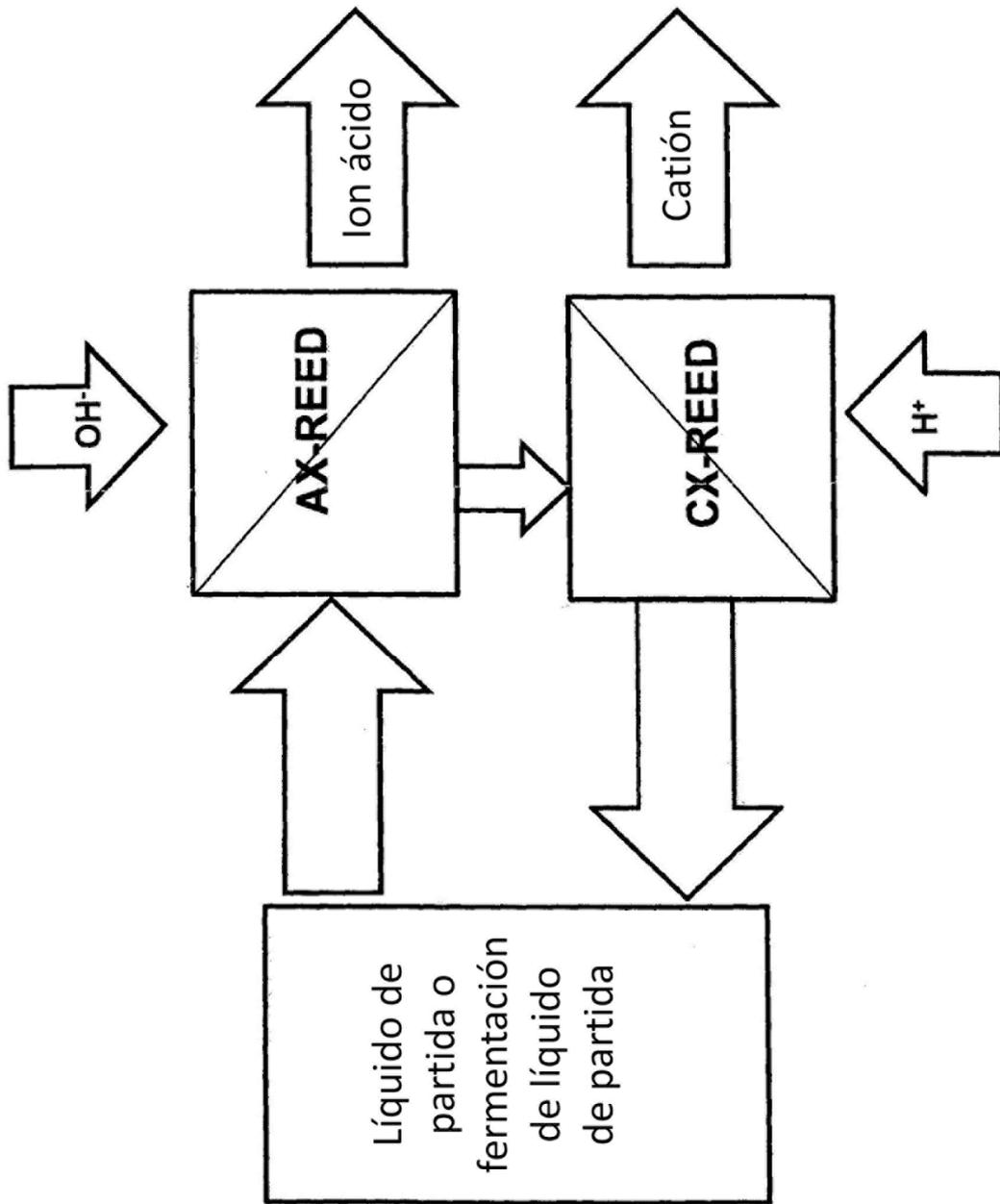


Fig. 1

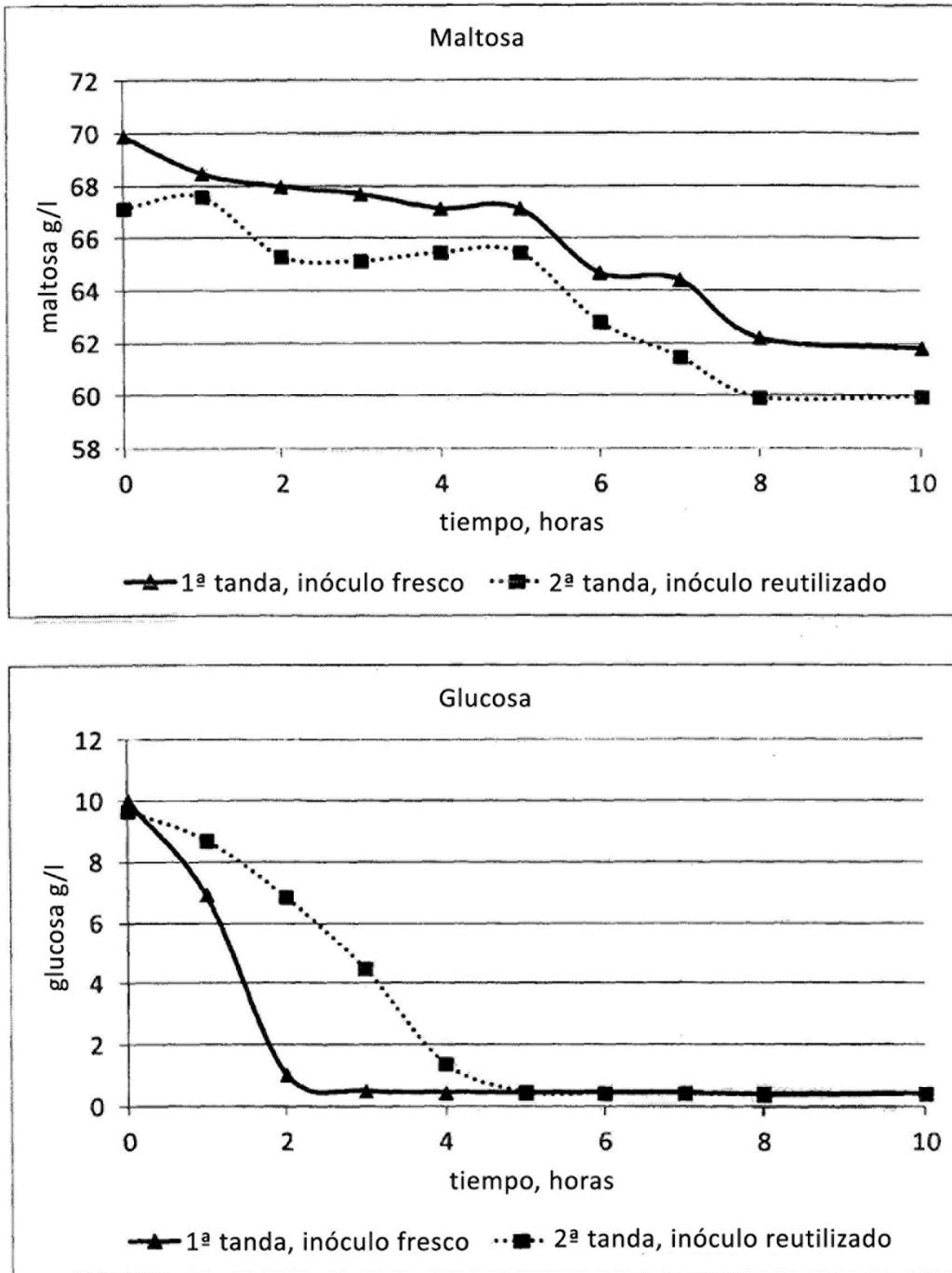
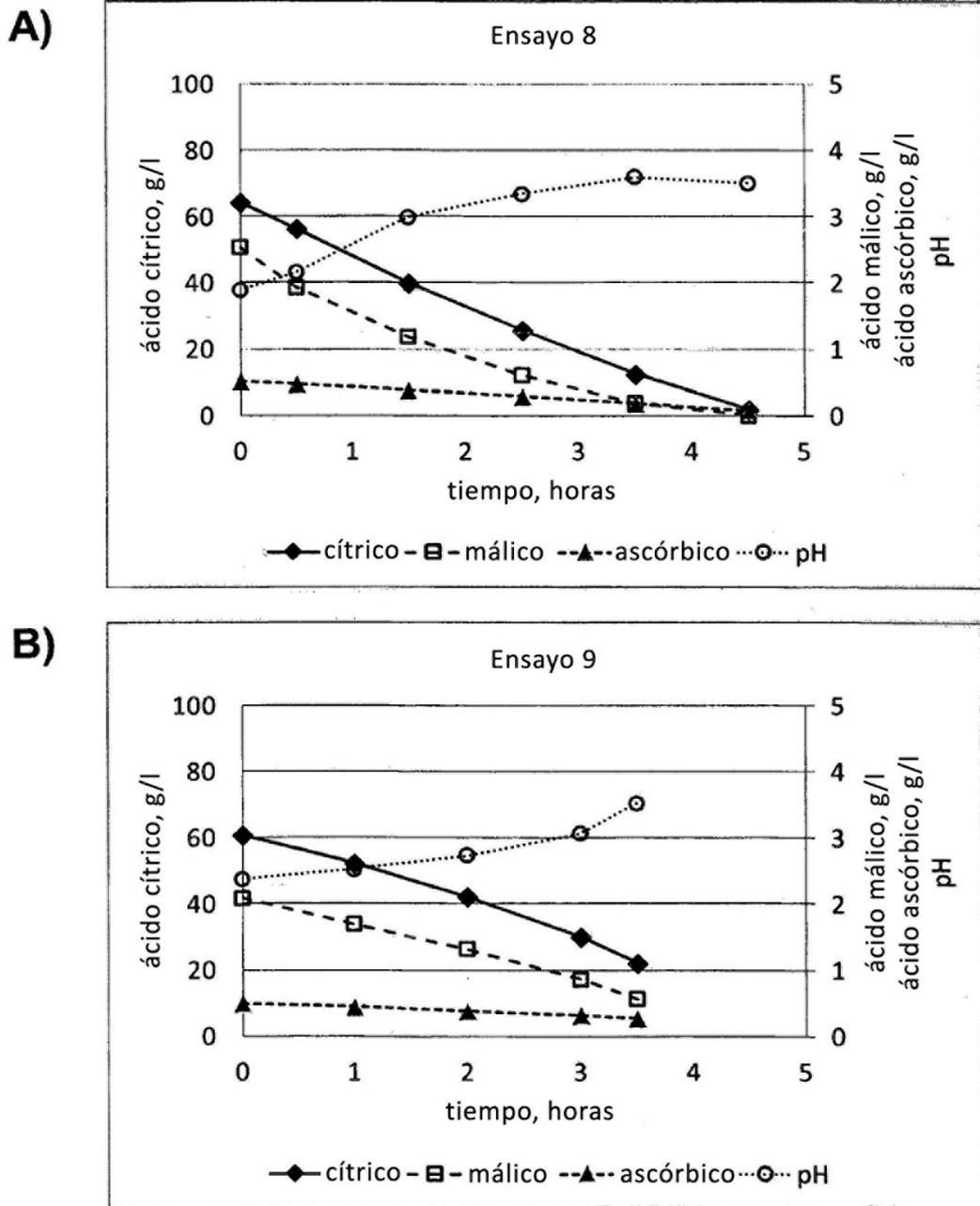


Fig. 2



**Fig. 3**

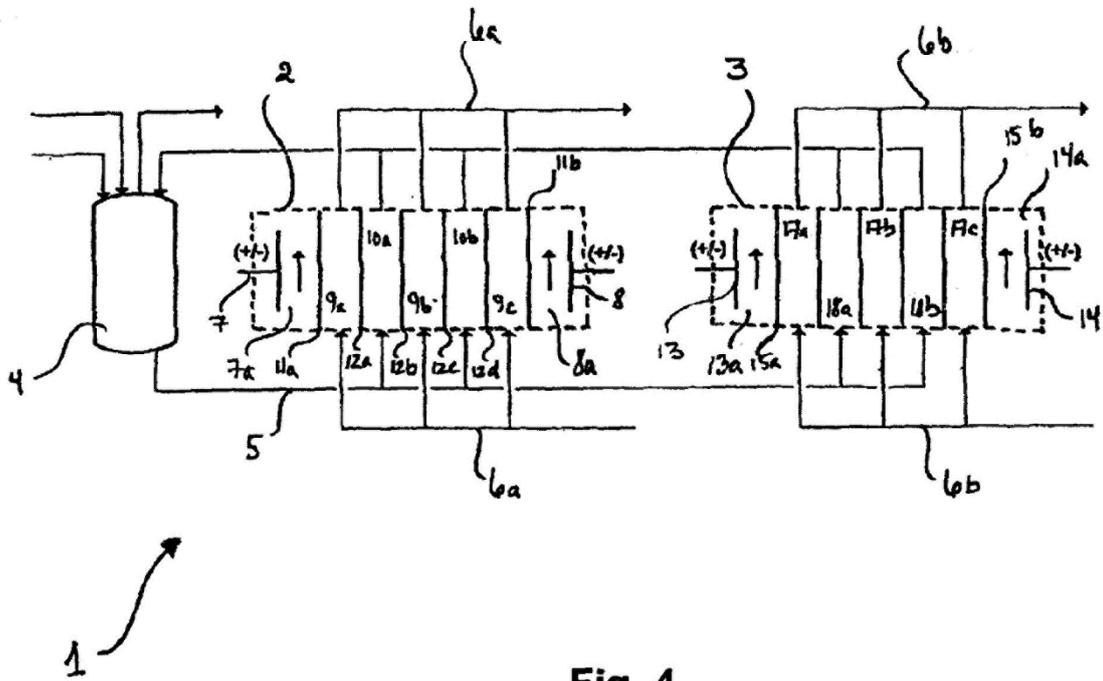
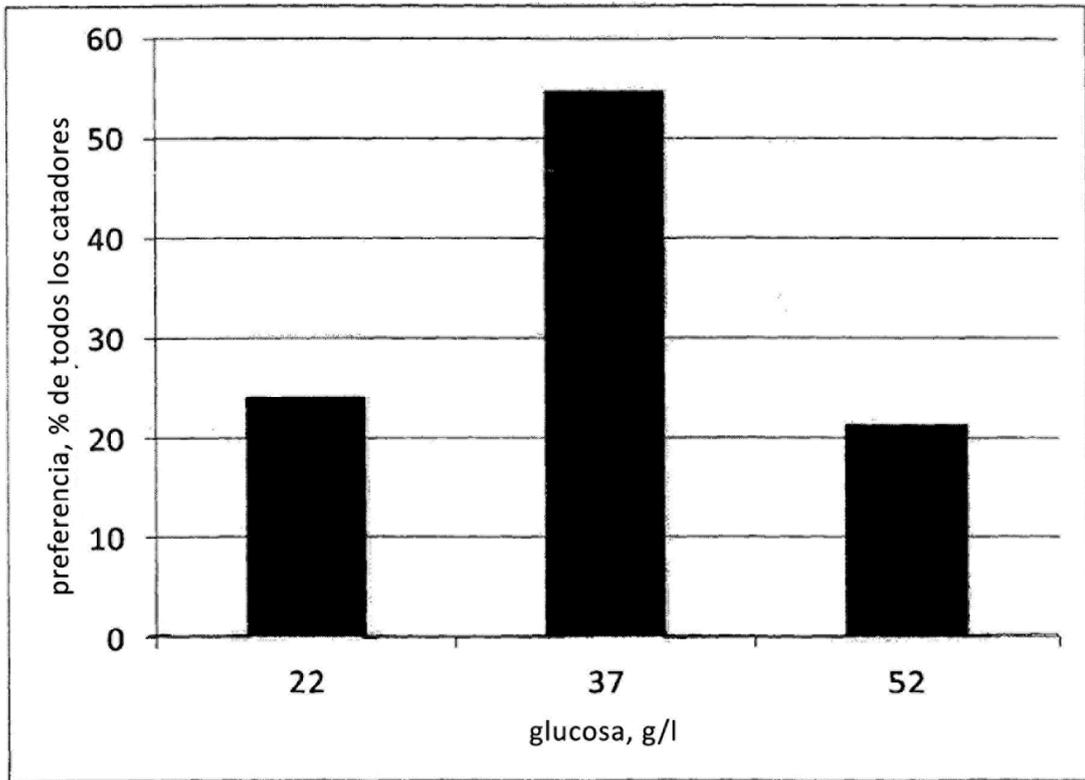


Fig. 4



**Fig. 5**

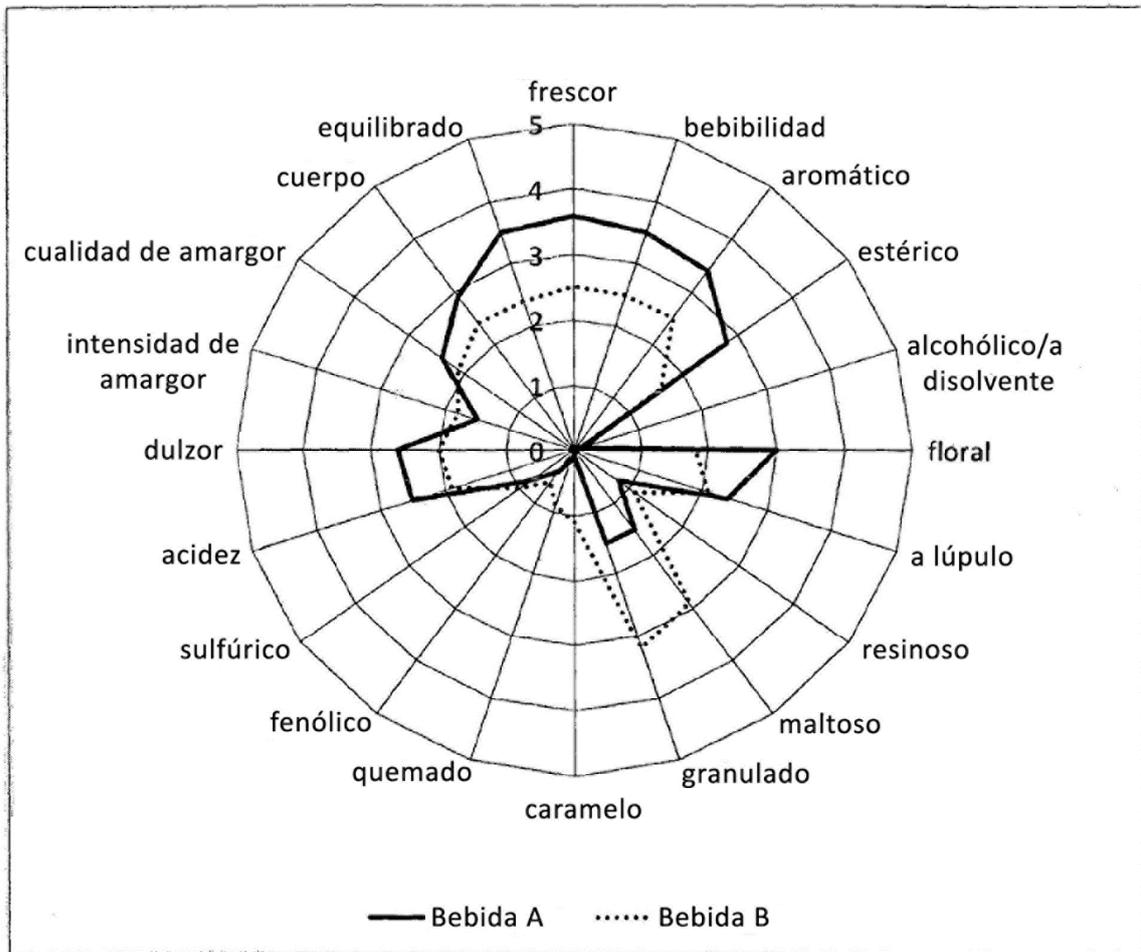
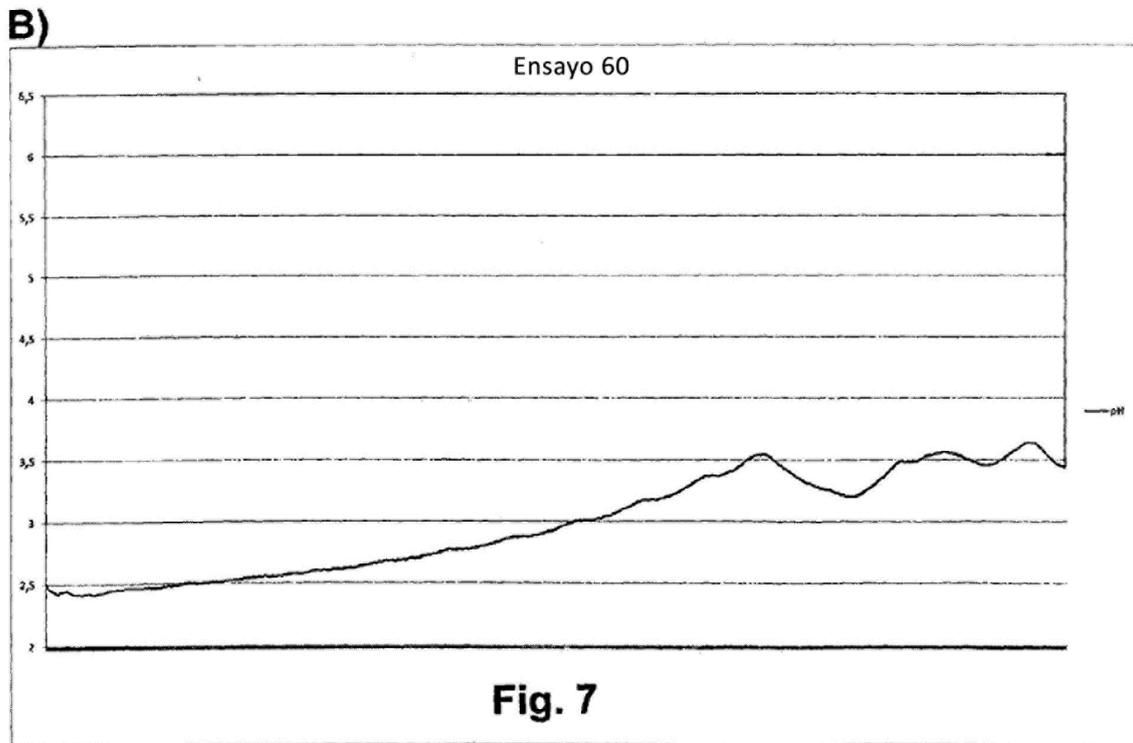
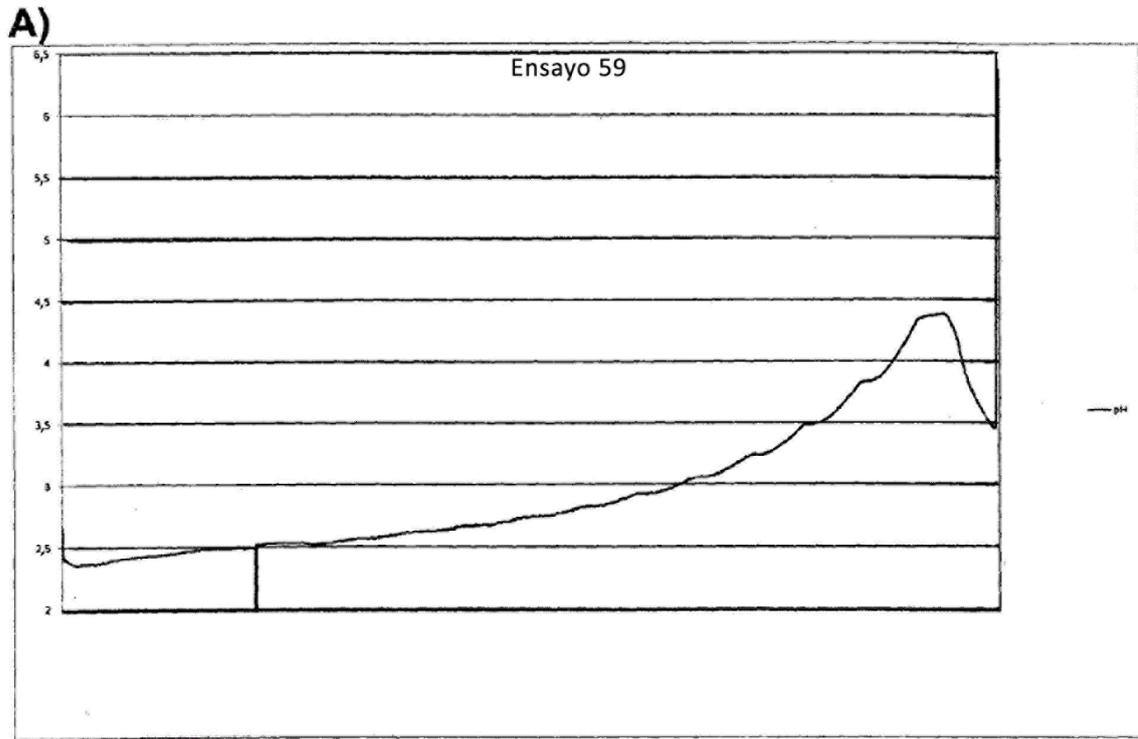


Fig. 6



**Fig. 7**