(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 739 899**

(51) Int. Cl.:

C13K 1/06	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)
A23L 2/62	(2006.01)
C08B 31/00	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
A23L 29/219	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2009 PCT/US2009/000570**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO09099546**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09708295 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2247204**

(54) Título: **Preparación de almidón hidrolizado enzimáticamente**

(30) Prioridad:

30.01.2008 US 6295808 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2020

(73) Titular/es:

CARGILL, INCORPORATED (100.0%)
15407 Mcginty Road West, Mail Stop 24
Wayzata, MN 55391, US

(72) Inventor/es:

FONTEYN, DIRK;
HEIGIS, JOHN R.;
HOLTWICK, JOSEPH B.;
MAURO, DAVID J.;
HOMSMA, CATHARINA H.;
PROVOOST, DIRK R.;
SHIEH, WEN-JUIN y
STEPHENS, BLAIR C.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 739 899 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

Preparación de almidón hidrolizado enzimáticamente

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de preparación de almidón hidrolizado enzimáticamente para uso como agente estabilizante. La presente invención también se refiere a emulsiones y productos alimenticios que contienen tal almidón hidrolizado enzimáticamente.

Antecedentes de la invención

Las composiciones químicas tales como goma guar, goma arábiga y otras gomas, almidones, proteínas, diversos polímeros solubles en agua y similares se usan a menudo como agentes emulsionantes y estabilizantes en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y diversas aplicaciones industriales. La goma arábiga se selecciona con frecuencia por su superior estabilidad en almacenamiento, larga historia de uso, percepción natural por parte de los consumidores y facilidad de uso, especialmente durante el almacenamiento refrigerado o congelado de la emulsión. La goma arábiga es cara, sin embargo, y su suministro y calidad son impredecibles. Además, a menudo también es necesario usar goma arábiga en niveles relativamente altos en formulaciones para cumplir con los requisitos de rendimiento funcional. De este modo, la industria ha buscado durante mucho tiempo un reemplazo estable y de bajo coste para la goma arábiga. Se han sugerido productos derivados del almidón para tal uso.

El documento US 6 096 524 describe un éster de almidón que tiene un grado de sustitución entre 1.0 y 1.8, que es útil en la fabricación de emulsiones acuosas. El documento EP 0 332 027 describe un método que usa la degradación enzimática para preparar un almidón modificado, por ejemplo, un almidón nOSA, que tiene propiedades de emulsificación. El documento US 2002/142087 también describe un método de preparación de un almidón nOSA mediante modificación enzimática. TECH S ET AL "STABILIZATION OF EMULSION BY OSA STARCHES", Journal of Food Engineering, Barking, Essex, GB, vol. 54, no. 2, 1 January 2002(2002-01-01, pages 167-174, es un estudio de la estabilización de emulsiones por almidones nOSA).

Un inconveniente del uso de los productos derivados de almidón conocidos para reemplazar la goma arábiga, sin embargo, es que los derivados de almidón conocidos son menos estables durante el almacenamiento. Estos derivados del almidón presentan una vida útil más corta y una mala refrigeración y estabilidad de congelación/descongelación en comparación con la goma arábiga. Los derivados del almidón son susceptibles de ser hidrolizados con ácidos o enzimas en un patrón aleatorio, no selectivo que produce fragmentos de almidón que tienen poca capacidad de emulsionar.

Se piensa que el problema de estabilidad en las aplicaciones de bebidas ocurre por una variedad de razones. Si bien no pretende limitarse a la teoría, una descripción de la comprensión actual en la estabilización de emulsiones de bebidas es útil para ilustrar por qué una combinación de requisitos es por lo general necesaria para proporcionar un emulsionante de bebidas apropiado. Una emulsión de bebida es a menudo una mezcla emulsionada mecánicamente de soluciones inmiscibles de líquidos polares y no polares. La goma o el almidón se mezcla con agua para formar una solución o suspensión de moléculas o pequeñas partículas dispersas en el medio líquido. Se añade un aceite saborizante u otro ingrediente no acuoso y se impone la agitación mecánica. A menudo, la emulsión se crea en dos etapas, primero con agitación de energía relativamente baja para hacer una emulsión gruesa y luego segundo con homogeneización a alta presión para hacer una emulsión fina. Si la emulsión es fina o gruesa como resultado de la energía mecánica impuesta a la mezcla, si la emulsión es estable a lo largo del tiempo y si la mezcla es un aceite en agua o agua en una emulsión de aceite, puede verse influida por la viscosidad del aceite y las fases del agua además de otros aspectos discutidos más adelante. La viscosidad de la fase oleosa no es algo que a menudo se modifique con ingredientes adicionales, aunque el propio aceite se puede modificar o seleccionar para que tenga una cierta viscosidad a una temperatura y velocidad de cizallamiento conocidas. La temperatura de la fase oleosa se puede usar para modificar la viscosidad durante la homogeneización. A medida que aumenta la temperatura, la viscosidad del aceite disminuye por lo general. La viscosidad de la fase acuosa se rige por la concentración y el peso y la arquitectura molecular del estabilizante de emulsión de la bebida. La diferencia entre la viscosidad de la fase acuosa y la viscosidad de la fase oleosa debe coincidir con la energía mecánica y la temperatura durante la emulsificación para finalmente actuar en la emulsión de concentrado de bebida final. La tendencia de la emulsión formada mecánicamente, debido a fuerzas tales como la repulsión electrostática, la tensión superficial, las diferencias de densidad que causan el movimiento del fluido, el movimiento browniano y las presiones osmóticas que causan la floculación del agotamiento, generalmente favorecen la separación de la emulsión en una fase oleosa y acuosa. Las gotitas de aceite en la emulsión de aceite en agua se pueden unir, flocular, formar crema, sedimentarse o cambiar de tamaño, lo que creará una falla en la aplicación. Por lo tanto, la estabilidad de una emulsión se puede regir por atributos tales como la viscosidad de fase continua y de fase discreta, los agentes con actividad de superficie presentes en la formulación, el tamaño y la distribución de tamaño de las gotitas de aceite, las diferencias de densidad entre las fases, las condiciones de almacenamiento y otras interacciones de ingredientes.

Los estabilizantes de emulsión de bebida pueden actuar para disminuir las fuerzas que tienden a desestabilizar una emulsión. Una teoría generalmente aceptada sostiene que una molécula con extremos hidrófobos e hidrófilos puede estabilizar la superficie y preservar la separación en la interfase entre la superficie polar y no polar. Se piensa que las burbujas de jabón actúan de esta manera alineando de manera lineal en la interfase con el extremo no polar apuntado hacia la fase oleosa y la cabeza polar apuntando hacia la fase acuosa. La concentración micelar crítica se produce cuando hay suficientes moléculas de un peso molecular suficientemente alto y una carga polar/no polar para elevar la tensión superficial por encima de las fuerzas que actúan para desestabilizar la superficie. A medida que el tamaño discreto de las gotitas en la fase oleosa disminuye con una mayor entrada de energía durante la homogeneización, aumenta el área de superficie interfacial de la fase acuosa y oleosa. De este modo, a medida que disminuye el tamaño de las gotitas de aceite, se debe usar ya sea una concentración de micelas más alta o un estabilizante de emulsión de mayor actividad. Con moléculas más grandes, tales como el almidón o las gomas, se piensa que la superficie interfacial se estabiliza aún más por la acción de puente del enmarañamiento molecular de las cadenas de polímero en la fase acuosa polar de la emulsión. La concentración micelar crítica en la que la emulsión es estable a la coalescencia, por lo tanto, disminuye con el enmarañamiento creciente de las cadenas de polímero. Las concentraciones más bajas del estabilizante de emulsión mantendrán efectivamente la fase discreta intacta. En la fase oleosa, generalmente se entiende que, a medida que el peso molecular de los grupos terminales hidrófobos se eleva desde un solo hidrocarburo a múltiples cadenas de carbono, la capacidad de interactuar con el aceite se vuelve más fuerte. Se sabe que la goma arábiga contiene muchos grupos cargados, que tienen una fuerte interacción tanto con la fase oleosa como con la fase acuosa. También se sabe que el almidón sustituido con el anhídrido octenil succínico de calidad alimentaria tiene una mayor capacidad para estabilizar las emulsiones de aceite en agua en comparación con el almidón que no tiene una unidad estructural hidrófoba unida. Cuando el grupo hidrófobo se ve impedido estéricamente en su exposición a la fase oleosa, se reduce su capacidad para interactuar y estabilizarse. Cuando el grupo hidrófobo se encuentra en el exterior de la molécula y se abre completamente para interactuar con la fase oleosa, aumenta la capacidad para estabilizar la emulsión. Las enzimas se pueden usar para escindir al grupo activo, o la derivación química se puede hacer de una manera selectiva a nivel local para agregar de forma no homogénea y causar una mayor concentración de sustituyentes en el exterior del emulsionante.

Además de los problemas de viscosidad descritos anteriormente, los productos de almidón disponibles en la actualidad tienen una tendencia a la retrogradación, lo que provoca, por ejemplo, la descomposición de la emulsión de aceite saborizante en el ciclo de temperatura o el almacenamiento a largo plazo. La retrogradación se ha superado parcialmente en ciertas aplicaciones mediante la derivación química de la molécula de almidón para estabilizar el almidón. Estas modificaciones interfieren con la asociación entre las moléculas de almidón, o porciones de la misma molécula, y por lo tanto reducen la tendencia del almidón a perder su capacidad de hidratación en el almacenamiento. Por ejemplo, hacer reaccionar el almidón con un reactivo para introducir sustituyentes tales como grupos hidroxipropilo, fosfato y acetato o succinato tiende a estabilizar la molécula de almidón durante el almacenamiento. Estas reacciones se pueden llevar a cabo en almidones, que se modifican adicionalmente mediante reticulación o degradación para obtener almidones para aplicaciones particulares. Aun así, estos almidones no proporcionan las propiedades de emulsificación estables típicas de la goma arábiga.

Otros procesos tratan el almidón con una exo-enzima, tal como una beta-amilasa, que escinde la maltosa del extremo no reductor del polímero. Mientras que los derivados de almidón modificados resultantes presentan una tendencia reducida a la retrogradación durante el almacenamiento, la beta-amilasa de pureza apropiada, sin contaminación de alfa-amilasa, no está fácilmente disponible y es costosa de usar en la fabricación de los productos. La contaminación de la alfa-amilasa reacciona con el almidón y reduce la viscosidad por debajo del nivel en el cual el almidón es funcional. Por lo tanto, la beta-amilasa debe probarse exhaustivamente y seleccionarse específicamente para encontrar lotes comerciales que tengan un bajo nivel de contaminación de alfa-amilasa y puedan producir almidón de suficiente viscosidad para estabilizar una emulsión o realizar otras aplicaciones. Incluso con esta selección, los productos de almidón hidrolizados con beta-amilasa presentan una baja viscosidad que a menudo no es suficiente para estabilizar cinemáticamente las emulsiones. Las moléculas límite de dextrina producidas por la beta-amilasa son emulsionantes relativamente funcionales, en virtud del modo final no reductor selectivo de hidrólisis de la enzima, que teóricamente expone la unidad estructural hidrófobo activo a la gotita de aceite más fácilmente que con una molécula dividida al azar. La enzima beta-amilasa solo escindirá unidades de maltosa consecutivas del final de la cadena de almidón hasta que se alcance un sustituyente químico o un punto de ramificación en el almidón. El subproducto de maltosa de la beta-amilasa que a menudo representa la mayoría de la composición, sin embargo, se sabe que es una molécula inactiva para mejorar la estabilidad de la emulsión. Además, no es rentable separar la maltosa inactiva de la dextrina límite activa producida usando beta-amilasa. De este modo, debido al coste, el rendimiento y la dificultad de uso, todavía existe la necesidad de un producto que combine las propiedades de la emulsificación con la estabilidad durante el almacenamiento en estantería, los ciclos de refrigeración y congelación/descongelación, y que pueda utilizarse para reemplazar la goma arábiga.

Breve descripción de las figuras.

La figura 1 muestra la distribución del tamaño de partícula de 3 formulaciones de emulsión.

Resumen de la invención

La invención se caracteriza por un método de producción de un almidón hidrolizado enzimáticamente. El método incluye las etapas de: (a) primero gelatinizar un almidón anhídrido n-octenil succínico (nOSA); y luego (b) hidrolizar el almidón gelatinizado usando una enzima alfa-amilasa fúngica.

Otro aspecto de la invención presenta un almidón hidrolizado enzimáticamente para su uso como agente estabilizante que incluye un almidón nOSA que ha sido hidrolizado por una enzima que tiene actividad endohidrolítica. El almidón se gelatiniza a una temperatura entre 120 °C y 150 °C antes de ser hidrolizado.

El almidón hidrolizado enzimáticamente resultante se puede usar para crear una emulsión que tiene una estabilidad superior para su uso en alimentos, bebidas y aplicaciones industriales tales como, por ejemplo, cosméticos. La presente invención también se refiere a composiciones de bebidas, productos alimenticios y productos industriales que incluyen el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención.

Inesperadamente, en algunas realizaciones, se observó que el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención permanece estable a la retrogradación en una mezcla acuosa a niveles de almidón de menos de 50% de sólidos en peso (las realizaciones preferidas incluyen las de menos de 30% sólidos en peso, y más preferiblemente menos del 15% en peso) en un disolvente a base de agua durante al menos 90 días en condiciones de almacenamiento de menos de 50 °C. En otras realizaciones, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención permanece estable a la retrogradación en condiciones de almacenamiento de menos de 25 ºC, y en otras realizaciones más de 10 ºC. En una realización particular, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención permanece estable a la retrogradación en una solución acuosa a niveles de almidón de entre 25% a 35% de sólidos en peso en un disolvente a base de agua durante al menos 90 días en condiciones de almacenamiento de menos de 10 °C.

En algunas realizaciones, cuando se usa para crear una emulsión, el almidón hidrolizado enzimáticamente se mantiene sorprendentemente estable a la retrogradación a niveles de almidón de menos de 50% de sólidos en peso en una solución acuosa durante al menos 90 días en condiciones de almacenamiento de menos de 50 °C. En una realización particular, cuando se usa para crear una emulsión, el almidón hidrolizado enzimáticamente permanece estable a la retrogradación en una solución acuosa a niveles de almidón de entre 10% a 15% de sólidos en peso en un disolvente a base de agua durante al menos 295 días en condiciones de almacenamiento a menos de 30 °C. En otra realización particular, cuando se usa para crear una emulsión, el almidón hidrolizado enzimáticamente permanece estable a la retrogradación en una solución acuosa a niveles de almidón de entre 5% a 15% de sólidos en peso en un disolvente a base de agua durante al menos 180 días en condiciones de almacenamiento a menos de 10 °C.

En otra realización más, el almidón hidrolizado enzimáticamente se usa para crear una emulsión que incluye gotitas de aceite de tamaño de partícula mono-modal y predominantemente gaussiana de menos de 5 micrómetros. En esta realización, el tamaño de partícula promedio se mantiene dentro del 10% de su valor inicial durante al menos 90 días en condiciones de almacenamiento de menos de 50 °C.

El almidón usado en la invención es un almidón de anhídrido n-octenil succínico. La enzima usada en la invención es una alfa-amilasa fúngica.

En los aspectos anteriores, el almidón se gelatiniza exponiendo el almidón a temperaturas entre 120 ºC y 150 ºC. En algunas construcciones, el almidón gelatinizado se enfría entre 40 °C y 60 °C antes de que se hidrolice.

Los anteriores y otros objetos y características de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención comprende un método de producción de un almidón hidrolizado enzimáticamente para uso como agente estabilizante. El producto resultante y las aplicaciones del producto resultante se pueden usar en alimentos, bebidas y aplicaciones industriales. El procedimiento incluye las etapas de: primero, gelatinización de un almidón; y a continuación, la hidrólisis del almidón gelatinizado usando una enzima que tiene actividad endo-hidrolítica. Las aplicaciones del almidón hidrolizado enzimáticamente resultante incluyen emulsiones para uso en bebidas, alimentos y aplicaciones industriales. Las emulsiones preparadas con el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención permanecen sorprendentemente estables a la retrogradación en condiciones de almacenamiento en frío e incluso durante los ciclos de congelación/descongelación. Por consiguiente, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar para reemplazar la goma arábiga y otros almidones modificados actualmente usados para emulsiones en tales bebidas, alimentos e industriales.

II. Abreviaturas y Términos

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Como se usa en este documento, "que comprende" significa "que incluye" y las formas singulares "uno" o "una" o "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "o" se refiere a un elemento único de elementos alternativos establecidos o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término porcentaje de sólidos como se usa en una mezcla o solución en este documento se refiere al porcentaje en peso de la mezcla o solución respectiva.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otras características de la presente invención son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Las definiciones de términos comunes en química se pueden encontrar en Richard J. Lewis, Sr. (ed.), Hawley's Condensed Chemical Dictionary, publicado por John Wiley & Sons, Inc., 1997 (ISBN 0-471-29205-2).

El término "emulsión", como se usa en este documento, significa una dispersión estable de un fluido en un segundo líquido inmiscible, tal como, por ejemplo, aceite en agua. En una emulsión de aceite en agua, la emulsión incluye por lo general un aceite no ponderado, agua y un estabilizante de grado alimenticio. El componente de aceite no ponderado puede ser cualquier aceite digestible o no digerible no ponderado de cualquier fuente animal o vegetal, incluidos, por ejemplo, hidrocarburos terpénicos, aceites vegetales, aceites saborizantes, poliésteres de poliol no digeribles o mezclas de estos. Una emulsión también puede incluir un aceite pesado de tal manera que la densidad de la fase oleosa coincida con la fase acuosa y se reduzca la tendencia a separarse. Los agentes de ponderación pueden incluir, por ejemplo, acetato de sacarosa isobutirato, aceite vegetal bromado, goma de éster y otros ingredientes. Un concentrado de emulsión es una emulsión producida usando los ingredientes mencionados anteriormente con el propósito de proporcionar una forma concentrada para su posterior dilución en una bebida terminada. Por ejemplo, un aceite saborizante, almidón y agua se pueden combinar y convertir en un concentrado de emulsión. El agua, el azúcar, la carbonatación y el conservante adicionales se pueden mezclar posteriormente en el concentrado para hacer un producto de bebida terminado. La industria a menudo busca usar la concentración de almidón y aceite lo más alta posible en el concentrado de emulsión para facilitar un alto rendimiento de producción, concentrados de sabor de alta resistencia y minimizar los costes.

La retrogradación de almidones se refiere a un procedimiento similar a la cristalización que se produce cuando las porciones lineales de las moléculas de almidón se alinean unas junto a otras y forman enlaces de hidrógeno entre cadenas a través de grupos hidroxilo. Cuando se produce suficiente unión entre cadenas, las moléculas se asocian para formar agregados moleculares, que muestran una capacidad reducida para la hidratación y, por lo tanto, una menor solubilidad en agua. Estos agregados pueden precipitar o, en soluciones más concentradas, pueden formar un gel. La tendencia a la retrogradación es más pronunciada en los almidones que contienen altos niveles de la molécula de amilosa lineal. En los almidones que contienen moléculas tanto lineales (amilosa) como ramificadas (amilopectina), y aún más con los almidones que contienen solo moléculas ramificadas, la tendencia a la retrogradación es menos pronunciada. En cualquier caso, a medida que la temperatura disminuye, los almidones que contienen amilosa y amilopectina muestran una mayor tendencia a la retrogradación. La tendencia a la retrogradación aumenta al aumentar la concentración de almidón. Una vez que la fracción de almidón retrocede, la capacidad de estabilización de la emulsión del almidón se reduce o elimina y la emulsión falla. Por lo tanto, es importante proporcionar un almidón para la estabilización de la emulsión que tenga una baja tendencia a la retrogradación a temperatura reducida, bajo alta concentración y para largos tiempos de almacenamiento.

El término "estable", como se usa en este documento, significa que la emulsión o la mezcla de fase acuosa no muestra un cambio significativo en las propiedades con respecto al tiempo. Un parámetro importante para los concentrados de emulsión es que conservan sus propiedades materiales entre el momento de producción y el tiempo en que se diluyen en una bebida terminada. Además, la bebida terminada debe ser estable en el estante entre el momento de la producción y su consumo final. El tamaño de partícula de la gotita de aceite, la viscosidad, la transmitancia y la reflectancia de la luz son propiedades que deben permanecer estables para que la emulsión funcione como se espera. Una emulsión estable se refiere a una emulsión que, por ejemplo, no tiene un cambio en el tamaño promedio de las partículas de aceite superior al 10% de su valor inicial, ni muestra ningún defecto visible significativo, como la floculación, la sedimentación o el anillo. Estable a la retrogradación significa que el almidón no se recristaliza ni precipita apreciablemente fuera de la solución durante el almacenamiento. Los indicadores típicos para la retrogradación incluyen un aumento o disminución de la blancura y la reflectividad a la luz con el tiempo, un aumento o disminución de la viscosidad, o un aumento de la cristalinidad, medido al aumentar la entalpía de fusión durante la calorimetría diferencial de barrido. Un estabilizante de emulsión es un ingrediente agregado a una formulación para mejorar la estabilidad de las propiedades de la emulsión.

Dos mediciones son particularmente útiles para determinar cuándo un almidón hidrolizado enzimáticamente en una solución acuosa ya no es estable a la retrogradación. La primera es la observación visual de una transición de líquido a sólido del almidón hidrolizado enzimáticamente en una solución acuosa. El segundo es la medición de 0%

de transmitancia promedio entre 10 mm y 30 mm usando un turbímetro Turbiscan™ en una muestra del almidón hidrolizado enzimáticamente en una solución acuosa. Estas medidas son igualmente útiles cuando se usan para analizar cuando una emulsión que incluye un almidón hidrolizado enzimáticamente ya no es estable a la retrogradación.

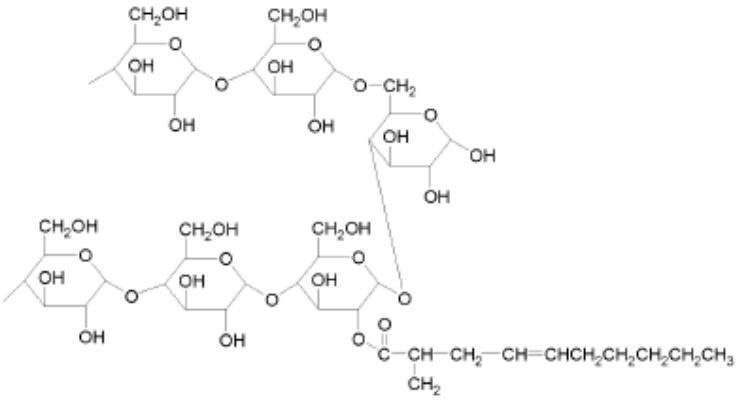
Una enzima es una proteína que cataliza una reacción bioquímica. Una amilasa es una enzima que hidroliza el almidón. Una alfa-amilasa es una enzima que cataliza la endo-hidrólisis de los enlaces 1-4-alfa-glicosídicos en almidón, glucógeno y polisacáridos y oligosacáridos relacionados que contienen 3 o más unidades de d-glucosa 1,4-alfa unidas. La alfa-amilasa es fúngica.

El término "actividad endo-hidrolítica", como se usa en este documento, se refiere a la actividad enzimática llevada a cabo con una enzima que puede escindir enlaces que son internos a la molécula. Estos enlaces incluyen los enlaces lineales glucosídicos α-1,4 en el caso de las alfa amilasas, así como los puntos de ramificación glucosídicos α-1,6 en la molécula en el caso de otras enzimas como las pululanasas y las isoamilasas. Solo como ejemplo, una Endoenzima es una endoamilasa capaz de hidrolizar rápidamente los enlaces internos (α-1,4 glucosídicos) de almidón gelatinizado, amilosa y soluciones de amilopectina que producen dextrinas solubles con menores cantidades de glucosa y maltosa. La enzima fúngica alfa-amilasa CLARASE® L 40,000 (disponible de Genencor International) es un ejemplo de una enzima que es capaz de una acción endo-hidrolítica. La descripción anterior de la actividad endo-hidrolítica contrasta con la acción de enzimas exo-hidrolíticas conocidas, como la beta-amilasa, en que las enzimas endo-hidrolíticas no solo escinden las unidades de beta-maltosa del extremo no reductor de las moléculas de almidón como la beta-amilasa lo hace. Las enzimas endo-hidrolíticas de la presente invención son alfa-amilasas fúngicas. La actividad enzimática predominante es endo-hidrolítica, se prefieren las enzimas en las que la actividad enzimática primaria es endo-hidrolítica, o aquellas en las que la actividad enzimática sustancialmente toda es endo-hidrolítica.

El término "gelatinizar", como se usa en este documento, significa las interrupciones irreversibles de los órdenes moleculares dentro del gránulo de almidón. El procedimiento de gelatinización convierte el almidón de una suspensión de gránulos semicristalinos insolubles en un hidrogel amorfo hinchado o con más calor y cizallamiento en una dispersión acuosa de moléculas de polisacárido solubles y semisolubles.

El término "hidrolizar", como se usa en este documento, significa escindir un polímero bajo la acción de ácido, enzima, calor, cizallamiento o una combinación de estos. El modo y la velocidad de hidrólisis y, por lo tanto, la composición del producto resultante se relaciona con el tipo de enzima usada, la concentración de sustrato y el tiempo de exposición entre otros parámetros. En general, la hidrólisis del almidón se acompaña de una reducción en el peso molecular y la viscosidad del polímero.

El anhídrido n-octenil succínico ("nOSA") es un reactivo que se puede usar para modificar un almidón. El tratamiento del almidón con nOSA da como resultado un almidón modificado que tiene unidades estructurales tanto hidrófilos como hidrófobos. El almidón nOSA resultante puede ayudar en la emulsificación. A continuación, se muestra un fragmento de almidón nOSA de ejemplo:



Un almidón es un polímero de carbohidratos. Los almidones consisten esencialmente en amilosa y/o amilopectina y en la forma nativa están por lo general en forma de gránulos semicristalinos. La amilopectina es el componente principal (alrededor del 70%-80%) de la mayoría de los almidones. Es un polímero ramificado de varios miles a varios millones de unidades de glucosa. La amilosa es el componente menor (alrededor del 20%-30%) de la mayoría de los almidones. Sin embargo, hay almidones con alto contenido de amilosa con un 40%-90% de amilosa. La

amilosa está compuesta de más polímeros de glucosa lineales con alguna ramificación de cadena larga y consta de varios cientos a varios cientos de miles de unidades de glucosa. Los almidones cerosos se componen principalmente de moléculas de amilopectina.

Las fuentes de almidón incluyen, pero no se limitan a frutas, semillas y rizomas o tubérculos de plantas. Las fuentes típicas de almidón incluyen, entre otras, arroz, trigo, maíz, papas, tapioca, arrurruz, trigo sarraceno, plátano, cebada, yuca, kudzu, oca, sagú, sorgo, batatas, taro y ñame. Los frijoles comestibles, como las habas, las lentejas y los guisantes, también son ricos en almidón.

Algunos almidones se clasifican como almidones cerosos. Un almidón ceroso consiste esencialmente en amilopectina y carece de una cantidad apreciable de amilosa. Los almidones cerosos típicos incluyen almidón de maíz ceroso, almidón de arroz ceroso, almidón de patata ceroso y almidón de trigo ceroso.

Algunos almidones se clasifican como almidones con alto contenido de amilosa. Estos incluirían cualquier almidón que tenga más del 15-30% de amilosa aparente típica.

El término "almidón instantáneo", como se usa en este documento, significa un almidón que se hincha o forma un coloide o dispersión de moléculas o gránulos hidratados hinchados y, a menudo, desarrolla una viscosidad incrementada en solución sin calentamiento. Los almidones instantáneos se usan, por ejemplo, en pudines instantáneos. Un almidón instantáneo puede consistir en un hidrogel hinchado en solución o una dispersión soluble de moléculas dependiendo de las técnicas de modificación y procesamiento empleadas.

El término "almidón modificado", como se usa en este documento, significa un almidón que tiene una estructura que ha sido alterada de su estado nativo, dando como resultado la modificación de una o más de sus propiedades químicas o físicas. Los almidones pueden modificarse, por ejemplo, por enzimas, por tratamiento térmico, oxidación o reacción con diversos productos químicos que incluyen, entre otros, óxido de propileno y anhídrido acético, o complejos con compuestos que incluyen proteínas. Los almidones pueden modificarse para aumentar la estabilidad contra el calor, los ácidos o la congelación. Los almidones también pueden modificarse para mejorar la textura, aumentar o disminuir la viscosidad, aumentar o disminuir los tiempos de gelatinización y/o aumentar o disminuir la solubilidad, entre otros. Los almidones modificados pueden degradarse parcial o completamente en cadenas más cortas o moléculas de glucosa. La amilopectina puede estar desramificada. En un ejemplo, los almidones modificados están reticulados para mejorar la estabilidad. Los almidones que se modifican por sustitución tienen una composición química diferente. Un almidón nOSA es un almidón modificado que ha sido parcialmente sustituido, por ejemplo, desde aproximadamente el 0.1% hasta aproximadamente el 3%, con anhídrido n-octenil succínico. Otros almidones modificados incluyen, pero no se limitan a, almidones reticulados, almidones acetilados y orgánicamente esterificados, almidones hidroxietilados e hidroxipropilados, almidones fosforilados e inorgánicamente esterificados, almidones catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos, y derivados de almidón succinato y succinato sustituido . Tales modificaciones son conocidas en la técnica, por ejemplo, en almidones modificados: propiedades y usos, Ed. Wurzburg, CRC Press, Inc., Florida (1986).

En contraste con un "almidón modificado", el término "almidón no modificado", como se usa en este documento, se refiere a un almidón cuya estructura no ha sido alterada de su estado nativo.

El término "sustitución", como se usa en este documento, significa el acto, procedimiento o resultado de reemplazar una cosa por otra. La sustitución puede referirse, por ejemplo, a la sustitución de almidón por un hidrocoloide en un producto de bebida, tal como un refresco. La sustitución puede referirse alternativamente a la adición de uno o más grupos funcionales en una molécula o sustrato como resultado de una reacción química o física o mecánica. Por ejemplo, el anhídrido n-octenil succínico se puede usar en una reacción de sustitución con almidón de producción de un almidón modificado con nOSA.

El término "soluble", como se usa en este documento, significa ser suspendido, disuelto y/o dispersado molecularmente en un solvente de tal manera que la concentración del soluto en el solvente sea relativamente homogénea en todo el volumen. El almidón soluble se puede mezclar en un solvente y se suspende sin la adición de calor, cizallamiento o productos químicos. Un almidón que permanece soluble en una solución acuosa no tiene tendencia a retroceder como un cristalito insoluble o precipitado. De manera similar, un almidón que retiene la solubilidad no pasa de una solución líquida a un sólido gelificado.

Un "almidón pregelatinizado", como se usa en este documento, se refiere a un almidón que se ha gelatinizado parcial o completamente y se ha recuperado como una partícula seca que puede solubilizarse sin calentamiento adicional. El almidón pregelatinizado típico se produce mediante cocción al vapor en la boquilla de un secador por pulverización, mediante calentamiento por contacto en la superficie de un secador de tambor, por inyección directa de vapor en un recipiente o cocina a chorro, o por gelatinización química, como con hidróxido de sodio.

III. Métodos de preparación de almidón hidrolizado enzimáticamente

En un aspecto de la presente invención, el almidón hidrolizado enzimáticamente se prepara formando una suspensión de almidón en una solución acuosa. La suspensión incluye el almidón y el agua en cualquier proporción necesaria para lograr la concentración deseada de enzima-sustrato cuando finalmente se lleva a cabo el tratamiento enzimático. En general, la reacción de hidrólisis enzimática preferida se lleva a cabo con el mayor contenido de sólidos que es factible para facilitar el secado posterior de la composición de almidón mientras se mantienen las velocidades de reacción óptimas. Por ejemplo, una dispersión de almidón precocido con un contenido de sólidos de hasta el 40% es apropiada para la producción de un emulsionante para aplicaciones de bebidas usando una alfa-amilasa fúngica. Sin embargo, se puede usar un mayor contenido de sólidos. Pero a un mayor contenido de sólidos, la agitación es difícil o ineficaz y la dispersión del almidón es más difícil de manejar.

La suspensión de almidón en una solución acuosa se cocina para gelatinizar el almidón. El almidón se puede gelatinizar según una serie de métodos que incluyen, por ejemplo, la solubilización a través de la gelatinización térmica, la gelatinización química, el tratamiento mecánico o la imposición de otras formas de energía. En una realización particular, la suspensión se cocina para gelatinizar sustancialmente por completo el almidón. El procedimiento de gelatinización altera las moléculas de almidón de la estructura granular, lo que permite que la enzima hidrolice de manera más fácil y uniforme las moléculas de almidón. La suspensión se cocina a temperaturas de entre 120°C y 150°C. En una realización de la presente invención, el tratamiento térmico es tal que la temperatura y el cizallamiento causan una dispersión molecular sustancialmente completa del almidón, sustancialmente libre de estructura granular residual y zonas de unión cristalinas residuales. En este aspecto, el tratamiento térmico a alta temperatura minimiza o elimina las estructuras residuales, que más tarde podrían actuar como sitios de nucleación para la cristalización y otros procesos de desestabilización del almidón.

Se puede usar cualquier método de cocción capaz de cocinar la suspensión y mantener la suspensión a las temperaturas apropiadas. Por ejemplo, un tiempo de espera apropiado, o tiempo de residencia, es una cantidad de tiempo suficiente para asegurar la completa gelatinización del almidón. El tipo de almidón también puede tener un impacto del método de cocción apropiado. Por ejemplo, un almidón instantáneo no requerirá una cocción adicional significativa o una temperatura tan alta como un almidón granular modificado tal como un nOSA, almidón ceroso sin cocer. En otra realización, se puede usar un tratamiento químico además de o en lugar de cocinar para gelatinizar el derivado de almidón. Los productos químicos adecuados para la presente invención pueden incluir, por ejemplo, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. La Patente de los Estados Unidos No. 4,985,082 de Whistler, Roy L., también informa sobre métodos de degradación granular, almidonada no cocida.

La hidrólisis del almidón usando una enzima que tiene actividad endo-hidrolítica se lleva a cabo después de la gelatinización del almidón. Un número de factores, incluyendo la concentración de enzima, la concentración de sustrato, el pH, la temperatura y la presencia o ausencia de inhibidores pueden afectar la actividad de la enzima. Los parámetros para la actividad enzimática óptima variarán dependiendo de la enzima usada y pueden ser determinados por un experto en la técnica. Por ejemplo, después de la gelatinización del almidón, el pH, la temperatura o tanto el pH como la temperatura del almidón gelatinizado deben ajustarse para una actividad enzimática óptima. En otro caso, la temperatura del almidón gelatinizado debe ajustarse para que la enzima en particular se use durante la hidrólisis. De este modo, en un aspecto de la presente invención, el almidón gelatinizado se enfría a una temperatura de entre 40 ºC y 60 ºC antes de la hidrólisis usando una enzima. En otro aspecto de la presente invención, el pH del almidón gelatinizado se ajusta entre 4.0 y 6.0. En otro aspecto más de la presente invención, el almidón gelatinizado se enfría a una temperatura de entre 40 ºC y 60 ºC y el pH del derivado de almidón gelatinizado se ajusta a entre 4.0 y 6.0. La reacción puede proceder en presencia de tampones para asegurar que el pH estará en el nivel óptimo durante toda la hidrólisis. Los tampones como los acetatos, los citratos o las sales de otros ácidos débiles son aceptables. En algunos casos, la introducción de materiales como el calcio o el sodio puede aumentar la vida media de la enzima, optimizando así la actividad de la enzima. Al igual que con otros parámetros de la reacción enzimática, los rangos óptimos de temperatura variarán con los cambios en otros parámetros, como la concentración de sustrato, el pH y otros factores que afectan la actividad de la enzima, y pueden ser determinados por el médico.

Aunque el procedimiento de esta invención hace uso de una enzima en solución, los procesos que utilizan una enzima inmovilizada en un soporte sólido están destinados a caer dentro del alcance de esta invención.

Se permite que la reacción enzimática continúe hasta que se alcance el nivel deseado de hidrólisis en el almidón. En una realización de la presente invención, el almidón debe mantenerse a una temperatura de 35 ºC a 70 ºC durante aproximadamente 20 minutos durante la digestión enzimática. Si se desean tiempos de reacción más cortos, se puede usar un rango de temperatura de 50 °C a 55 °C. Alternativamente, se puede usar una mayor concentración de enzima. El progreso de la reacción enzimática se puede medir por varios métodos. Si se han establecido parámetros específicos para lograr una composición de almidón particular, entonces se puede permitir que la reacción proceda a un punto final relativo en el tiempo predeterminado. El punto final también se puede monitorear y definir midiendo la concentración de azúcares reductores. Para definir el punto final de la reacción, se pueden usar otras técnicas, como monitorear el cambio en la viscosidad, los cambios espectrales o el cambio en el peso molecular.

La hidrólisis se llevará a cabo durante períodos que van desde unos pocos minutos hasta 24 horas o más, dependiendo de la temperatura, las concentraciones de enzimas y sustratos y otras variables. La acción de la

enzima se termina entonces por medio de calor, adiciones químicas u otros métodos conocidos en la técnica para desactivar una enzima o separar una enzima de su sustrato. En un aspecto de la presente invención, la alfa-amilasa fúngica promueve una velocidad de reacción más rápida en comparación con la beta-amilasa y también conduce a tasas de producción más altas. Por ejemplo, mientras que las reacciones de beta-amilasa pueden requerir de 6 a 8 horas de tiempo de reacción, la alfa-amilasa fúngica produjo tiempos de reacción de 20 minutos o menos para alcanzar el punto final deseado. Se pueden obtener varios beneficios de la reducción del tiempo de reacción, incluida la adaptación más fácil a un procedimiento continuo, minimizando los tamaños de los tanques y minimizando la degradación a los grupos sustituidos en la molécula de almidón. La adaptación a un procedimiento continuo y de corto tiempo, por ejemplo, menos de 1 hora, proporciona beneficios adicionales, incluida la capacidad de conservar grupos sustituyentes activos en el derivado del almidón, como, por ejemplo, ésteres de succinato, a temperaturas de procesamiento más bajas de lo que sería necesario usando un procedimiento por lotes o un procedimiento de tiempo de residencia más largo, como por ejemplo más de 1 hora. Los largos tiempos de residencia y los procesos por lotes pueden causar la hidrólisis de los grupos funcionales y hacer que el almidón quede inactivo con el propósito de emulsionar.

El almidón hidrolizado enzimáticamente resultante para uso como agente estabilizante puede secarse por pulverización, secarse en tambor o recuperarse de otra manera en una forma apropiada para la aplicación pretendida. Si la aplicación de uso final requiere la purificación de la composición de almidón, los azúcares y otras impurezas y subproductos de reacción pueden eliminarse mediante diálisis, filtración, centrifugación o cualquier otro método conocido en la técnica para aislar y concentrar las composiciones de almidón. El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención también puede suministrarse en forma líquida, incluyendo una forma líquida concentrada, sin secado o recuperación adicional.

IV. Aplicaciones del almidón hidrolizado enzimáticamente.

A. Emulsiones

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención tiene aplicación en una serie de emulsiones, incluidas las descritas anteriormente.

Las emulsiones se pueden preparar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, excepto que se añade el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención.

B. Bebidas, productos alimenticios, y productos industriales.

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar en una variedad de aplicaciones, incluyendo cualquier producto en el que se haya usado goma arábiga como un emulsionante, estabilizante o similares, y en cualquier producto donde un peso molecular alto, se han usado emulsionantes solubles en agua, incluidos ciertos almidones modificados, para formar o estabilizar emulsiones.

En un aspecto, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar en bebidas que están aromatizadas con aceites tales como aceites de naranja o de limón, productos de confitería, helados, otras bebidas y otros productos alimenticios que requieren un emulsionante estable al almacenamiento. Además, se puede usar en bebidas a base de agua y alcohol.

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención también se puede usar en la preparación de aceites aromatizados extruidos o secados por pulverización encapsulados que se pueden reconstituir con agua para proporcionar emulsiones aromáticas, condimentos, así como en tintas, textiles y otros usos finales no alimentarios.

Como otro ejemplo de su aplicación, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar en la producción de productos de panadería estables en almacenamiento, donde se explota la capacidad emulsionante y la funcionalidad antienvejecimiento del almidón hidrolizado enzimáticamente. El almidón hidrolizado enzimáticamente también exhibe actividad antienvejecimiento en productos de panadería tal como el pan. Por ejemplo, un grupo hidrófobo en una realización de la invención puede interactuar con la amilosa y la amilopectina presentes en la harina de pan para prevenir cambios no deseados en la textura, la miga, la comestibilidad y la posibilidad de venta.

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar adicionalmente en la emulsificación de productos cárnicos y aditivos para productos cárnicos. En un aspecto, el almidón hidrolizado enzimáticamente reduce la purga cuando se usa en combinación con viscosificadores y aditivos de unión al agua.

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención también se puede usar como un estabilizante y texturizador en productos lácteos y batidos. En al menos un aspecto, el almidón hidrolizado enzimáticamente proporciona una estructura estable al almacenamiento apropiada y reduce la sinéresis u otros cambios texturales indeseables en el producto.

El almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención también puede encontrar aplicación en la producción de emulsificación y/o encapsulación de caroteno o vitamina E como ingredientes colorantes o nutritivos. Los beneficios de usar el almidón hidrolizado enzimáticamente para este propósito incluyen la estabilidad a largo plazo de la solución de la emulsión.

En otro ejemplo más, el almidón hidrolizado enzimáticamente se puede usar en la emulsificación y/o encapsulación de probióticos, prebióticos y suplementos dietéticos. En un ejemplo particular, el almidón hidrolizado enzimáticamente de la presente invención se puede usar en una emulsión de ácido graso Omega 3.

Se debe entender que la presente invención en este documento incluye cualquier composición emulsionada en la que el agente emulsionante es almidón que se ha hidrolizado enzimáticamente para mejorar la estabilidad en almacenamiento de una emulsión. De este modo, se pretende incluir emulsiones que comprenden una mezcla del almidón hidrolizados enzimáticamente y las gomas u otros agentes emulsionantes. La invención también incluye cualquier composición no emulsionada en la que el almidón se usa como un agente de texturización o para preservar la textura de la composición.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustrarán más completamente las realizaciones de la presente invención. Se entiende que estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. En estos ejemplos, todas las partes y porcentajes se dan con base al peso seco y todas las temperaturas están en grados Celsius, a menos que se indique lo contrario. La estabilidad en anaquel se mide a baja temperatura para acelerar la retrogradación y acortar el período de prueba.

Los ejemplos 1 y 2 proporcionan etapas del procedimiento para preparar un almidón hidrolizado enzimáticamente según la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de un almidón hidrolizado enzimáticamente (procedimiento continuo)

Etapa 1: 15% de preparación de lechada de almidón

Se obtuvieron 5,500 libras de EmTex 06369, un almidón ceroso nOSA disponible de Cargill, Incorporated. El almidón se suspendió en un tanque con 3178 galones de agua a 15% de sólidos. El almidón se adicionó gradualmente hasta 5,500 libras de almidón, y durante la adición del almidón, se adicionó agua fría filtrada hasta 3197 galones para suspender el almidón.

A continuación, se añadieron 14 libras de cloruro de calcio al 32% y 5.95 libras de sulfito de bisodio al 35% a la mezcla. La mezcla se dejó agitar durante la noche. Se añadieron 4.05 libras de sulfito de bisodio al 35% a la mezcla al día siguiente. Finalmente, se comprobó el pH de la solución y se ajustó a 5.57 usando hidróxido de sodio.

Etapa 2: Gelatinización (Cocción De Almidón)

El almidón se cocinó a aproximadamente 143ºC usando una cocina a chorro Hydrothermal™. El tiempo de residencia en la cámara de cocción a chorro Hydrothermal™ fue de aproximadamente 80 segundos. El almidón gelatinizado se bombeó a través de un enfriador instantáneo y la temperatura se ajustó a 57ºC.

Etapa 3: Hidrólisis (licuefacción enzimática)

CLARASE® L 40,000, una enzima alfa-amilasa fúngica, se obtuvo de Genencor, International. La enzima se diluyó a 1: 100 con agua DI.

La enzima alfa-amilasa fúngica diluida se añadió continuamente al almidón gelatinizado y se ajustó a la velocidad para hidrolizar el almidón gelatinizado a una viscosidad de 14-18 cPs. El almidón gelatinizado se bombeó a través de una serie de recipientes reactores con agitación continua con un tiempo de residencia de aproximadamente 20 minutos. El tiempo total para hidrolizar 5500 libras de almidón fue de aproximadamente 6 horas.

Etapa 4: Desactivación de la enzima y neutralización

El almidón hidrolizado con la enzima se bombeó en un tanque de desactivación donde se añadió ácido sulfúrico para ajustar el pH a 3.0 para desactivar la enzima. Después de la desactivación de la enzima, se añadieron 5 galones de hidróxido de sodio al 10%, elevando el pH a 3.7.

Etapa 5: Secado por pulverización

El almidón hidrolizado enzimáticamente se ajustó a pH 4.5 con hidróxido de sodio. Finalmente, el almidón hidrolizado enzimáticamente se secó por pulverización para recuperar un polvo seco.

Ejemplo 2: Preparación de un almidón hidrolizado enzimáticamente (procedimiento por lotes)

Etapa 1: 15% de preparación de lechada de almidón

El almidón (50 libras de EmTex 06369, un almidón granular modificado con nOSA obtenido de Cargill, Incorporated) se suspendió en agua hasta 15% de sólidos. El pH se verificó y se ajustó a pH 6.0 con ácido sulfúrico diluido e hidróxido de sodio diluido.

Etapa 2: Gelatinización (Cocción del almidón)

El almidón se cocinó usando una cocina a chorro Schlick™ con un tiempo de residencia en la cámara de cocción de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 145 ºC. El almidón gelatinizado se bombeó a través de un enfriador instantáneo para ajustar la temperatura a 53 °C en preparación para la adición de enzimas.

Etapa 3: licuefacción de la enzima de hidrólisis

El almidón cocido a chorro se recogió en un recipiente agitado y se agitó durante aproximadamente 70 minutos. Luego se adicionó una enzima fúngica alfa-amilasa (CLARASE® L 40,000 obtenida de Genencor International) para hidrolizar el almidón gelatinizado durante un tiempo total de incubación de 15 minutos.

Etapa 4: Desactivación de la enzima y neutralización

El almidón hidrolizado con la enzima se bombeó en un tanque de desactivación donde se añadió ácido sulfúrico para ajustar el pH a 3.0 para desactivar la enzima.

Etapa 5: Secado por pulverización

El almidón hidrolizado enzimáticamente se ajustó a pH 4.0 con hidróxido de sodio diluido y se secó por pulverización para recuperar un polvo seco.

Ejemplo 3: Tamaño promedio de partículas en emulsión

Este ejemplo ilustra una comparación del tamaño de partícula de la emulsión promedio entre una emulsión preparada usando el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2 y una emulsión preparada usando goma arábiga.

Se preparó una primera emulsión de la siguiente manera: el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2 se mezcló con agua al 12% de sólidos. A continuación, se añadió aceite de naranja prensado en frío al 18% al almidón hidrolizado enzimáticamente y al agua y se mezcló a alta velocidad en una licuadora para obtener una emulsión gruesa. Esta emulsión gruesa se homogeneizó luego a 3500 psi para crear una emulsión fina.

Se preparó una segunda emulsión según el procedimiento descrito anteriormente, excepto que en lugar de usar el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2, se usó una goma arábiga de calidad de emulsión.

Se usó un analizador de distribución de tamaño de partícula de dispersión de láser Horiba™ LA-300 para determinar el tamaño de partícula de emulsión promedio. Se añadieron 2-3 gotas de la emulsión en agua mientras se agitaba hasta que la transmitancia estaba entre 80-90%.

En la tabla 1 a continuación se presenta una comparación del tamaño promedio de partícula de la emulsión durante un período de tiempo para cada una de las emulsiones.

Tabla 1

Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (Días)	Tamaño promedio de partícula de la emulsión (μm)	
	Emulsión preparada usando el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2	Emulsión preparada usando goma arábiga
1	0.47	0.82
10	0.48	0.94
35	0.47	1.23
55	0.48	1.85

Como se ve en la tabla 1, el tamaño de partícula de emulsión promedio del almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2 se mantuvo constante en comparación con el aumento en el tamaño de partícula promedio a lo largo del tiempo de la emulsión preparada usando goma arábiga. Un aumento en el tamaño de partícula indica inestabilidad de la emulsión (es decir, falla de la emulsión). Por lo tanto, la presente invención crea una emulsión más estable al almacenamiento que una en la que se usó goma arábiga.

Además, el tamaño de partícula de la emulsión promedio de la emulsión preparada usando la solución de almidón hidrolizado enzimáticamente producida en el ejemplo 2 se midió después de 295 días. Este tamaño de partícula de emulsión promedio se midió a 0.48 µm. Este dato indica que se obtiene una emulsión considerablemente estable al almacenamiento usando el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2.

Ejemplo 4: Estabilidad a la retrogradación en soluciones acuosas

Se prepararon tres muestras de almidón hidrolizado enzimáticamente a partir de almidón nOSA disponible comercialmente usando diversas enzimas. Las condiciones de pH y temperatura se ajustaron para ser adecuadas para la enzima particular usada.

Las 3 enzimas utilizadas fueron BAN™ 480L (obtenidas de Novozymes) de producción del Ejemplo 4A, SPEZYME PRIME™ de producción del Ejemplo 4B y CLARASE® L 40,000 (las últimas 2 enzimas se obtuvieron de Genencor International, Inc.) de producción del Ejemplo 4C. BAN™ 480L y SPEZYME PRIME™ son enzimas alfa-amilasas bacterianas, mientras que CLARASE® L 40,000 es una alfa-amilasa fúngica.

Las condiciones de pH y temperatura utilizadas durante la hidrólisis enzimática para cada muestra fueron las siguientes. BAN™ 480L: pH 6.0 y 80°C; SPEZYME PRIME™: pH 6.0 y 80 °C; CLARASE® L 40,000: pH 5.3 y 53 °C. Para las muestras hechas con BAN™ 480L y SPEZYME PRIME™, la enzima se adicionó a la suspensión de almidón antes de la gelatinización y la hidrólisis. Los almidones se cocinaron a 80ºC a través de una cocina de chorro y se hidrolizaron durante 20 minutos. Se añadió ácido sulfúrico para desactivar la enzima a pH 3.0. El pH se ajustó entre 3.5 y 4.5 con hidróxido de sodio antes del secado por pulverización. El mismo procedimiento no fue posible usando CLARASE® L 40,000 porque esta enzima se desactiva a temperaturas superiores a aproximadamente 70°C. El almidón no puede ser gelatinizado completamente por debajo de 70 °C. Por lo tanto, el procedimiento según el Ejemplo 2 se usó para hacer que la muestra se hidrolizara con CLARASE® L 40,000.

Se prepararon 3 soluciones, una solución para cada muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente. Las soluciones se prepararon al 30% de sólidos en agua y se probaron a lo largo del tiempo para determinar la retrogradación usando la observación visual de la transición de líquido a sólido. También se usó un turbidímetro Turbiscan™ para medir el cambio en la transmitancia de luz promedio en muestras de 10-30 mm de altura, que se relaciona con el grado de opacidad debido a la retrogradación. Las muestras se sometieron a un ciclo de una temperatura de aproximadamente 4 ºC a 25 ºC diariamente. Las muestras se consideraron inestables cuando se observó visualmente una transición de líquido a sólido al inclinar el vial de la muestra a la posición horizontal, o cuando el turbidímetro Turbiscan™ midió un 0% de transmitancia promedio entre 10 mm y 30 mm en el vial de la muestra. Estas dos mediciones produjeron el mismo resultado de Estabilidad a la Retrogradación (días) para cada muestra. Los datos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Enzima usada para preparar una solución de muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente:	Estabilidad a la retrogradación (Días)
4A) BAN™ 480L	< 20
4B) SPEZYME PRIME™	< 10
4C) CLARASE® L 40,000	> 50

Como se ve en la tabla 2, la solución preparada usando un almidón producido por gelatinización a alta temperatura, enfriando y luego hidrolizando la enzima con la enzima fúngica alfa-amilasa, permaneció estable a la retrogradación por más de 50 días. En contraste, las soluciones preparadas usando un almidón producido por gelatinización con enzimas bacterianas presentes a una temperatura más baja, alrededor de 80°C, permanecieron estables por menos de 20 días.

Ejemplo 5: Estabilidad a la retrogradación en formulaciones de bebidas representativas

Se prepararon dos bebidas, la Bebida 1 y la Bebida 2, según la receta de la tabla 3, pero usando diferentes muestras de almidón hidrolizado enzimáticamente.

Tabla 3

Ingrediente	% de base total	Peso total (g)
Muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente	30%	240
Ácido cítrico (30%)	0.25%	2
Benzoato de sodio (50%)	0.10%	0.8
Vitamina C	0.15%	1.2
Agua	69.50%	556
Total	100%	800

En la bebida 1, la muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente usada se realizó con la enzima BAN™ 480L como en el ejemplo 4A. En la bebida 2, la muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente usada fue el almidón hidrolizado enzimáticamente preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Para preparar cada bebida, el agua se llevó primero a 65 °C en un vaso de precipitados con doble camisa conectado a un baño de agua. Los ingredientes restantes se añadieron luego al agua. Cada mezcla se dejó hidratar durante 2 minutos. Durante este tiempo, las mezclas se agitaron a una velocidad de 400 rpm. Las dos mezclas de bebidas se vertieron en tazas separadas y se refrigeraron. Las mediciones de viscosidad de las mezclas de bebidas refrigeradas se tomaron a lo largo del tiempo usando un Haake Rheostress 1. La Tabla 4 muestra la viscosidad de cada bebida a lo largo del tiempo a una velocidad de cizallamiento de aproximadamente 1 s^{-1}.

Tabla 4

	Viscosidad (cP)			
	Día 1	Día 3	Día 6	Día 9
Bebida 1 (medida a una velocidad de cizallamiento de 1.062 s^{-1})	1,160	1,490	3,970	101,000
Bebida 2 (medida a una velocidad de cizallamiento de 1.067 s^{-1})	964	909	931	880

La viscosidad en el tiempo es un indicador del grado de estabilidad de un almidón. Como se ve en la tabla 4, la viscosidad de la bebida 2, la bebida que usa el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2, se mantuvo relativamente constante en comparación con la Bebida 1. Debe observarse que el almidón hidrolizado enzimáticamente producido en el ejemplo 2 se hizo usando un almidón producido por gelatinización a alta temperatura, enfriamiento y luego hidrólisis enzimática con CLARASE® L 40,000, una enzima fúngica alfa-amilasa con actividad endo-hidrolítica.

En contraste, el almidón hidrolizado enzimáticamente usado en la Bebida 1 era un almidón gelatinizado con una enzima bacteriana presente a una temperatura más baja de alrededor de 80°C. La bebida 1 sufrió una retrogradación significativa a lo largo del tiempo, como se puede ver por las mediciones de viscosidad en aumento en la tabla 4. De hecho, después de 9 días, la bebida 1 se convirtió en un producto de gelatina blanca, casi rebanable y muy difícil de medir.

Ejemplo 6: Estabilidad del concentrado de emulsión

Se prepararon dos concentrados de emulsión de bebida, bebida 1 y bebida 2, según la receta de la tabla 5, pero usando diferentes muestras de almidón hidrolizado enzimáticamente.

Tabla 5

Ingrediente	Concentración (%)	Peso total (g)
Muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente	10.00	50.00
Aceite de cáscara de naranja	10.00	50.00
Benzoato de sodio (30%)	0.67	3.33
Ácido cítrico (50%)	0.60	3.00
Agua	78.73	393.67
Total	100	500

En la bebida 1, la muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente usada se elaboró con la enzima BAN™ 480L como en el ejemplo 4. En la bebida 2, la muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente usada fue el almidón hidrolizado enzimáticamente preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Cada una de las 2 bebidas se preparó de la siguiente manera. Primero, la muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente se mezcló en 350 ml de agua que contenía benzoato de sodio a 60 °C. La mezcla se mantuvo a 60°C durante 2 horas y se mezcló a intervalos regulares. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió ácido cítrico para ajustar el pH a 3. Luego se añadió agua para llevar la mezcla a 450 g. A continuación, se añadió el aceite de cáscara de naranja mientras se mezclaba usando un Ultra-Turrax (velocidad 2). Se continuó mezclando durante otros 3 minutos. Inmediatamente después de la mezcla, la emulsión se homogeneizó en 2 etapas (2500/500 psi o 175/35 bar) y se pasó dos veces por el homogeneizador. El pH final se verificó y se ajustó a pH 3.0-3.5, si fuera necesario.

Las bebidas se almacenaron a aproximadamente 6 ºC y un pH de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 3.5. La estabilidad de la emulsión de las 2 Bebidas se midió usando un instrumento Turbiscan™ para determinar la retrodispersión media de la solución entre 10 mm y 30 mm en el vial de la muestra. Cuanto mayor sea la reducción de la retrodispersión a lo largo del tiempo, menos estables serán las emulsiones durante el almacenamiento. Una disminución en la retrodispersión en el medio de la muestra indica que la emulsión se está desestabilizando con las gotas de aceite que migran a la parte superior o inferior del vial. Las mediciones indicaron que la Bebida 2 tenía una emulsión estable a los 180 días con una disminución de la retrodispersión promedio de menos del 20%, mientras que la Bebida 1 mantuvo una emulsión estable por menos de 50 días con una disminución de la retrodispersión promedio de más del 20%.

La estabilidad de la emulsión de la bebida 2 fue significativamente mejor que la estabilidad de la emulsión de la bebida 1. La bebida 2 también fue la Bebida que contenía el almidón producido por gelatinización a alta temperatura, enfriamiento y luego hidrólisis enzimática con CLARASE® L 40,000, un hongo alfa-amilasa enzima con actividad endo-hidrolítica. El almidón hidrolizado enzimáticamente en la Bebida 1 se preparó con un almidón gelatinizado con una enzima bacteriana presente a una temperatura más baja de alrededor de 80 °C.

Ejemplo 7: Estabilidad con diferentes enzimas y con gelatinización antes de la licuefacción de enzimas

El propósito de este ejemplo fue demostrar la necesidad de combinar la gelatinización a alta temperatura, seguido de la hidrólisis de la enzima alfa-amilasa fúngica. 2 Las bebidas se prepararon según la receta de la tabla 3, pero usando diferentes muestras de almidón hidrolizado enzimáticamente. Cada muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente se preparó según el procedimiento del Ejemplo 2, excepto que se utilizan diferentes combinaciones de almidón y enzima. La muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente de la bebida 1 se realizó usando el almidón Emtex 06369 y la enzima BAN™ 480L. La muestra de almidón hidrolizado enzimáticamente de la bebida 2 se realizó usando el almidón Emtex 06369 y la enzima CLARASE® L 40,000. Las 2 bebidas se almacenaron a aproximadamente 6 °C.

La estabilidad de la emulsión de las 2 Bebidas se estudió posteriormente a pH 3.5 (para representar una bebida de soda gasificada). La estabilidad se determinó midiendo la transmitancia media entre 10 y 30 mm usando el turbidímetro Turbiscan™. Cuando la transmitancia se redujo a cero, la muestra ya no se consideró estable. Los datos resultantes se presentan en la tabla 6.

Tabla 6

Muestra	Estabilidad a pH 3.5 (Días)
Bebida 1 (Gelatinización a 145°C seguida de BAN™ 480L)	45 días
Bebida 2 (Gelatinización a 145°C seguida de CLARASE® L 40,000)	> 90 días

Como se muestra en la tabla 6, la bebida que contiene un almidón producido con BAN™ 480L no se mantuvo estable mientras la bebida que contenía un almidón producido con CLARASE® L 40,000, aunque ambos productos se gelatinizaron primero sin enzima, se enfriaron y luego se añadió la enzima para la hidrólisis. Este dato indica que la estabilidad del almidón hidrolizado enzimáticamente se relaciona con el tipo de enzima en lugar de únicamente las etapas del procedimiento y las temperaturas de licuefacción.

Ejemplo 8: Distribución del tamaño de partícula y tamaño de partícula promedio

Se prepararon tres formulaciones de emulsión según la receta de la tabla 7, pero usando diferentes estabilizantes de emulsión.

Tabla 7

Ingrediente		Peso total (g)	Concentración (%)
Estabilizante de emulsiones		150.00	20.00
Fase oleosa (densidad = 0.9757g/ml)		127.50	17.00
Aceite de cáscara de naranja	41%		
Goma de éster	59%		
Benzoato de sodio (30%)		5.00	0.67
Ácido cítrico (50%)		4.50	0.60
Agua		463.01	61.73
Total (pH = 3.0-3.5)		750.00	100.00

El estabilizante de emulsiones usado en la formulación de emulsión 1 se hizo con BAN™ 480L como en el ejemplo 4. El estabilizante de emulsiones usado en la formulación de emulsión 2 fue goma arábiga (goma de acacia 393A secada por pulverización obtenida de Farbest Brands). El estabilizante de emulsiones usado en la Fórmula 3 de Emulsión fue un almidón hidrolizado enzimáticamente según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Las formulaciones de emulsión se prepararon mezclando el almidón estabilizante de emulsiones en agua que contiene benzoato de sodio a 60 ºC. La solución se mantuvo a 60 °C durante 2 horas y se mezcló a intervalos regulares. La solución se enfrió luego a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el ácido cítrico para ajustar el pH a aproximadamente 3. Luego se añadió el agua restante. La fase oleosa se añadió a continuación mientras se mezclaba usando un Ultra-Turrax a velocidad 2. La mezcla se continuó durante otros 3 minutos. La muestra se dejó a temperatura ambiente durante un período de tiempo suficiente para permitir que la espuma colapsara. La emulsión se homogeneizó después en dos etapas (primero a 2500 psi (o 175 bar) y luego a 500 psi (o 35 bar)) y se pasó dos veces por el homogeneizador. El pH final se verificó y se ajustó a pH 3.0-3.5 según sea necesario.

La distribución del tamaño de partícula para cada Formulación de Emulsión se proporciona en la Figura 1. Se utilizó un analizador de tamaño de partículas por dispersión de luz láser Mastersizer 2000 para determinar el tamaño de gota de aceite en los concentrados de emulsión. El análisis se realizó colocando 2-3 gotas en una solución de agua agitada hasta que la transmitancia del instrumento fue de alrededor del 80%. Las colas se observaron tanto para la formulación de emulsión 1 como para la Formulación de la Emulsión 2. La cola es un indicador de partículas grandes, lo que resulta en inestabilidad de la emulsión (es decir, falla de la emulsión). La Formulación de Emulsión que no mostró Cola fue la formulación de emulsión 3. La Formulación de Emulsión 3 usó un estabilizante de emulsiones que se realizó usando el procedimiento del ejemplo 2, incluida la gelatinización seguida de enfriamiento y licuefacción de enzimas con CLARASE® L 40,000 alfa-amilasa fúngica.

La Tabla 8 muestra el tamaño de partícula promedio para las tres formulaciones de emulsión.

Tabla 8

Formulación de emulsión	Diámetros promedio (μm)				
	D10	D50	D90	Diámetro promedio de volumen	Diámetros promedio de área superficial
1	0.26	0.61	1.50	0.51	0.84
2	0.30	0.71	1.83	0.59	0.95
3	0.22	0.47	1.04	0.40	0.56

D10, D50 y D90 describen el diámetro por debajo del cual se encuentra un % de las partículas. Esto se puede explicar de la siguiente manera: Dx con x = 10, 50 y 90. El valor que se muestra es el diámetro (en μm) por debajo del cual se encuentra el x % del volumen de las partículas. Por ejemplo, en la formulación de emulsión 3, el 90% de las partículas están por debajo del tamaño de partícula de 1.04 μm, mientras que en 2, el 90% de las partículas están por debajo del tamaño de partícula de 1.83 μm y en la formulación de emulsión 1, el 90% de las partículas son por debajo del tamaño de partícula 1.50 μm. Este dato indica que hay una mayor presencia de partículas más grandes en las Formulaciones de Emulsión 1 y 2. Este mayor porcentaje de partículas más grandes es un indicador de la inestabilidad de la emulsión. Los datos para D10, D50, Diámetro promedio de volumen y Diámetro promedio de área de superficie pueden interpretarse de manera similar.

La Tabla 9 muestra el ancho de distribución y el área de superficie específica para las tres formulaciones de emulsión.

Tabla 9

Formulación de emulsión	Ancho de distribución (μm)	Área de superficie específica (m^2/cc)
1	2.04	11.98
2	2.15	10.20
3	1.74	14.90

El ancho de distribución es un valor obtenido con el siguiente cálculo: ((D90 - D10)/D50). El área de superficie específica está inversamente relacionada con el diámetro del área de superficie. Una mayor área de superficie específica representa una mejor emulsión. En este documento, el área de superficie específica más alta es exhibida por formulación de emulsión 3.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un almidón hidrolizado enzimáticamente que comprende las etapas de:

(a) primero, gelatinizar un almidón de anhídrido n-octenil-succénico al exponer el almidón a temperaturas entre aproximadamente 120 °C y 150 °C, y

(b) luego, hidrolizar enzimáticamente el almidón gelatinizado usando una alfa-amilasa fúngica como la enzima.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de enfriar el almidón gelatinizado a entre aproximadamente 40 ºC y aproximadamente 60 ºC antes de que se hidrolice.

3. Un almidón hidrolizado enzimáticamente para uso como agente estabilizante que comprende un almidón anhídrido n-octenil succénico que se ha gelatinizado a una temperatura entre aproximadamente 120 °C y 150 °C e hidrolizado por una enzima que tiene actividad endo-hidrolítica, en el que la enzima es una alfa-amilasa fúngica.

4. Una emulsión que comprende el almidón hidrolizado enzimáticamente de la reivindicación 3.

5. La emulsión de la reivindicación 4, en la que la emulsión comprende gotitas de aceite de tamaño de partículas mono-modales y predominantemente Gaussianas de menos de aproximadamente 5 micrómetros y en la que el tamaño de partícula promedio se mantiene dentro del 10% de su valor inicial durante al menos 90 días cuando se almacena a temperaturas inferiores a 50 °C.

6. Un alimento, bebida o producto industrial que comprende el almidón hidrolizado enzimáticamente de la reivindicación 3 o la emulsión de las reivindicaciones 4 o 5.

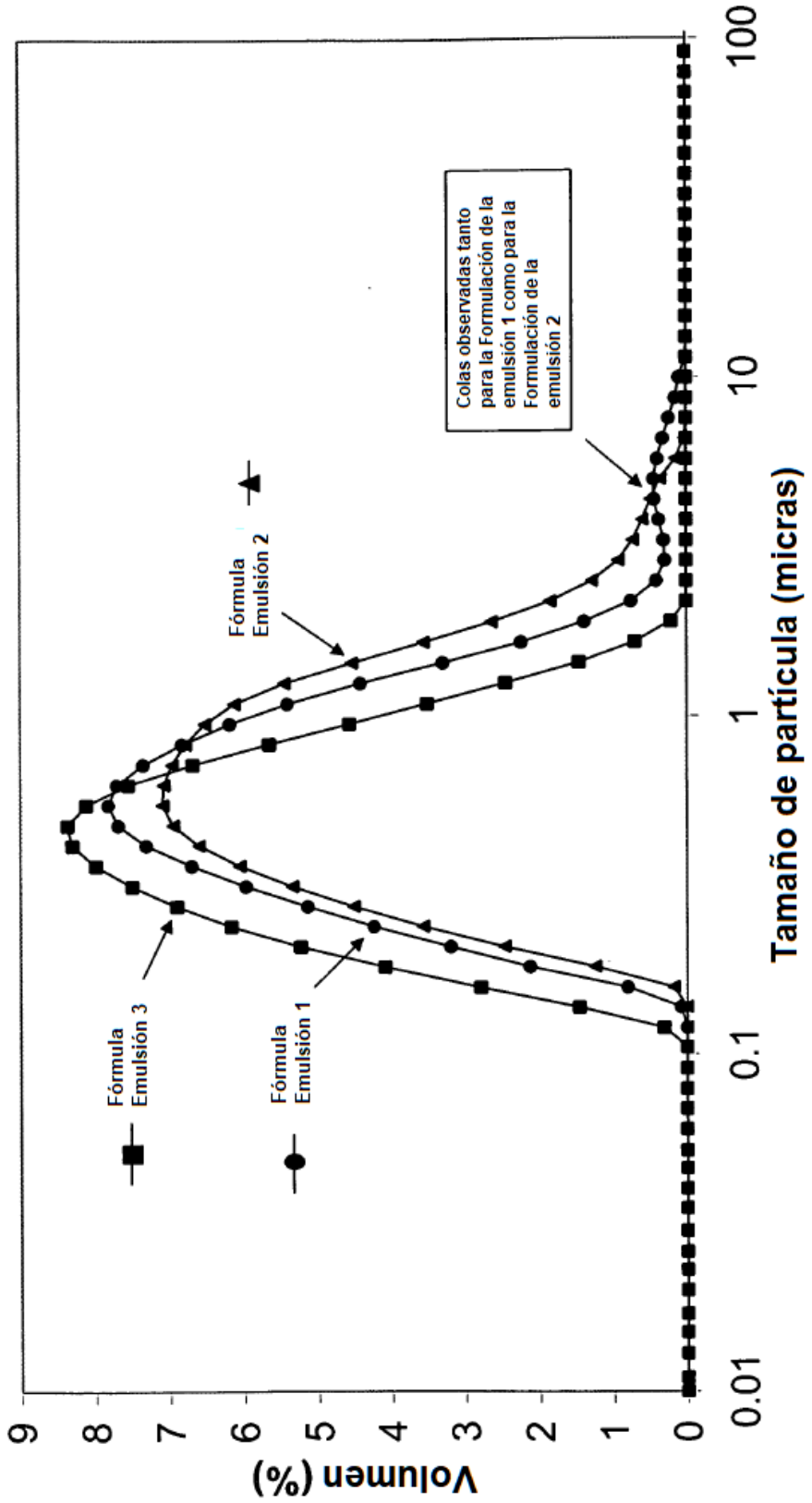

Volumen (%)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
100
Tamaño de partícula (micras)
Fórmula Emulsión 3
Fórmula Emulsión 1
Fórmula Emulsión 2
Colas observadas tanto para la Formulación de la emulsión 1 como para la Formulación de la emulsión 2

Fig. 1