

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 635**

51 Int. Cl.:

**C08B 30/18** (2006.01)

**C08L 3/02** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A23L 29/212** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2016** **PCT/FR2016/053326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017** **WO17098191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2016** **E 16825824 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024** **EP 3387020**

54 Título: **Hidrolizado de almidón de baja viscosidad que presenta un comportamiento mejorado de retrogradación**

30 Prioridad:

**10.12.2015 FR 1562123**

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

**28.06.2024**

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)**  
**1 rue de la Haute Loge**  
**62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**IBERT, MATHIAS;**  
**LECOCQ, ALINE y**  
**LANOS, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 974 635 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

Hidrolizado de almidón de baja viscosidad que presenta un comportamiento mejorado de retrogradación

5 **Campo de la invención**

La invención tiene por objeto un nuevo método de fabricación de hidrolizado de almidón. También se describe el uso de este hidrolizado en la industria alimentaria y farmacéutica.

- 10 Más precisamente, la invención tiene como objetivo proporcionar un hidrolizado de almidón que presente un buen comportamiento de retrogradación, conservando al mismo tiempo un sabor y un olor más neutros y poco azucarados, así como una textura en boca mejorada.

**Técnica anterior**

- 15 Los hidrolizados de almidón se agrupan de forma general en dos grandes familias: las maltodextrinas, cuando presentan un valor de DE bajo, normalmente inferior a 20, y los jarabes de glucosa cuando presentan un DE de 20 o más.

- 20 Estos hidrolizados se producen en forma de jarabes a partir de almidón en suspensión acuosa, descomponiéndose este almidón por calor e hidrolizado en presencia de ácido, de enzima o de una mezcla de ácido y enzima, para transformar el almidón en carbohidratos de peso molecular más bajo. Finalizado este método se obtiene un jarabe, que eventualmente puede atomizarse.

- 25 La composición del hidrolizado (o también perfil glucídico) depende del almidón inicial utilizado, pero también del método de hidrólisis utilizado. Por ejemplo, la conversión del almidón se lleva a cabo mediante una primera etapa de hidrólisis, comúnmente denominada "licuefacción".

- 30 Puede detenerse la hidrólisis después de esta etapa para obtener maltodextrinas, cuyo DE es controlado fácilmente por el experto en la técnica variando las condiciones operativas (duración, temperatura, selección y cantidades de enzimas y/o de pH...). Con respecto a los jarabes de glucosa, estas maltodextrinas son poco azucaradas.

- 35 Al contrario, es posible dejar que la hidrólisis prosiga para obtener jarabes de glucosa, que presentan normalmente un gusto más azucarado. Normalmente se obtienen estos jarabes de glucosa mediante una segunda etapa de hidrólisis, frecuentemente denominada "sacarificación". Esta etapa se hace normalmente a temperatura más baja que la etapa de licuefacción y en condiciones operativas distintas, por ejemplo añadiendo una o varias enzimas.

- En caso de utilizarse enzimas en el método, su selección es evidentemente esencial en el perfil glucídico del hidrolizado obtenido.

- 40 Entre las enzimas que pueden utilizarse en los métodos de fabricación de jarabes de glucosa figuran las enzimas alfaamilasa comercializadas de forma relativamente reciente por la empresa Verenium con las marcas Veretase® y Fuelzyme®-LF. La función enzimática de estas enzimas alfaamilasas es hidrolizar especialmente los sacáridos de alto peso molecular; esto permite concretamente reducir muy rápidamente la viscosidad del hidrolizado de almidón.

- 45 A continuación en la descripción, para mayor simplicidad, estas enzimas alfaamilasas que hidrolizan especialmente los sacáridos de alto peso molecular se agrupan bajo el término "Enzima V".

- 50 Las Enzimas V comercializadas por la empresa Verenium con las marcas Veretase® y Fuelzyme®-LF son enzimas seleccionadas de entre los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica como la representada en SEQ ID N°1 o una secuencia nucleotídica que presenta un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID N°1 al menos igual al 80 %, preferiblemente 85 %, preferiblemente 90 %, más preferiblemente 98 %, aún más preferiblemente 99 %.

- 55 La secuencia SEQ ID N°1 representa una secuencia nucleotídica que codifica para una alfaamilasa. Esta secuencia está disponible en línea con el número de acceso de GenBank AF504065.1.

- 60 Estas enzimas V se describen también en las patentes US-7.273.740, US-7.666.633 y US-7.659.102. Estos documentos describen también métodos de fabricación de jarabes muy ricos en glucosa (cuyo contenido es superior a 95 % en glucosa), comprendiendo estos métodos una etapa de licuefacción una Enzima V y una etapa de sacarificación que utiliza esta enzima junto con una enzima adicional de tipo glucoamilasa.

- 65 Además, entre los documentos que describen la fabricación de hidrolizados que utilizan una Enzima V, puede citarse la solicitud WO2009/137839, que describe esencialmente hidrolizados que son jarabes de glucosa. Estos hidrolizados presentan un DE de 20 a 52 de baja viscosidad que comprende un contenido en azúcares inferior al 25 %. Estos jarabes son de baja viscosidad ya que comprenden una escasa cantidad de polisacáridos de DP superior o igual a 15,

además de una cantidad elevada de oligosacáridos de DP de 3 a 14. Entre las numerosas variantes de fabricación de estos hidrolizados figura la realización del ejemplo 18; esta describe un jarabe de glucosa fabricado mediante un método que comprende una etapa de licuefacción de almidón en presencia de una amilasa de tipo Enzima V seguida de una etapa de sacarificación que utiliza esta enzima junto con enzimas adicionales, que son una isoamilasa y una pululanasa. Los jarabes obtenidos presentan un DE de 29 o 30 y no comprenden cantidad alguna de polisacáridos de DP superior o igual a 15.

El documento WO2013/116175 describe igualmente un método de fabricación de un jarabe de glucosa que comprende una etapa de hidrólisis del almidón que utiliza una Enzima V para obtener, antes de la etapa de filtración, un hidrolizado con un perfil glucídico con cantidades de DP1-2 del 10 al 25 %, de DP3-11 del 70 al 90 % y cantidades de DP12 y más que sean inferiores al 15 %. Estos jarabes presentan también las mismas ventajas: un contenido en azúcares reducido con respecto a un jarabe de glucosa de DE superior, aun con una viscosidad similar.

La mezcla de alfaamilasas descrita en la solicitud WO2011/017093 se refiere a una mezcla de una Enzima V y de una enzima de *Bacillus licheniformis*, estando estas enzimas en cantidades relativas de 0,5 a 5 *Liquefon Units* (LU, unidades liquefon) de *Bacillus licheniformis* por cada 5 Modified Wohlgemuth Units (MWU, unidades modificadas de Wohlgemuth) de Enzima V. Esta mezcla pretende resolver el problema siguiente: cuando se lleva a cabo la fabricación de un jarabe muy rico en glucosa llevando a cabo una etapa de licuefacción que utiliza exclusivamente como alfaamilasa una Enzima V, el jarabe muy rico en glucosa obtenido tras la sacarificación presenta resultados positivos para el ensayo de yodo, que indica que la hidrólisis del almidón es incompleta. Este documento describe la fabricación de jarabes de glucosa de alto DE fabricados mediante un método que comprende una etapa de licuefacción de almidón en presencia de la mezcla de alfaamilasa de tipo Enzima V y *Bacillus licheniformis*, seguida de una etapa de sacarificación que utiliza esta mezcla de enzima junto con una mezcla adicional de las enzimas glucoamilasa y pululanasa (Optimax® 4060 VHP).

Los hidrolizados de almidón se llevan en la mayor parte de los casos a una solución antes de ser utilizados, por ejemplo, en la fabricación de alimentos. En lo que respecta a hidrolizados de almidón obtenidos por alfaamilasas clásicas, por ejemplo la enzima Liquozyme® Supra (Novozymes®), uno de los problemas recurrentes es que es posible que no sean estables cuando se llevan a la solución. Se habla de un fenómeno de retrogradación. La solución de hidrolizado se vuelve entonces no homogénea, lo que complica su uso posterior y exige normalmente volver a solubilizar el hidrolizado retrogradado antes de poder utilizar la solución de hidrolizado. Este fenómeno se observa generalmente al cabo de unos días. No obstante, este fenómeno de la retrogradación de los hidrolizados se observa más rápidamente para hidrolizados que presentan un DE inferior a 10, especialmente cuando el DE es inferior a 5.

De lo anterior se constata que, aun cuando ya se han descrito métodos de fabricación de jarabes de glucosa utilizando una Enzima V en la etapa de licuefacción, se constata que ninguno de estos documentos aborda el problema de la retrogradación de los hidrolizados de almidón. Al contrario que en los hidrolizados obtenidos por las alfaamilasas tradicionales, la empresa solicitante ha constatado que, de forma sorprendente, los hidrolizados con un DE de 30 o menor y fabricados mediante un método que comprende una etapa de licuefacción de almidón utilizando una Enzima V, retrogradan rápidamente. Este fenómeno de retrogradación puede observarse en el caso de los hidrolizados de DE inferior o igual a 30 y especialmente en el caso de las maltodextrinas de DE inferior a 20.

En el marco de sus investigaciones, la empresa solicitante ha logrado producir un nuevo hidrolizado de almidón que presenta un buen comportamiento en la retrogradación, al tiempo que conserva una viscosidad más baja que los hidrolizados de DE equivalente producidos mediante alfaamilasas tradicionales (distintas de una Enzima V). Este hidrolizado se caracteriza por un perfil glucídico muy particular.

### **Sumario de la invención**

Se describe un hidrolizado de almidón que presenta un equivalente de dextrosa DE de 5 a 30 y en donde el DE, el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 10 a 20 (DP 10-20) y el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 50 o más (DP 50+) son tales que responden a las inecuaciones siguientes:

$$\begin{aligned} & \bullet \quad -0,83 \times \text{DE} + 25 \leq \% \text{DP} 50+ \leq -1,07 \times \text{DE} + 40 ; \\ & \bullet \quad -0,83 \times \text{DE} + 27,5 \leq \% \text{DP} 10-20 \leq -1,25 \times \text{DE} + 55 . \end{aligned}$$

El hidrolizado presenta de forma sorprendente un muy buen comportamiento en la retrogradación.

Además, en solución, tiene la ventaja de presentar una baja viscosidad.

Esto le permite ser fácilmente manipulado y utilizado como materia prima en productos alimentarios y farmacéuticos. Presenta además otras ventajas tales como un sabor y olor neutros, poco azucarados debido a su DE, pero más que los hidrolizados tradicionales, y una muy buena textura en boca.

La empresa solicitante ha logrado producir el hidrolizado utilizando un método particular.

La invención se refiere a un método de fabricación de un hidrolizado de almidón que comprende:

- 5 a) una etapa de puesta en contacto de una solución acuosa de almidón o de material amiláceo con al menos una alfaamilasa seleccionada de entre las Enzimas V;
- b) seguida de una etapa de hidrólisis de dicha solución acuosa;
- 10 c) seguida de una etapa de inhibición de la Enzima V para formar una solución de hidrolizado intermedio que presenta un DE igual a DE<sub>c</sub>;
- d) seguida de una etapa de puesta en contacto de la solución de hidrolizado intermedio obtenida en la etapa c) con al menos una alfaamilasa adicional, distinta de la Enzima V;
- 15 e) seguida de una segunda etapa de hidrólisis para formar un hidrolizado durante un tiempo suficiente para que presente un equivalente de dextrosa DE<sub>e</sub> de 5 a 30;
- f) seguida de una etapa de recuperación del hidrolizado formada en la etapa e);

caracterizado por que la Enzima V es una enzima seleccionada de entre:

- los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica como la representada en SEQ ID N°1 o por una secuencia nucleotídica que presenta un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID N°1 al menos igual al 80 %, preferiblemente 85 %, preferiblemente 90 %, más preferiblemente 98 %, aún más preferiblemente 99 %, o
- los polipéptidos que comprenden el fragmento enzimáticamente activo de la secuencia codificada por la secuencia SEQ ID N°1.

Según una variante de la invención, la Enzima V es una enzima que presenta un resultado en el test A inferior al 10 %, consistiendo el test A en:

- llevar a cabo una de etapa de hidrólisis a un pH de 5,3 de un almidón de maíz nativo con la enzima a ensayar como única enzima, hasta que se obtenga un hidrolizado de almidón de DE igual a 20,
- determinar el contenido en DP50+ de dicho hidrolizado, siendo el resultado del test A igual a este contenido en DP50+.

Al contrario de las enzimas citadas en los documentos FR 2 203 877 A1, GB 2 001 075 A, WO 01/96537 A2, EP 0 905 256 A1, WO 2004/064540 A1 y FR 2 762 616 A1, la enzima V de la invención permite así reducir en muy gran medida el contenido de sacáridos en DP50+ en comparación con las enzimas tradicionales. Entre las enzimas tradicionales puede mencionarse la enzima Termamyl 120 L.

Como se ha mostrado en los ejemplos, este método específico, que utiliza esta Enzima V particular, ha permitido obtener el perfil glucídico particular del hidrolizado de la invención.

El hidrolizado presenta concretamente, en comparación con un hidrolizado del mismo DE y producido a partir de una enzima tradicional de tipo Termamyl, un sabor más azucarado, aun cuando los contenidos en azúcares (es decir, en DP1 y DP2) son muy similares.

En la descripción que sigue se describirá en detalle la invención.

#### Descripción detallada de las figuras

La Figura 1 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP1-2 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

La Figura 2 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP3-6 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

La Figura 3 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP7-9 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

La Figura 4 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP10-20 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

La Figura 5 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP21-30 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

5 La Figura 6 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP31-40 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

La Figura 7 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP41-50 en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

10 La Figura 8 muestra la evolución del contenido en peso seco de DP50+ en función del DE de hidrolizados según la invención y de comparación.

### Descripción detallada de la invención

15 A continuación se describirá detalladamente un hidrolizado de almidón particular. El hidrolizado presenta un equivalente de dextrosa (DE) de 5 a 30. El DE define el grado de hidrólisis del almidón. Más especialmente, el DE, expresado porcentualmente, se determina midiendo el poder reductor del hidrolizado de almidón en comparación con el poder reductor de la glucosa. El DE puede medirse utilizando el método NF EN ISO 5377:1981.

20 El perfil glucídico del hidrolizado presenta una distribución particular de sacáridos.

El término "sacáridos" incluye según la invención, todos los tipos de sacáridos, es decir, los monosacáridos, los disacáridos, los oligosacáridos y los polisacáridos.

25 Para definir los sacáridos y esta distribución, se utiliza el término DP X en donde X representa el número de unidades de glucosa en el sacárido. Además, los sacáridos de grado de polimerización que comprende un número de unidades de glucosa de X a Y (X e Y incluidos) se agrupan en el término sacáridos de DP X-Y. Además, los sacáridos de grado de polimerización que comprende un número de unidades de glucosa de más de X (X no incluido) se agrupan en el término sacáridos de DP X+.

30 Por "sacáridos de alto peso molecular", se entiende los sacáridos de DP 50+.

La composición comprende, según su DE, contenidos específicos en sacáridos de DP 10-20 y en sacáridos de DP 50+. Los contenidos en sacáridos se expresan en peso seco, es decir, expresan la cantidad en peso seco de estos sacáridos con respecto a la cantidad en peso seco de la totalidad de los sacáridos en el hidrolizado.

35 Estos contenidos pueden determinarse mediante cromatografía líquida de alta resolución en resina de intercambio iónico (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) y mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Size Exclusion Chromatography). El aparato de HPLC puede estar provisto de una columna de resina de estireno divinilbenceno de intercambio iónico con forma iónica de plata, por ejemplo una columna de tipo Bio-Rad HPX 42A, y de un detector de índice de refracción. El aparato de SEC puede estar provisto de columnas del polímero polihidroximetilmetacrilato, por ejemplo columnas OHpak SB-802 HQ, OHpak SB-803 HQ y OHpak SB-805 HQ puestas en este orden. El aparato de SEC puede calibrarse con ayuda de patrones de pululanos. En la parte Ejemplos se presentan protocolos de preparación de las muestras y de medición.

45 Para los sacáridos en DP X-Y cuyo contenido es de hasta 19, el contenido se determina directamente mediante HPLC. En cuanto a los sacáridos en DP X-Y cuyo DP es de 20 o más (DP 20-30, DP 31-40, DP 41-50 y DP50+), sus contenidos se determinan de la forma siguiente:

- 50 • el contenido en DP 20+ se determina mediante HPLC según el método anterior;
- la relación (DP X-Y/DP20+) se determina mediante SEC según el método anterior;
- el contenido en DP X-Y se determina mediante la fórmula siguiente:

$$55 \quad \text{DP X-Y} = \text{DP 20+} \times (\text{relación DPX-Y/DP20+}).$$

el hidrolizado de almidón presenta un equivalente de dextrosa DE 5 a 30 y en donde el DE, el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 10 a 20 (DP 10-20) y el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 50 o más (DP 50+) son tales que responden a las inecuaciones siguientes:

- 60 •  $-0,83 \times \text{DE} + 25 \leq \% \text{DP 50+} \leq -1,07 \times \text{DE} + 40$  ;
- $-0,83 \times \text{DE} + 27,5 \leq \% \text{DP 10-20} \leq -1,25 \times \text{DE} + 55$  .

Preferiblemente, el DE del hidrolizado de la invención es inferior a 20, con máxima preferencia es de 10 a 19,5.

5 En estos intervalos de DE, el comportamiento en la retrogradación es aún mejor con respecto a un hidrolizado del mismo DE obtenido mediante un método que comprende una etapa de licuefacción de almidón que utiliza una Enzima V.

El hidrolizado de almidón presenta:

- 10
- un DE de 24 a 30;
  - un contenido en peso seco de DP 10-20 del 10 al 18 %;
  - un contenido en peso seco de DP 50+ del 3 al 13 %.

15

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- un contenido en peso seco de DP 1-2 del 6 al 14 %;
- 20 • y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 35 al 55 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 5 al 25 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 2 al 8 %;
- 25 • y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 1 al 4 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 1 al 4 %.

30

El hidrolizado de almidón presenta:

- un DE de 20 a 24;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 10 al 20 %;
- 35 • un contenido en peso seco de DP 50+ del 6 al 18 %.

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- 40 • un contenido en peso seco de DP 1-2 del 4 al 10 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 25 al 50 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 13 al 30 %;
- 45 • y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 2 al 8 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 2 al 5 %;
- 50 • y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 1 al 4 %.

El hidrolizado de almidón presenta:

- un DE de 17 a 20;
- 55 • un contenido en peso seco de DP 10-20 del 12 al 25 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 10 al 19 %.

60

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- un contenido en peso seco de DP 1-2 del 2 al 7 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 15 al 35 %;

- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 17 % al 26 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 3 al 10 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 2 al 6 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 2 al 4 %.

El hidrolizado de almidón presenta:

- un DE de 15 a 17;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 16 al 27 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 13 al 22 %.

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- un contenido en peso seco de DP 1-2 del 2 al 6 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 16 al 25 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 17 al 24 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 5 al 10 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 3 al 6 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 2 al 4 %.

El hidrolizado de almidón presenta:

- un DE de 13 a 15;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 17 al 30 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 17 al 25 %.

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- un contenido en peso seco de DP 1-2 del 1 al 5 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 13 al 23 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 15 al 23 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 6 al 12 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 3 al 7 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 2 al 4 %.

El hidrolizado de almidón presenta:

- un DE de 10 a 13;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 20 al 32 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 18 al 28 %.

El hidrolizado de almidón presenta de forma ventajosa:

- un contenido en peso seco de DP 1-2 del 0 al 4 %;

- y/o un contenido en peso seco de DP 3-6 del 10 al 20 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 7-9 del 15 al 22 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 21-30 del 5 al 12 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 31-40 del 4 al 8 %;
- y/o un contenido en peso seco de DP 41-50 del 2 al 4 %.

Las variantes 2 a 7 detalladas anteriormente no pueden combinarse entre sí. Sin embargo, el conjunto de estas variantes puede combinarse con la primera variante descrita anteriormente.

Las variantes ventajosas y preferidas descritas a continuación también pueden combinarse con las variantes 1 a 7.

Normalmente, el contenido en peso seco de DP11+ es superior al 15 %, incluso superior al 20 %, por ejemplo superior al 25 %.

Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP1-2 es del 1 al 15 %. Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP3-6 es del 10 al 60 %. Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP7-9 es del 5 al 30 %. Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP21-30 es del 2 al 15 %. Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP31-40 es del 1 al 6 %. Preferiblemente, el contenido en peso seco de DP41-50 es del 1 al 4 %.

El hidrolizado de almidón puede ser un hidrolizado de almidón procedente de cualquier origen vegetal, extraído de órganos y tejidos de reserva de los vegetales superiores. Este almidón puede ser un almidón rico en amilosa o, por el contrario, rico en amilopectina (*waxy*). Preferiblemente, el contenido seco en amilosa del almidón es del 0 al 85 % y el contenido seco en amilopectina es del 15 al 100 %. Según la invención, el término "almidón" agrupa a los almidones y a las féculas. Puede tratarse de almidón nativo de cereales, tales como trigo, maíz, cebada, triticale, sorgo o arroz, de tubérculos, tales como patata o yuca, o de plantas leguminosas, tales como guisante y la soja, y de mezclas de tales almidones. Preferiblemente, el hidrolizado según la invención es un hidrolizado de almidón de trigo, de maíz, de maíz *waxy*, de guisante o un hidrolizado de fécula de patata, con máxima preferencia de trigo, de maíz, de maíz *waxy*.

El hidrolizado puede utilizarse concretamente en las industrias alimentaria y farmacéutica, concretamente para la fabricación de alimentos para bebés, bebidas para deportistas, galletas, cremas de helado, salsas, sopas, bebidas en polvo, glaseados, soportes de aromas, edulcorantes. El hidrolizado puede utilizarse en dietética infantil, en dietética clínica o en dietética deportiva. El hidrolizado puede utilizarse también para fermentaciones diversas, concretamente en pastelería, en cervecería o en charcutería. El hidrolizado puede también servir para la fabricación de una mezcla que comprende el hidrolizado de almidón de la invención, concretamente una mezcla de hidrolizado según la invención con un hidrolizado adicional, pudiendo seleccionarse este hidrolizado adicional entre los jarabes ricos en glucosa y/o en maltosa.

El hidrolizado ilustrado por los ejemplos puede obtenerse mediante el método particular de la invención, cuyos distintos parámetros se describen en detalle a continuación; el experto en la técnica podrá modificar fácilmente estos parámetros para obtener estos hidrolizados según la invención.

La invención se refiere a un método de fabricación de un hidrolizado de almidón que comprende:

- a) una etapa de puesta en contacto de una solución acuosa de almidón con al menos una alfaamilasa seleccionada de entre las Enzimas V;
- b) seguida de una etapa de hidrólisis de dicha solución acuosa;
- c) seguida de una etapa de inhibición de la Enzima V para formar una solución de hidrolizado intermedio que presenta un DE igual a DE<sub>c</sub>;
- d) seguida de una etapa de puesta en contacto de la solución de hidrolizado intermedio obtenida en la etapa c) con al menos una alfaamilasa adicional, distinta de la Enzima V;
- e) seguida de una segunda etapa de hidrólisis para formar un hidrolizado durante un tiempo suficiente para que presente un equivalente de dextrosa DE<sub>e</sub> de 5 a 30;
- f) seguida de una etapa de recuperación del hidrolizado formada en la etapa e);

siendo la Enzima V una enzima que presenta un resultado para el test A inferior al 10 %, consistiendo el test A en:



- llevar a cabo una de etapa de hidrólisis a un pH de 5,3 de un almidón de maíz nativo con la enzima a ensayar como única enzima, hasta que se obtenga un hidrolizado de almidón de DE igual a 20,

5      •            determinar el contenido en DP50+ de dicho hidrolizado, siendo el resultado del test A igual a este contenido en DP50+.

En la primera etapa del método se lleva a cabo una etapa de puesta en contacto de una solución acuosa de almidón o de material amiláceo con al menos una alfaamilasa seleccionada de entre las Enzimas V.

10      El almidón utilizado para la fabricación de la solución acuosa de almidón de la etapa a) puede ser almidón nativo, es decir, almidón en forma granular obtenido por extracción de los órganos y tejidos de reserva de las plantas superiores mencionadas anteriormente. El almidón puede ser también un almidón sometido a una etapa de modificación. Esta etapa de modificación puede ser una etapa de pregelatinización, de gelatinización, de oxidación o de hidrólisis ácida. Preferiblemente, el almidón utilizado para la fabricación de la solución acuosa de almidón es almidón nativo.

15      La solución acuosa de almidón puede comprender una cantidad de almidón, expresada en masa seca de almidón, del 10 al 50 %, preferiblemente del 25 al 40 %, por ejemplo del 30 al 35 %. Un gránulo de almidón nativo comprende agua asociada. La tasa de humedad del almidón nativo, en condiciones estándar, varía según la naturaleza botánica del almidón. El almidón nativo comprende una cantidad intrínseca de agua y la tasa de humedad en este almidón está comprendida normalmente entre el 10 y el 20 %. Como ejemplo, un almidón de maíz nativo presenta una humedad en las condiciones estándar de aproximadamente el 13 %, mientras que una fécula de patata nativa presenta una humedad de aproximadamente el 18 %. La masa seca del almidón puede calcularse según la norma ISO 1666:1996.

25      En la solución acuosa de almidón se introduce, en la etapa a), al menos una alfaamilasa seleccionada de entre las Enzimas V.

Las Enzimas V hidrolizan especialmente los sacáridos de alto peso molecular. Por lo tanto, una Enzima V es una enzima que presenta concretamente un resultado para el test A inferior al 10 %, incluso inferior al 5 %.

30      La etapa de hidrólisis del test A puede hacerse a 95 °C, eventualmente después de una etapa de hervido al vapor de 5 minutos a 106 °C. Para llevar a cabo la etapa de hidrólisis del test A, puede hacerse referencia por ejemplo a las condiciones descritas en el protocolo 1 de la parte de ejemplos de la presente solicitud.

35      La Enzima V de la invención es una enzima seleccionada de entre

- los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica como la representada en SEQ ID N°1 o por una secuencia nucleotídica que presenta un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID N°1 al menos igual al 80 %, preferiblemente 85 %, preferiblemente 90 %, más preferiblemente 98 %, aún más preferiblemente 99 %, o

40      – los polipéptidos que comprenden el fragmento enzimáticamente activo de la secuencia codificada por la secuencia SEQ ID N°1.

45      Por “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de ácidos nucleicos o en el sentido de la presente invención, se entiende designar un porcentaje de nucleótidos entre ambas secuencias a comparar, obtenido del mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico, y estando distribuidas las diferencias entre ambas secuencias aleatoriamente y en toda su longitud. Se entiende por “mejor alineamiento” o “alineamiento óptimo”, el alineamiento para el cual el porcentaje de identidad determinado como se indica a continuación es más alto. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos se llevan a cabo tradicionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, haciéndose dicha comparación por segmento o por “ventana de comparación” para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede hacerse, manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988), mediante software que utilice estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Para obtener el alineamiento óptimo, se utiliza preferiblemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62.

55      El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de forma óptima, pudiendo comprender la secuencia de ácidos nucleicos a comparar adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las que el nucleótido es idéntico entre ambas secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

65

- En la etapa a), la Enzima V se pone en contacto con la solución de almidón o de material amiláceo en cantidades que permitan obtener el DE del hidrolizado intermedio en la etapa b). Esta cantidad puede variar mucho y está relacionada directamente a las condiciones utilizadas en esta etapa b), concretamente la duración, la temperatura, y/o el pH de la suspensión acuosa de almidón. La Enzima V se introduce normalmente en forma de soluciones comerciales de enzimas. Por ejemplo, puede introducirse en forma de una solución de enzima VERETASE® comercializada por la empresa VERENIUM®; la solución de enzima VERETASE puede introducirse en cantidades de masa, expresadas con respecto a la masa seca de almidón, del 0,01 al 0,5 %, preferiblemente del 0,03 al 0,13 %. Otra forma de expresar la cantidad de Enzima V es expresarla en cantidad de actividad enzimática de tipo “Unidad Modificada de Wolgemuth” (MWU), bien conocida por el experto en la técnica. Una unidad MWU es la cantidad de enzima que permite hidrolizar un miligramo de almidón solubilizado en una dextrina específica para el test de MWU, en treinta minutos y en las condiciones estándar de uso de la enzima. Por gramo de almidón seco, esta cantidad puede estar comprendida en el intervalo de 10 a 1000 MWU, por ejemplo de 50 a 500 MWU. Como ejemplo, 1 g de una solución de enzima VERETASE® comprende al menos 120000 MWU.
- Según una variante del método, una alfaamilasa adicional, distinta de la Enzima V también se pone en contacto con la suspensión acuosa de almidón en la etapa a). Esta alfaamilasa adicional distinta de la Enzima V puede elegirse de entre los *Bacillus licheniformis*, concretamente de los descritos en la solicitud WO 2011/017093 A1. Preferiblemente, los *Bacillus licheniformis* se eligen de entre las enzimas de tipo Spezyme® Alpha (Genencor®), LpHera® (Novozymes®), Liquozyme® Supra (Novozymes®) y Termamyl® 120L (Novozymes®).
- En las etapas a) y d), el pH de las soluciones de almidón puede aumentarse añadiendo al menos una base o reducirse añadiendo al menos un ácido en cantidades suficientes de forma que se seleccione el pH deseado. El ácido puede ser orgánico o inorgánico y concretamente ácido clorhídrico. La base puede ser orgánica o inorgánica y concretamente sosa.
- De forma ventajosa, la solución acuosa de almidón formada en la etapa a) presenta un pH de 4,0 a 6,5, de forma ventajosa de 4,3 a 5,9.
- La suspensión acuosa de almidón puede comprender otros compuestos aditivos que ayudan a la hidrólisis enzimática. Por ejemplo, puede comprender además al menos una sal de calcio, concretamente cuando se utiliza una alfaamilasa suplementaria que sea dependiente de calcio. La suspensión acuosa de almidón puede comprender también bisulfito de sodio.
- La solución acuosa de almidón puede prepararse por simple mezcla de los constituyentes.
- Tras la etapa de puesta en contacto, el método comprende una etapa de hidrólisis b) para formar una solución de hidrolizado de almidón, denominada “hidrolizado intermedio”.
- Como se ha indicado anteriormente, la duración y la temperatura de la etapa de hidrólisis b) depende directamente del pH y de la cantidad de Enzima V utilizada en la etapa a), y del DE del hidrolizado intermedio DE previsto.
- Esta etapa de hidrólisis b) puede realizarse calentando la solución de almidón preparada en la etapa a). Preferiblemente, la solución de almidón se calienta a una temperatura de 75 a 120 °C. Esta etapa b) se realiza hasta que se hidroliza suficientemente el almidón, antes de llevar a cabo la etapa de inhibición c), para a continuación poder obtener el hidrolizado intermedio útil para la invención. La duración de esta etapa b) puede ser de 2 a 300 minutos. Esta etapa puede hacerse en cualquier tipo de reactor utilizado tradicionalmente para la hidrólisis del almidón y preferiblemente con agitación.
- Según una primera variante, esta primera etapa de hidrólisis b) puede consistir en un estado de hidrólisis denominado “de alta temperatura”, pudiendo estar comprendida la temperatura utilizada en este estado entre 100 y 115 °C, utilizando concretamente un hervidor de inyección de vapor, frecuentemente denominado *jet cooker*. De forma ventajosa, este estado se realiza de forma que se gelatinice el almidón o que el almidón se haga al menos parcialmente soluble. Este estado puede durar concretamente de 2 a 30 minutos, normalmente de 3 a 15 minutos. Puede hacerse a una presión de al menos 1,2 bar, por ejemplo a una presión de 1,3 bar a 8 bar.
- Según una segunda variante, esta primera etapa de hidrólisis b) puede comprender un primer estado de hidrólisis denominado “de alta temperatura” y un segundo estado de hidrólisis denominado “de baja temperatura”, siendo la temperatura utilizada en el primer estado superior a la utilizada en el segundo estado. El estado de hidrólisis de alta temperatura puede realizarse como se describe en la variante anterior. El estado de hidrólisis de baja temperatura puede realizarse en cualquier tipo de reactor tradicional termostatzado, preferiblemente con agitación, de forma ventajosa a una temperatura comprendida entre 80 y 100 °C. Este segundo estado puede durar concretamente de 5 a 300 minutos.
- El método según la invención comprende una etapa c) de inhibición de la Enzima V. Esta etapa de inhibición puede hacerse calentando la solución de hidrolizado intermedia. Preferiblemente, la etapa de inhibición se lleva a cabo mediante el calentamiento de la solución de hidrolizado intermedio, por ejemplo a una temperatura superior o igual a

140 °C o superior o igual a 150 °C. Una ventaja de esta etapa de inhibición por calentamiento es que no necesita adiciones sucesivas de ácido y de base; por lo tanto, la etapa posterior eventual de desmineralización del hidrolizado es más fácil. Esta etapa de inhibición puede hacerse también bajando el pH de la solución de hidrolizado intermedio, concretamente a un pH inferior a 3,5, en combinación con un calentamiento de 90 °C o más. De forma ventajosa, el pH está comprendido entre 2,5 y 3, por ejemplo es de 2,9 aproximadamente. Preferiblemente, la etapa de inhibición tiene una duración que es de unos minutos a unas horas, por ejemplo de 30 a 120 minutos. Esta etapa es esencial en el método de la invención, para poder obtener el hidrolizado a la distribución glucídica particular de la invención. Tras esta etapa c) de inhibición, la solución de hidrolizado intermedio inhibida obtenida en la etapa c) puede presentar un DE<sub>c</sub> muy ligeramente superior al de la etapa b). Se considera normalmente que la enzima V se inhibe cuando, al poner la solución de hidrolizado intermedio inhibida 3 horas a 90 °C y a un pH de 5,2, su DE es inferior o igual a DE<sub>c</sub>+1, preferiblemente inferior o igual a DE<sub>c</sub>+0,5, con máxima preferencia igual a DE<sub>c</sub>.

Según el método específico de la invención, DE<sub>c</sub> es inferior al DE del hidrolizado (DE<sub>e</sub>) recuperado después de la etapa f) posterior y por tanto depende del mismo directamente.

Tras esta etapa de inhibición c), el DE del hidrolizado intermedio puede ser de 3 a 20, por ejemplo de 4 a 15, concretamente de 5 a 11.

Después de la etapa de inhibición, se lleva a cabo una etapa d) de puesta en contacto de la solución de hidrolizado intermedio obtenida en la etapa c) con al menos una alfaamilasa adicional, distinta de la Enzima V.

La alfaamilasa adicional puede elegirse entre los *Bacillus licheniformis*, concretamente los descritos en la solicitud WO 2011/017093 A1. Preferiblemente, los *Bacillus licheniformis* se eligen de entre las enzimas de tipo Spezyme® Alpha (Genencor®), LpHera® (Novozymes®), Liquozyme® Supra (Novozymes®) y Termamyl® (Novozymes®).

En la etapa d), la alfaamilasa adicional se pone en contacto en cantidades que permitan obtener el hidrolizado previsto tras finalizar la etapa e). Esta cantidad puede variar mucho y está relacionada directamente con las condiciones utilizadas en esta etapa e), concretamente la duración, la temperatura, y/o el pH de la suspensión acuosa de almidón. La alfaamilasa adicional se ha introducido normalmente en forma de soluciones comerciales de enzimas. Por ejemplo, puede introducirse en forma de una solución comercial de enzima en cantidades de masa, expresadas con respecto a la masa seca de almidón, que es del 0,01 al 0,5 %, preferiblemente del 0,02 al 0,13 %. Otra forma de expresar la cantidad de alfaamilasa adicional es expresarla en cantidad de actividad enzimática de tipo "Novo Unit" (NU, unidad Novo), bien conocida por el experto en la técnica. Por gramo de almidón seco, esta cantidad puede estar comprendida en el intervalo de 10 a 1000 NU, por ejemplo de 50 a 500 NU. Como ejemplo, 1 g de una solución de enzima Liquozyme Supra® comprende al menos 136000 NU y 1 g de una solución de enzima LpHera® comprende al menos 400000 NU.

Para evitar una interpretación errónea, se precisa que, cuando se utilizan varias alfaamilasas adicionales según el método de la invención, ninguna de estas alfaamilasas puesta en contacto con el hidrolizado en la etapa d) es una Enzima V. Por lo tanto, la etapa de hidrólisis e) se lleva a cabo en ausencia de Enzima V. Preferiblemente, no se pone en contacto ninguna enzima que no sean las alfaamilasas adicionales con el hidrolizado en las etapas d) y e). Las condiciones de pH pueden seleccionarse de forma que la alfaamilasa presente una actividad enzimática en la etapa e).

De forma ventajosa, la solución de hidrolizado formada en la etapa d) presenta un pH de 4,3 a 5,9.

La solución de hidrolizado formada en la etapa d) puede comprender otros compuestos aditivos que ayuden a la hidrólisis enzimática. Por ejemplo, puede comprender además al menos una sal de calcio, concretamente cuando se utiliza una alfaamilasa adicional que sea dependiente de calcio. La suspensión acuosa de almidón puede comprender también bisulfito de sodio.

La solución de hidrolizado formada en la etapa d) puede prepararse por simple mezcla de los constituyentes.

Para obtener el perfil particular del hidrolizado según la invención, el método según la invención comprende dos etapas de hidrólisis enzimática b) y e), realizadas con distintas alfaamilasas. Por lo tanto, la etapa e) de hidrólisis enzimática se lleva a cabo de forma que el equivalente de dextrosa DE<sub>e</sub> sea superior al equivalente de dextrosa DE<sub>c</sub> del hidrolizado intermedio, es decir, que la etapa e) se lleva a cabo en condiciones de tiempo y de temperatura que permitan aumentar el equivalente de dextrosa del hidrolizado.

De forma ventajosa, el equivalente de dextrosa DE<sub>e</sub> es superior o igual a DE<sub>c</sub> + 1, preferiblemente superior o igual a DE<sub>c</sub> + 3, concretamente superior o igual a DE<sub>c</sub> + 5, por ejemplo superior o igual a DE<sub>c</sub> + 7. Evidentemente, el perfil glucídico del hidrolizado varía, en los puntos descritos anteriormente, y esto depende de la diferencia entre los equivalentes de dextrosa DE<sub>c</sub> y DE<sub>e</sub>. Cuanto mayor sea esta diferencia, más se diferenciará el perfil glucídico del perfil de un hidrolizado obtenido por una etapa de hidrólisis enzimática utilizando exclusivamente la Enzima V en la etapa de hidrólisis.

Esta etapa de hidrólisis e) puede hacerse calentando el hidrolizado intermedio obtenido en la etapa c). Las condiciones de temperatura y de tiempo pueden variar en gran medida según sea el hidrolizado previsto. Pueden seleccionarse en función del pH y de las cantidades de enzimas adicionales utilizadas, de forma que se obtenga el equivalente de dextrosa DE<sub>e</sub> deseado.

Preferiblemente, dicho hidrolizado intermedio se calienta a una temperatura de 50 a 120 °C. Esta etapa e) se lleva a cabo hasta que se obtenga este hidrolizado intermedio. La duración de esta etapa e) puede ser de 10 a 1500 minutos.

El método según la invención comprende una etapa f) de recuperación del hidrolizado formado en la etapa e) anterior.

Esta etapa puede comprender además una etapa posterior g) de transformación del hidrolizado recuperado en la etapa f).

La etapa de transformación g) puede consistir en una etapa de purificación del hidrolizado. Esta etapa puede ser concretamente una etapa de filtración, por ejemplo pasando por un filtro prensa o por una membrana de microfiltración o de ultrafiltración. Puede ser también una etapa de desmineralización del hidrolizado, por ejemplo mediante una resina de intercambio iónico. Puede ser también una etapa de decoloración del hidrolizado, por ejemplo poniendo en contacto el hidrolizado con carbonos activos.

La etapa de transformación puede consistir también en una etapa de concentración por evaporación del agua del hidrolizado o también en una etapa de dilución del hidrolizado con agua.

Después de la etapa de recuperación f) o de las etapas de tratamiento mencionadas anteriormente, el hidrolizado obtenido se presenta en forma de una solución acuosa.

Se describe también un hidrolizado de almidón que se presenta en forma de solución acuosa, cuya cantidad de masa de hidrolizado, expresada en masa seca, es de forma ventajosa del 20 al 85 % y preferiblemente entre el 50 y el 80 %.

El método de la invención puede comprender también distintas etapas de transformación entre las descritas anteriormente.

El método según la invención puede comprender también una etapa de transformación g) que es una etapa formación del hidrolizado en forma de polvo, concretamente mediante una etapa de atomización. En caso de que se lleven a cabo distintas etapas de transformación, esta etapa de atomización puede ser la etapa de transformación final.

Así, el hidrolizado puede presentarse en forma de polvo que pueda presentar una cantidad de masa en el hidrolizado, expresada en masa seca, superior al 90 %. Ahora va a describirse en detalle la invención en los siguientes ejemplos. El experto en la técnica podrá adaptar fácilmente, tras la lectura de la descripción de la solicitud, las condiciones del método para obtener los hidrolizados.

## Ejemplos

### Fabricación y caracterización de los hidrolizados

#### Enzimas utilizadas

*Enzima V: Enzima Veretase® (Verenium®).*

Otras alfaamilasas:

*LpHera® (Novozymes®);*

*Liquozyme® Supra (Novozymes®);*

*Termamyl® 120L (Novozymes®).*

#### Métodos

#### *Cromatografía líquida de alta resolución*

El sistema de cromatografía líquida de alta resolución se compone de una bomba WATERS M515, un inyector automático WATERS WISP, un horno de termostatación de columnas regulado a 55 °C, un refractómetro diferencial WATERS R2414 y un sistema informático provisto de un software que permite tratar los cromatogramas Empower (WATERS). Se utilizan dos columnas de resina de intercambio iónico con forma iónica de plata de tipo columna de carbohidratos Aminex HPX - 42A (300 mm × 7,8 mm) montadas en serie. El eluyente utilizado es agua destilada (caudal: 0,4 ml/minuto). Se prepara una muestra de la solución de hidrolizado a analizar diluyendo con agua destilada dicha solución al 5 % de materia seca aproximadamente, a continuación se filtra haciéndola pasar por una jeringuilla

provista de una boquilla compuesta por una membrana de filtración (poro de 0,45 µm). A continuación se inyectan 20 µl de esta solución en el aparato de análisis.

#### Cromatografía de exclusión por tamaño

El sistema de cromatografía de exclusión por tamaño es un cromatógrafo líquido de alta resolución compuesto por una bomba de alta presión de tipo WATERS 510, un inyector WATERS 717+, un horno de termostatación de columnas regulado a 35 °C, un refractómetro diferencial WATERS R2414 y un sistema informático provisto de un software que permite tratar los cromatogramas, Empower (WATERS) que incluye la opción SEC. Se conectan tres columnas en serie y se ponen en el orden siguiente: OHPak SB-802 HQ, OHPak SB-803 HQ, OHPak SB-805 HQ (Waters). El eluyente utilizado (0,5 ml/minuto) es una solución acuosa obtenida a partir de agua destilada, nitrato de sodio (concentración en solución acuosa de 0,1 M) y nitrato de sodio (concentración al 0,02 % en masa). El cromatógrafo de exclusión por tamaño se calibra con ayuda de un patrón de pululan. Se prepara una muestra de la solución de hidrolizado a analizar diluyendo con eluyente dicha solución al 5 % de materia seca aproximadamente, a continuación se filtra haciéndola pasar por una jeringuilla provista de una boquilla compuesta por una membrana de filtración (poro de 0,45 µm). A continuación se inyectan 100 µl de esta solución en el aparato de análisis.

#### Equivalente de dextrosa

El DE se mide utilizando el método NF EN ISO 5377:1981.

#### Método de fabricación des hidrolizados

Se han obtenido distintos hidrolizados de almidón de comparación según el protocolo 1 siguiente:

Se prepara en un recipiente con agitación activa una solución acuosa de almidón a 18 - 19 grados de la escala baumé (es decir aproximadamente 33 % MS) a partir de almidón de maíz nativo seco y de agua desmineralizada. Siempre con agitación, el pH se rectifica (con una solución de HCl o de NaOH a 0,1 N) para regular el pH a 5,3, o a 4,8 en caso de que la alfaamilasa utilizada a continuación es la enzima LpHera.

Siempre bajo agitación, la solución comercial de alfaamilasa (CP1 a CP4) o la mezcla de soluciones comerciales de alfaamilasa (CP5 a CP6) se pone en contacto con la solución acuosa de almidón en las proporciones de masa con respecto al peso seco de almidón indicado en la Tabla 1. En caso de que se utilice la enzima Termamyl 120L, que es calciodependiente, se añade previamente CaCl<sub>2</sub> a la suspensión (aproximadamente 60 ppm de calcio en la solución de almidón).

La etapa de hidrólisis se hace de la forma siguiente: la solución de almidón se introduce en un hervidor de inyección de vapor (*jet cooker*). Se inyecta vapor en la solución de almidón mediante un conducto para alcanzar 106 °C con una contrapresión de 1,4 bar. La solución de almidón tras la descomposición se mantiene a dicha temperatura en una zona de contacto durante 5 a 6 minutos. El almidón se solubiliza en esta etapa y se recupera a la salida del hervidor de inyección de vapor y se introduce directamente en un baño maría para que continúe la hidrólisis. La temperatura se regula a 95 °C. El DE del hidrolizado aumenta conforme aumenta la hidrólisis. Se recuperan distintos hidrolizados de almidón con el transcurso del tiempo. Tras la recuperación, la enzima se inhibe inmediatamente bajando el pH a 2,9 mediante una solución de HCl (0,1 N) y manteniendo el hidrolizado a 95 °C durante 1 h.

Se han obtenido distintos hidrolizados de almidón según la invención según el protocolo 2 siguiente:

Se prepara en un recipiente con agitación activa una solución acuosa de almidón a 18 - 19 grados de la escala baumé (es decir aproximadamente 33 % MS) a partir de almidón de maíz nativo seco y de agua desmineralizada. Siempre con agitación, se rectifica el pH (con una solución de HCl o de NaOH a 0,1 N) para regular el pH a 5,3.

Siempre con agitación, la solución comercial de Enzima V se pone en contacto con la solución acuosa de almidón, en cantidades de masa del 0,08 % en masa con respecto al peso seco de almidón.

La etapa de hidrólisis se hace de la forma siguiente: la solución de almidón se introduce en un hervidor de inyección de vapor (*jet cooker*). Se inyecta vapor en la solución de almidón mediante un conducto para alcanzar 106 °C con una contrapresión de 1,4 bar. La solución de almidón tras la descomposición se mantiene a dicha temperatura en una zona de contacto durante 5 a 6 minutos. El almidón se solubiliza en esta etapa y se recupera a la salida del hervidor de inyección de vapor y se introduce directamente en un baño maría. La enzima V se inhibe inmediatamente bajando el pH a 2,9 con una solución de HCl (0,1 N) y manteniendo el hidrolizado a 95 °C durante 1 h. Se obtuvieron dos hidrolizados intermedios según este protocolo; el primer hidrolizado intermedio presenta un DE igual a 7 (para un tiempo de contacto de aproximadamente 6 minutos) y el segundo hidrolizado intermedio de DE igual a 5 (para un tiempo de contacto de aproximadamente 5 minutos).

Siempre con agitación, se rectifica el pH (con una solución de NaOH a 0,1 N) para regular el pH a 5,3 en caso de que la alfaamilasa adicional utilizada a continuación sea la enzima Licozyme Supra o a 4,8 en caso de que la alfaamilasa utilizada a continuación sea la enzima LpHera.

Según un primer ejemplo según la invención (INV1), la solución comercial de Licozyme Supra se pone en contacto con la solución del primer hidrolizado intermedio (DE=7), en cantidades de masa del 0,1 % en masa con respecto al peso seco de almidón. El hidrolizado se mantiene a 95 °C y el DE del hidrolizado aumenta conforme aumenta la hidrólisis. Se recuperan distintos hidrolizados de almidón con el transcurso del tiempo. Tras la recuperación de un hidrolizado, la enzima se inhibe inmediatamente bajando el pH a 2,9 mediante una solución de HCl (0,1 N) y manteniendo el hidrolizado a 95 °C durante 1 h.

Según un segundo ejemplo según la invención (INV2), la solución comercial de LpHera se pone en contacto con la solución del segundo hidrolizado intermedio (DE=5), en cantidades de masa del 0,03 % en masa con respecto al peso seco de almidón. El hidrolizado se mantiene a 95 °C y el DE del hidrolizado aumenta conforme aumenta la hidrólisis. Se recuperan distintos hidrolizados de almidón con el transcurso del tiempo. Tras la recuperación de un hidrolizado, la enzima se inhibe inmediatamente bajando el pH a 2,9 mediante una solución de HCl (0,1 N) y manteniendo el hidrolizado a 95 °C durante 1 h.

#### Características de los hidrolizados

Los contenidos en peso seco de los sacáridos y los DE de los hidrolizados de comparación y según la invención se analizan según los métodos descritos anteriormente, y se especifican en las Tablas 1 y 2 que siguen.

Si estos contenidos de DP10-20 o DP50+ son conformes con los criterios de la invención, la cifra indicada en la celda correspondiente se indica en negrita.

Tabla 1: DE y perfiles glucídicos de los hidrolizados obtenidos por el protocolo 1 (de comparación)

N°	CP1					CP 2				CP3					CP4				
Enzima	Termamyl 120L (0,1 %)					Licozyme Supra (0,1 %)				Veretase (0,08 %)					LpHera (0,03 %)				
DE	12	17	19	21	28	16	19,2	22,7	25,8	13,9	18,7	20,1	22	29,3	12,1	17,5	20,6	23,7	28,1
DP1-2	3,8	5,7	6,5	7,6	11,2	4,2	6,1	9,2	9,9	3,9	5,5	6,7	7,7	12,6	2,3	4,6	6,7	9,1	12,9
DP3-6	16,5	26,2	27,4	32,1	53,3	21,2	30,2	38,1	39,8	13,0	17,5	20,7	23,5	34,3	16,3	26,8	32,5	37,7	45,0
DP7-9	11,9	14,2	13,8	13,7	5,7	17,2	18,3	14,9	13,6	19,4	24,6	26,9	28,3	29,1	16,7	19,6	18,2	15,4	9,5
DP11+	ND	ND	ND	ND	ND	53,4	42,7	35,9	34,9	54,7	42,1	36,1	30,8	15,7	61,6	47,3	41	36,5	30,5
DP10-20	22,4	19,6	18,4	16,7	10,8	14	9,1	8,8	9,1	41,6	40,8	37,5	34,6	22,5	10,7	6,5	6,5	7,5	9,5
-0,83 × DE + 27,5	17,5	13,3	11,7	10,1	4,3	14,2	11,6	8,7	6,1	16,0	12,0	10,8	9,2	3,2	17,5	13,0	10,4	7,8	4,2
-1,25 × DE + 55	40,0	33,8	31,3	28,8	20,0	35,0	31,0	26,6	22,8	37,6	31,6	29,9	27,5	18,4	39,9	33,1	29,3	25,4	19,9
DP21-30	6,9	5,8	5,5	4,8	3,3	4,5	3,7	3,8	3,9	10,1	6,9	5,4	4,1	1,2	3,4	2,7	3,1	3,6	4
DP31-40	3,7	3,5	3,5	3,7	2,5	3,1	3	3,3	3,2	4,8	2,5	1,8	1,2	0,2	2,1	2,6	2,8	3	3
DP41-50	2,9	2,8	2,6	2,5	2,0	2,7	3	2,8	2,7	2,3	0,9	0,6	0,3	0	1,6	2,5	2,7	2,7	2,4
DP50+	31,8	22,2	22,4	18,8	11,1	33,3	26,6	19,2	18	5,1	1,3	0,7	0,4	0	46,7	34,8	27,4	21,1	13,6
-0,83 × DE + 25	15,0	10,9	9,2	7,6	1,8	11,7	9,1	6,2	3,6	13,5	9,5	8,3	6,7	0,7	15,0	10,5	7,9	5,3	1,7
-1,07 × DE + 40	27,2	21,8	19,7	17,5	10,0	22,9	19,5	15,7	12,4	25,1	20,0	18,5	16,5	8,6	27,1	21,3	18,0	14,6	9,9

Tabla 2: DE y perfiles glucídicos de los hidrolizados obtenidos mediante el protocolo 1 con mezclas de enzimas (de comparación) y mediante el protocolo 2 (según la invención)

°	CP5				INV1				CP6				INV2				
Enzima	0,08 % Licozyme Supra + 0,02 % Veretase				Veretase / inhibición / Licozyme Supra				0,05 % Licozyme Supra + 0,05 % Veretase				Veretase / inhibición / LpHera				
DE	12,4	20,2	22,8	26,1	16,9	19,8	22,4	27,4	15	18,2	22,3	28,7	12,7	20,6	21,9	24,7	28,1
DP1-2	3,0	6,2	7,6	10,4	3,6	5,9	7,1	11,5	3,5	5,0	7,1	12,5	2,5	5,4	6,9	10,1	11,0
DP3-6	11,9	28,8	31,6	39,2	22,8	31,7	36,7	49,8	13,4	18,3	25,1	39,9	16,3	29,4	35,7	42,2	46,4

°	CP5				INV1				CP6				INV2				
Enzima	0,08 % Liquezyme Supra + 0,02 % Veretase				Veretase / inhibición / Liquezyme Supra				0,05 % Liquezyme Supra + 0,05 % Veretase				Veretase / inhibición / LpHera				
DP7-9	16,7	24,6	25,6	24,6	21,9	23,1	21,9	12,7	18,8	23,3	27,7	26,4	18,8	24,3	23,1	18,3	14,9
DP11 +	61,3	33,9	27,6	19,0	45,7	34,9	30,4	22,4	55,8	44,8	31,0	13,6	56,3	36,6	30,7	25,5	23,9
DP10-20	35,4	24,1	24,9	20,8	21,5	16,2	13,9	12,5	39,5	38,0	32,4	19,8	23,8	15,2	12,7	12,9	13,1
-0,83 × DE + 27,5	17,2	10,7	8,6	5,8	13,5	11,1	8,9	4,8	15,1	12,4	9,0	3,7	17,0	10,4	9,3	7,0	4,2
-1,25 × DE + 55	39,5	29,8	26,5	22,4	33,9	30,3	27,0	20,8	36,3	32,3	27,1	19,1	39,1	29,3	27,6	24,1	19,9
DP21-30	10,7	6,0	4,9	2,9	6,8	5,1	4,6	3,8	10,4	7,9	4,8	1,1	8,9	5,5	4,8	4,4	4,2
DP31-40	6,0	3,1	2,1	1,0	4,3	3,5	3,2	2,4	5,0	3,3	1,6	0,2	5,3	3,7	3,2	2,7	2,5
DP41-50	3,3	1,8	1,1	0,4	2,9	2,4	2,2	1,6	2,5	1,4	0,6	0,1	3,2	2,5	2,1	1,8	1,5
DP50+	13,0	5,5	2,4	0,8	16,3	12,1	10,5	6,0	6,8	2,9	0,9	0,0	21,2	14,1	11,5	7,6	6,6
-0,83 × DE + 25	14,7	8,2	6,1	3,3	11,0	8,6	6,4	2,3	12,6	9,9	6,5	1,2	14,5	7,9	6,8	4,5	1,7
-1,07 × DE + 40	26,7	18,4	15,6	12,1	21,9	18,8	16,0	10,7	24,0	20,5	16,1	9,3	26,4	18,0	16,6	13,6	9,9

Estas tablas demuestran que solos los hidrolizados de la invención presentan el perfil glucídico particular y combinan el conjunto de los criterios DP10-20 o DP50+. En particular, el hidrolizado obtenido a partir de la enzima Termamyl 120L presenta sistemáticamente cantidades de sacáridos de tipo DP50+ siempre superiores a las del criterio según la invención.

En las Figuras 1 a 8 se representa la evolución de los contenidos en peso seco de DPX-Y en función del DE de los hidrolizados según la invención y los de comparación. Las figuras, concretamente las Figuras 4 y 8, son un buen testimonio del perfil glucídico particular del hidrolizado según la invención.

Test de retrogradación de los hidrolizados de almidón

Los hidrolizados de los ensayos INV1, CP3 y CP5 se recuperan y filtran al vacío haciéndolos pasar por una torta de tierra de diatomeas. Estos hidrolizados presentan un DE de 22,4, 22,0 y 22,8, respectivamente. Se obtienen en forma de soluciones concentradas al 30 % de materia seca, que son ahora transparentes. Estas soluciones se ponen a 4 °C durante 6 horas para acelerar la eventual retrogradación. Después de este tratamiento, se observa si la solución se retrograda o no, es decir, si sigue siendo transparente o no. Estas condiciones se comunican en la Tabla 3.

Tabla 3: Comportamiento de retrogradación

N° de hidrolizado	INV 1	CP3	CP5
Aspecto de la solución	Transparente	Turbia	Turbia

Estos ensayos demuestran que el hidrolizado según la invención presenta un mejor comportamiento de retrogradación. El hidrolizado CP3 obtenido a partir de la Enzima V y el hidrolizado CP5 obtenido a partir de una mezcla de Enzima V y enzima de *Bacillus licheniformis* descrita en la solicitud WO2011/017093 se vuelven turbios en el test; por el contrario, la solución de hidrolizado según la invención permanece transparente al cabo de 6 horas.

Test sensorial (sabor y olor)

Se desea medir el impacto del cambio de perfil glucídico sobre el sabor y el olor de dos jarabes de glucosa (DE aproximadamente igual a 28).

Productos

Ambos productos ensayados son los hidrolizados INV 1, que presentan un DE igual a 27,4 y CP 1, que presenta un DE igual a 28.

Material y métodos

Realización

Los 2 productos se han puesto en solución para alcanzar un brix final de 27,5. El agua utilizada para la disolución de los productos se desmineraliza antes de su adición al producto.

El análisis sensorial se ha llevado a cabo mediante un ensayo triangular según la norma ISO 4120: 2004.

5 Para el test triangular de olor, las soluciones se presentan a los panelistas en frascos de vidrio cerrados mantenidos al baño maría a 60 °C.

Para el test triangular de sabor, las soluciones se presentan a los panelistas en frascos de vidrio cerrados mantenidos a temperatura ambiente.

10 Panel

El panel está constituido por participantes habituales en paneles de control de calidad de hidrolizados de almidón.

Condiciones de cata

- 15
- Recintos individuales de cata, paredes blancas, ambiente tranquilo (para facilitar la concentración)
  - Frascos coloreados (para no verse influido por la vista del producto)
- 20
- Productos anonimizados por un código de 3 cifras (para evitar que el código no influya en la apreciación de los productos)
  - Productos presentados en un orden aleatorio (para evitar los efectos de orden y de persistencia)

25 Ejercicio

El método empleado para comparar los productos fue la prueba triangular. Se presentan simultáneamente tres muestras a los catadores, 2 de las 3 muestras son idénticas. El ejercicio consiste en identificar cuál es la muestra diferente de las otras 2. Con el fin de evitar cualquier sesgo, la prueba se realizó en bloques equilibrados (la muestra diferente es la muestra A o la muestra B, y se encuentra de manera aleatoria en la primera, segunda o tercera posición: AAB, ABA, ABB, BAA, BAB, BBA)

30

Tratamiento de los datos

35 Al responder al azar a la pregunta “¿cuál es la muestra diferente?” hay 1 posibilidad de 3 de encontrar la respuesta correcta. Por tanto, la probabilidad de obtener respuestas correctas BR (del francés, “bonnes réponses”) según N panelistas de forma aleatoria, sigue una ley Binomial  $BR \sim B(N, 1/3)$ . El umbral de confianza habitual es de 0,05.

Resultados

40 Olor

Hay una diferencia bien perceptible entre los productos sometidos al test, el hidrolizado según la invención INV1 induce menos *off flavors* (producto de limpieza, pegamento), tiene un olor más neutro, menos pronunciado.

45 Sabor

Hay una diferencia bien perceptible entre los productos sometidos al test. Según los participantes del panel, el producto según la invención INV1 es ligeramente más azucarado y el producto comparativo presenta además un ligero sabor de papel (asociado también a la textura del hidrolizado), de caramelo e incluso de detergente.

50

Este ensayo demuestra que, en comparación con un hidrolizado del mismo DE y producido con una enzima tradicional de tipo Termamyl 120 L, el hidrolizado presenta un sabor más azucarado. Es tanto más sorprendente cuanto que las cantidades de azúcares (DP1-2) de los hidrolizados son muy similares a las de los hidrolizados de comparación CP1.

55



## REIVINDICACIONES

1. Método de fabricación de un hidrolizado de almidón que presenta un equivalente de dextrosa DEe de 5 a 30 que comprende:

a) una etapa de puesta en contacto de una solución acuosa de almidón o de material amiláceo con al menos una alfaamilasa que comprende una Enzima V;  
 b) seguida de una etapa de hidrólisis de dicha solución acuosa;  
 c) seguida de una etapa de inhibición de la Enzima V para formar una solución de hidrolizado intermedio que presenta un DE igual a DEc;  
 d) seguida de una etapa de puesta en contacto de la solución de hidrolizado intermedio obtenida en la etapa c) con al menos una alfaamilasa adicional, distinta de la Enzima V;  
 e) seguida de una segunda etapa de hidrólisis para formar un hidrolizado durante un tiempo suficiente para que presente un equivalente de dextrosa DEe de 5 a 30;  
 f) seguida de una etapa de recuperación del hidrolizado formada en la etapa e);  
**caracterizado por que** la Enzima V es una enzima seleccionada de entre:

- los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica como se representa en SEQ ID N°1 o una secuencia nucleotídica que presenta un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID N°1 al menos igual al 80 %, o
- los polipéptidos que comprenden el fragmento enzimáticamente activo de la secuencia codificada por la secuencia SEQ ID N°1; y

**por que** la alfaamilasa adicional distinta de la Enzima V es una alfaamilasa de *Bacillus licheniformis*.

2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado por que** la solución acuosa de almidón formada en la etapa a) presenta un pH de 4,3 a 5,9.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizado por que** la solución de hidrolizado formada en la etapa d) presenta un pH de 4,3 a 5,9.
4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** la etapa de inhibición se lleva a cabo calentando la solución de hidrolizado intermedio a una temperatura superior o igual a 150 °C.
5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** DEe es superior o igual a DEc + 3.
6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado por que** comprende además al menos una etapa g) de transformación del hidrolizado recuperado en la etapa f).
7. Método según la reivindicación 6 **caracterizado por que** la etapa g) es una etapa de formación del hidrolizado en forma de polvo por atomización.
8. Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, presentando el hidrolizado de almidón un equivalente de dextrosa DE de 5 a 30 y en donde el DE, el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 10 a 20 (DP 10-20) y el contenido en peso seco de sacáridos de grado de polimerización de 50 o más (DP 50+) son tales que responden a las inequaciones siguientes:

$$\bullet \quad -0,83 \times DE + 25 \leq \%DP50+ \leq -1,07 \times DE + 40 ;$$

$$\bullet \quad -0,83 \times DE + 27,5 \leq \%DP\ 10-20 \leq -1,25 \times DE + 55 .$$

9. Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 24 a 30;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 10 al 18 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 3 al 13 %.

10. Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 20 a 24;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 10 al 20 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 6 al 18 %.

11. Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 17 a 20;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 12 al 25 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 10 al 19 %.

5      12.      Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 15 a 17;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 16 al 27 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 13 al 22 %.

10

13.      Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 13 a 15;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 17 al 30 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 17 al 25 %.

15

14.      Método según la reivindicación 8, presentando el hidrolizado de almidón:

- un DE de 10 a 13;
- un contenido en peso seco de DP 10-20 del 20 al 32 %;
- un contenido en peso seco de DP 50+ del 18 al 28 %.

20

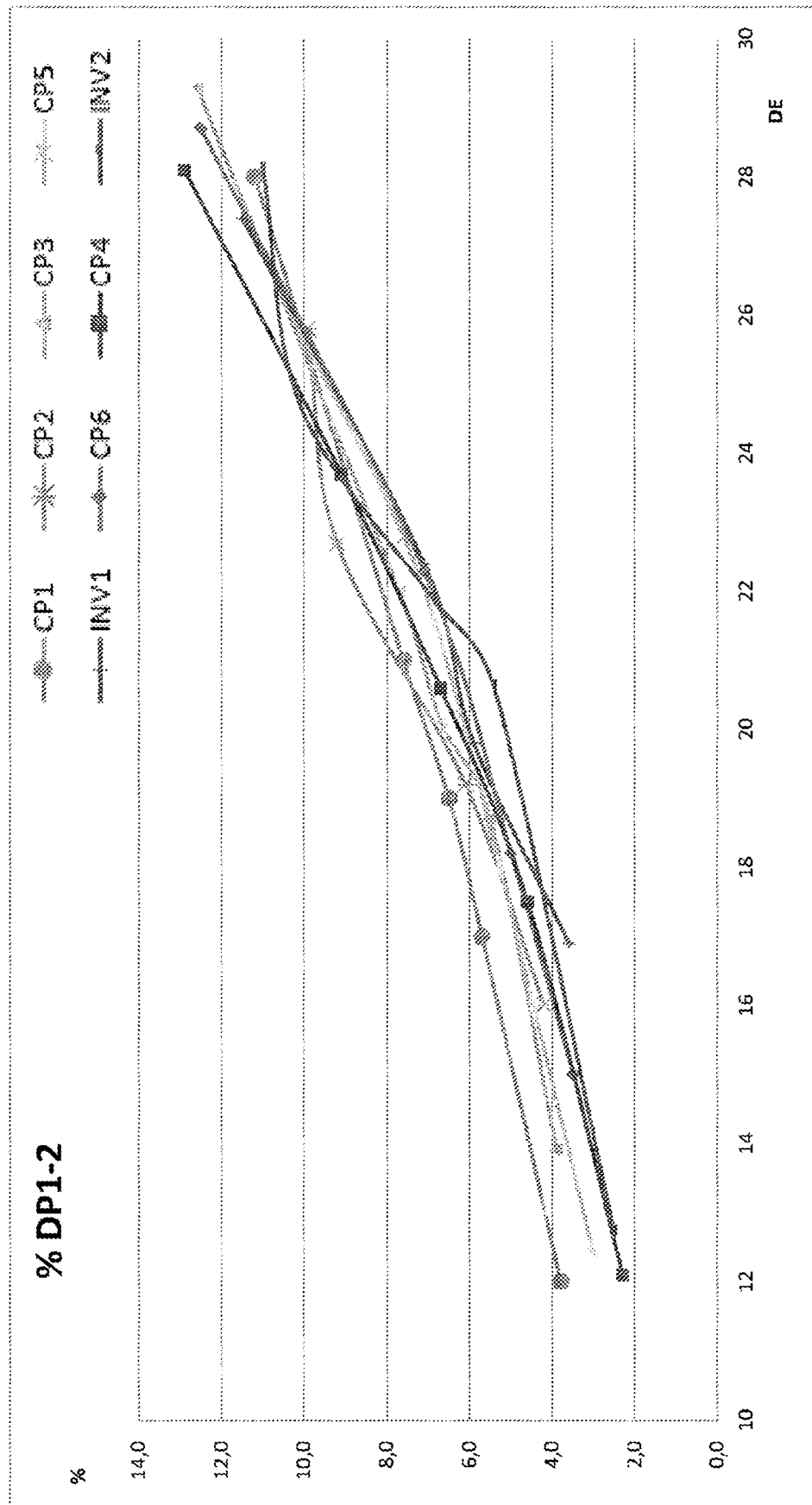


Figura 1

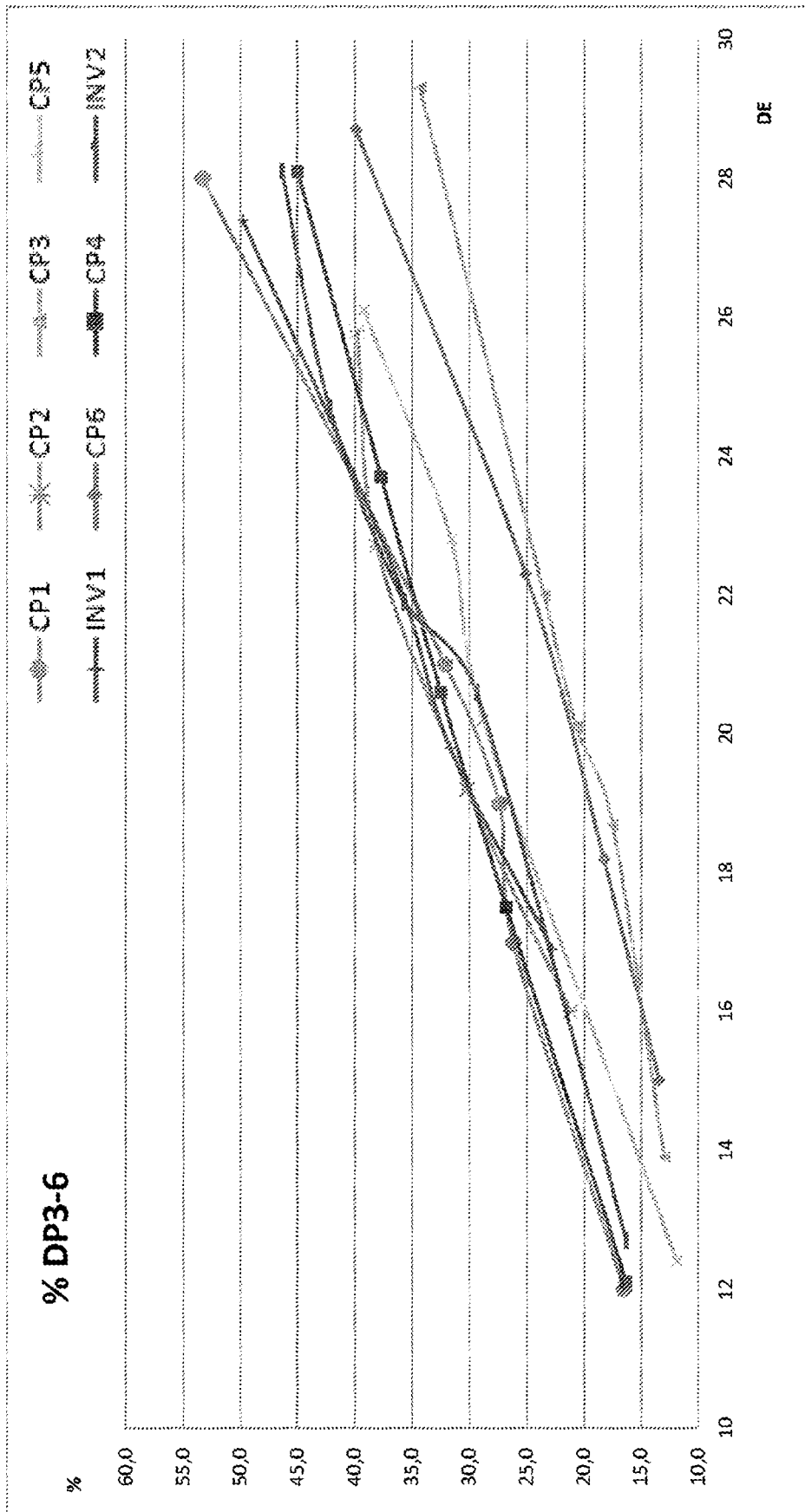


Figura 2

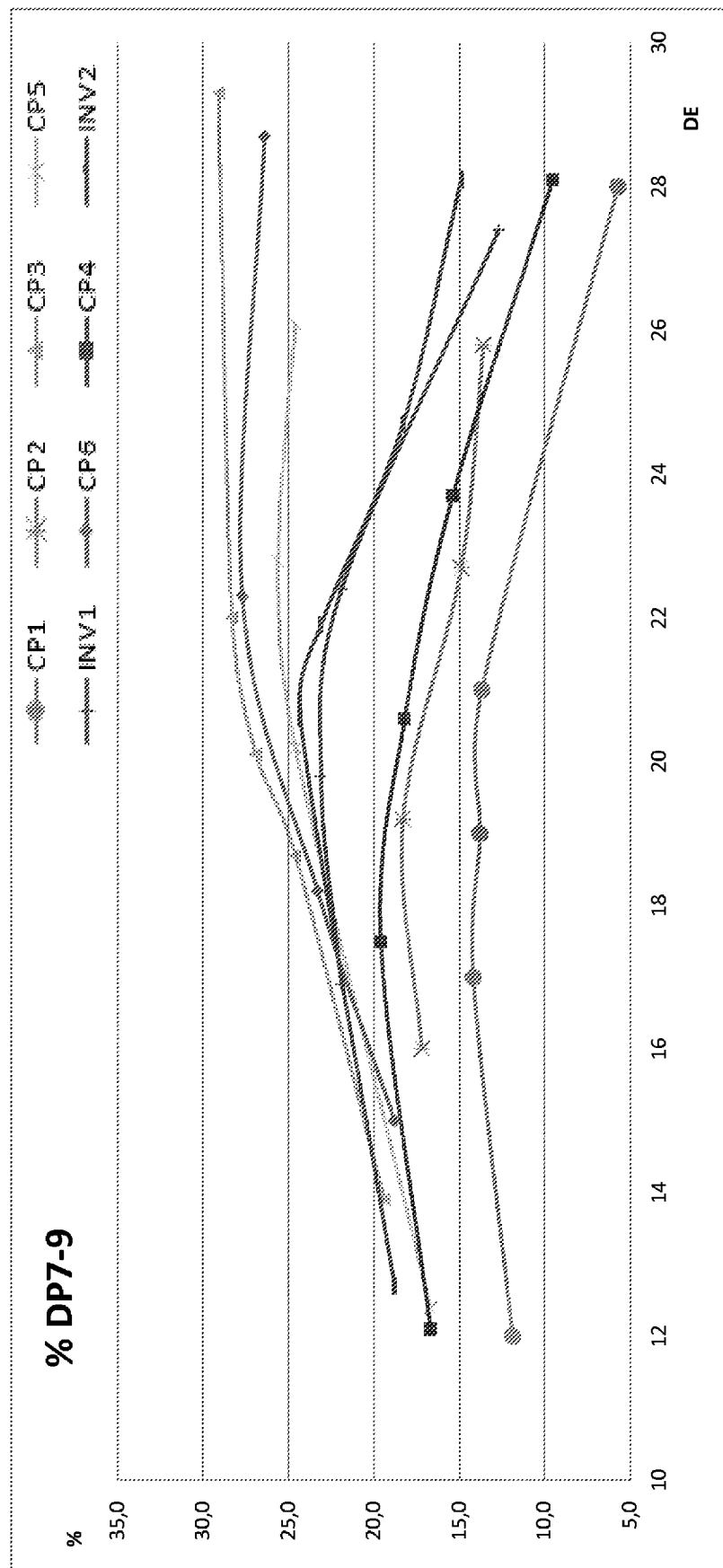


Figura 3

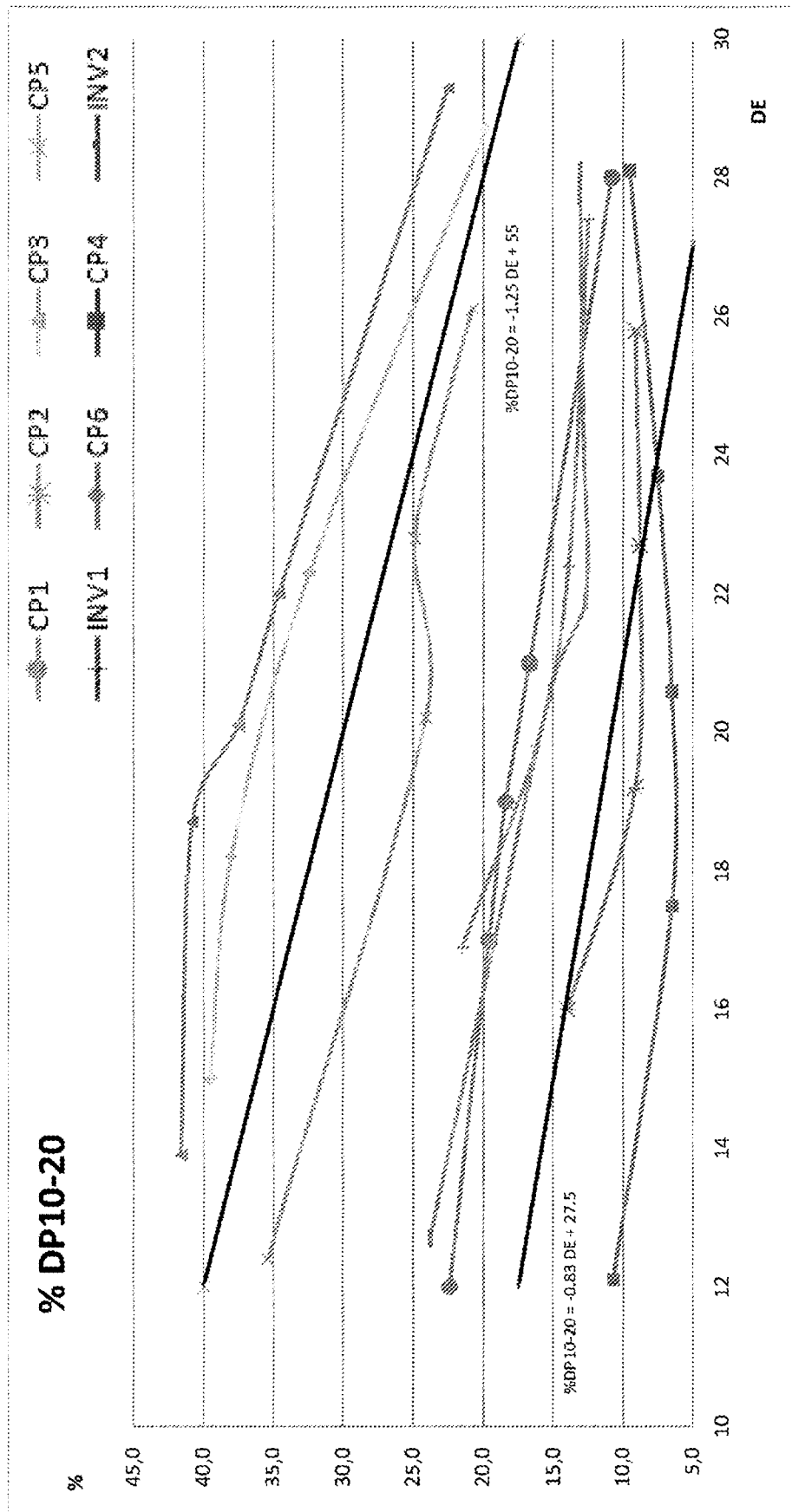


Figura 4

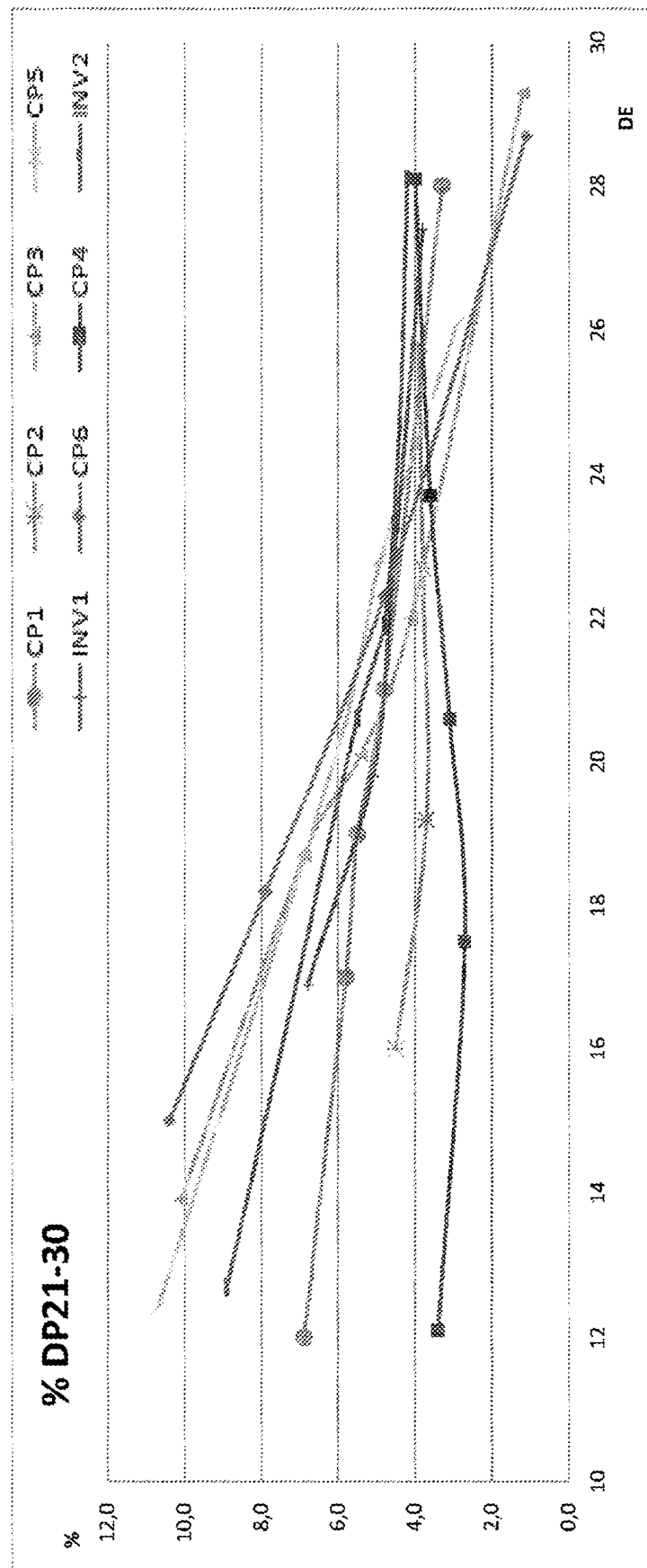


Figura 5

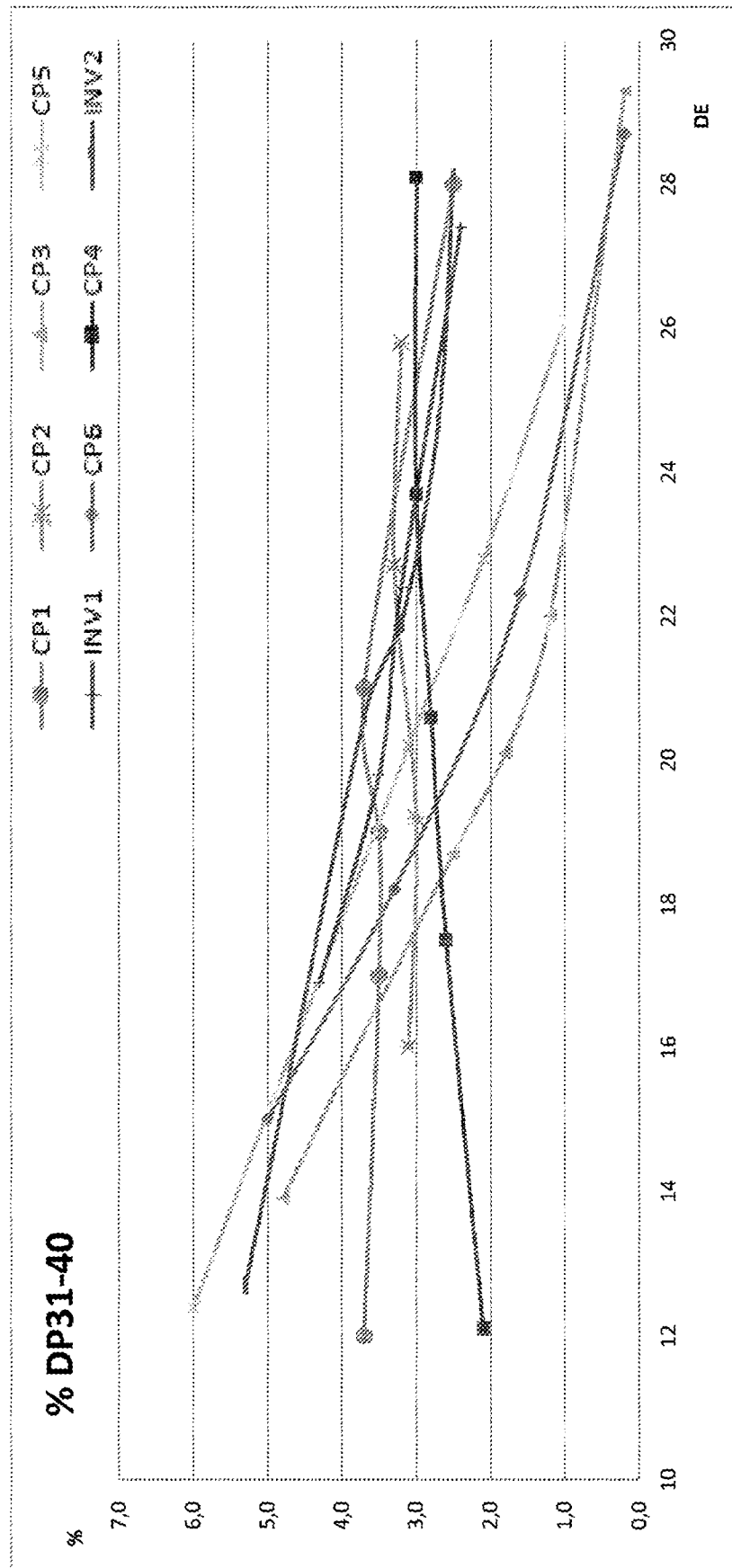


Figura 6



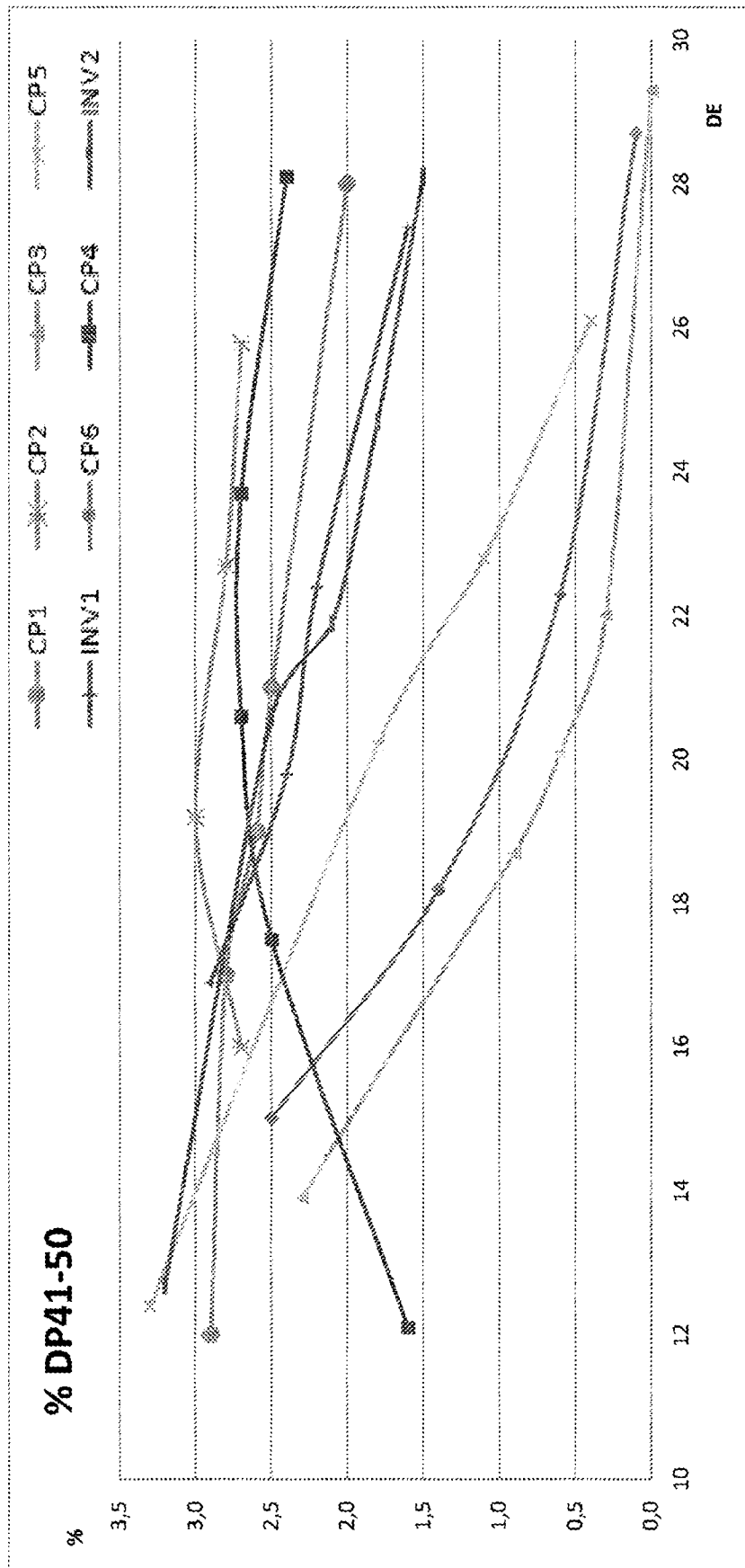


Figura 7

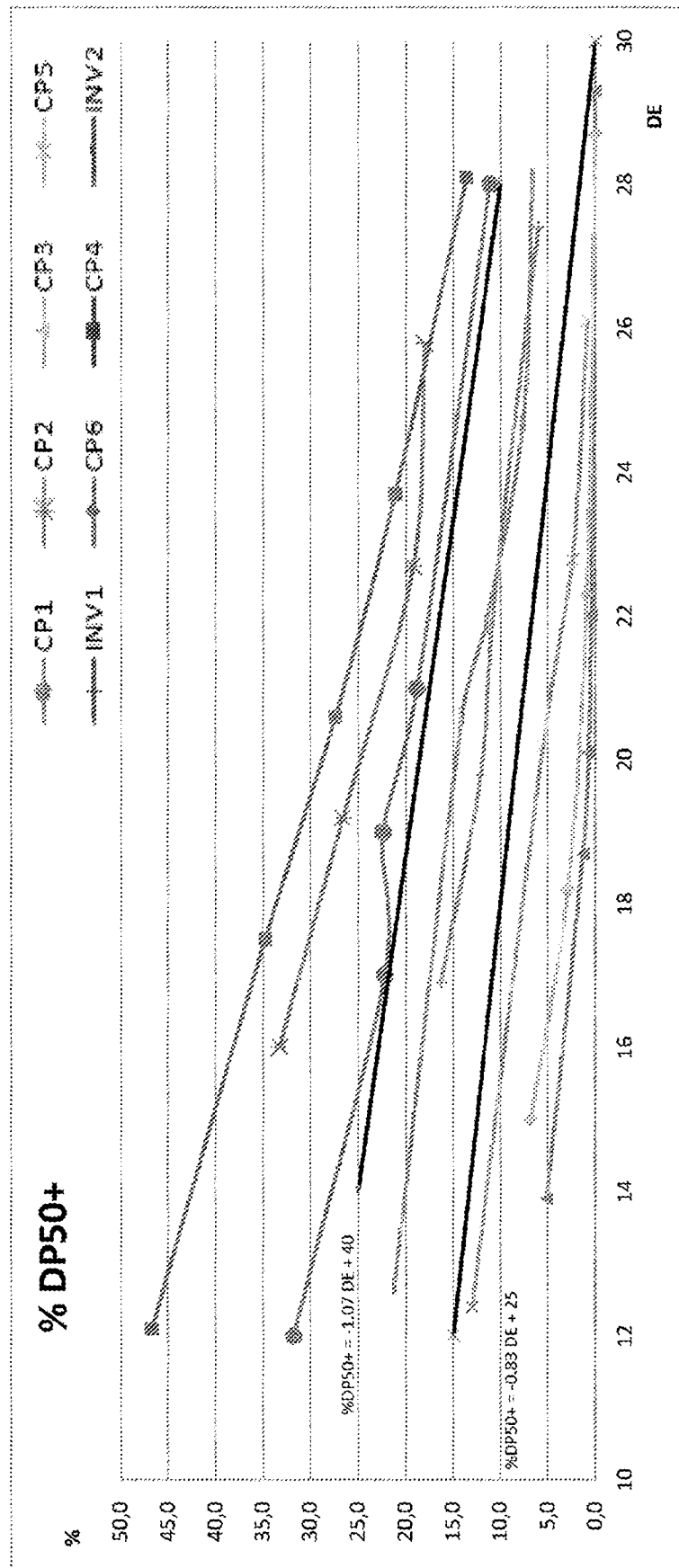


Figura 8