

JARABE DE AZÚCAR BAJO EN AZÚCAR Y DE BAJA VISCOSIDAD

I. CAMPO TÉCNICO

La invención se relaciona con jarabes bajos en azúcar y con métodos para la producción de estos.

II. ANTECEDENTES

La reducción del azúcar se ha convertido en una macrotendencia en todo el mundo a medida que los consumidores son cada vez más conscientes de los efectos adversos para la salud de los azúcares añadidos. Además, los impuestos a las bebidas azucaradas en muchos países están impulsando a las empresas de bebidas a buscar formas de reducir la cantidad de azúcar añadido en sus productos. Además, los gobiernos exigen que los "azúcares añadidos" estén claramente etiquetados. Los "azúcares añadidos" en los alimentos generalmente se definen como azúcares simples (mono y disacáridos).

Los jarabes de azúcar, tales como los jarabes de glucosa, se usan en muchas aplicaciones, tales como barras de granola, cereales, helados y confitería. El jarabe de azúcar funciona como edulcorante, espesante y humectante. El jarabe de azúcar se puede usar como una solución acuosa viscosa o como un polvo seco.

Los jarabes de glucosa generalmente se elaboran a partir de almidón. El almidón comprende polisacáridos. Durante el proceso de preparación de jarabes de glucosa, los polisacáridos se hidrolizan a monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos más cortos para obtener el grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés) promedio y el equivalente de dextrosa (DE, por sus siglas en inglés) promedio deseados. El equivalente de dextrosa es una medida de la cantidad de azúcares reductores presentes en un producto de azúcar, expresada como porcentaje sobre una base seca en relación con la dextrosa, que tiene un DE de 100.

Tradicionalmente, los jarabes de glucosa se elaboran mediante hidrólisis ácida y/o enzimática. El producto comercial típico tiene un DE de 42. El jarabe con DE de 42 tiene aproximadamente la mitad del dulzor de la dextrosa. El jarabe con DE de 42 con un nivel de sólidos de 72,5 % en peso tiene una viscosidad de menos de 2500 cP a 30 °C. El jarabe con DE de 42 tiene aproximadamente 33 % en peso de azúcar, el azúcar se define como la suma de mono y disacáridos (DP1+DP2). Un ejemplo de tal jarabe de glucosa tradicional producido a partir de conversión enzimática es ENZOSE® con DE de 42.

Un método común para preparar jarabes de glucosa es realizar una etapa de licuefacción, en donde las enzimas alfa amilasa hidrolizan el almidón en oligosacáridos,

seguida de una etapa de sacarificación, en donde los oligosacáridos se hidrolizan enzimáticamente a mono o disacáridos.

Se pueden preparar jarabes de glucosa de diferentes niveles de DE, con DE típicamente que varía de 20-99. Cuanto mayor sea la conversión del jarabe, menor será la viscosidad del producto. Sin embargo, con una reducción de la viscosidad, hay un aumento de azúcar.

Se conocen jarabes bajos en azúcar, por ejemplo de CN111440834A. Después de la etapa de licuefacción, se realiza la conversión enzimática usando maltotetraasa y pululanasa durante 40-60 horas para obtener un líquido de sacarificación, que se decolora, se intercambia con iones y se concentra para obtener un jarabe de oligosacárido de maltosa. Sin embargo, a una concentración de azúcar de 73,2 %, la viscosidad aún es de 2849,5 mPa·s y la reacción toma 40-60 horas.

WO2013116175A se dirige a un jarabe de azúcar reducido que tiene una viscosidad baja. Sin embargo, a DP1+2 de 15 % en peso, la viscosidad a 71 % en peso de sólidos secos aún era significativamente mayor que la de un jarabe de azúcar comparable.

El jarabe de glucosa de alta viscosidad es problemático por muchas razones: es difícil de verter y usualmente es necesario calentarlo antes de su uso. Se pueden formar costras, puede ser difícil limpiar del

equipo, es más difícil de mezclar y, lo más importante, da lugar a una textura indeseable (p. ej., dura o quebradiza) en el producto final.

Aún persiste la necesidad de jarabes bajos en azúcar que puedan proporcionar una buena alternativa a los jarabes de azúcar tradicionales. En particular, persiste la necesidad de jarabes de azúcar que tengan una viscosidad comparable con el mismo nivel de sólidos, ya que esto es fundamental para un reemplazo con un rendimiento similar.

Además, aún persiste la necesidad de un proceso para producir jarabes bajos en azúcar de manera eficiente.

III. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un jarabe de maíz que tiene una distribución de sacáridos que tiene (i) un contenido de DP1+DP2 de 20 % en peso o menos; y (ii) un contenido de DP60+ de 8 % en peso o menos; en relación con el peso total de sacáridos.

La presente invención proporciona además un jarabe de maíz, que tiene una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP1+DP2 de 20 % en peso o menos, en relación con el peso total de sacáridos; y que tiene una viscosidad (medida a un contenido de sólidos de 72,5 % en peso y a 30 °C) de 2500 cP o menos.

La presente invención proporciona además un método para preparar un jarabe de maíz, dicho método comprende:

- (a) Proporcionar almidón de maíz;
- (b) Someter dicho almidón de maíz a licuefacción para obtener un primer hidrolizado;
- (c) Someter dicho primer hidrolizado a sacarificación para obtener un segundo hidrolizado;
- (d) Poner en contacto dicho segundo hidrolizado con una alfa-amilasa para obtener un tercer hidrolizado; y
- (e) Procesar el tercer hidrolizado a un jarabe de maíz.

El método de la invención se puede usar para obtener los jarabes de maíz de la invención.

IV. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo de un proceso ilustrativo de la invención.

V. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporciona un jarabe de maíz que tiene una distribución de sacáridos que tiene (i) un contenido de DP1+DP2 de 20 % en peso o menos; y (ii) un contenido de DP60+ de 8 % en peso o menos; en relación con el peso total de sacáridos.

Grado de polimerización (DP) es un término conocido en la técnica. Como se usa en la presente descripción, los porcentajes de DP se refieren al porcentaje en peso de sacáridos que tienen ese grado de polimerización, en relación con el peso total de sacáridos. Los valores de DP proporcionan así la distribución de sacáridos del producto. DP1 se refiere a monosacáridos y DP2 se refiere a disacáridos. Ejemplos de monosacáridos son glucosa, fructosa y galactosa, ejemplos de disacáridos son lactosa, maltosa y sacarosa. El contenido de DP1+DP2 se refiere al contenido total de DP1 y DP2 y también puede denominarse contenido de "azúcar". El contenido de DP60+ se refiere al contenido total de polisacáridos que tienen un grado de polimerización de 60 o más. El contenido de DP5-59 se refiere al contenido total de sacáridos que tienen un grado de polimerización de 5 a 59 (5 y 59 incluidos).

Además, se proporciona además un jarabe de maíz, que tiene una distribución de sacáridos que tiene un

contenido de DP1+DP2 de 20 % en peso o menos, en relación con el peso total de sacáridos; y que tiene una viscosidad (medida a un contenido de sólidos de 72,5 % en peso y a 30 °C) de 2700 cP o menos.

Los jarabes de maíz preferentemente tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP1+DP2 de 18 % en peso o menos, con mayor preferencia 17 % en peso o menos, aun con mayor preferencia 16 % en peso o menos. Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP1+DP2 de 10 % en peso o más, preferentemente 11 % en peso o más.

Los jarabes de maíz tienen preferentemente una viscosidad de 2.700 cP o menos, con mayor preferencia una viscosidad de 2600 cP o menos, aun con mayor preferencia 2500 cP o menos. Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una viscosidad de 1600 o más, con mayor preferencia 1700 cP o más. Los valores de viscosidad se miden a un contenido de sólidos secos de 72,5 % en peso y a 30 °C. Las viscosidades más altas pueden dar lugar a una mezcla y un vertido deficientes y, por lo tanto, pueden requerir dilución y calentamiento. Las viscosidades más bajas también pueden dar lugar a una mezcla deficiente.

El jarabe de maíz de acuerdo con la invención tiene una distribución de sacáridos que tiene un

contenido de DP 60+ de 8 % en peso o menos. Preferentemente, el jarabe de maíz tiene una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP60+ de 7 % en peso o menos, con mayor preferencia 5 % en peso o menos, aun con mayor preferencia 4 % en peso o menos. Sorprendentemente, se ha descubierto que la viscosidad se mejora (se disminuye) al reducir el contenido de DP60+.

Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP1-4 de aproximadamente 70 % en peso o más. Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP1-4 de aproximadamente 85 % en peso o menos.

Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP3 de aproximadamente 13 % en peso o más, con mayor preferencia 14 % en peso o más, aun con mayor preferencia 15 % en peso o más. Preferentemente, el contenido de DP3 es aproximadamente 25 % en peso o menos, con mayor preferencia 20 % en peso o menos. Los sacáridos DP3 son oligosacáridos, que no cuentan para el contenido de azúcar del jarabe, pero dan lugar a una baja viscosidad.

Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP4 de aproximadamente 35 % en peso o más, con mayor preferencia aproximadamente 40 % en peso o más.

Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos que tiene un contenido de DP4 de 60 % en peso o menos, con mayor preferencia 55 % en peso o menos. Los sacáridos DP4 son oligosacáridos, que no cuentan para el contenido de azúcar del jarabe, pero dan lugar a una baja viscosidad.

Preferentemente, los jarabes de maíz tienen una distribución de sacáridos en donde la fracción DP4 es la fracción de grado único de polimerización más grande. Por lo tanto, DP4 es la fracción dominante.

En una modalidad preferida, los co una distribución de sacáridos que tiene:

- un contenido de DP1+DP2 de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 17 % en peso;
- un contenido de DP3 de aproximadamente 13 a aproximadamente 25 % en peso, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 % en peso;
- un contenido de DP4 de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 % en peso, preferentemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 55 % en peso;
- un contenido de DP5-59 de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 % en peso,

preferentemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 % en peso; y

- un contenido de DP60+ de menos de aproximadamente 8 % en peso, preferentemente menos de aproximadamente 5 % en peso, por ejemplo de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 5 % en peso.

Preferentemente, el valor equivalente de dextrosa (DE) de los jarabes de maíz es aproximadamente 25 a aproximadamente 45, preferentemente aproximadamente 30 a aproximadamente 38, con mayor preferencia aproximadamente 32 a aproximadamente 36. El valor equivalente de dextrosa es una medida del contenido de azúcar reductor. Los azúcares reductores pueden actuar como agentes reductores, tales como en la reacción de Maillard, que es importante para determinar el sabor de los alimentos.

La invención proporciona además un método para preparar un jarabe de maíz. El método comprende la etapa (a): proporcionar almidón de maíz. El almidón de maíz puede ser cualquier almidón de maíz que sea adecuado para su procesamiento a un jarabe de maíz. Tal almidón de maíz puede obtenerse comercialmente. El almidón se proporciona preferentemente como una mezcla acuosa de almidón en agua.

El método de la invención comprende la etapa (b): someter dicho almidón de maíz a licuefacción para

obtener un primer hidrolizado. La licuefacción es una etapa común en la preparación de un jarabe de maíz, en donde las moléculas de almidón se hidrolizan en polisacáridos más pequeños. La licuefacción se puede realizar usando un ácido adecuado. Preferentemente, la licuefacción se realiza de forma enzimática. La licuefacción de almidón como tal es bien conocida en la técnica. Los procesos de licuefacción ilustrativos y las enzimas ilustrativas que pueden usarse en estos se describen, p. ej., en W. Douglas Crabb and Colin Mitchinson, *Enzymes used in the Processing of Starch to Sugars*, Tibtech (vol. 15), septiembre de 2017 y en *Starch: Chemistry and Technology 2nd Addition* 1984. Chapter IV. Enzymes in the Hydrolysis and Synthesis of Starch, Elsevier, Whistler et al. ed..

Preferentemente, la etapa (b) se realiza hasta que se obtiene un DE de 6-12, preferentemente un DE de 8-10. Se ha descubierto que esto permite un punto de partida adecuado para la siguiente etapa de sacarificación, ya que facilita lograr una distribución preferida de sacáridos y una viscosidad del producto final.

Preferentemente, la etapa (b) comprende añadir una alfa-amilasa de licuefacción. Como se usa en la presente descripción, el término alfa-amilasa de licuefacción se refiere a la alfa amilasa usada en la

etapa de licuefacción (b). La alfa-amilasa es capaz de hidrolizar enlaces alfa de grandes polisacáridos con enlaces alfa. Se puede usar cualquier alfa-amilasa adecuada para la licuefacción. Las alfa-amilasas adecuadas para la licuefacción son bien conocidas en la técnica. Con mayor preferencia, la alfa-amilasa de licuefacción es una alfa-amilasa termoestable. Tales alfa-amilasas termoestables se pueden obtener comercialmente. Preferentemente, la alfa-amilasa de licuefacción es una alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, o una variante de esta. Una alfa-amilasa comercial preferida es Liquozyme Supra.

La alfa-amilasa de licuefacción se añade preferentemente en una cantidad de 0,05 a 0,80 kg de enzima por tonelada métrica de sólidos secos (kg/MTDS), preferentemente 0,10 a 0,50 kg/MTDS. Cantidades mayores de enzima pueden ser más efectivas y, por lo tanto, requerir menos tiempo. Sin embargo, cantidades demasiado altas de enzima son menos rentables y pueden dar lugar a un menor control del proceso.

Preferentemente, en la etapa (b) el almidón de maíz está presente como una mezcla acuosa de 25-40 % en peso de almidón seco en agua, con mayor preferencia 30-35 % en peso. Cantidades mayores de almidón seco pueden ser demasiado viscosas para la licuefacción, mientras que cantidades menores no son eficientes en volumen.

Preferentemente, la etapa (b) se realiza a una temperatura de 85 °C a 115 °C, con mayor preferencia 105 °C a 115 °C. El procesamiento a esta temperatura da lugar a una hidrolización más efectiva. Debido a estas temperaturas aumentadas, la alfa-amilasa de licuefacción es preferentemente una alfa-amilasa termoestable, de tal manera que no pierde actividad a la temperatura aumentada.

Preferentemente, la etapa (b) se realiza a una presión de 1 a 2 bar y/o en condiciones de vapor saturado. La presión requerida para el vapor saturado a una temperatura determinada se puede determinar usando tablas de vapor saturado.

Preferentemente, la etapa (b) se realiza en condiciones de alto cizallamiento. Las condiciones de alto cizallamiento permiten una mezcla eficiente de la suspensión de almidón y dan lugar a una licuefacción más eficiente. Con mayor preferencia, se usa una cocina de chorro de vapor. En una cocina de chorro de vapor, se inyecta vapor a través de boquillas, chorros u otros rociadores para elevar la temperatura de la suspensión y cocinar el almidón.

Preferentemente, la etapa (b) se realiza a un pH de 4,5-6,0, con mayor preferencia 5,0 a 5,5. El rango de pH se selecciona preferentemente de tal manera que la alfa-amilasa de licuefacción sea lo suficientemente activa.

Preferentemente, la etapa (b) se realiza durante 10 minutos a 30 minutos, con mayor preferencia 12 minutos a 20 minutos. El experto entenderá que dependiendo de las condiciones del proceso tales como la dosis y actividad de la enzima, la presión, el pH y la temperatura, el proceso puede requerir un tiempo más largo o más corto. Por ejemplo, aumentar la concentración de enzima puede permitir que el proceso tome menos tiempo.

Preferentemente, en las modalidades en donde la etapa (b) comprende añadir una alfa-amilasa de licuefacción, después de la etapa (b) pero antes de la etapa (c), el primer hidrolizado se calienta hasta una temperatura suficiente para desactivar la alfa-amilasa de licuefacción; y/o se lleva a un pH suficiente para desactivar la alfa-amilasa de licuefacción, durante un tiempo suficiente para desactivar la alfa-amilasa de licuefacción. Preferentemente, la temperatura es 50 °C a 100 °C, con mayor preferencia 60 °C a 70 °C. Preferentemente, el pH es 2,0 a 3,0, con mayor preferencia 2,4 a 2,8. Preferentemente, dicha duración es al menos 20 minutos, con mayor preferencia al menos 30 minutos. Con mayor preferencia, la temperatura es 60 °C a 70 °C y el pH es 2,4 a 2,8, y la duración es al menos 30 minutos. Un pH más alto da lugar a una menor corrosión del equipo.

El método de la invención comprende la etapa (c): someter dicho primer hidrolizado a sacarificación para obtener un segundo hidrolizado. La sacarificación es una etapa comúnmente conocida en la preparación de un jarabe de maíz, en donde el producto licuado se hidroliza adicionalmente a sacáridos que tienen un grado de polimerización más bajo. Los procesos de sacarificación ilustrativos y las enzimas ilustrativas que pueden usarse en estos se describen, p. ej., en W. Douglas Crabb and Colin Mitchinson, *Enzymes used in the Processing of Starch to Sugars*, Tibtech (vol. 15), septiembre de 2017 y en *Starch: Chemistry and Technology 2.^a Adición 1984*. Capítulo XXI, *Glucose and fructose Containing Sweeteners from Starch*, Elsevier, Whistler et al. ed.

Preferentemente, la etapa (c) comprende añadir una alfa-amilasa específica de maltotetraosa y una enzima desramificante.

Una alfa-amilasa específica de maltotetraosa es una alfa-amilasa que hidroliza enlaces alfa de tal manera que se forma maltotetraosa. La maltotetraosa es un oligosacárido con un DP de 4. Esto facilita mantener los sacáridos DP1 o DP2 relativamente bajos y dentro de los límites preferidos.

Preferentemente, la alfa-amilasa formadora de maltotetraosa es una glucano 1,4-alfa-maltotetraohidrolasa (EC3.2.1.60). Tales enzimas son conocidas en la técnica.

Una enzima adecuada ilustrativa puede obtenerse comercialmente bajo el nombre comercial Optimalt® 4G. La patente de los EE. UU. núm. 2012/0135466 describe alfa-amilasas formadoras de maltotetraosa ilustrativas (y enzimas desramificantes) que pueden usarse. Alfa-amilasas formadoras de maltotetraosa ilustrativas que pueden usarse también se describen en <https://www.brenda-enzymes.org/literature.php?e=3.2.1.60&r=732251>.

Preferentemente, la alfa-amilasa específica de maltotetraosa se añade en una cantidad de 0,5 a 5 kg/MTDS, preferentemente de 1 a 4 kg/MTDS.

Una enzima desramificadora convierte un polisacárido ramificado en uno lineal. Esto facilita que el polisacárido lineal sea escindido aún más por la alfa-amilasa específica de maltotetraosa. Las enzimas desramificantes son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Starch: Chemistry and Technology 2.^a Adición 1984. Capítulo XXI, Glucose and fructose Containing Sweeteners from Starch, Elsevier, Whistler et al. ed..

Preferentemente, la enzima desramificante es una pululanasa, con mayor preferencia una pululanasa de *Bacillus deramificans* o una variante de esta. Tal enzima puede obtenerse comercialmente bajo el nombre comercial Optimax ® L 1000, Optimax ® L 2500.

Preferentemente, la enzima desramificante se añade en una cantidad de 0,5 a 5 kg/MTDS, preferentemente de 1 a 4 kg/MTDS.

Preferentemente, la etapa (c) se realiza a una temperatura de 50 a 80 °C, preferentemente 60 a 70 °C.

Preferentemente, la etapa (c) se realiza a un pH de 4,5 a 6,5, preferentemente 4,0 a 6,0. Esto permite que las enzimas sean efectivas.

Preferentemente, la etapa (c) se realiza durante 0,5 horas a 10 horas, con mayor preferencia 1 hora a 4 horas, aun con mayor preferencia 1,5 horas a 2,5 horas.

En algunas modalidades, después de la etapa (c) pero antes de la etapa (d), las enzimas de sacarificación se desactivan. Por lo tanto, preferentemente el segundo hidrolizado se calienta hasta una temperatura suficiente para desactivar (i) la alfa-amilasa formadora de maltotetraosa y (ii) la enzima desramificante; y/o se lleva a un pH suficiente para desactivar (i) la alfa-amilasa formadora de maltotetraosa y (ii) la enzima desramificante, durante un tiempo suficiente para desactivar (i) la alfa-amilasa formadora de maltotetraosa y (ii) la enzima desramificante. Preferentemente, la temperatura es 50 °C a 100 °C, con mayor preferencia 60 °C a 70 °C. Preferentemente, el pH es menor que 4,5, con mayor preferencia menor que 4,0. Preferentemente, el pH es mayor que 2,0, con mayor preferencia mayor que 2,5, aun con mayor

preferencia mayor que 3,0. Preferentemente, dicha duración es al menos 20 minutos, con mayor preferencia al menos 30 minutos. Con mayor preferencia, la temperatura es 60 °C a 70 °C y el pH es 3,0 a 4,0, y la duración es al menos 30 minutos. Un pH más alto da lugar a una menor corrosión del equipo. Esta etapa de desactivación de enzimas permite reducir aún más la cantidad de DP1 y DP2 en el producto final.

El método comprende la etapa (d): poner en contacto dicho segundo hidrolizado con una alfa-amilasa para obtener un tercer hidrolizado.

Preferentemente, la etapa (d) se realiza cuando un DE de 22-30, preferentemente un DE de 24-28, se obtiene en el segundo hidrolizado. Se descubrió que esto facilita lograr la distribución deseada de polisacáridos.

Preferentemente, la etapa (d) se realiza mientras las enzimas de sacarificación aún están activas. Esto permite que el proceso sea más eficiente.

Preferentemente, la etapa (d) se realiza hasta que se obtiene un DE de 30-38, preferentemente un DE de 32-36.

Preferentemente, la alfa-amilasa en la etapa (d) es una alfa-amilasa termoestable. Con mayor preferencia, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Cytophaga* sp. o una variante de esta.

La alfa-amilasa de *Cytophaga* sp. (también denominada en la presente descripción "amilasa CspAmy2"), fue descrita previamente por Jeang, C-L et al. ((2002) Applied and Environmental Microbiology, 68:3651-54). La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido a-amilasa CspAmy2 se muestra a continuación como la sec. con núm. de ident.: 1:

AATNGTMMQY	FEWYVPNDGQ	QWNRLRTDAP	YLSSVGITAV	WTPPAYKGTS
QADVGYGPYD	LYDLGEFNQK	GTVRTKYGTK	GELKSAVNTL	HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD	YTENVTAVEV	NPSNRNQETS	GEYNIQAWTG	FNFPGRGTTY
SNFKWQWFHF	DGTDWDQSRS	LSRIFKFRGT	GKAWDWEVSS	ENGNYDYLMY
ADIDYDHPDV	VNEMKKWGVW	YANEVGLDGY	RLDAVKHIKF	SFLKDWVDNA
RAATGKEMFT	VGEYWQNDLG	ALNNYLAKVN	YNQSLFDAPL	HYNFYAASTG
GGYYDMRNIL	NNTLVASNPT	KAVTLVENHD	TQPGQSLEST	VQPWFKPLAY
AFILTRSGGY	PSVFYGDMYG	TKGTTTREIP	ALKSKIEPLL	KARKDYAYGT
QRDYIDNPDV	IGWTREGDST	KAKSGLATVI	TDGPGGSKRM	YVGTSNAGEI
WYDLTGNRTD	KITIGSDGYA	TFPVNGGSVS	VWVQQ	

Como se usa en la presente descripción, una variante de alfa-amilasa de *Cytophaga* sp se refiere a una amilasa que tiene un grado definido de homología/identidad de secuencia de aminoácidos con la sec. con núm. de ident.:1, por ejemplo, al menos 60 % de homología/identidad de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, una variante puede tener al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 76 %, al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 100 %.

al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o incluso al menos 99 % de homología/identidad de secuencia de aminoácidos con la sec. con núm. de ident.:1.

Con mayor preferencia, la alfa-amilasa usada en la etapa (d) es una variante descrita en WO 2014/164777 o WO 2014/164834. El contenido de estas publicaciones se incorpora a la presente descripción como referencia. Preferentemente, la alfa amilasa usada en la etapa (d) es una alfa amilasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 como se publica en WO 2014/164777 y/o alfa amilasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como se publica en WO 2014/164834. Con mayor preferencia, la alfa-amilasa usada en la etapa (d) es una alfa-amilasa de acuerdo con la reivindicación 11 como se publica en WO 2014/164834 o una alfa-amilasa de acuerdo con la reivindicación 2, preferentemente en combinación con la reivindicación 3, como se publica en WO 2014/164777. Preferentemente, la alfa amilasa usada en la etapa (d) es una variante descrita en el párrafo [00142] de WO 2014/164777, con la máxima preferencia CspAmy2-vC16F como se describe en WO

2014/164777, párrafo [00142] (usando la sec. con núm. de ident.: 1 para numeración):

N126Y + F153W + T180H + I203Y + S241Q (es decir, CspAmy2-vC16F);

También se puede usar una variante de esta. Por ejemplo, las combinaciones anteriores de mutación también se contemplan para su uso junto con deleciones en posiciones correspondientes a R178, G179, T180 y/o G181. Tales deleciones pueden ocurrir naturalmente, como en el caso de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*.

En una modalidad preferida, la alfa-amilasa usada en la etapa (d) es la variante CspAmy2-vC16F como se describe en WO 2014/164777, párrafo [00142] (usando la sec. con núm. de ident.: 1 para numeración), con deleciones en las posiciones correspondientes a R178 y G179, que se muestra a continuación como sec. con núm. de ident.: 2

AATNGTMMQY	FEWYVPNDGQ	QWNRLRTDAP	YLSSVGITAV	WTPPAYKGTS
QADVGYGPYD	LYDLGEFNQK	GTVRTKYGTK	GELKSAVNTL	HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD	YTENVTAVEV	NPSNRYQETS	GEYNIQAWTG	FNFPGRGTTY
SNWKWQWFHF	DGTDWDQSRS	LSRIFKF <u>H</u>	GKAWDWEVSS	ENGNYDYLMY
ADYDYDHPDV	VNEMKKWGVW	YANEVGLDGY	RLDAVKHIKF	<u>Q</u> FLKDWVDNA
RAATGKEMFT	VGEYWQNDLG	ALNNYLAKVN	YNQSLFDAPL	HYNFYAASTG
GGYYDMRNIL	NNTLVASNPT	KAVTLVENHD	TQPGQSLEST	VQPWFKPLAY
AFILTRSGGY	PSVFYGDMYG	TKGTTTREIP	ALKSKIEPLL	KARKDYAYGT

QRDYIDNPDV IGWTREGDST KAKSGLATVI TDGPGGSKRM YVGTSNAGEI
WYDLTGNRTD KITIGSDGYA TFPVNGGSVS VWVQQ

En la sec. con núm. de ident.: 2, N126Y, F153W, T180H, I203Y y S241Q están subrayados.

El aviso GRAS 617 proporciona una descripción adicional de una alfa-amilasa que puede usarse ventajosamente en la etapa (d).

Una alfa-amilasa preferida para usar en la etapa (d) se puede obtener comercialmente bajo el nombre de enzima GC127 de Genencor. Se ha descubierto que las alfa-amilasas preferidas facilitan el logro de la distribución deseada de sacáridos.

Preferentemente, en la etapa (d) la alfa-amilasa se añade en una cantidad de 0,30 a 2,0 kg/MTDS. Con mayor preferencia, la alfa-amilasa se añade en una cantidad de 0,40 a 0,60 kg/MTDS.

Preferentemente, la etapa (d) se realiza a una temperatura de 50 a 80 °C, preferentemente 60 a 70 °C;

Preferentemente, la etapa (d) se realiza durante 0,5 horas a 3 horas, preferentemente 1 hora a 2,5 horas.

Preferentemente, después de la etapa (d), el tercer hidrolizado se calienta hasta una temperatura suficiente para desactivar la alfa-amilasa de la etapa (d) y opcionalmente las enzimas de sacarificación, y/o se lleva a un pH suficiente para desactivar la alfa-amilasa de la etapa (d) y opcionalmente las enzimas de

sacarificación, durante un tiempo suficiente para desactivar la alfa-amilasa de la etapa (d) y opcionalmente la enzimas de sacarificación. Preferentemente, la temperatura es 50 °C a 100 °C, preferentemente 60 °C a 70 °C. Preferentemente, el pH es menor que 4,5, con mayor preferencia menor que 4,0. Preferentemente, el pH es mayor que 2,0, con mayor preferencia mayor que 2,5, aun con mayor preferencia mayor que 3,0. Un pH más alto da lugar a una menor corrosión del equipo. Preferentemente, dicha duración es al menos 20 minutos, con mayor preferencia al menos 30 minutos, con mayor preferencia al menos 1 hora. Con mayor preferencia, la temperatura es 60 °C a 80 °C y el pH es 3,0-4,0, durante un tiempo de al menos 30 minutos.

Preferentemente, después de la desactivación usando temperatura y/o pH, el tercer hidrolizado se enfría y se deja reposar. Preferentemente, el tercer hidrolizado se deja reposar durante al menos 4 horas, con mayor preferencia al menos 6 horas, aun con mayor preferencia al menos 12 horas. Esto permite que los sólidos, que comprenden las enzimas y el almidón restante, se hundan, lo que facilita la etapa de procesamiento.

El método comprende la etapa (e): procesar el tercer hidrolizado a un jarabe de maíz. Dicho procesamiento puede realizarse de acuerdo con cualquier

método conocido en la técnica. Tales métodos pueden incluir la eliminación de proteínas insolubles mediante filtración o centrifugas. Estos métodos pueden ir seguidos de tratamiento con carbón y/o intercambio iónico o resinas de pulido para eliminar proteínas solubles, enzimas, cenizas y componentes de sabor o color, y evaporación para eliminar el agua.

Preferentemente, la etapa (e) comprende filtrar o centrifugar el tercer hidrolizado para eliminar materiales insolubles.

Preferentemente, la etapa (e) comprende poner en contacto el tercer hidrolizado con una resina de intercambio iónico, una resina de pulido y/o carbón activo. Esto permite inmovilizar las enzimas, tanto solubles como insolubles, en el hidrolizado y de esta manera separar estas del jarabe de maíz. Por lo tanto, no se requiere ninguna etapa de desactivación usando temperatura/pH. Además permite eliminar más material proteico, cenizas, componentes de sabor y/o color, decolorando y purificando de esta manera el jarabe de maíz.

Preferentemente, la etapa (e) comprende deshidratar el producto hasta 70-85 % en peso de sólidos secos. Dicha deshidratación se realiza preferentemente usando calor, opcionalmente en combinación con presión subatmosférica. La deshidratación da lugar a un producto

que tiene las propiedades de fluidez deseadas, al mismo tiempo que ahorra espacio y peso en el transporte.

VI. Ejemplos

Procedimiento general experimentos A-D y ejemplos 1-10

Se preparó una suspensión de almidón de maíz nativo con 30-35 % en peso de sólidos secos en agua de grifo. El pH se ajustó entre 5,0-5,5 usando ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Se añadió Liquozyme® Supra (2,2X) (alfa amilasa líquida para licuefacción de Novozymes, una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*) a la suspensión en una dosis de 0,25 kg/MTDS y se cocinó con chorro de vapor a 93 °C para una licuefacción completa. A un equivalente de dextrosa (DE) de 6-14, Liquozyme® Supra se desactivó al ajustar el pH a 2,4-2,8 usando ácido clorhídrico y mantener este pH a 65 °C durante más de 30 minutos. Se reajustó el pH de la muestra entre 5,0-6,0 y se añadió Optimalt® 4G (alfa-amilasa formadora de maltotetraosa de DuPont) a una dosis de 1,5 kg/MTDS y enzima desramificante Optimax® L 1000 (pululanasa de DuPont, variante de una pululanasa de *Bacillus deramificans* expresada en *Baciullus licheniformis*) a una dosis de 1,5 kg/MTDS. Entre DE 26-30, la reacción se terminó mediante intercambio iónico/filtración para eliminar coadyuvante(s) de

procesamiento y subproductos. El pH de la muestra se ajustó a entre 5,0-6,0. Se añadió la enzima GC127 (obtenida de Genencor) a la muestra a 0,47 kg/MTDS. Cuando la muestra DE estaba entre 32-37, la reacción se terminó mediante desactivación ácida (pH por debajo de 4) o la enzima se eliminó mediante intercambio iónico.

Después, la muestra se filtró usando tierra de diatomita (Kenite 5200) para eliminar proteínas y otro material no digerido. La muestra se deshidrató usando un rotoevaporador al vacío y se calentó (60 °C) hasta que los sólidos secos estuvieron por encima de 75 % en peso.

El producto final se caracterizó por su contenido de azúcar, distribución de peso molecular, equivalencia de dextrosa y viscosidad. El contenido de azúcar se analizó usando cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés) equipada con columnas TOSOH BIOSCIENCE TSK 2500 para análisis del grado de polimerización (DP) 1-4 y 60+ y distribución de peso molecular. La medición de la viscosidad se realizó a 72,5 % en peso de sólidos secos (usando titulación Karl-Fischer), medida usando Anton Parr RheolabOC equipado con husillo CC27, con una velocidad de cizallamiento de 10/s, mantenido durante 10 minutos a 30 °C. La equivalencia de dextrosa (D.E.) de las muestras se determinó usando un osmómetro (Advanced Instruments), donde la muestra se analizó a 15 % en peso de sólidos secos usando agua

desionizada. Para determinar la D.E., se usó el siguiente cálculo: Lectura del osmómetro (mOsm) X 0,09837 + 2,59.

Experimentos de referencia A-D

Tablas 1 y 2: Experimentos comparativos. Liquozyme Supra se desactivó a varios DE, después de lo cual se añadieron Optimalt 4G y Optimax L 1000. La reacción se detuvo a varios DE.

Exp. de ref.	Liquozyme Supra desactivada a	Reacción detenida a	Viscosidad (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C) / cP	DE final
A	DE 8,0	DE 28	4728	29,2
B	DE 9,4	DE 29	9819	28,4
C	DE 10,5	DE 27	-	26,1
D	DE 11,6	DE 30	7479	30,4

Exp. de ref.	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5-59 / % en peso	DP60+ / % en peso
A	3,45	6,44	11,50	54,53	9,89	66,03	75,92	16,02	8,25
B	2,72	6,20	11,65	48,37	8,92	60,02	68,94	15,91	15,07
C	1,92	5,39	10,31	42,75	7,31	53,06	60,37	18,38	21,38
D	3,53	7,74	13,51	50,99	11,27	64,50	75,77	16,13	14,24

En la tabla anterior, se puede observar que la viscosidad de los jarabes estaba por encima de 2500 cP (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C)

Ejemplos 1-3

Tablas 3 y 4: Liquozyme Supra se desactivó a DE 8,0. Se añadió alfa-amilasa (GC 127) a DE 28. La reacción se detuvo a varios DE.

Ejemplo	Reacción detenida a	Viscosidad (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C) / cP	DE final
1	DE 32	2354	33,5
2	DE 34	2113	35,5
3	DE 36	2203	38,8

Ejemplo	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5- 59 / % en peso	DP60+ / % en peso
1	4,58	7,90	15,09	50,01	12,48	65,10	77,58	20,60	1,89
2	5,58	9,02	16,11	48,88	14,60	64,99	79,59	19,48	1,06
3	6,22	9,61	18,07	47,44	15,83	65,51	81,34	18,35	0,62

La adición de la alfa-amilasa final a DE 38 dio lugar a una disminución de la viscosidad de 4728 cP a menos de 2500 cP, en comparación con el experimento de referencia A. El contenido final de DP1+2 fue menor que 17 % en peso de sacáridos totales. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 77 % en peso de sacáridos totales.

Ejemplos 4, 5

Tablas 5 y 6: Liquozyme Supra se desactivó a DE 9,4, se añadió alfa-amilasa (GC 127) a DE 29. La reacción se detuvo a varios DE.

Ejemplo	Reacción detenida a	Viscosidad (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C) / cP	DE final
4	DE 34	2299	34,0
5	DE 35	1938	35,2

Ejemplo	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5-59 / % en peso	DP60+ / % en peso
4	4,32	8,36	16,77	46,73	12,68	63,50	76,18	21,37	3,67
5	4,83	9,04	17,52	46,21	13,87	63,73	77,60	20,61	2,61

La adición de la alfa-amilasa final a DE29 dio lugar a una disminución de la viscosidad de 7479 cP a menos de 2300 cP, en comparación con el experimento de referencia B. El contenido final de DP1+2 fue menor que 14 % en peso de sacáridos totales. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 76 % en peso de sacáridos totales.

Ejemplo 6

Tablas 7 y 8: Liquozyme Supra se desactivó a DE 9,5. Se añadió alfa-amilasa (GC 127) a DE 27. La reacción se detuvo a DE 36.

	Reacción detenida a	Viscosidad (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C) / cP	DE final
6	DE 36	2025	34,6

	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5-59 / % en peso	DP60+ / % en peso
6	4,52	8,60	17,14	44,92	13,12	62,06	75,18	22,30	3,24

El contenido final de DP1+2 fue menor que 14 % en peso de sacáridos totales. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 75 % en peso de sacáridos totales.

Ejemplos 7-10

Tablas 9 y 10: Liquozyme Supra se desactivó a DE 10,5, se añadió alfa-amilasa (GC 127) a DE 27. La reacción se detuvo a varios DE.

Ejemplo	Reacción detenida a	Viscosidad (72,5 % en peso de sólidos, 30 °C) / cP	DE final
7	DE 35	2087	33,9
8	DE 41	2205	35,2
9	DE 37	1562	35,7
10	DE 39	1731	38,3

Ejemplo	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5- 59 / % en peso	DP60+ / % en peso
7	3,97	8,45	17,04	42,89	12,42	59,93	72,35	23,75	4,68
8	4,39	8,94	17,81	43,00	13,33	60,81	74,14	22,99	3,82
9	4,87	9,39	18,48	42,83	14,26	61,31	75,57	22,29	3,16
10	5,29	9,86	19,20	42,13	15,15	61,33	76,48	21,07	2,93

El contenido final de DP1+2 fue menor que 16 % en peso de sacáridos totales. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 72 % en peso de sacáridos totales.

Ejemplo 11

Tabla 11 y 12: Liquozyme Supra se desactivó a DE 11,6, se añadió alfa-amilasa (GC 127) a DE 30. La reacción se detuvo a DE 37.

Ejemplo	Reacción detenida a	Viscosidad / cP	DE final
11	DE 37	1822	36,7

Ejemplo	Distribución de sacáridos								
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP3+4 / % en peso	DP 1-4 / % en peso	DP 5- 59 / % en peso	DP60+ / % en peso
11	5,12	9,56	18,03	45,75	14,68	63,78	78,46	19,87	2,47

La adición de la alfa-amilasa final a DE 30 dio lugar a una disminución de la viscosidad de 7479 cP a menos de 1900 cP, en comparación con el experimento de referencia D. El contenido final de DP1+2 fue menor que 17 % en peso de sacáridos totales. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 78 % en peso de sacáridos totales.

Ejemplos 12 y 13

Para el Ejemplo 12, se preparó una suspensión de almidón de maíz nativo con 30-35 % en peso de sólidos secos en agua de grifo. El pH se ajustó entre 5,0-5,5 usando ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Se añadió Liquozyme® Supra (2,2X) (alfa amilasa líquida para licuefacción de Novozymes, una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*) a la suspensión en una

dosis de 0,25 kg/MTDS y se cocinó con chorro de vapor a 98 °C hasta que el licuado se hidrolizó hasta DE 8,2. La Liquozyme® Supra se desactivó al ajustar el pH a 2,4-2,8 usando ácido clorhídrico y mantener este pH a 65 °C durante 12 minutos. Se determinó que el DE final después de esta etapa era 8,9.

Se reajustó el pH del primer hidrolizado entre 5,0-6,0 y se añadió Optimalt® 4G (alfa-amilasa formadora de maltotetraosa de DuPont) a una dosis de 4,5 kg/MTDS y enzima desramificante Optimax® L 1000 (pululanasa de DuPont, variante de una pululanasa de *Bacillus deramificans* expresada en *Baciullus licheniformis*) a una dosis de 4,5 kg/MTDS. Esta reacción se realizó durante 3 horas, momento en el que el DE fue 26,3.

El pH del segundo hidrolizado se ajustó a entre 5,0-6,0. Se añadió la enzima GC127 (obtenida de Genencor) a la muestra a 1,41 kg/MTDS. La reacción se continuó durante una hora más, momento en el que el DE fue 32,6.

La reacción se terminó al ajustar el pH a 2,4-2,8 usando ácido clorhídrico y mantener este pH a 65 °C durante 2,5 horas. El DE final fue 33,4.

El producto se enfrió durante la noche, se clarificó y se mezcló. Una muestra mezclada se caracterizó por su contenido de azúcar, distribución de peso molecular, equivalencia de dextrosa y viscosidad. El contenido de azúcar se analizó usando GPC equipado con

columna BioRad Aminex HPX-42A. La medición de la viscosidad se realizó a 72,5 % en peso de sólidos secos (usando titulación Karl-Fischer), medida usando Anton Parr RheolabOC equipado con husillo CC27, con una velocidad de cizallamiento de 10/s, mantenido durante 10 minutos a 30 °C. La equivalencia de dextrosa (D.E.) de las muestras se determinó usando un osmómetro (Advanced Instruments), donde la muestra se analizó a 15 % en peso de sólidos secos usando agua desionizada. Para determinar la D.E., se usó el siguiente cálculo: Lectura del osmómetro (mOsm) X 0,09837 + 2,59.

Para el Ejemplo 13, se preparó una suspensión de almidón de maíz nativo con 30-35 % en peso de sólidos secos en agua de grifo. El pH se ajustó entre 5,0-5,5 usando ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Se añadió Liquozyme® Supra (2,2X) (alfa amilasa líquida para licuefacción de Novozymes, una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*) a la suspensión en una dosis de 0,75 kg/MTDS y se cocinó con chorro de vapor a 98 °C hasta que el licuado se hidrolizó hasta DE 9,2. La Liquozyme® Supra se desactivó al ajustar el pH a 2,4-2,8 usando ácido clorhídrico y mantener este pH a 65 °C durante 20 minutos. Se determinó que el DE final después de esta etapa era 10,4.

Se reajustó el pH del primer hidrolizado entre 5,0-6,0 y se añadió Optimalt® 4G (alfa-amilasa formadora

de maltotetraosa de DuPont) a una dosis de 4,5 kg/MTDS y enzima desramificante Optimax® L 1000 (pululanasa de DuPont, variante de una pululanasa de *Bacillus deramificans* expresada en *Baciullus licheniformis*) a una dosis de 4,5 kg/MTDS. Esta reacción se realizó durante 3 horas, momento en el que el DE fue 25,1.

El pH del segundo hidrolizado se ajustó a entre 5,0-6,0. Se añadió la enzima GC127 (obtenida de Genencor) a la muestra a 1,41 kg/MTDS. La reacción se continuó durante una hora más, momento en el que el DE fue 34,1.

La reacción se terminó al ajustar el pH a 2,4-2,8 usando ácido clorhídrico y mantener este pH a 65 °C durante 2,5 horas. El DE final fue 35,1.

El producto se enfrió durante la noche, se clarificó y se mezcló. Una muestra mezclada se caracterizó por su contenido de azúcar, distribución de peso molecular, equivalencia de dextrosa y viscosidad.

Tabla 13: perfil de azúcar, viscosidad y DE final de las pruebas en planta piloto

Ej.	Distribución de sacáridos							Viscosidad / cP	DE final
	DP1 / % en peso	DP2 / % en peso	DP3 / % en peso	DP4 / % en peso	DP1+2 / % en peso	DP1-4 / % en peso	DP11+ / % en peso		
12	5,72	8,65	15,51	49,25	14,37	79,13	7,91	2500	34,3
13	5,98	8,93	15,57	45,86	14,91	76,34	12,57	2450	35,1

El contenido final de DP1+2 fue menor que 15 % en peso. La viscosidad fue aproximadamente 2500 cP. El contenido final de DP1-4 fue mayor que 76 % en peso.

Si bien los principios de la invención se han establecido anteriormente en relación con modalidades específicas, debe entenderse que esta descripción se realiza simplemente a modo de ejemplo y no como una limitación del alcance de protección, que se determina mediante las reivindicaciones adjuntas.