

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 519**

51 Int. Cl.:  
**A23D 7/005** (2006.01)  
**A23L 1/24** (2006.01)  
**C11B 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09166897 .0**  
96 Fecha de presentación: **30.07.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2149308**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.2010**

54 Título: **ESTABILIDAD A LA OXIDACIÓN USANDO ANTIOXIDANTES NATURALES.**

30 Prioridad:  
**30.07.2008 US 84792 P**  
**27.07.2009 US 509787**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.03.2012**

73 Titular/es:  
**Kraft Foods Global Brands LLC**  
**Three Lakes Drive**  
**Northfield, IL 60093, US**

72 Inventor/es:  
**West, Leslie;**  
**Dinwoodie Robert y**  
**Tsui, Ida**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 376 519 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**

Estabilidad a la oxidación usando antioxidantes naturales

REFERENCIA A UN SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica las ventajas de las solicitudes de EEUU número 61/084.792, archivada el 30 de julio de 2088, y 12/509.787, archivada el 27 de julio de 2009, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

CAMPO.

El campo se refiere a antioxidantes naturales, y en particular a antioxidantes naturales en alimentos.

ANTECEDENTES.

10 La oxidación es un proceso que tiene lugar en productos alimentarios, ocasionando que los alimentos se estropeen y se hagan indeseables en sabor y apariencia. Las reacciones de oxidación pueden tener lugar cuando los agentes químicos de los alimentos se exponen al oxígeno del aire y se forman radicales libres. Se ha visto que los radicales libres se pueden dar de forma natural, al menos en parte, debido a la presencia catalizadores de iones de hierro o  
15 cobre. Bajo condiciones normales, los tejidos de animales y plantas contienen naturalmente antioxidantes que evitan daños oxidativos. Sin embargo, en alimentos muchos de estos antioxidantes naturales se rompen y no tienen por más tiempo sus propiedades de protección del alimento. La oxidación de grasa y aceites en el alimento puede conducir a la rancidez y, en frutas, puede causar decoloración. Finalmente esta oxidación conduce al deterioro del alimento y a una correspondiente pérdida del valor nutricional y las propiedades organolépticas favorables. Como  
20 consecuencia, eliminando los iones metálicos libres, tales como iones de hierro y cobre presentes en productos alimentarios, puede dar como resultado estabilidad oxidativa de los alimentos que son más resistentes a estropearse y se conserva la calidad del sabor y se mejora la retención del color.

Tradicionalmente, se ha usado ácido etilendiaminotetraacético o EDTA en productos alimentarios y bebidas para evitar la oxidación y el deterioro debido a su capacidad quelante de metales. Este material generalmente disfruta de un amplio uso en la industria, medicina, y ciencia de laboratorio debido a su relativamente alta capacidad quelante de iones metálicos. En la industria alimentaria y de bebidas, a menudo se usa EDTA para proteger productos de la oxidación y el deterioro y para mejorar sabor, calidad y retención de color. El EDTA, sin embargo, es un ingrediente sintético o artificial.

Últimamente, se ha incrementado el deseo de eliminar ingredientes artificiales en productos alimentarios y bebidas y su sustitución por alternativas naturales. Por ejemplo, los conservantes, colorantes y edulcorantes artificiales se han sustituido satisfactoriamente, en algunos casos, por homólogos naturales. Debido a su eficacia, coste razonable y falta de alternativas viables, sin embargo, hasta el momento el EDTA ha sido el ingrediente artificial más difícil de sustituir. Hasta hora los intentos de sustituir o eliminar EDTA de alimentos y bebidas han producido hasta ahora resultados un tanto decepcionantes. Por ejemplo, los sideróforos producidos de manera natural (a partir de levaduras y hongos) son eficaces quelando metales, pero inaceptablemente añaden color a alimentos y bebidas.

30 La patente JP2007-153807 describe una composición que promueve la absorción de hierro oral que contiene nicotianamina como un ingrediente activo, y un alimento, bebida o medicamento que contiene un compuesto quelante nicotianamina-hierro o una mezcla de nicotianamina con un compuesto de hierro como un ingrediente activo y cada uno tiene acción que promueve la absorción de hierro. La patente JP2007/153807 también proporciona un método para producir tales composiciones y las usa para mejorar los síntomas de la anemia, como los promotores de la absorción oral de hierro y como agentes orales de hierro para ser administrado tras una donación de sangre, operaciones quirúrgicas y partos.

La patente US2002/122857 proporciona un proceso para producir un producto de nicotianamina de la pureza deseada. El proceso implica o bien la etapa de precipitación fraccionamiento de un extracto acuoso de soja mediante la adición de un disolvente orgánico tal como etanol, o la etapa de fraccionamiento de peso molecular del extracto mediante ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño, seguido por filtración por carbón activo, tratamiento con resina de intercambio de cationes o aniones o tratamiento con otro adsorbente (por ejemplo, poliamida o octadecilsilano) para proporcionar el producto nicotianamina. El producto se añade a alimentos y bebidas para proporcionar productos saludables.

45 La patente US2005/065184 describe un método para determinar si un sujeto tiene estrés oxidativo; evaluando el nivel de estrés oxidativo en un sujeto; reduciendo el riesgo de un suceso adverso, especialmente un suceso cardiovascular adverso, que resulta a partir de estrés oxidativo; tratamiento de estrés oxidativo; y evaluación de la eficacia del tratamiento con al menos una composición farmacéutica para reducir el estrés oxidativo.

50 La patente EP1949798 describe un aderezo líquido que contiene los siguientes (A), (B), y (C): (A) 0,4 a 8% en masa de sodio (B) 0,01 a 4% en masa de flavonoides (C) 1 a 10% en masa de etanol.

La patente EP2078461 proporciona un alimento o bebida que contiene un ácido graso muy insaturado producido por combinación de un aceite y grasa que contiene un ácido graso muy insaturado, una harina de soja y agua y homogeneizándolos como materias primas que tienen una propiedad acidificante.

La patente WO2008/059782 describe un proceso para producir un compuesto de ácido mugineico.

5 La patente US2005/089620 describe una emulsión comestible con fibra insoluble. La emulsión comestible es adecuada para usar como una base para fabricar productos alimentarios reducidos en aceite. Los productos alimentarios reducidos en aceite fabricados con la emulsión comestible que tiene fibra insoluble tienen viscosidad y textura aceptables para el consumidor y propiedades sensoriales que concuerdan con productos alimentarios con toda la grasa.

## 10 COMPENDIO.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una mayonesa estable oxidativamente que comprende una base de mayonesa; de 60 a 400 ppm de nicotianamina combinada en la base de mayonesa, la nicotianamina es eficaz para proporcionar estabilidad oxidativa; y donde la base de mayonesa no tiene EDTA, y donde la nicotianamina mantiene la cantidad de heptadienal generada a partir de la mayonesa estable oxidativamente a 1500 ppb o menor después de 7 semanas de almacenamiento a 43°C. En una realización, la cantidad eficaz de nicotianamina es de 60 a 200 ppm. En otra realización, la cantidad eficaz de nicotianamina es eficaz para reducir la formación de radicales libres en la comida a menos de aproximadamente 3, y más preferentemente menos de 2 microM equivalentes Tempol después de 130 horas de incubación a 37°C.

20 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar una mayonesa que contiene nicotianamina estable oxidativamente que comprende una mayonesa que se proporciona; y combinación de 60 a 400 ppm de nicotianamina eficaz para reducir la oxidación del producto, donde la mayonesa no tiene EDTA, y donde la nicotianamina mantiene la cantidad de heptadienal generado a partir de mayonesa a aproximadamente 1500 ppb o menos después de 7 semanas de almacenamiento a 43°C. La nicotianamina se puede añadir al producto durante la formulación del producto. Alternativamente, la nicotianamina se puede añadir al producto después de su formulación.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La figura 1 es un gráfico que demuestra la eficacia de la nicotianamina comparado con EDTA; y

La figura 2 es otro gráfico que demuestra la eficacia de la nicotianamina comparado con EDTA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA.

30 Se proporciona una mayonesa estable desde el punto de vista de la oxidación que incluye antioxidantes que se dan de manera natural. En particular, se describe mayonesa que incluye cantidades eficaces de nicotianamina (NA) para proporcionar estabilidad oxidativa similar a EDTA. En una propuesta, la NA es natural o es no sintético o formado artificialmente. En otra propuesta, la NA se obtiene a partir de plantas u otra fuente natural. Se ha descubierto que la nicotianamina puede ser capaz de proporcionar los mismos efectos conservantes y de protección que proporciona el EDTA. Esta sustitución de nicotianamina permitiría el reemplazo de EDTA sintético por el compuesto nicotianamina que se da de forma natural. En un aspecto, de 60 a 400 ppm, en otro aspecto, de 60 a 200 ppm es suficiente para impartir estabilidad oxidativa similar a EDTA. En un ejemplo particular, se proporciona de 60 a 400 ppm de NA en mayonesa, para formar un producto estable oxidativamente que también está significativamente libre de EDTA. En una propuesta, la mayonesa incluye lípidos, agua, emulsionantes tales como huevo, ácidos comestibles y saborizantes en combinación con cantidades eficaces de NA.

45 Además, para los propósitos de esta descripción, el término "libre de EDTA" tiene la intención de indicar un producto que tiene menos de 1% en peso de EDTA, preferentemente un producto que tiene menos de 0,1% en peso de EDTA, y más preferentemente un producto que no contiene EDTA. Además, las cantidades eficaces de NA también no imparten ningún cambio organoléptico que objetar a los alimentos, tales como cambios de color, sabor, olor, o textura, de modo que los alimentos con la NA tienen propiedades organolépticas similares a los alimentos con EDTA.

50 La nicotianamina (NA) es un aminoácido no proteico que está ampliamente representado en la naturaleza, especialmente en plantas. NA generalmente se refiere a ácido N-(N-(3-amino-3-carboxipropil)-3-amino-3-carboxipropil) azetidina-2-carboxílico y generalmente se encuentra en plantas tales como tabaco, arroz, bayas de Goji, y hayas y se puede obtener a partir de hojas de estas plantas. También se sabe que la nicotianamina se puede encontrar en alubias y soja y que para obtener nicotianamina purificada se trata un extracto de alubias con agua o agua caliente con una resina sintética.

55 Se proporcionan los siguientes ejemplos de cómo se puede extraer y obtener nicotianamina a partir de diversas fuentes. Se entenderá que también se pueden usar otros métodos y fuentes de nicotianamina si se necesita. Por ejemplo, se ha aislado y purificado nicotianamina mediante la creación de un extracto de soja, sometiendo el

extracto a ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño para obtener una fracción que tenga un peso molecular de 1.000 o menos, añadiendo un disolvente orgánico, y recogiendo el precipitado que resulta. Además, el extracto o fracción acuosa se puede someter a tratamiento con resina de intercambio de iones y/o filtración con carbón activo para purificar más la nicotianamina contenida en el producto. En otros ejemplos, también se puede obtener nicotianamina mediante células de levadura obtenidas por ingeniería genética para producir en exceso el precursor de nicotianamina S-adenosil metionina (SAM). El SAM se somete a trimerización mediante nicotianamina sintetasa para crear nicotianamina a niveles significativamente aumentados (véase, por ejemplo, W. Yasuaki, *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae producing nicotianamine: potencial for industrial biosintesis of a novel hypertensive substrate*, Bioscience, biotechnology, and biochemistry (Japón), junio 2006).

En una propuesta, se puede añadir nicotianamina a mayonesa en una cantidad de métodos. Por ejemplo, se puede añadir la nicotianamina con otros ingredientes durante la formación de la mayonesa, o mediante otras propuestas, también se puede añadir después de la formación final del producto. Específicamente, la nicotianamina se debería añadir a la mayonesa en una cantidad eficaz para evitar niveles de oxidación de la mayonesa similar a los efectos antioxidantes obtenidos cuando se usaba EDTA en su lugar. Se añade de 60 a 400 ppm de nicotianamina a mayonesa para lograr tales efectos antioxidantes similares cuando la mayonesa está significativamente libre de EDTA.

En una realización, se añade nicotianamina a mayonesa para evitar la oxidación de la mayonesa durante el almacenamiento. La nicotianamina se puede añadir en lugar de EDTA o como complemento de EDTA. En una realización preferente, la mayonesa no contiene EDTA. En otra propuesta, la mayonesa preferentemente tiene un pH de entre 3,0 y 5,0 y preferentemente tiene una acidez titulable entre 2,0 y 5,0.

Las ventajas y realizaciones de esta invención se ilustran más con siguientes ejemplos, pero los materiales y cantidades particulares citadas en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no se deberían considerar indebidamente limitantes de la invención. Todas las partes y porcentajes están en peso a menos que se indique otra cosa.

## 25 EJEMPLOS.

### EJEMPLO 1.

Se crearon muestras para ensayo formando primero una base de mayonesa, que no contenía agente quelante. Esta base de mayonesa se usó como un control y se etiquetó "Mayo, sin EDTA", en la figura 1, la base de mayonesa tenía un pH de aproximadamente 3,7 y una acidez titulable de aproximadamente 0,31. Se añadieron ácido cítrico, ácido clorogénico, nicotianamina (NA), y EDTA a la base de mayonesa mediante agitación de las sustancias en las cantidades indicadas en la figura 1. La muestra etiquetada "mayo con EDTA" es una muestra de mayonesa comercialmente disponible (mayonesa Kraft REAL, Kraft Foods, Northfield, Illinois) que generalmente tiene aproximadamente 70 ppm de EDTA. La muestra etiquetada "70 ppm EDTA" era una muestra de comparación preparada combinando 70 ppm de EDTA en la base de mayonesa similar a los otros ingredientes.

Las muestras se analizaron usando resonancia paramagnética electrónica cuantitativa (EPR) para detectar la formación de radicales libres. La técnica EPR es una adaptación de Thomsen, "Quantification of Radical Formation in Oil-in-Water Food Emulsions by Electron Spin Resonance Spectroscopy" en Journal of Food Lipids, volumen 6, issue 2, páginas 149-158, junio 1999, que se incorpora en la presente memoria en su totalidad. Se usa EPR para detectar la presencia de radicales libres estables expresados como equivalentes 4-hidroxi-2, 2, 6, 6-tetrametil piperidiniloxi (TEMPOL) medido a nivel micromolar (microM). Cantidades más altas de equivalentes TEMPOL presentes en la muestra indican una capacidad más baja de resistir o evitar la formación de radicales libres. Niveles más bajos de equivalentes TEMPOL indican que la sustancia tiene un efecto protector y ayuda en la prevención de la formación de radicales libres. Mediante la prevención de la formación de radicales libres y por tanto bajando la cantidad de radicales libres presentes en el producto, se evita también la oxidación del producto.

Las muestras de mayonesa que resultan se incubaron a aproximadamente 37°C y se midió la presencia de equivalentes TEMPOL en diversos momentos. Como se muestra en la figura 1, mientras que las muestras que no contenían EDTA, 70 ppm de ácido clorogénico, y 70 ppm de ácido cítrico mostraban niveles incrementados de formación de radicales libres, las muestras que contenían 70 ppm y 196 ppm de nicotianamina tenían niveles de radicales libres comparables a ambas muestras de mayonesa que contenían EDTA. Por lo tanto, la presencia de nicotianamina impartía un efecto protector sobre la muestra de mayonesa equivalente al EDTA.

### EJEMPLO 2.

Similar al ejemplo 1, las muestras para ensayar se crearon formando primero una base de mayonesa. Esta base de mayonesa se usó como un control y se etiquetó "sin EDTA" en la figura 2. Se añadió aproximadamente 100, 200, y 400 ppm de nicotianamina (NA) y aproximadamente 70 ppm de EDTA a la base de mayonesa mediante agitación de la sustancia en la mayonesa. La muestra etiquetada "70 ppm EDTA" era una muestra de comparación preparada por combinación de 70 ppm de EDTA en la base de mayonesa similar a los otros agentes quelantes.

- 5 Se sometieron las diversas muestras de mayonesa a un medio de almacenamiento acelerado incubando cada una de las muestras durante hasta aproximadamente 7 semana a aproximadamente 43°C. A intervalos semanales, se hicieron pruebas en los espacios de cabeza de los contenedores que contenían las muestras para detectar presencia de heptadienal. El heptadienal es un compuesto que se genera a partir de la oxidación de lípidos y se usa con este propósito para evaluar la velocidad y cantidad e oxidación que tiene lugar durante almacenamiento acelerado. Se analizaron los niveles de heptadienal tomando primero una muestra de gas del espacio de cabeza de cada contenedor. Estas muestras de gas después se sometieron a cromatografía para detectar la presencia y cantidad de heptadienal. Niveles más altos de heptadienal presentes indican una cantidad elevada de oxidación, mientras que niveles más bajos de heptadienal presente indican una cantidad relativamente baja de oxidación.
- 10 Como se muestra en la figura 2, la muestra de mayonesa que no contiene EDTA tenía cantidad elevada de heptadienal, y por lo tanto oxidación, durante el periodo de prueba cuando se comparó con las otras muestras. Sin embargo, los niveles de heptadienal en las muestras de mayonesa contenían aproximadamente 100, 200 y 400 ppm de nicotianamina eran comparables con la muestra que contenía EDTA. Por lo tanto, la presencia de tales cantidades de nicotianamina era eficaz para impartir un efecto protector en la muestra de mayonesa equivalente a EDTA.
- 15

Se comprenderá que diversos cambios en los detalles, materiales, y disposición en las formulaciones e ingredientes, que se han descrito en la presente memoria y que se ilustran para explicar la naturaleza de los productos y métodos de la presente memoria se pueden hacer por los expertos en la técnica con el principio y ámbito de la descripción como se expresa en las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una mayonesa estable oxidativamente que comprende:  
una base de mayonesa;  
de 60 a 400 ppm de nicotianamina combinada con la base de mayonesa, la nicotianamina eficaz para proporcionar estabilidad oxidativa; y
- 5 en la que la base de mayonesa está libre de EDTA, y en la que la nicotianamina mantiene la cantidad de heptadienal generada a partir de la mayonesa estable oxidativamente a 1500 ppb o menos después de 7 semanas de almacenamiento a 43°C.
2. La mayonesa estable oxidativamente de la reivindicación 1, en la que la cantidad eficaz de nicotianamina reduce la formación de radicales libres a menos de 2 microM equivalentes Tempol después de 130 horas de incubación a 37°C.
- 10 3. Un método para preparar una mayonesa que contiene nicotianamina estable oxidativamente que comprende:  
proporcionar una mayonesa; y
- 15 combinar de 60 a 400 ppm de nicotianamina eficaz para reducir la oxidación del producto, en la que la mayonesa está libre de EDTA, y en la que la nicotianamina mantiene la cantidad de heptadienal generado a partir de mayonesa de 1500 ppb o menos después de 7 semanas de almacenamiento a 43°C.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la nicotianamina se añade durante la formación de la mayonesa.
5. El método de la reivindicación 3, en el que la nicotianamina se añade después de la formación de la mayonesa.
- 20 6. La mayonesa estable oxidativamente de la reivindicación 1, en la que  
la mayonesa tiene un pH de 3 a 5 y una acidez titulable de 0,2 a 0,5; y  
de 60 a 400 ppm de nicotianamina combinada en la mayonesa.
7. La mayonesa estable oxidativamente de la reivindicación 6, en la que la mayonesa tiene menos de 2 micromolar equivalentes Tempol después de 130 horas de incubación a 37°C.

*Fig. 1*

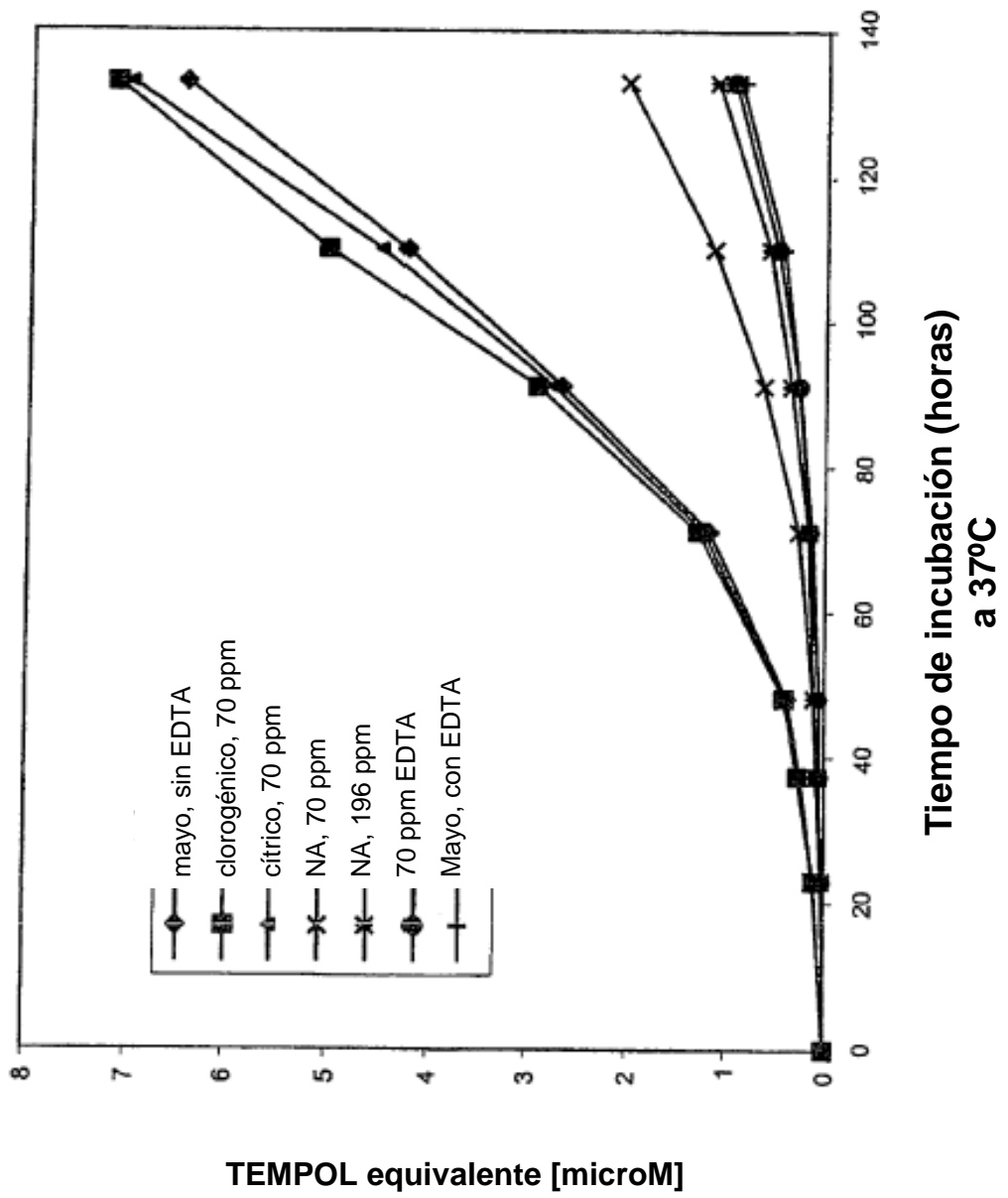


Fig. 2

