

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 566**

51 Int. Cl.:

A23L 1/32 (2006.01)

A23L 1/24 (2006.01)

A23L 1/035 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009** **E 09156228 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2106706**

54 Título: **Un procedimiento y formulación para preparar un producto de huevo con funcionalidad y sabor aumentados**

30 Prioridad:

31.03.2008 US 59776

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

07.03.2013

73 Titular/es:

**KRAFT FOODS GROUP BRANDS LLC (100.0%)
Three Lakes Drive
Northfield, IL 60093, US**

72 Inventor/es:

**TOPINKA, JOHN BENJAMIN;
PRAGER, STACEY A.;
GASS, PAUL VICTOR;
LIS, DANIEL G.;
BROWN, PETER HARRIS;
CLASS, ROBERT F.;
SILVER, RICHARD STUART y
ZBYLUT, STEVEN DONALD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 566 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

Un procedimiento y formulación para preparar un producto de huevo con funcionalidad y sabor aumentados.

En la presente memoria se proporcionan productos de huevo tratado que tienen funcionalidad y sabor a huevo aumentados, y métodos de preparación de tales productos de huevo. Tales productos de huevo se preparan mediante la aplicación simultánea de enzimas fosfolipasa y proteasa. El producto de huevo se puede usar como composición aromatizante de alimentos, y/o se puede usar para reemplazar a la yema de huevo o huevo entero en composiciones alimenticias a niveles mucho más bajos que los tradicionales y proporcionar sin embargo el sabor y funcionalidad de los de una fórmula de 100 por ciento de yema de huevo.

Antecedentes de la invención

Estudios clínicos demuestran consistentemente que el consumo de altos niveles de colesterol aumenta el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. A menudo se usan huevos en productos alimenticios convencionales y, por desgracia, son ricos en grasas, lípidos y colesterol. Estos componentes se encuentran principalmente en la yema del huevo. Una yema de huevo contiene aproximadamente 213 miligramos de colesterol. Las mayonesas para untar, ciertos tipos de aderezos para ensalada, postres tales como natillas y pudines, y artículos de pastelería que contienen generalmente yemas de huevo y/o huevos enteros.

En los últimos años ha habido por parte de los consumidores una creciente demanda de alimentos con grasa total y colesterol reducidos. Entre las composiciones alimenticias que se han desarrollado en respuesta a esta creciente demanda están mayonesas para untar que son más bajas en colesterol. Se han utilizado varios planteamientos para reducir los niveles de colesterol en la mayonesa. Por ejemplo, se han desarrollado productos de mayonesa de grasa reducida con un contenido de huevo reducido. Sin embargo, como el huevo sirve como emulsionante para la mayonesa y es crítico para sostener la emulsión, reducir el contenido de huevo del producto requiere el uso de espesantes adicionales y emulsionantes químicos para conseguir la necesaria textura y consistencia en la mayonesa. De manera general, estos emulsionantes químicos comunican malos sabores al producto alimenticio, y los consumidores a menudo perciben tales emulsionantes químicos como artificiales y, por tanto, como poco saludables. El uso de emulsionantes químicos puede también estar excluido por el estándar de normas de identidad para productos tales como mayonesa genuina.

Aunque se pueden preparar muchas composiciones alimenticias eliminando o reduciendo la cantidad de huevo usada, especialmente yema de huevo, las composiciones alimenticias resultantes son generalmente afectadas de manera adversa. Por ejemplo, la eliminación de los huevos da como resultado a menudo una pérdida en el sabor, una textura pobre y mal olor. Por tanto, tales productos alimenticios que resultan de la simple eliminación o reducción del contenido de huevo no han recibido generalmente una alta aceptación por los consumidores.

Se descubrió rápidamente que la pérdida de sabor con la retirada o reducción del contenido de huevo en productos alimenticios necesitaba ser compensada. Se pueden usar aromas artificiales hasta un punto limitado, pero, de nuevo, esto acaba con una aceptación más baja de los consumidores. Se han hecho intentos previos usando enzimas, tales como proteasas, para aumentar las propiedades de sabor de productos de huevo. Sin embargo, estas fuentes de huevo con sabor potenciado son generalmente caras desde el punto de vista de la producción, porque el producto de huevo aromatizado sirve sólo como aromatizante, y tiene poca funcionalidad (es decir, propiedades emulsionantes) en el producto alimenticio final.

Se han hecho numerosos otros intentos para tratar huevos y/o yemas de huevo para hacerlos más aceptables para el uso en productos alimenticios para consumidores a dieta o que cuidan su salud. La patente de EE.UU. N° 6.660.312 está dirigida a tratar yema de huevo fluida con enzima fosfolipasa A para convertir los fosfolípidos en lisofosfolípidos. La yema tratada fluida se trata después con dióxido de carbono supercrítico para reducir el contenido de colesterol en la yema fluida.

El documento JP 61031065A2 está dirigido a una yema de huevo procesada de la que se reporta que tiene emulsionabilidad, resistencia a la congelación y resistencia al calor mejoradas. La yema procesada del documento JP 61031065 se obtiene tratando la yema con enzima proteasa para efectuar una hidrólisis parcial; se añade aproximadamente 1-15 por ciento en peso de sal a la yema procesada.

El documento JP 2002325559A2 está dirigido a un producto de huevo procesado que tiene un sabor mejorado. El método del documento JP 2002325559A2 incluye tratar la yema de huevo con enzima fosfolipasa ácida A1 y un tratamiento por calor a 60-75 °C durante 7-40 minutos; se reporta que las emulsiones aceite en agua preparadas usando tales yemas de huevo procesadas tienen una excelente resistencia al calor.

El documento JP 2005-052052 proporciona un método para producir yema tratada con enzimas que tiene una funcionalidad tal como resistencia al calor, resistencia a la congelación o emulsión; y para proporcionar alimentos procesados tales como productos emulsionados que contienen la yema tratada con enzimas obtenida por el método. El método comprende tratar la yema con una proteasa alcalina que no tiene actividad amilasa.

El documento JP 2004-305021 proporciona un método seguro y eficaz para producir una yema de huevo tratada con

enzimas que tiene funcionalidad. La yema de huevo es producida por tratamiento secuencial con una proteasa inmovilizada y una fosfolipasa o fosfolipasa inmovilizada.

El documento JP 2000-316521 describe un producto ácido emulsionado de tipo aceite en agua que es estable sin causar pérdida del sistema de emulsión, incluso cuando es calentado en un horno microondas desde la temperatura ambiente o estando congelado. El producto tiene buenas propiedades de textura, sabor y retención de la forma, y es útil para la preparación de pan. El producto comprende (A) 5 a 50 por ciento en peso de aceite y grasa, tal como aceite de soja, (B) 1 a 15 por ciento en peso de yema tratada con enzimas obtenida tratando secuencialmente la yema con fosfolipasa A y después tratando la yema con una proteasa, (C) 0,1 a 3 por ciento en peso de metilcelulosa, y (D) 30 a 85 por ciento en peso de agua. El producto ácido emulsionado de tipo aceite en agua se prepara emulsionando una fase oleosa a la que se añade metilcelulosa y una fase acuosa a la que se añade una yema tratada con enzimas.

El documento JP 2003-018972 proporciona una emulsión de tipo aceite en agua que tiene un sabor suave y consistente, y es eficaz para obtener un sabor salado más suave. La emulsión contiene una o más sales seleccionadas de sal gema, sal natural y sal bruta que tiene un contenido de potasio de 0,001 a 30 por ciento en peso derivado de cloruro de potasio y un contenido de calcio total de 0,001 a 0,5 por ciento en peso derivado de cloruro de calcio y sulfato de calcio.

El documento JP 2007-053934 proporciona una composición ácida en emulsión de tipo aceite en agua que es resistente a la separación del aceite, incluso cuando se usa como recubrimiento sobre pan. La composición, cuando se calienta, tiene una buena apariencia exterior, propiedad de retención de la forma, se funde en la boca y tiene buen sabor. La composición ácida en emulsión de tipo aceite en agua se prepara usando un líquido de huevo dado mezclando dos o más tipos de líquidos de huevo, cada uno de los cuales se trata con al menos un tipo de enzima.

El documento JP 2002233334A2, de Shigeko et al., describe un método para producir un producto de huevo procesado en el que se trata yema de huevo no salada con enzima fosfolipasa A2 durante 0,5 a 4,5 horas, seguido de la adición de una enzima proteasa para un procesamiento adicional durante un tiempo de tratamiento total de 1 a 5 horas. Shigeko et al. reportaron un intento de hacer una reacción simultánea, donde la proteasa y la fosfolipasa A2 se añadieron al mismo tiempo, pero la yema de huevo tratada resultante no proporcionó una emulsión de mayonesa estable. El método de tratamiento secuencial con enzimas mostrado por Shigeko et al. no es deseable desde el punto de vista de la estabilidad microbiana y de fabricación, porque la cantidad de tiempo requerida para realizar tratamientos secuenciales con enzimas aumenta la cantidad total de tiempo que la yema de huevo es expuesta a elevadas temperaturas, aumentando así el riesgo de contaminación y crecimiento microbianos.

El documento JP 11289979A de Toshihiro et al. está dirigido a un método para tratar secuencialmente yema de huevo con fosfolipasa A y después proteasa. Se reporta que la emulsión aceite en agua resultante tiene buena estabilidad de emulsión y resistencia al calor.

Hay varios inconvenientes asociados con los procedimientos y los productos de yema de huevo tratada conocidos en la técnica. Como se puede ver a partir del resumen anterior, el problema de proporcionar un producto de yema de huevo que tiene las propiedades tanto de emulsión como de sabor necesarias para el uso en productos alimenticios no ha sido afrontado adecuadamente en las técnicas de procesamiento de alimentos. El procedimiento para preparar yema de huevo tratada proporcionado en la presente memoria representa una significativa mejora sobre las yemas de huevo tratadas de la técnica anterior, y vence los problemas asociados con los métodos de la técnica anterior.

La sustitución de una parte del huevo entero y/o yema de huevo en productos alimenticios por menores cantidades de yema de huevo tratada podría dar como resultado productos más sanos para los consumidores y significativos ahorros de costes desde el punto de vista de la fabricación. Sigue habiendo una necesidad de un producto de huevo que tenga todas las características deseables de una yema de huevo normal, tales como sabor y funcionalidad (es decir, propiedades de emulsión) pero que se pueda usar a niveles mucho más bajos que los tradicionales en productos alimenticios, permitiendo así que los productos alimenticios resultantes tengan un contenido de grasa y colesterol reducido en comparación con las recetas tradicionales. Tales composiciones de yema de huevo tratada y métodos se proporcionan en la presente memoria.

Compendio de la invención

En la presente memoria se proporcionan yemas de huevo tratadas con funcionalidad y sabor mejorados, y métodos para preparar tales yemas de huevo tratadas. Tales composiciones son proporcionadas mediante el tratamiento simultáneo de yema de huevo con enzimas fosfolipasa y proteasa. Las composiciones de yema de huevo tratada resultantes se pueden usar en una amplia variedad de productos alimenticios.

Las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria confieren a los productos alimenticios en los que están incorporadas una funcionalidad y sabor de huevo aumentados, y se pueden usar en cantidades reducidas en comparación con la cantidad de huevos enteros y/o yemas de huevo usada normalmente en los productos alimenticios. Las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria son particularmente útiles porque (1) permiten el uso de menos yema de huevo en la preparación de productos

alimenticios para conseguir las mismas características de emulsión, estabilidad e intensidad de sabor que las que se consiguen usando niveles más altos de yema de huevo o huevos enteros no tratados en productos alimenticios; (2) la yema de huevo tratada y los productos alimenticios que la contienen tienen mayor estabilidad frente al calor y estabilidad a la congelación/descongelación; (3) permiten el uso de cantidades más bajas de aceite en productos alimenticios en emulsión, tales como mayonesa, sin embargo evitan la separación y retienen una buena textura y sabor; (4) proporcionan significativos ahorros de costes en la preparación de productos alimenticios para el consumo masivo debido a la reducida cantidad de yema de huevo requerida para conseguir productos alimenticios con características organolépticas y de sabor satisfactorias comparables a las de productos alimenticios producidos usando cantidades convencionales de yemas de huevo o huevos enteros no tratados; y (5) exhiben características de robustez y funcionalidad después de un tratamiento con temperaturas elevadas.

Se proporciona un procedimiento para preparar una composición de yema de huevo que tiene funcionalidad y sabor de yema de huevo mejorados, procedimiento que comprende: (1) preparar una mezcla acuosa de yema de huevo; (2) precalentar la mezcla de yema de huevo de la etapa (1) a una temperatura de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 °C; (3) tratar simultáneamente la mezcla de yema de huevo de la etapa (2) con enzimas fosfolipasa y proteasa a un tiempo y temperatura eficaces para convertir al menos aproximadamente 50 por ciento de los fosfolípidos en lisofosfolípidos y para escindir las proteínas de la yema de huevo para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 6000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a 105 kDa, menos que aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa, para proporcionar una mezcla de yema de huevo tratada. Preferiblemente, las proteasas son eficaces para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 7000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 3000 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, menos que aproximadamente 1000 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa.

La conversión de fosfolípidos en lisofosfolípidos puede ser determinada por HPLC, tal como describen Lesnfsky et al., *Analytical Biochemistry*, 285: 246-254 (2000). Aunque los péptidos pueden ser cuantificados usando diversos métodos conocidos en la técnica, es probable que los diversos métodos den resultados diferentes, dependiendo de las condiciones de procesamiento precisas y las limitaciones inherentes de los métodos. Por ejemplo, la electroforesis en gel tiene uso limitado para péptidos menores que 13 kDa. Por lo tanto, para los fines de definición de la presente memoria, la conversión de proteínas en péptidos que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 13 kDa es estimada añadiendo ácido tricloroacético (TCA) a la yema de huevo tratada hasta una concentración de aproximadamente 12 por ciento en peso para precipitar los péptidos mayores que aproximadamente 13 kDa, aunque el tamaño de los péptidos precipitados puede depender de las propiedades de los péptidos. El precipitado es retirado por centrifugación. Los péptidos pequeños (aproximadamente 13 kDa o menos) que permanecen en el sobrenadante se miden después por absorbancia espectrofotométrica UV a 280 nm. Los péptidos más grandes, de aproximadamente 14 a aproximadamente 105 kDa y de aproximadamente 106 a aproximadamente 240 kDa, se miden usando otra muestra de la yema de huevo tratada (que contiene todos los intervalos de peso molecular) usando el Agilent 2100 Bioanalyzer de electroforesis capilar microfluida (μCE) Lab-on-a-Chip, de Agilent Technologies (Santa Clara, CA), como se describe en la Guía del Kit Agilent Protein 230 (Número de Publicación: G2938-90054, Última Actualización: 9/2006). El método Lab-on-a-Chip no mide con exactitud péptidos pequeños (es decir, péptidos por debajo de aproximadamente 13 kDa); por lo tanto, la cantidad de péptidos pequeños es estimada usando el método UV discutido anteriormente, y no el método Lab-on-a-Chip descrito en la presente memoria. El procedimiento general para el método Lab-on-a-Chip es como sigue. Se preparan alícuotas de la yema de huevo tratada diluyendo la yema líquida tratada con una disolución de suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco que contiene 1 por ciento de SDS, de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) en tubos cónicos de 50 ml. Las muestras se diluyen a 100.000 partes por millón (ppm) ± 1 por ciento y se agitan en vórtex dos veces durante aproximadamente 10 a 20 segundos para asegurar que la muestra se dispersó. Después las muestras se agitan durante aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 250 rpm en un agitador orbital Barnstead Max Q 2000, de Barnstead International (Dubuque, IA). Después, cada muestra se centrifuga durante 10 minutos a 4750 rpm en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-15R, de Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA) para retirar cualesquiera estructuras insolubles, es decir, gránulos, que floten en la fase líquida. Las muestras se preparan y ejecutan bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (con y sin DL-Ditiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, D0632-1G)) según la Guía del Kit Agilent Protein 230. Después se filtran las muestras con un filtro de jeringa GHP Acrodisc de 13 mm (P/N 4554T) justo antes de cargar los pocillos para muestras. El contenido de péptidos de aproximadamente 14 a aproximadamente 105 kDa y péptidos de aproximadamente 106 a aproximadamente 240 kDa se calcula a partir de ello.

Preferiblemente, se forman menos que 2 por ciento en volumen de agregados tras calentar la mezcla de yema de huevo tratada a 71,1°C durante 20 minutos, más preferiblemente no se forman agregados tras calentar la mezcla de yema de huevo tratada a 71,1°C durante 20 minutos. Opcionalmente, la mezcla de yema de huevo tratada puede ser calentada durante un tiempo a una temperatura eficaz para inactivar las enzimas y para pasteurizar la composición de huevo tratado. Después la composición de huevo calentada se enfría para proporcionar la composición de yema de huevo tratada.

Como se emplea en la presente memoria, "simultáneo" o expresiones similares se definen como tratar una mezcla

de yema de huevo mediante la adición de enzimas proteasa y fosfolipasa al mismo o sustancialmente el mismo tiempo, pero también incluye la adición secuencial de enzimas proteasa y fosfolipasa, a condición de que no se haya completado más que 10 por ciento de la reacción de la proteasa o, alternativamente, no más que 30 por ciento de la reacción de la fosfolipasa antes de la adición de la segunda enzima añadida. Por ejemplo, cuando la proteasa es la primera enzima añadida, tratamiento "simultáneo" incluye la adición de fosfolipasa después de que se ha completado no más que 10 por ciento de la reacción de la proteasa.

Como no ha sido reconocido previamente en la técnica, la selección de la proteasa es crítica para conseguir tanto el sabor a huevo como la funcionalidad deseables de la yema de huevo tratada y, en última instancia, del producto alimenticio que incorpora la yema de huevo tratada en el mismo. Las enzimas proteasa adecuadas para el uso en los procedimientos descritos en la presente memoria tienen actividades tanto endo- como exo-peptidasa, de tal modo que cuando entra en contacto con la mezcla de yema de huevo, la proteasa escinde las proteínas de la yema de huevo para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 6000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, menos que aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa. Preferiblemente, las proteasas son eficaces para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 7000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 3000 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, menos que aproximadamente 1000 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa.

Las yemas de huevo tratadas exhiben características de robustez y funcionalidad después de un tratamiento con temperaturas elevadas. Se forman menos que 2 por ciento en volumen de agregados tras calentar la yema de huevo tratada a 71,1°C durante 20 minutos. Preferiblemente, sustancialmente no se forman agregados tras calentar la yema de huevo líquida tratada a 71,1°C durante 20 minutos.

Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que los péptidos pequeños (es decir, péptidos por debajo de aproximadamente 5 kDa) son creados por exopeptidasas, y están asociados con el sabor. En el caso de hidrolizados de proteínas, se sabe que los componentes que tienen sabor están comprendidos de péptidos pequeños y aminoácidos libres tales como glutamato y aspartato. Aunque tampoco se desea estar limitado por la teoría, se cree que los péptidos más grandes que aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa son creados por endopeptidasas y están asociados con la estabilización de la emulsión. En emulsiones alimenticias mediadas por yema de huevo, los fosfolípidos de la yema son los principales agentes emulsionantes, pero se cree también que las proteínas del huevo juegan un papel en la emulsión. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que las proteínas de la yema migran a la interfaz aceite-agua y ayudan a impedir la coalescencia de gotitas de aceite. Para este papel, se cree que los péptidos de la yema de huevo de aproximadamente 14 a aproximadamente 240 kDa son los más eficaces. Las proteasas útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria proporcionan el equilibrio correcto tanto de péptidos pequeños que tienen sabor como de péptidos estabilizantes de la emulsión.

Las enzimas fosfolipasa adecuadas incluyen las que tienen actividad fosfolipasa A1, actividad fosfolipasa A2, o una combinación de las mismas, aunque se prefieren las enzimas que tienen actividad fosfolipasa A1. Por supuesto, también se pueden usar mezclas de enzimas que tienen actividad fosfolipasa A1 y fosfolipasa A2, si se desea. Las enzimas fosfolipasa adecuadas son eficaces para convertir al menos aproximadamente 50 por ciento, preferiblemente al menos aproximadamente 60 por ciento, de los fosfolípidos presentes en la mezcla de yema de huevo en lisofosfolípidos. La conversión de fosfolípidos en lisofosfolípidos puede ser medida por HPLC, tal como describen Lesnfsky et al., *Analytical Biochemistry*, 285: 246-254 (2000).

Las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria se pueden usar en productos alimenticios para comunicar funcionalidad de yema de huevo mejorada, de tal modo que la yema de huevo tratada se puede usar en cantidades reducidas en comparación con la cantidad de yema de huevo o huevo entero usada normalmente en el producto alimenticio. Las composiciones de yema de huevo tratada también se pueden usar como composición aromatizante de alimentos, y se puede usar para sustituir la yema de huevo o huevo entero en composiciones alimenticias en las que se desea aromatizar con huevo. Las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria pueden ser incorporadas en niveles mucho más bajos que los tradicionales y retener sin embargo el sabor y funcionalidad de los de una fórmula de 100 por ciento de yema de huevo (es decir, la cantidad de huevo entero y/o yema de huevo no tratados usada normalmente para preparar el producto alimenticio). Preferiblemente, la yema de huevo tratada se puede usar en aproximadamente 30 a aproximadamente 75 por ciento de la cantidad de huevo entero y/o yema de huevo usada tradicionalmente en el producto alimenticio. La composición de yema de huevo tratada descrita en la presente memoria se puede usar para sustituir la yema de huevo o huevo entero en productos alimenticios tales como artículos de pastelería, un alimento de tipo emulsión continua en agua tal como mayonesa, aderezos para ensalada, pan y postres, tales como natillas, pasteles, tartas y similares. También se proporcionan composiciones alimenticias que contienen tales productos de yema de huevo tratada. Así, por ejemplo, se puede preparar un producto de mayonesa incorporando una cantidad apropiada de la yema de huevo tratada. Preferiblemente, la cantidad de yema de huevo tratada usada en el producto de mayonesa sustituye a la cantidad entera de huevo entero o yema de huevo usada normalmente en el producto de mayonesa, y más preferiblemente se usa en cantidades reducidas en comparación con la cantidad de huevo entero y/o yema de huevo usada normalmente en el producto de mayonesa, tal como en la cantidad de aproximadamente 30 a

aproximadamente 75 por ciento de la cantidad de huevo entero y/o yema de huevo usada tradicionalmente en el producto de mayonesa. Así, los productos alimenticios que incluyen la composición de yema de huevo tratada tienen grasa y colesterol reducidos en comparación con productos alimenticios preparados con huevos enteros y/o yemas de huevo naturales.

- 5 Estas y otras ventajas de las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria se harán evidentes para los expertos en la técnica tras la consideración de la presente memoria descriptiva.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que ilustra de manera general la preparación de un producto de huevo tratado de acuerdo con una realización ilustrativa.

- 10 La FIG. 2 es un electroferograma descrito en el Ejemplo 1 que ilustra el efecto de diferentes proteasas sobre el contenido de proteína de las yemas de huevo tratadas de acuerdo con una realización ilustrativa.

La FIG. 3(A) es un gel y un electroferograma que compara la muestra inventiva calentada (1R) con la muestra de la técnica anterior calentada (2R) del Ejemplo 2.

- 15 La FIG. 3(B) es un gel y un electroferograma que compara la muestra inventiva no calentada (3R) con la muestra de la técnica anterior no calentada (4R) del Ejemplo 2.

La FIG. 3(C) es un gel y un electroferograma que compara la muestra inventiva calentada (1R) con la muestra de la técnica anterior no calentada (4R) del Ejemplo 2.

La FIG. 4 es un gel y un electroferograma que compara la muestra inventiva calentada (1R) del Ejemplo 2 con la muestra (5R) del Ejemplo 3 procesada usando el procedimiento secuencial del método de la técnica anterior.

- 20 La FIG. 5 es un electroferograma que compara el producto del método simultáneo descrito en la presente memoria con los productos de los métodos secuenciales comparativos del Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

- En la presente memoria se proporcionan composiciones de yema de huevo tratada con funcionalidad y sabor mejorados y métodos de preparación de tales composiciones de yema de huevo. Para preparar la composición de yema de huevo tratada, se trata simultáneamente yema de huevo líquida con enzimas proteasa y fosfolipasa. Tal tratamiento permite el desarrollo de un sabor mejorado y propiedades de emulsión mejoradas deseadas para el uso en composiciones alimenticias que requieren convencionalmente huevo entero y/o yema de huevo. Los productos alimenticios preparados con las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria tienen características reológicas asociadas generalmente con productos alimenticios que incorporan yema de huevo fresca o salada no tratada.

- Las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria se pueden usar para preparar composiciones alimenticias de contenido en huevo reducido, tales como aderezos para ensaladas, mayonesa, postres y productos horneados. Las composiciones de yema de huevo tratada se pueden usar en productos alimenticios para sustituir a la yema de huevo o huevo entero naturales a niveles mucho más bajos que los tradicionales y retener aún el sabor y la funcionalidad de los de una fórmula de 100 por ciento de yema de huevo (es decir, la fórmula convencional). Preferiblemente, la composición de yema de huevo tratada se puede usar en aproximadamente 30 a aproximadamente 75 por ciento de los niveles tradicionales de yema de huevo o huevo entero naturales en el producto alimenticio. Los productos alimenticios que contienen el producto de yema de huevo tratada son una alternativa más sana a los productos alimenticios que contienen huevo entero o yema de huevo, debido al nivel más bajo de colesterol y de grasa contenida en la yema de huevo en los productos alimenticios resultantes. Los productos de yema de huevo tratada descritos en la presente memoria no sólo son beneficiosos para la salud del consumidor, sino también para la fabricación de productos alimenticios, tales como mayonesas para untar, debido a los significativos ahorros de costes. Sustituir una cantidad significativa de yema de huevo y/o huevo entero con yema de huevo tratada en la fabricación de mayonesa proporciona unos ahorros de costes significativos, mientras que aún se proporciona el sabor, textura y apariencia de la mayonesa convencional.

- La FIG. 1 proporciona un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de acuerdo con una realización. Se ha encontrado que tratar yema de huevo líquida bajo las condiciones descritas en la presente memoria proporciona composiciones con funcionalidad y sabor mejorados, proporcionando de este modo una composición de yema de huevo que se puede usar en menores cantidades que las de yema de huevo fresca o salada no tratada. De manera general, se prepara una mezcla de yema de huevo líquida relativamente homogénea. Las yemas de huevo útiles para los procedimientos descritos en la presente memoria no se limitan a yemas proporcionadas a partir de huevos enteros frescos. Es bien entendido que la mayor parte de la capacidad emulsionante es proporcionada por la yema, y que la fracción de la clara del huevo es relativamente ineficaz a este respecto. Asimismo, la mayor parte del sabor a huevo es proporcionado por la yema. Aunque se pueden usar huevos enteros, no separados (es decir, tanto la yema como la clara) para preparar la yema de huevo líquida usada en los métodos proporcionados en la presente

memoria, se prefiere separar la yema de la fracción de la clara, de tal modo que sólo se usa la fracción de la yema en la mezcla de yema de huevo. En este aspecto, la yema de huevo separada puede ser combinada después del tratamiento con enzimas con la clara, y ser usada como se usarían de manera similar huevos enteros, si se deseara. Se pueden usar otras formas de huevo para proporcionar la mezcla de yema líquida usada en la presente memoria. Por ejemplo, se puede rehidratar yema de huevo deshidratada con una solución acuosa y/o se puede descongelar y usar yema de huevo congelada, si se desea. De manera general, la yema de huevo debe ser tratada para proporcionar una mezcla de yema de huevo líquida, tal como mezclando y añadiendo una solución acuosa según se necesite. Se puede usar yema de huevo líquida disponible en el mercado, tal como la de Rose Acre Farms (Seymour, IN), si se desea. Preferiblemente, la mezcla de yema de huevo líquida comprende hasta aproximadamente 20 por ciento de sal, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 por ciento de sal. Aunque no es crítico, salar la yema de huevo líquida es ventajoso desde la perspectiva de la estabilidad microbiana, y también porque la sal mejora la fluidez de la yema líquida (p.ej., impide la gelificación).

Preferiblemente, la mezcla de yema de huevo líquida es precalentada hasta una temperatura de aproximadamente 40 a aproximadamente 60°C, tal como en un intercambiador de calor, antes del tratamiento con enzimas. Después, la mezcla de yema de huevo líquida se trata simultáneamente con enzimas proteasa y fosfolipasa a una temperatura y durante un tiempo eficaces para convertir al menos aproximadamente 50 por ciento de los fosfolípidos presentes en la mezcla de yema de huevo en lisofosfolípidos y proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 6000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a 105 kDa, y menos que aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa. Preferiblemente, las proteasas son eficaces para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos aproximadamente 7000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, y al menos aproximadamente 3000 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, y menos que aproximadamente 1000 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa.

Preferiblemente, la mezcla de yema de huevo se trata simultáneamente con enzimas proteasa y fosfolipasa a aproximadamente 40 a aproximadamente 60°C, más preferiblemente aproximadamente 45 a aproximadamente 55°C, durante aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas. Alternativamente, la mezcla de yema de huevo líquida se puede tratar simultáneamente con enzimas proteasa y fosfolipasa a temperaturas más bajas durante un tiempo más largo, tal como a aproximadamente 4 a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 0,1 a aproximadamente 14 días, aunque el tratamiento con enzimas a temperaturas más frías durante periodos de tiempo largos debe ser evitado cuando se usan enzimas fosfolipasa que tienen actividades lipasa secundarias.

La conversión de fosfolípidos en lisofosfolípidos puede ser determinada por HPLC, tal como describen Lesnefsky et al., *Analytical Biochemistry*, 285: 246-254 (2000). Aunque los péptidos pueden ser cuantificados usando diversos métodos conocidos en la técnica, es probable que los diversos métodos den resultados diferentes dependiendo de las condiciones de procesamiento precisas y las limitaciones inherentes de los métodos. Por ejemplo, la electroforesis en gel tiene uso limitado para péptidos menores que 14 kDa. Por lo tanto, para los propósitos de definición de la presente memoria, la conversión de proteínas en péptidos que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 13 kDa es estimada añadiendo ácido tricloroacético (TCA) a la yema de huevo tratada hasta una concentración de aproximadamente 12 por ciento en peso para precipitar los péptidos mayores que aproximadamente 13 kDa, aunque el tamaño de los péptidos precipitados puede depender de las propiedades de los péptidos. El precipitado es retirado por centrifugación. Los péptidos pequeños (aproximadamente 13 kDa o menos) que permanecen en el sobrenadante se miden después por absorbancia espectrofotométrica UV a 280 nm. Los péptidos más grandes, de aproximadamente 14 a aproximadamente 105 kDa y de aproximadamente 106 a aproximadamente 240 kDa, se miden usando otra muestra de la yema de huevo tratada (que contiene todos los intervalos de peso molecular) usando el Agilent 2100 Bioanalyzer de electroforesis capilar microfluida (μ CE) Lab-on-a-Chip, de Agilent Technologies (Santa Clara, CA), como se describe en la Guía del Kit Agilent Protein 230 (Número de Publicación: G2938-90054, Última Actualización: 9/2006). El método Lab-on-a-Chip no mide con exactitud péptidos pequeños (es decir, péptidos por debajo de aproximadamente 13 kDa); por lo tanto, la cantidad de péptidos pequeños es estimada usando el método UV discutido anteriormente, y no el método Lab-on-a-Chip descrito en la presente memoria. El procedimiento general para el método Lab-on-a-Chip es como sigue. Se preparan alícuotas de la yema de huevo tratada diluyendo la yema líquida tratada con una disolución de suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco que contiene 1 por ciento de SDS, de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) en tubos cónicos de 50 ml. Las muestras se diluyen a 100.000 partes por millón (ppm) $\pm$ 1 por ciento y se agitan en vórtex dos veces durante aproximadamente 10 a 20 segundos para asegurar que la muestra se dispersó. Después, las muestras se agitan durante aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 250 rpm en un agitador orbital Barnstead Max Q 2000, de Barnstead International (Dubuque, IA). Después, se centrifuga cada muestra durante 10 minutos a 4750 rpm en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-15R, de Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA) para retirar cualesquiera estructuras insolubles, es decir, gránulos, que floten en la fase líquida. Las muestras se preparan y ejecutan bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (con y sin DL-Ditiotretitol, DTT (Sigma-Aldrich, D0632-1G)) según la Guía del Kit Agilent Protein 230. Después, se filtran las muestras con un filtro de jeringa GHP Acrodisc de 13 mm (P/N 4554T) justo antes de cargar los pocillos para muestras. El contenido de péptidos de aproximadamente 14 a aproximadamente 105 kDa y péptidos de aproximadamente 106 a aproximadamente 240 kDa se calcula a partir de ello.

Como se emplea en esta memoria, “simultáneamente” o expresión similar se define como tratar una mezcla de yema de huevo mediante la adición de enzimas proteasa y fosfolipasa al mismo o sustancialmente el mismo tiempo, pero también incluye la adición secuencial de enzimas proteasa y fosfolipasa, a condición de que no se haya completado más que 10 por ciento de la reacción de la proteasa o, alternativamente, no más que 30 por ciento de la reacción de la fosfolipasa antes de la adición de la segunda enzima añadida. Por ejemplo, cuando la proteasa es la primera enzima añadida, tratamiento “simultáneo” incluye la adición de fosfolipasa después de que se ha completado no más que 10 por ciento de la reacción de la proteasa. Cuando la fosfolipasa es la primera enzima añadida, tratamiento “simultáneo” incluye la adición de proteasa después de que se ha completado no más que 30 por ciento de la reacción de la fosfolipasa (es decir, no más que aproximadamente 30 por ciento de los fosfolípidos se han convertido en lisofosfolípidos). Preferiblemente, las enzimas proteasa y fosfolipasa se añaden al mismo o sustancialmente el mismo tiempo.

Se encontró sorprendentemente que son necesarias proteasas que escinden péptidos en intervalos de tamaño específicos y en cantidades particulares de cada intervalo de tamaños para producir una yema de huevo tratada que tiene funcionalidad y sabor aumentados. Las enzimas proteasa adecuadas tienen tanto actividades endopeptidasa como exopeptidasa, de tal modo que cuando entran en contacto con la mezcla de yema de huevo, la proteasa escinde las proteínas de la yema de huevo en fragmentos, de tal modo que la composición comprende al menos aproximadamente 6000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, y menos que aproximadamente 2500 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa. Preferiblemente, la composición de yema de huevo tratada comprende al menos aproximadamente 7000 ppm de péptidos menores que aproximadamente 13 kDa, al menos aproximadamente 3000 ppm de péptidos de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 105 kDa, menos que aproximadamente 1000 ppm de péptidos de aproximadamente 106 kDa a aproximadamente 240 kDa.

Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que los péptidos pequeños (es decir, péptidos por debajo de aproximadamente 5 kDa) son creados por exopeptidasas, y están asociados con el sabor. En el caso de hidrolizados de proteínas, se sabe que los componentes que tienen sabor están comprendidos de péptidos pequeños y aminoácidos libres tales como glutamato y aspartato. Aunque tampoco se desea estar limitado por la teoría, se cree que los péptidos más grandes que aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa son creados por endopeptidasas y están asociados con la estabilización de la emulsión. En emulsiones alimenticias mediadas por yema de huevo, los fosfolípidos de la yema son los principales agentes emulsionantes, pero se cree también que las proteínas del huevo juegan un papel en la emulsión. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que las proteínas de la yema migran a la interfaz aceite-agua y ayudan a impedir la coalescencia de gotitas de aceite. Para este papel, se cree que los péptidos de la yema de huevo de aproximadamente 14 a aproximadamente 240 kDa son los más eficaces. Las proteasas útiles en los métodos proporcionados en la presente memoria proporcionan el equilibrio correcto tanto de péptidos pequeños que tienen sabor como de péptidos estabilizantes de la emulsión.

Las enzimas proteasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, proteasas de origen microbiano, fúngico, animal o vegetal, o similares. Los ejemplos específicos de proteasas preferidas incluyen FLAVOURZYME®, de Novozymes (Franklinton, NC) y Accelerzyme CPG (DSM Food Specialties, Parsippany, NJ). El FLAVOURZYME® es un complejo de proteasas/peptidasas fúngicas que tiene actividades tanto endopeptidasa como exopeptidasa. Se sabe que FLAVOURZYME® hidroliza proteínas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas, y por lo tanto se puede usar para quitar el amargor de hidrolizados de proteínas amargos en bajos grados de hidrólisis, y para la hidrólisis extensiva de proteínas que da como resultado un desarrollo del sabor.

Las enzimas fosfolipasa adecuadas incluyen las que tienen actividad fosfolipasa A1, actividad fosfolipasa A2, o una combinación de las mismas, aunque se prefieren las enzimas que tienen actividad fosfolipasa A1. Por supuesto, también se pueden usar mezclas de enzimas que tienen actividades fosfolipasa A1 y fosfolipasa A2, si se desea. Las fosfolipasas útiles en este procedimiento inventivo convierten al menos aproximadamente 50 por ciento de los fosfolípidos en la yema de huevo en lisofosfolípidos, preferiblemente al menos aproximadamente 60 por ciento. Se prefieren las enzimas fosfolipasa A1 porque las enzimas fosfolipasa A1 liberan selectivamente ácidos grasos saturados que predominan en la posición sn1 de los fosfolípidos, mientras que las enzimas fosfolipasa A2 liberan ácidos grasos insaturados que predominan en la posición sn2 y pueden causar rancidez oxidativa. Un ejemplo específico de una enzima fosfolipasa A1 preferida es LECITASE® Ultra, de Novozymes (Franklinton, NC). Un ejemplo específico de una enzima fosfolipasa A2 adecuada es Maxapal (DSM Food Specialties, Parsippany, NJ). Se debe apuntar que el tratamiento con enzimas a temperaturas más frías durante largos periodos de tiempo se debe evitar cuando se usan enzimas fosfolipasa que tienen actividades lipasa secundarias. La actividad lipasa secundaria es generalmente indeseable debido a la liberación de ácidos grasos libres de los lípidos, que pueden causar malos sabores, así como disminuir indeseablemente el pH, y acelerar la oxidación y rancidez. Las actividades lipasa secundarias son inhibidas generalmente a temperaturas aumentadas, tales como 50°C o superiores. Por ejemplo, la LECITASE® Ultra, de Novozymes (Franklinton, NC) tiene actividades lipasa secundarias a temperaturas más bajas, y no se debe usar a temperaturas frías (es decir, 4°C a 45°C) durante largos periodos de tiempo (es decir, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 14 días).

El tratamiento con enzimas simultáneo es seguido opcionalmente de un tratamiento con calor durante un tiempo y temperatura eficaces para inactivar las enzimas y para pasteurizar la mezcla de yema de huevo tratada. Por

ejemplo, la mezcla puede ser calentada hasta aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 0,25 a aproximadamente 60 minutos. Calentar la yema de huevo puede tener el beneficio de desarrollar sabores inducidos por calor deseables, tales como sabores Mallard, pero el calentamiento también puede causar agregación de proteínas, lo que puede reducir la capacidad estabilizante de la emulsión de la yema de huevo. La mezcla de yema de huevo tratada puede ser enfriada después hasta una temperatura de aproximadamente -30 a aproximadamente 10°C, tal como en un intercambiador de calor. Si se desea, la yema de huevo tratada puede ser congelada o deshidratada hasta un polvo por métodos convencionales para una vida útil extendida, tales como, pero no limitados a, secado por pulverización, liofilización, secado en tambor, o similares.

Las mezclas de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria tienen funcionalidad y sabor drásticamente mejorados, y pueden ser incorporadas en productos alimenticios en cantidades menores que las yemas de huevo y/o huevos enteros no tratados usados normalmente en los productos alimenticios. Las mezclas de yema de huevo tratada exhiben características de robustez y funcionalidad después de un tratamiento con temperaturas elevadas. Por ejemplo, se forman menos que 2 por ciento en volumen de agregados tras calentar la mezcla de yema de huevo tratada a 71,1°C durante 20 minutos. Preferiblemente, sustancialmente no se forman agregados tras calentar la mezcla de yema de huevo tratada a 71,1°C durante 20 minutos. Así, los productos alimenticios para servir en cucharadas en los que están incorporadas tales composiciones de yema de huevo tratada exhiben viscosidad y sabor aumentados cuando se comparan con productos alimenticios generados usando cantidades similares de yemas de huevo y/o huevos enteros no tratados. Además, el uso de las composiciones de yema de huevo tratada en productos alimenticios proporciona la textura, sensación en la boca, estabilidad e intensidad de sabor de productos alimenticios comparables generados usando mayores cantidades de yemas de huevo y/o huevos enteros no tratados.

La funcionalidad y sabor aumentados comunicados por las composiciones de yema de huevo tratada permiten el uso de cantidades reducidas de yema de huevo tratada en la preparación de productos alimenticios en comparación con yemas de huevo y/o huevos enteros no tratados, sin afectar de manera adversa a las propiedades organolépticas. Esta reducción en la cantidad de yema de huevo requerida para la preparación de productos alimenticios con funcionalidad y sabor satisfactorios proporciona una significativa reducción en el coste de preparación de productos alimenticios para el consumo masivo. Además, como las cantidades de yema de huevo pueden ser reducidas sin afectar de manera adversa a las propiedades organolépticas, el contenido total de colesterol y/o grasa de los productos alimenticios puede ser reducido también.

Se proporcionan composiciones alimenticias en las que las cualidades texturales, organolépticas y de sabor son proporcionadas por composiciones de yema de huevo que han sido tratadas simultáneamente con enzimas fosfolipasa y proteasa como se describe anteriormente. La composición de yema de huevo tratada descrita en la presente memoria se puede usar para sustituir la yema de huevo o huevo entero en diversos productos alimenticios, tales como artículos de pastelería, mayonesa, aderezos para ensaladas, y postres, tales como natillas, pasteles, tartas y similares. Preferiblemente, las composiciones de yema de huevo tratada proporcionadas en la presente memoria se usan en productos alimenticios que comprenden emulsiones continuas en agua que tienen un contenido de lípidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 por ciento, tales como mayonesa, aderezos para ensalada y similares. Ventajosamente, los productos de yema de huevo tratada proporcionados en la presente memoria se pueden usar en el producto alimenticio a aproximadamente 30 a aproximadamente 75 por ciento de la cantidad de huevo entero y/o yema de huevo usados tradicionalmente en el producto alimenticio.

Las mayonesas para untar y aderezos para ensalada convencionales son emulsiones aceite en agua en las que la yema de huevo y/o huevo entero funcionan como emulsionantes. Se ha encontrado que tratar yema de huevo bajo las condiciones descritas en la presente memoria proporciona composiciones que son emulsionantes eficaces, y se pueden usar en lugar de yema de huevo o huevo entero no tratados, incluso en una cantidad más baja que la de la yema de huevo o huevo entero usada normalmente en los productos de mayonesa y aderezos para ensalada. Como resultado, se pueden preparar salsas de mayonesa y aderezos para ensalada con un contenido de huevo reducido que tienen el sabor, textura y apariencia de las mayonesas o aderezos para ensalada convencionales que contienen huevo entero o yema de huevo. Estos productos alimenticios con huevo reducido también tienen un contenido de grasa y colesterol reducido en comparación con la mayonesa o aderezos para ensalada tradicionales, porque son necesarias menores cantidades de yema de huevo para conseguir similar sabor y funcionalidad en el producto alimenticio. Por supuesto, los productos alimenticios que incorporan la composición de yema de huevo tratada pueden comprender además estabilizantes, tales como estabilizantes hidrocoloidales, si se desea.

Se descubrió además que la funcionalidad aumentada comunicada por las composiciones de yema de huevo tratada descritas en la presente memoria permite el uso de menos aceite en la preparación de productos alimenticios que contienen huevo entero y/o yema de huevo no tratada. Dado que la cantidad de aceite puede ser reducida sin afectar de manera adversa a las propiedades organolépticas, el contenido total de grasa y/o colesterol, dependiendo del aceite usado, puede ser reducido adicionalmente en comparación con los productos alimenticios convencionales.

Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden hacer modificaciones y variaciones sin apartarse del espíritu y alcance verdaderos de la invención. La invención no es, por lo tanto, para ser limitada a las realizaciones descritas e ilustradas, sino que es para ser determinada a partir de las reivindicaciones adjuntas. A menos que se especifique de otro modo, todos los porcentajes y relaciones son en peso.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que usar diferentes proteasas en el mismo procedimiento da como resultado productos de yema que tienen diferentes características de viscosidad y sabor. Se usó LECITASE® Ultra como fosfolipasa en cada experimento, mientras que la proteasa fue variada según la tabla a continuación.

Enzimas	Combinación de enzimas A	Combinación de enzimas B	Combinación de enzimas C
LECITASE® Ultra (fosfolipasa de Novozymes, Franklinton, NC) *	10 LU/g	10 LU/g	10 LU/g
FLAVOURZYME® (proteasa de Novozymes, Franklinton, NC) *	0,5 LAPU/g		
Alcalase 2.4 AF (proteasa de Novozymes, Franklinton, NC) *		0,0024 AU-A/g	
Accelerzyme CPG (proteasa de DSM Food Specialties, Parsippany, NJ) *			0,9 CPGU/g
* Las unidades de enzimas son como especifican los respectivos proveedores.			

Se precalentó a 50°C yema de huevo líquida con 10 por ciento de sal (Rose Acres Farms, Seymour, IN). Las combinaciones de enzimas se añadieron como se especifica en la tabla anterior a alícuotas independientes de la preparación de yema de huevo salada. Todas las mezclas se incubaron a 50°C durante 3 horas. Después, la combinación A se calentó a 76,7°C durante 20 minutos, mientras que las combinaciones B y C se calentaron a 71,1°C durante 20 minutos. La combinación A se calentó a una temperatura ligeramente más alta que las combinaciones B y C porque Flavourzyme requiere una temperatura más alta para inactivar una actividad secundaria conocida.

Las tres muestras de huevo tratadas fueron catadas por un experto catador acreditado. De las tres combinaciones de enzimas descritas en este ejemplo, se encontró que la combinación B dio resultados de sabor inaceptables, mientras que las combinaciones A y C dieron un sabor a huevo deseable, como se describe en la tabla a continuación.

Combinación de enzimas	Comentarios del experto catador
Combinación A	Cualidad de huevo, rico, preferido
Combinación B	Toque con olor a verde, toque oxidado, más agrio y ácido que la Combinación A, cualidad de huevo similar a la Combinación A
Combinación C	El más cercano al control en cuanto a huevo, rico, oleoso, no agrio, preferencia en cuanto a huevo y preferencia global

A) Análisis de proteínas

Las muestras de yema de huevo tratada de cada combinación de enzimas se analizaron después para correlacionar los resultados de sabor con los cambios composicionales en la yema de huevo tratada. El alto contenido en lípidos de la yema de huevo, así como la baja solubilidad, hace difícil el análisis por técnicas cromatográficas o electroforéticas convencionales. Se usó el Agilent 2100 Bioanalyzer de electroforesis capilar microfluida (μCE) Lab-on-a-Chip, de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) para caracterizar el contenido proteico de las proteínas de la yema de huevo modificada con enzimas.

Cada muestra se preparó como se describe en la Guía del kit Agilent Protein 230 (Número de Publicación: G2938-90054, Última Actualización: 9/2006), utilizando los reactivos de Agilent® Protein 230 Parte I y Parte II. Se prepararon alícuotas de la yema de huevo líquida tratada de cada combinación de enzimas diluyendo la yema líquida tratada con una solución de suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco que contenía 1 por ciento de SDS, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) en tubos cónicos de 50 ml. A fin de asegurar que la asignación de las posiciones de las proteínas eran exactas, se disolvieron un marcador de bajo peso molecular (4,5 kDa) y un marcador de alto peso molecular (240 kDa) en el tampón de muestra que se añade a cada muestra, para que el gel pueda ser alineado a una escala de pesos moleculares que se añadió a una calle en cada chip. Las muestras fueron diluidas a 100.000 partes por millón (ppm) ± 1 por ciento. Cada muestra fue agitada en vórtex dos veces durante aproximadamente 10 a 20 segundos para asegurar que la muestra se dispersó. Después, las muestras se agitaron durante aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 250 rpm en un agitador orbital Barnstead Max Q 2000, de Barnstead International (Dubuque, IA). Después, cada muestra se centrifugó durante 10 minutos a 4750 rpm en una

centrífuga Beckman Coulter Allegra X-15R, de Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA) para retirar cualesquiera estructuras insolubles, es decir, gránulos, que floten en la fase líquida.

Todas las muestras se prepararon y ejecutaron bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (con y sin DL-Ditiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, D0632-1G)) según la Guía del Kit Agilent Protein 230. Después se filtraron las muestras con un filtro de jeringa GHP Acrodisc de 13 mm (P/N 4554T) justo antes de cargar los pocillos para muestras. Se ejecutaron repeticiones múltiples (n=5) de cada muestra y se analizaron en el Agilent 2100 Bioanalyzer.

Como se muestra en la FIG. 2, los datos electroforéticos adquiridos con el Agilent 2100 Bioanalyzer ilustran las diferencias en la composición peptídica de la muestra tratada con la combinación de enzimas A frente a la muestra tratada con la combinación de enzimas B.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con enzimas simultáneo del método inventivo da un producto diferente y superior con una textura única y un perfil de sabores natural en comparación con el producto de huevo tratado producido por el tratamiento con enzimas secuencial descrito en el documento JP2002233334A2. Las composiciones de yema de huevo tratada se prepararon según el método inventivo simultáneo y el tratamiento con enzimas secuencial de la técnica anterior como se describe a continuación.

1) Tratamiento con enzimas simultáneo (Método Inventivo)

Se precalentó a 50°C yema de huevo líquida prepasteurizada, con 10 por ciento de sal (Rose Acres Farms, Seymour, IN). Se añadieron a la yema de huevo líquida 10 LU/g de yema de huevo de fosfolipasa A1 LECITASE® Ultra y 0,5 LAPU/g de yema de huevo de proteasa FLAVOURZYME™, y la mezcla se incubó a 50°C durante 3 horas.

2) Tratamiento con enzimas secuencial (Método de la Técnica Anterior)

El documento JP2002233334 A2, que enumera a los inventores Nariko Hayashi y Yoshikazu Nakanishi, y asignado a Knorr Food Product K.K., describe la adición secuencial de enzimas fosfolipasa A2 y proteasa a yema de huevo. Los ejemplos descritos en el documento JP2002233334 usan fosfolipasa A2 Lecitase (Novonordisk K.K.) y proteasa P (Amano Seiyaku K.K.). Como se creyó que ninguna de estas enzimas estaba disponible en el mercado en el momento de realizar los experimentos descritos en la presente memoria, se buscaron enzimas de sustitución adecuadas. La patente de EE.UU. 6.312.739 también enumera a Hayashi y Nakanishi como inventores, y está asignada a Knorr Foods. La patente '739 está dirigida a hidrolizar yema con proteasa, y usa proteasa Protin A (de Daiwa Kasei Co., Ltd., ahora una filial de Amano Enzymes) en los ejemplos. Uno de los co-inventores de la presente invención contactó con Amano Enzymes, y Amano Enzymes indicó que "Protin A" estaba sustituida en el mercado por "PROTIN SD-AY10", una proteasa alcalina. Por lo tanto, las enzimas que se creía que se correspondían mejor con las características y propiedades publicadas de la fosfolipasa A2 Lecitase y de las proteasas fueron sustituidas para los fines de replicar el tratamiento con enzimas secuencial mostrado por el documento JP2002233334. Se seleccionaron la fosfolipasa MAXAPAL A2 (E.C. 3.1.1.4) (DSM Food Specialties, Parsippany, NJ) y PROTIN SD-AY10 de Amano Enzymes (Elgin, IL). Aunque Amano Enzymes parece ahora ofrecer una enzima llamada "Protease P 'Amano' 6", las "PROTIN SD-AY10" y "Protease P 'Amano' 6" son ambas serina proteasas alcalinas, y se espera que den resultados razonablemente similares. Por lo tanto, el experimento descrito en la presente memoria utiliza Protin SD-AY 10 para los fines de replicar el tratamiento con enzimas secuencial del documento JP2002233334.

Se separaron y mezclaron yemas de huevo de dos docenas de huevos para preparar aproximadamente 2 kg de suspensión de yema de huevo no salada. La suspensión de yema de huevo se pasteurizó a 64,5°C durante 3,5 minutos y después se enfrió a 50°C. Se añadieron 10 LU/g de fosfolipasa MAXAPAL A2 a la suspensión de yema de huevo y se incubó durante una hora antes de añadir 36 PU/g de PROTIN SD-AY 10, y se incubó durante dos horas adicionales.

A) Preparación de mayonesa

Las composiciones de yema de huevo tratada tanto del método inventivo como del de la técnica anterior fueron divididas después en dos muestras de cada uno, siendo una muestra de cada método enfriada inmediatamente (en lo sucesivo, muestra "inventiva no calentada" y muestra "de la técnica anterior no calentada", respectivamente) mientras que la otra muestra de cada método fue tratada con calor a 71,1°C durante 20 minutos (en lo sucesivo, muestra "inventiva calentada" y muestra "de la técnica anterior calentada", respectivamente). Las muestras inventiva calentada y de la técnica anterior calentada fueron enfriadas después en un baño de hielo y agua.

Las cuatro composiciones de yema de huevo tratada se usaron para preparar mayonesa según una fórmula comercial estándar y el procedimiento según la tabla a continuación.

Ingredientes	Cantidad (tanto por ciento)		
	Yema de huevo tratada	Control A	Control B
Agua	14,9	14,9	13,5
Aceite de soja	77,8	77,8	77,8
Yema de huevo tratada	1,4	0	0
Yema de huevo no modificada	0	1,4	2,9
Sal	0,8	0,8	0,8
Vinagre	4,3	4,3	4,3
Azúcar	0,7	0,7	0,7

Se prepararon cuatro lotes de mayonesa y se aromatizaron con 1,44 por ciento de yema de huevo tratada en base al peso de la mayonesa, con un lote de cada uno preparado a partir de la muestra inventiva calentada, la muestra inventiva no calentada, la muestra de la técnica anterior calentada y la muestra de la técnica anterior no calentada.

5 Se prepararon dos lotes de control adicionales para caracterización y comparación. El Control A se preparó con 1,4 por ciento de yema de huevo no modificada (no tratada) con 10 por ciento de sal, y el Control B se preparó con 2,9 por ciento de yema de huevo no modificada (no tratada) con 10 por ciento de sal. El Control B representa un producto de mayonesa convencional.

10 La viscosidad (tensión de deformación) se analizó usando un viscosímetro Haake VT550 (Haake USA, Paramus, NJ) para mayonesa preparada con la muestra inventiva calentada, la muestra inventiva no calentada, la muestra de la técnica anterior calentada, la muestra de la técnica anterior no calentada y la muestra del Control A. Los datos en la tabla a continuación demuestran que las muestras calentadas del método simultáneo inventivo y el método secuencial de la técnica anterior generaron mayonesa con características de textura claramente diferentes. La mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior calentada tenía una viscosidad deficiente, que era incluso

15 más baja que la viscosidad del Control A, que se preparó con 50 por ciento de la yema de huevo usada tradicionalmente en la receta. Aunque la mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior no calentada tenía una viscosidad aceptable, la mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior calentada era inaceptablemente líquida. Tanto las mayonesas preparadas con las muestras inventivas calentadas como las inventivas no calentadas tuvieron una viscosidad aceptable.

Muestra	Viscosidad de la mayonesa (Haake) Pa
Control A (50% de yema de huevo)	104
Control B (100% de yema de huevo)	No medido
Inventiva calentada	158
Inventiva no calentada	280
Técnica anterior calentada	82
Técnica anterior no calentada	270

20 A un experto catador adiestrado, con extensa experiencia en el campo del análisis del sabor del huevo, se le presentaron las muestras de mayonesa en un orden ciego y aleatorio. El experto catador adiestrado evaluó las muestras de mayonesa usando un análisis descriptivo basado en los atributos de la cualidad del huevo, rigidez, sabores desagradables, amargor, aceitosidad y sabor a mayonesa preferido global. Los comentarios del experto se proporcionan en la tabla a continuación.

Muestra	Datos sensoriales
Control A (1,44% de yema)	• Ninguno
Control B (2,88% de yema)	• Salado • Sensación oleosa • Sabor a huevo menos equilibrado

Muestra	Datos sensoriales
Mayonesa preparada con la muestra inventiva calentada (Método Simultáneo)	• Preferida sobre todas las muestras • Sabor más a huevo/oleosa • Equilibrada entre huevo y aceite • Ligeramente agria • Ningún sabor desagradable
Mayonesa preparada con la muestra inventiva no calentada (Método Simultáneo)	• No analizada
Mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior calentada (Método Secuencial)	• Textura líquida • Aroma a vinagre • Metálica • Agria • Sosa
Mayonesa preparada con muestra de la técnica anterior no calentada (Método Secuencial)	• Textura más rígida • Suave • Más sosa, ligero sabor a cartón • Más láctea/cremosa

Los datos sensoriales indicaron diferencias significativas entre las muestras. El experto en sabores seleccionó la mayonesa preparada con la muestra inventiva calentada como la mayonesa preferida. Según el experto en sabores, la mayonesa preparada con la muestra inventiva calentada tenía superior textura y sabor a huevo en comparación con las otras muestras. La mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior calentada era sosa y tenía una textura líquida, un sabor metálico y agrio, y aroma a vinagre. La mayonesa preparada con la muestra de la técnica anterior no calentada tenía una textura rígida, sabor suave, más a producto lácteo/cremoso (sabor), y era de sabor más soso, ligeramente a cartón.

B) Análisis visual

Las muestras de yema de huevo preparadas como anteriormente fueron evaluadas después de centrifugar en base a un análisis visual. Las diferencias visuales en las muestras se describen en la tabla a continuación.

Muestra	Características
Control	Yema líquida
Inventiva calentada	Capa muy fina de materia en partículas (menos que 2% en volumen)
Técnica anterior calentada	Capa muy grande de materia en partículas (aproximadamente 13% en volumen)
Inventiva no calentada	Lechosa/blanquecina
Técnica anterior no calentada	Materia en partículas amarilla

La muestra de yema inventiva calentada era muy amarilla y transparente, pero tenía una capa muy fina de material en el fondo del vial de vidrio, mientras que su contraparte de la técnica anterior calentada era transparente pero tenía una capa muy grande de material en el fondo del vial de vidrio. También, para la muestra de yema de la técnica anterior calentada, la materia en partículas estaba pegada en los lados del vial de vidrio, lo que no se observó en la muestra inventiva calentada. La muestra de yema inventiva no calentada mostró un color lechoso con una apariencia blanquecina en los lados del vial de vidrio. La muestra de yema de la técnica anterior no calentada tenía un color amarillo mucho más oscuro que la muestra de yema inventiva no calentada, así como tenía materia en partículas pequeñas pegada a los lados del vial de vidrio. Los resultados indican que la etapa de calentamiento a 71,1°C durante 20 minutos causa que se produzcan cambios físicos, tales como formación de agregados, como muestra la cantidad de materia en partículas formada en las muestras. La muestra inventiva calentada no tuvo los

grandes agregados de proteínas que eran visibles en la muestra de la técnica anterior. Por lo tanto, se determinó que la yema de huevo tratada producida por el método inventivo da como resultado un producto de huevo más robusto que puede resistir mejor los efectos del calentamiento.

C) Análisis cuantitativo de proteínas

5 Se usó el Agilent 2100 Bioanalyzer para demostrar claramente que el método simultáneo inventivo genera una yema de huevo tratada que tiene diferencias composicionales específicas en comparación con la yema de huevo tratada producida en el método secuencial del documento JP2002223334. Se cree que estas diferencias de composición están asociadas a la funcionalidad y sabor únicos de las composiciones de yema de huevo tratada de la invención.

10 Se analizaron muestras inventivas calentadas, inventivas no calentadas, de la técnica anterior calentadas y de la técnica anterior no calentadas como las preparadas anteriormente en cuanto al contenido de péptidos de bajo peso molecular (<13 kDa) midiendo el material proteico en la fracción soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12 por ciento. La muestra se llevó a 12 por ciento de TCA para precipitar los péptidos más grandes, y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 6 minutos para retirar el precipitado. Se usó un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU530 para medir la absorbancia a 280 nm para calcular el contenido de péptidos de bajo peso molecular. El contenido de péptidos más grandes (péptidos de aproximadamente 14 a aproximadamente 240 kDa) se midió usando el Agilent 2100 Bioanalyzer como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. Los péptidos que tenían un peso molecular mayor que 240 kDa no se midieron. También se analizó un control (yema de huevo líquida no tratada). Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Muestra	Péptidos (ppm)		
	< 13 kDa	14-105 kDa *	106-240 kDa *
Inventiva (calentada)	8288	3432	163
Técnica anterior (calentada)	5325	570	44
Inventiva (no calentada)	9450	5071	234
Técnica anterior (no calentada)	4563	4832	3024
Control	4100	8823	3709
* N=5 para al menos los péptidos de 14-105 y 106-240 kDa.			

20 Como se esperaba, todas las muestras de yema de huevo tratadas con enzimas tienen una concentración más alta de péptidos de bajo peso molecular que el control. Sin embargo, las muestras inventivas tienen una concentración considerablemente más alta de péptidos de bajo peso molecular que ambas muestras de la técnica anterior. El calentamiento da una ligera disminución en la concentración de péptidos de bajo peso molecular en el procedimiento inventivo y un ligero aumento en tales péptidos en la muestra de la técnica anterior. Como se reportó antes en este ejemplo, el calentamiento causó un cambio visual sorprendente en la muestra de la técnica anterior calentada, causando la formación de aproximadamente 13 por ciento en volumen de agregados visibles, en comparación con menos que 2 por ciento en volumen de agregados visibles en la muestra inventiva calentada.

30 La muestra inventiva no calentada tenía más péptidos de intervalo medio (14-105 kDa) y mucho menos de los péptidos de alto peso molecular (106-240 kDa) (que representan proteínas de la yema de huevo que han sido mínimamente hidrolizadas por la proteasa) en comparación con ambas muestras de la técnica anterior. Finalmente, después del calentamiento, la muestra de la técnica anterior muestra una gran reducción tanto en péptidos de intervalo medio como de alto peso molecular, mientras que la muestra inventiva muestra una reducción mucho más modesta.

D) Análisis descriptivo de proteínas - Comparación de muestras calentadas

35 Cada muestra se preparó como se describe usando el kit Agilent Protein 230 como se describió previamente en el Ejemplo 1. Los datos electroforéticos y de proteínas adquiridos con el Agilent 2100 Bioanalyzer demuestran además las diferencias composicionales (es decir, proteicas) en las muestras inventiva calentada y de la técnica anterior calentada.

40 Como se muestra en los datos de gel y electroforéticos en la FIG. 3(A), la muestra inventiva calentada (1R) y la muestra de la técnica anterior calentada (2R) tienen numerosas bandas y picos presentes en una muestra que no están presentes en la otra. Los picos y bandas a 4,5 y 240 kDa corresponden al marcador interno. Más específicamente, hay al menos seis bandas y picos presentes en la muestra 1R a 25,8, 27,8, 74,6, 102,9, 129,1 y 214,6 kDa que no están presentes en la muestra 2R. Hay también al menos tres bandas y picos presentes en la muestra 2R a 13,9, 50,9 y 227,6 kDa que no están presentes en la muestra 1R. Hay también diferencia significativa

en la intensidad de las bandas y picos. Como reflejan las sustanciales diferencias entre la composición de proteínas de la yema de huevo tratada producida por los métodos inventivo y de la técnica anterior, se concluyó que estos dos métodos han generado diferentes productos. Estas diferencias confirman que la modificación de textura y sabor es diferente en base a si se emplea el método inventivo o el de la técnica anterior.

- 5 Estos datos, tanto los datos visuales como los electroforéticos, demuestran claramente que el método inventivo simultáneo y el método secuencial de la técnica anterior tienen efectos diferentes sobre las proteínas y su entorno, tales como efectos de la sal, formación de agregados, diferente unión covalente, unión de hidrógeno aumentada, interacciones hidrófobas, y posibles efectos electrostáticos o estéricos. Aunque los mecanismos que causan estos efectos no están entendidos completamente, la yema de huevo tratada así producida por el método simultáneo de la invención es sustancialmente diferente de la producida por el procedimiento de la técnica anterior.

E) Análisis descriptivo de proteínas - Comparación de muestras no calentadas

Los datos electroforéticos y de proteínas adquiridos con el Agilent 2100 Bioanalyzer demuestran además las diferencias de composición (es decir, proteicas) en cada una de las muestras inventiva no calentada y de la técnica anterior no calentada.

- 15 Como se muestra en los datos de gel y electroforéticos en la FIG. 3(B), la muestra inventiva no calentada (3R) y la muestra de la técnica anterior no calentada (4R) tienen numerosas bandas y picos presentes en una muestra que no están presentes en la otra. De nuevo, los picos y bandas a 4,5 y 240 kDa corresponden al marcador interno. Específicamente, hay al menos cuatro bandas y picos presentes en la muestra 3R a 39,6, 102,0, 129,3 y 213,5 kDa que no están presentes en la muestra 4R. Hay también al menos cinco bandas y picos presentes en la muestra 4R que no están presentes en la muestra 3R, estando situados los más notables a 50,9, 55,6, 77,8, 107,7 y 226,3 kDa.

- 20 Estos datos demuestran de nuevo que la muestra inventiva no calentada y la muestra de la técnica anterior no calentada tienen composiciones claramente diferentes, y que estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferencias entre el método simultáneo inventivo y el método secuencial de la técnica anterior. Las diferencias en composición son también evidentes mediante un examen físico de las muestras, como se describe anteriormente. La muestra de la técnica anterior no calentada contiene materia en partículas, mientras que la muestra inventiva no calentada tiene un residuo blanquecino en los lados del vial de vidrio (es decir, sin partículas individuales). Estas diferencias confirman de nuevo que la modificación de textura y sabor es diferente en base a si se emplea el método inventivo o el de la técnica anterior, y no son debidas a la etapa de calentamiento.

- 25 F) Análisis descriptivo de proteínas - Comparación de la muestra inventiva calentada con la muestra de la técnica anterior no calentada

- 30 La FIG 3(C) compara adicionalmente la muestra inventiva calentada (1R) con la muestra de la técnica anterior no calentada (4R). La FIG 3(C) muestra que el método simultáneo inventivo y el método secuencial de la técnica anterior generan perfiles proteicos claramente diferentes. Los datos electroforéticos muestran numerosos picos grandes para la muestra de la técnica anterior no calentada por encima de 20 kDa que no se encuentran en los datos para la muestra inventiva calentada, lo que se cree que está correlacionado con la materia en partículas encontrada en la muestra de la técnica anterior no calentada. Estas diferencias confirman además que la modificación de textura es diferente en base a si se emplea el método inventivo o el de la técnica anterior.

G) Contenido de ácidos grasos

- 40 Para distinguir adicionalmente los productos de yema de huevo de los métodos inventivo y de la técnica anterior, se midió la distribución de ácidos grasos libres y la conversión de fosfolípidos.

Ácidos grasos libres (Distribución en partes por millón (ppm))		
	Inventivo	Técnica anterior
Butanoico 4:0	<10	<10
Decanoico 10:0	<10	<10
Dodecanoico 12:0	<10	<10
Hexadecanoico 16:0	12133	456
Hexanoico 6:0	<10	<10
Octadecadienoico 18:2	833	8315
Octadecanoico 18:0	5554	314
Octadecenoico 18:1	3571	12189

Ácidos grasos libres (Distribución en partes por millón (ppm))		
Octanoico 8:0	<10	<10
Tetradecanoico 14:0	72	<10
Propanoico 5:0	<40	<40

Los resultados indican que la generación de estos dos distintos perfiles de ácidos grasos libres está directamente relacionada con el mecanismo por el que las enzimas fosfolipasa generan ácidos grasos. Se calculó que al menos 50 por ciento de los fosfolípidos se convirtieron en lisofosfolípidos en el método inventivo. La fosfolipasa usada en el método inventivo (LECITASE® Ultra) actúa sobre los fosfolípidos (fosfatidas, lecitinas) como fosfolipasa de tipo A1 para dar el correspondiente liso-1-fosfolípido mas ácido graso libre (FFA, por sus siglas en inglés), mientras que la fosfolipasa usada en el método de la técnica anterior (MAXAPAL A2™) es una fosfolipasa A2 (fosfatida-2-acil-hidrolasa, E.C. 3.1.1.4) purificada que actúa sobre los fosfolípidos para generar la hidrólisis parcial de los fosfolípidos para obtener mejor unas propiedades de emulsión de los fosfolípidos mejoradas.

Como se puede ver en la tabla anterior, la LECITASE® Ultra generó dos ácidos grasos libres predominantemente saturados; hexadecanoico 16:0 (12133 ppm) y octadecanoico 18:0 (5554 ppm). El MAXAPAL A2™ generó dos ácidos grasos (R1) libres predominantemente insaturados: octadecenoico 18:1 (12189 ppm) y octadecadienoico 18:2 (8315 ppm). Es bien sabido que los ácidos grasos libres insaturados son más susceptibles a la oxidación que los mismos ácidos grasos unidos a glicéridos; por lo tanto, el producto inventivo es más estable a la oxidación, rancidez y generación de mal sabor que las yemas de huevo tratadas con fosfolipasas de tipo PLA2.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra adicionalmente que el tratamiento con enzimas simultáneo del método inventivo da un producto diferente y superior con una textura única en comparación con el producto de huevo tratado producido por el tratamiento con enzimas secuencial de la referencia JP2002233334, incluso cuando se usan las mismas enzimas preferidas en ambos métodos. Se preparó una composición de yema de huevo tratada según el tratamiento con enzimas secuencial descrito en el documento JP2002233334, como se describe anteriormente.

Se separaron de las claras yemas de huevo de huevos enteros. Se combinaron 2 partes de yema de huevo con una parte de agua y se mezclaron para proporcionar una suspensión de yema de huevo no salada. Esta suspensión de yema de huevo se pasteurizó a 64,5°C durante 3,5 minutos y después se enfrió hasta 45°C. Se añadieron 11,8 LU/g de fosfolipasa LECITASE® Ultra a la suspensión de yema de huevo y se incubó durante una hora antes de añadir 0,2 LAPU/g de yema de huevo de proteasa FLAVOURZYME™ y se incubó durante 2 horas adicionales. Después la muestra se enfrió en un baño de hielo y agua.

La composición de yema tratada (en lo sucesivo muestra "5R") se analizó después usando el Agilent 2100 Bioanalyzer como se describe previamente en los Ejemplos 1 y 2, y se comparó con la muestra "1R" del Ejemplo 2. Como se muestra en la FIG. 4, aunque hay varios picos en posiciones similares, la intensidad de los picos es muy diferente, siendo la intensidad de los picos para la muestra inventiva calentada (1R) generalmente mayor que los picos correspondientes en la muestra 5R.

La viscosidad de cada muestra de yema tratada se midió después usando un viscosímetro Haake VT550 (Haake USA, Paramus, NJ) para demostrar adicionalmente que los diferentes métodos dan productos que tienen diferentes características texturales. La muestra de la técnica anterior tenía una viscosidad mucho más baja que la muestra inventiva. Los datos de proteínas y datos de viscosidad demuestran además que las diferencias de composición entre la muestra inventiva calentada (1R) y la muestra de la técnica anterior (5R) preparadas con las enzimas preferidas dan productos con diferentes características texturales.

	Muestra 1R	Muestra 5R
Viscosidad (unidades Haake)	200	153
pH/TA	5,73/0,96	5,93/0,58

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra adicionalmente que el tratamiento con enzimas simultáneo del método inventivo da un producto diferente y superior con una textura única y un perfil de sabores natural en comparación con yema de huevo tratada secuencialmente con las mismas enzimas. En este ejemplo, se prepararon composiciones de yema de huevo tratada como se resume en la tabla a continuación y como se explica en mayor detalle a continuación.

	Método simultáneo (Inventivo)	Método secuencial A (Comparativo)	Método secuencial B (Comparativo)
Fosfolipasa LECITASE® Ultra	3,0 horas	3,0 horas	1,5 horas
Proteasa FLAVOURZYME		1,5 horas	1,5 horas

A) Tratamiento con enzimas simultáneo (Método Inventivo)

5 Se precalentó a 50°C yema de huevo líquida prepasteurizada, con 10 por ciento de sal (Rose Acres Farms, Seymour, IN). Después se añadieron 10 LU/g de fosfolipasa LECITASE® Ultra y 0,5 LAPU/g de proteasa FLAVOURZYME™ a la yema de huevo líquida, y la mezcla se incubó a 50°C durante 3 horas. Después, la yema de huevo tratada se calentó a 76°C durante 10 minutos.

B) Tratamiento con enzimas secuencial (Método Comparativo A)

10 Se precalentó a 50°C yema de huevo líquida prepasteurizada, con 10 por ciento de sal. Después se añadieron 10 LU/g de fosfolipasa LECITASE® Ultra a la yema de huevo líquida y se incubó a 50°C durante 1,5 horas. Después se añadieron 0,5 LAPU/g de proteasa FLAVOURZYME™ a la mezcla y se incubó durante 1,5 horas adicionales a 50°C. Después la yema de huevo tratada se calentó a 76°C durante 10 minutos.

C) Tratamiento con enzimas secuencial (Método Comparativo B)

15 Se precalentó a 50°C yema de huevo líquida prepasteurizada, con 10 por ciento de sal. Después se añadieron 10 LU/g de fosfolipasa LECITASE® Ultra a la yema de huevo líquida, y se incubó a 50°C durante 1,5 horas. Después la mezcla se calentó a 160°C durante 16 segundos para inactivar la enzima fosfolipasa. Después se añadieron 0,5 LAPU/g de FLAVOURZYME y se incubó durante 1,5 horas a 50°C. Después la yema de huevo tratada se calentó a 76°C durante 10 minutos.

Las yemas de huevo tratadas del método simultáneo inventivo y de ambos métodos secuenciales comparativos se usaron después para preparar lotes independientes de mayonesa como se preparan en el Ejemplo 2.

20 Análisis de viscosidad

La viscosidad (tensión de deformación) se analizó usando un viscosímetro Haake VT550 (Haake USA, Paramus, NJ) para cada lote de mayonesa preparado con yema de huevo del método simultáneo inventivo y los métodos secuenciales comparativos.

Muestra	Viscosidad de la mayonesa (Haake)
Método simultáneo (Inventivo)	170
Método secuencial A (Comparativo)	104
Método secuencial B (Comparativo)	97

25 El experimento mostró sorprendentemente que la mayonesa preparada con la yema de huevo tratada del método simultáneo inventivo tenía una viscosidad aumentada frente a la mayonesa preparada con la yema de huevo tratada de los métodos comparativos, incluso cuando se usan las mismas enzimas en cada experimento.

Análisis del sabor

30 A un experto en sabores acreditado con extensa experiencia en el campo del análisis del sabor del huevo se le presentaron las muestras en un orden ciego y aleatorio. El experto en sabores evaluó las muestras usando análisis descriptivo basado en los atributos de calidad de huevo, rigidez, malos sabores, amargor, oleosidad y sabor preferido global de la mayonesa. Los comentarios del experto se proporcionan en la tabla a continuación.

Muestra	Datos sensoriales
Método simultáneo (Inventivo)	Más espesa, más calidad de huevo
Método secuencial A (Comparativo)	- Fina, agria, ácida, con sabor a limón - Inferior en textura y sabor a huevo comparada con la muestra inventiva

Muestra	Datos sensoriales
Método secuencial B (Comparativo)	• Textura más fina inaceptable • Más láctea que la muestra inventiva simultánea pero con menos cualidad de huevo • Inferior en textura y sabor a huevo comparada con la muestra inventiva

Los datos sensoriales indicaron diferencias significativas entre las tres muestras de mayonesa. Según el experto en sabores, la mayonesa preparada con la yema de huevo tratada del método simultáneo inventivo tenía una textura más espesa y más sabor a huevo en comparación con las muestras comparativas preparadas con yema de huevo tratada del método secuencial. La mayonesa preparada con la yema de huevo tratada del método secuencial comparativo A tenía una consistencia fina, y un sabor agrio, ácido, a limón. La mayonesa preparada con la yema de huevo tratada del método secuencial comparativo B tenía una textura más fina, inaceptable. Aunque la mayonesa del método comparativo B tenía más sabor lácteo que la muestra inventiva simultánea, la mayonesa tenía menos sabor a huevo. Según el experto en sabores, ambas muestras de mayonesa preparadas con huevo tratado de los métodos secuenciales comparativos eran inferiores tanto en textura como en sabor a huevo en comparación con la muestra de mayonesa preparada con yema tratada del método simultáneo inventivo.

Análisis de proteínas

Se preparó cada muestra (n=8) con el Kit Agilent Protein 230 como se describió previamente en el Ejemplo 1. Los datos electroforéticos adquiridos con el Agilent 2100 Bionalyzer demuestran además las diferencias de composición (es decir, proteicas) en cada una de las composiciones de yema de huevo producidas por el método simultáneo inventivo y los métodos secuenciales comparativos. Como se muestra en los datos electroforéticos en la FIG. 5, las muestras del método simultáneo inventivo y los métodos secuenciales comparativos muestran similares posiciones de picos pero diferencias sustanciales en las intensidades de los picos. La muestra derivada del método comparativo B tenía las intensidades de picos más bajas. La muestra derivada del método comparativo A tenía picos con intensidad intermedia en comparación con los picos de la muestra del método simultáneo inventivo y la muestra del método comparativo B. Se cree que las diferencias en la intensidad de los picos explican las diferencias en los datos sensoriales y de viscosidad.

Aunque la invención se ha descrito en términos de las realizaciones preferidas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede poner en práctica con modificaciones dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de yema de huevo tratada que tiene sabor a huevo y funcionalidad mejorados, método que comprende:

(1) formar una mezcla de yema de huevo líquida; y

5 (2) tratar simultáneamente la mezcla de yema de huevo con enzimas fosfolipasa y proteasa durante un tiempo y a una temperatura eficaces para escindir las proteínas en la yema para proporcionar una mezcla de péptidos que comprende al menos 6000 ppm de péptidos menores que 13 kDa, al menos 2500 ppm de péptidos de 14 a 105 kDa, y menos que 2500 ppm de péptidos de 106 a 240 kDa, y eficaces para que la fosfolipasa convierta al menos 50 por
10 ciento de los fosfolípidos en la mezcla de yema en lisofosfolípidos para proporcionar la composición de yema de huevo tratada.

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el método comprende además calentar la composición de yema de huevo tratada a una temperatura eficaz para inactivar las enzimas y pasteurizar la composición de yema de huevo después de la compleción del tratamiento de la etapa (2), y enfriar la composición de yema tratada después del tratamiento con calor.

15 3. Un método para preparar una composición alimenticia aromatizada con huevo, método que comprende combinar (1) una preparación alimenticia a ser aromatizada con huevo y (2) una composición aromatizante de huevo para comunicar el sabor del huevo, **caracterizada porque** la composición aromatizante de huevo comprende una composición de yema de huevo tratada obtenida por el método según las reivindicaciones 1 o 2.

20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de tratamiento con enzimas se lleva a cabo a 40 a 60°C durante 1 a 6 horas.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la mezcla de yema de huevo acuosa comprende 2 a 10 por ciento de sal.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la fosfolipasa es una enzima fosfolipasa A1.

25 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la mezcla de péptidos comprende al menos 7000 ppm de péptidos menores que 13 kDa, al menos 3000 ppm de péptidos de 14 a 105 kDa, y menos que 1000 ppm de péptidos de 106 kDa a 240 kDa.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el método comprende además precalentar la mezcla de yema de huevo a una temperatura de 40 a 60°C antes de la etapa (2).

30 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el método comprende además calentar la composición de yema de huevo tratada a una temperatura eficaz para inactivar las enzimas y pasteurizar la composición de yema de huevo después de la compleción del tratamiento de la etapa (2).

10. El método según la reivindicación 3, **caracterizado porque** la preparación alimenticia se selecciona del grupo que consiste en mayonesa, aderezo para ensalada, pan, natillas, pastel y tarta.

35 11. El método según la reivindicación 3, **caracterizado porque** la composición aromatizante de huevo se combina con la preparación alimenticia en una cantidad de 30 a 75 por ciento de la cantidad de huevo entero o yema de huevo usada normalmente en la preparación alimenticia.

40 12. Una composición aromatizante de alimentos para comunicar sabor a huevo y funcionalidad aumentados, comprendiendo la composición aromatizante lisofosfolípidos y una mezcla de péptidos de yema de huevo, comprendiendo la mezcla de péptidos de yema de huevo al menos 6000 ppm de péptidos menores que 13 kDa, al menos 2500 ppm de péptidos de 14 a 105 kDa, y menos que 2500 ppm de péptidos de 106 a 240 kDa, en donde la composición aromatizante es obtenible por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 4 a 9.

13. Uso de la composición aromatizante de alimentos de la reivindicación 12 para comunicar el sabor y funcionalidad del huevo en un producto alimenticio.

45 14. La composición o uso según la reivindicación 12 o 13, en donde la mezcla de péptidos comprende al menos 7000 ppm de péptidos menores que 13 kDa, 3000 ppm de péptidos de 14 a 105 kDa, y menos que 1000 ppm de péptidos de 106 kDa a 240 kDa.

15. La composición o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14, en donde el producto alimenticio o composición comprende una emulsión continua en agua que tiene un contenido de lípidos de 5 a 80 por ciento.

50 16. La composición o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizados porque** el producto alimenticio o composición se selecciona del grupo que consiste en mayonesa y aderezo para ensalada.

17. La composición o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizados porque** el producto alimenticio o composición comprende la composición de yema de huevo tratada en una cantidad de 30 a 75 por ciento de la cantidad de huevo entero o yema de huevo usada normalmente en el producto alimenticio.

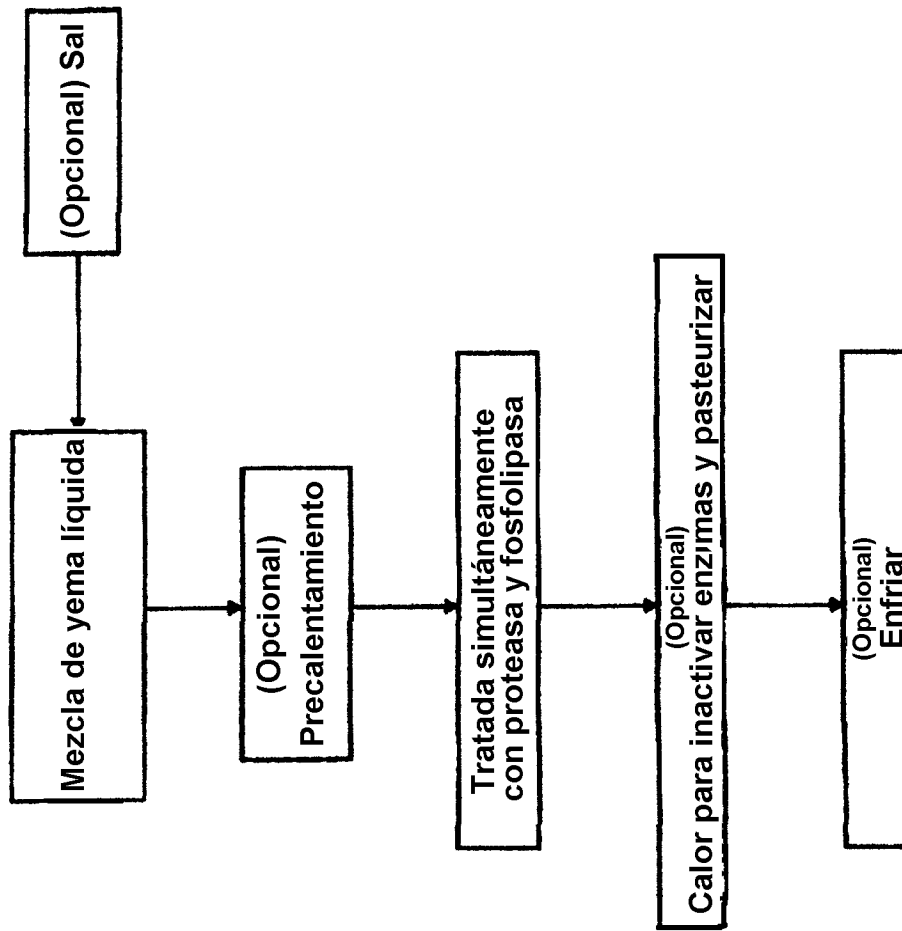


Figura 1

Figura 2

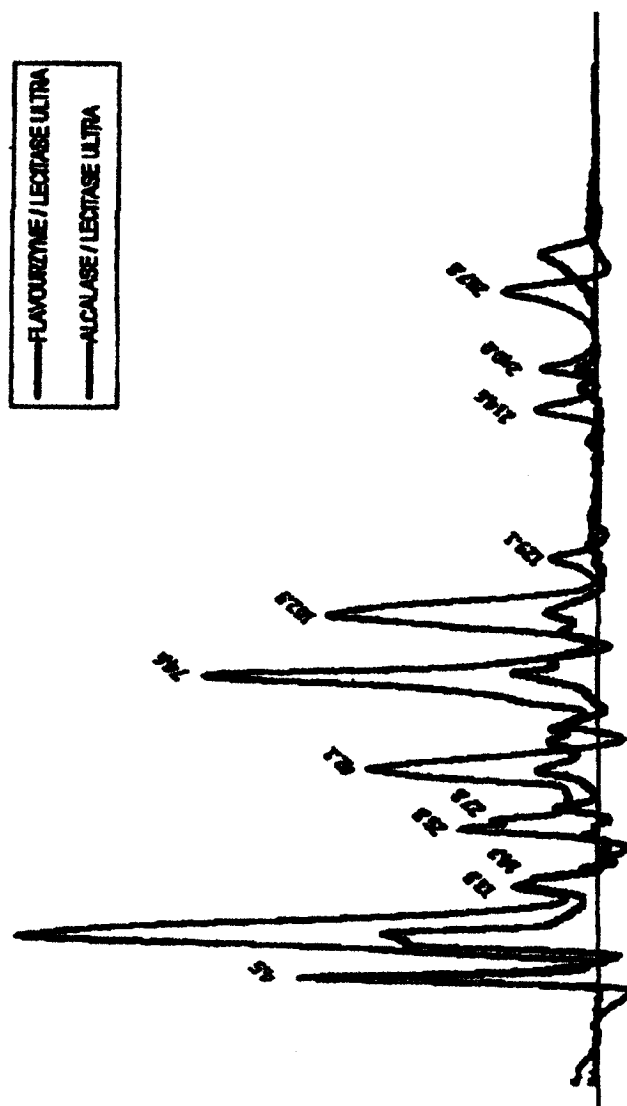


Figura 3(A)

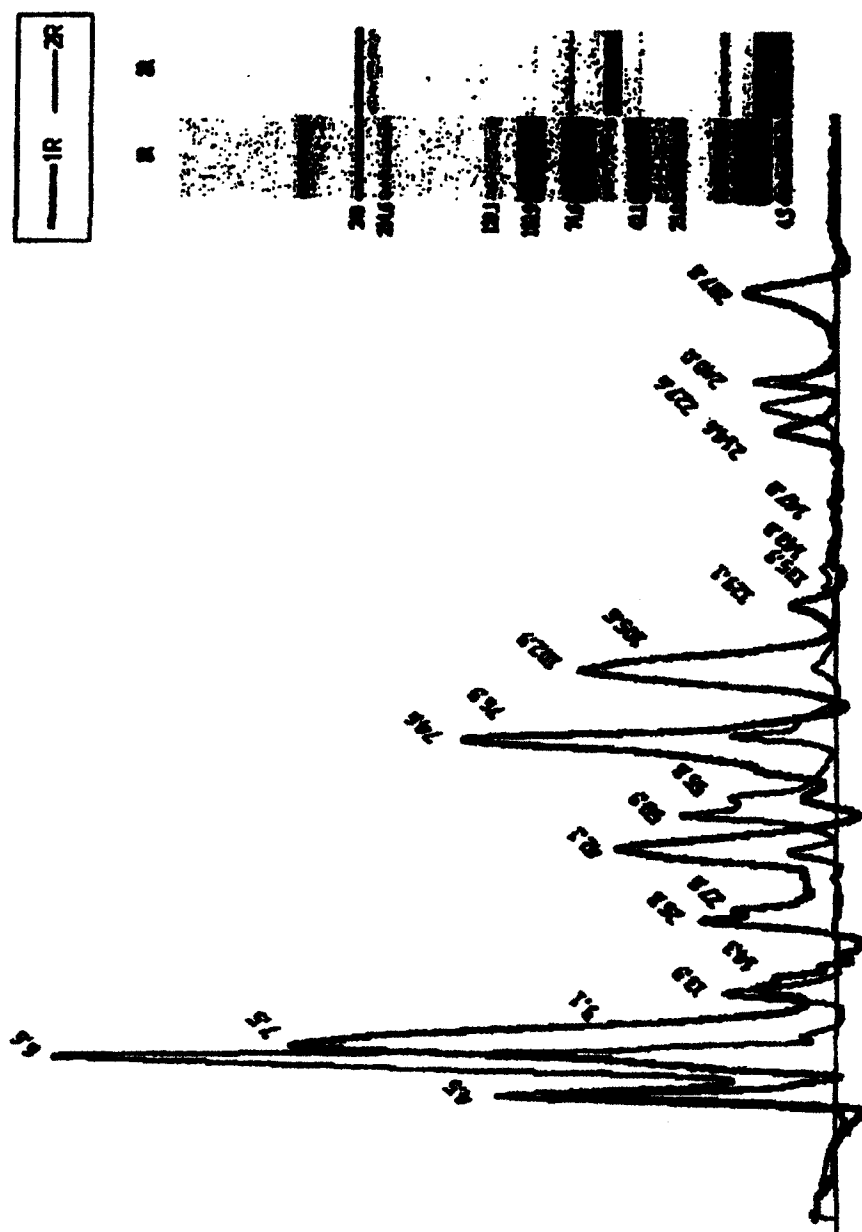


Figura 3(B)

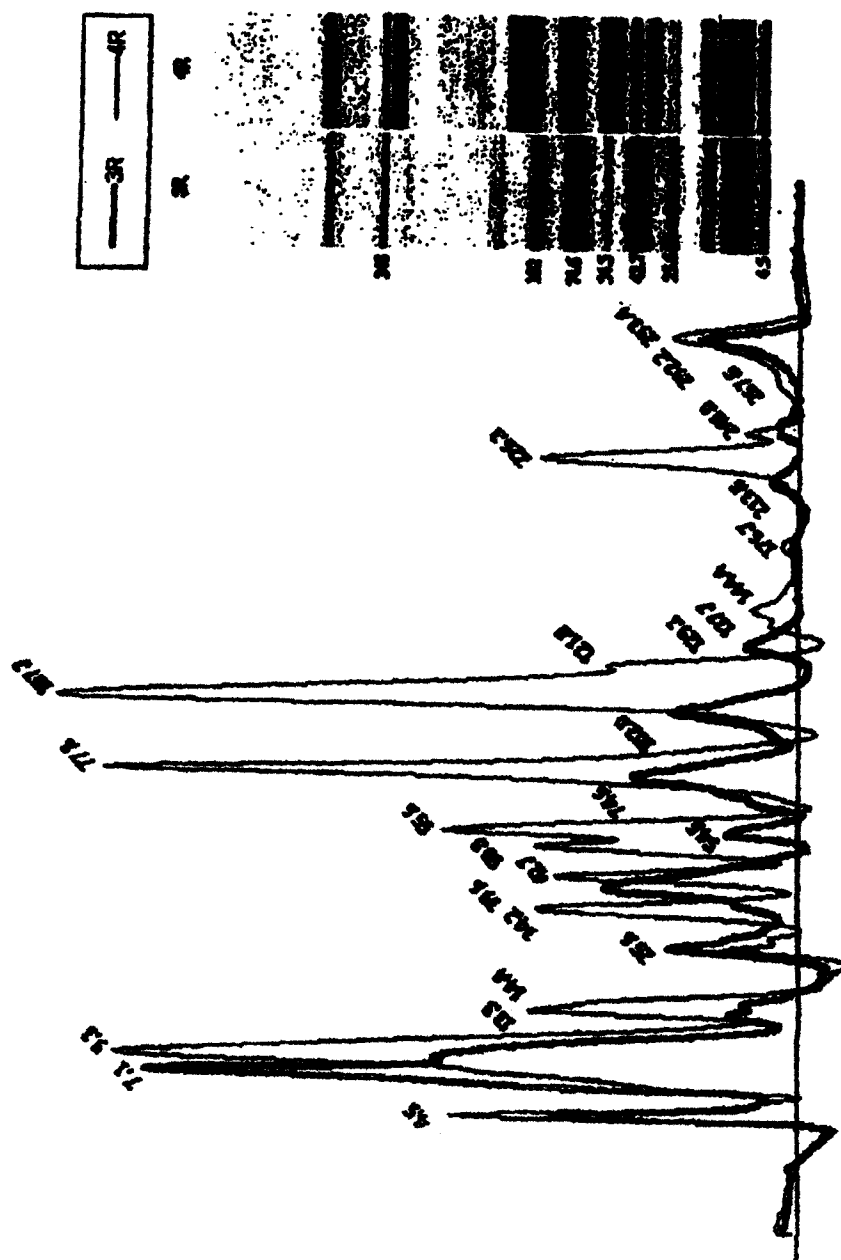


Figura 3(C)

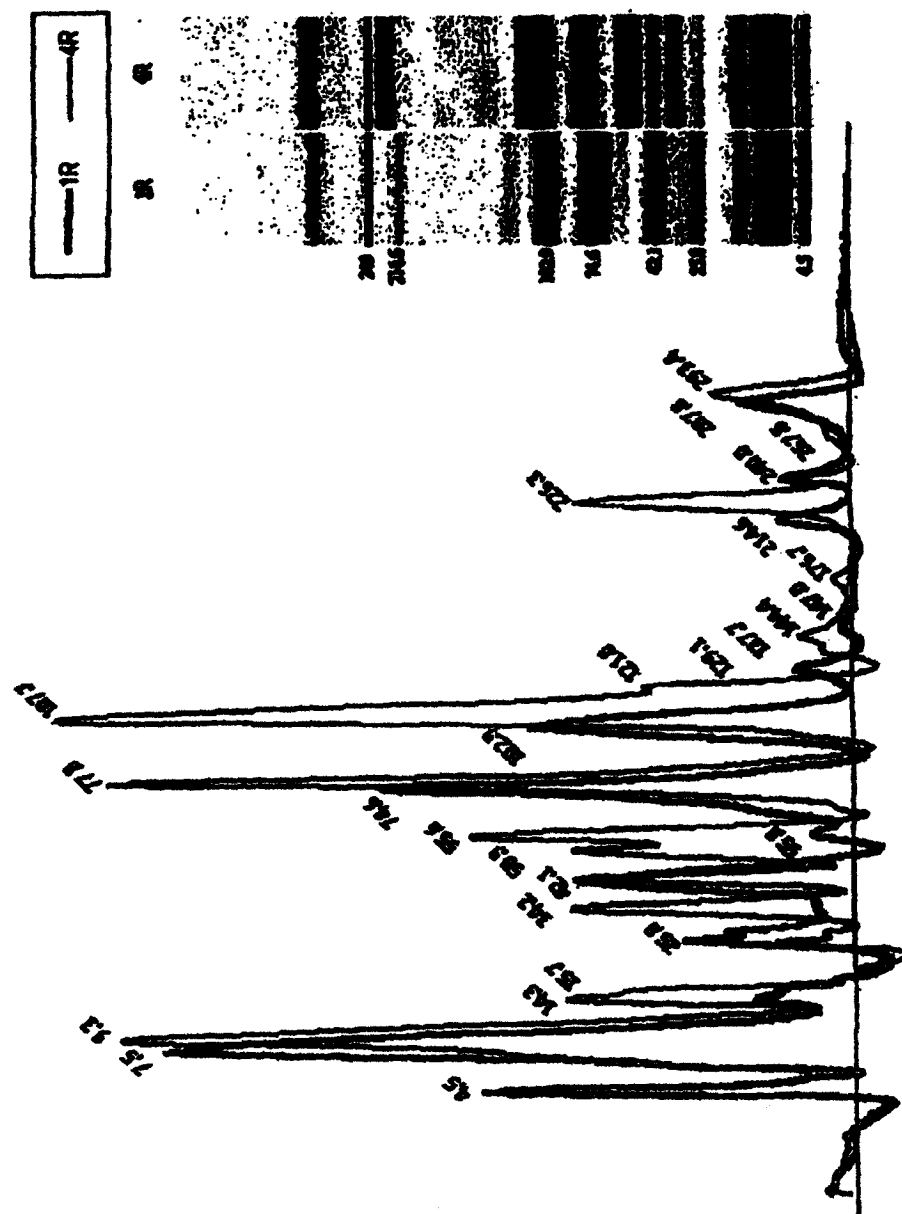


Figura 4

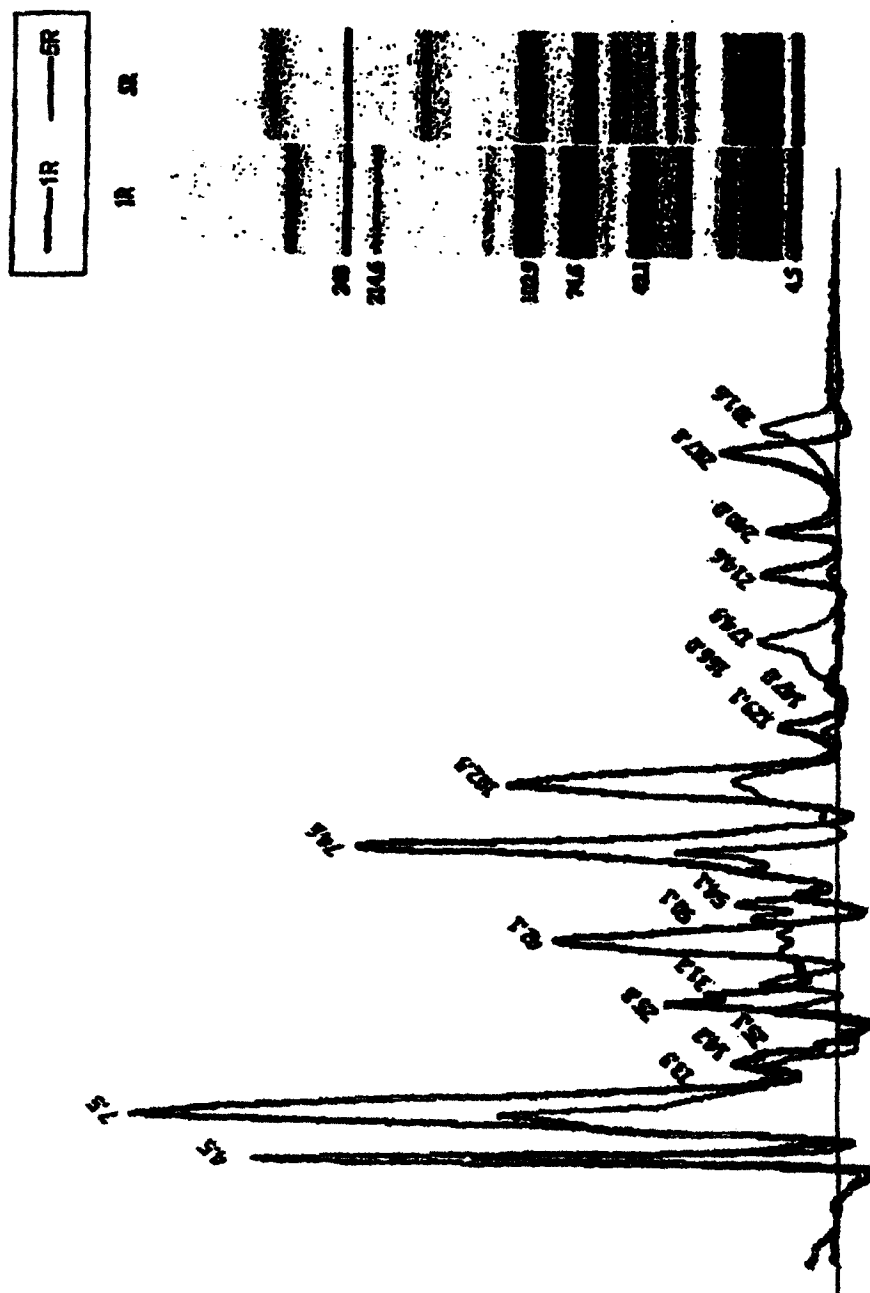


Figura 5

