

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 209**

51 Int. Cl.:

C09K 15/34 (2006.01)
A23B 7/015 (2006.01)
A23B 7/05 (2006.01)
A23L 3/32 (2006.01)
A23L 3/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08835268 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2201084**

54 Título: **Método para la conservación de un material vegetal**

30 Prioridad:

04.10.2007 SE 0702223

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2013

73 Titular/es:

DEJMEK, PETR (25.0%)
Marieholmsvägen 18
21763 Malmö, SE;
SJÖHOLM, INGEGERD (25.0%);
GALINDO, FEDERICO GÓMEZ (25.0%) y
PHOON, PUI YEU (25.0%)

72 Inventor/es:

DEJMEK, PETR;
SJÖHOLM, INGEGERD;
GALINDO, FEDERICO GÓMEZ y
PHOON, PUI YEU

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 416 209 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

Método para la conservación de un material vegetal

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a un método de congelación de un producto alimenticio vegetal que comprende los pasos de: proporcionar un material alimenticio vegetal que comprenda al menos un 70% de agua, aplicar un campo eléctrico pulsado a dicho material alimenticio vegetal, exponer dicho material vegetal a una solución de un agente crioprotector, aplicar presión a dicho material alimenticio vegetal y solución seguida de un período de reposo de al menos 30 minutos, y congelar dicho material alimenticio vegetal. De este modo, es posible por primera vez conservar un material alimenticio vegetal y mantener tanto la textura como el sabor del material alimenticio vegetal.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se dispone de un gran número de técnicas diferentes para conservar alimentos vegetales con el fin de hacer que la experiencia de comer sea más placentera o saludable para seres humanos o animales. La mejora puede incluir una serie de modificaciones de las propiedades del alimento vegetal tales como, por ejemplo, el realce o mantenimiento del aroma, textura, humedad, color, valor nutricional y/o apariencia.

- 15 La congelación no ha sido adecuada en la gestión de la cadena del frío para una amplia gama de alimentos vegetales. Cuando se descongelan, estos alimentos vegetales pueden perder tanto la textura como el sabor y, en ocasiones, también pierden agua, lo que da como un resultado un producto alimenticio muy alejado de lo que se entiende comúnmente por fresco. Ciertas frutas y verduras tienen un alto contenido de agua y dicha agua formará cristales al congelarse los cuales más adelante, cuando el material vegetal se descongele, harán que el material vegetal se deteriore. El daño estructural ocurre debido a la rotura de las células tras la formación de los cristales de hielo. La pérdida de color, textura e integridad estructural son por tanto comunes en la descongelación. Esto da como resultado una apariencia poco atractiva de las verduras y frutas congeladas-descongeladas, disminuyendo su valor de mercado y también puede implicar la pérdida de nutrientes, etc.

- 25 En la bibliografía se conocen diferentes métodos para el tratamiento de alimentos vegetales, los siguientes son algunos ejemplos.

El documento EP0266141 describe un método para minimizar la inestabilidad de la textura de un producto alimenticio que comprende la impregnación de los espacios intracelulares y/o intersticiales del alimento con una solución coloidea que puede gelificar utilizando infusión al vacío o inyección a presión. Después de la infusión se deja que el gel gelifique.

- 30 El documento US2006110504 describe un método para mejorar las propiedades de un alimento por electroporación del alimento utilizando pulsos eléctricos. Los pulsos son pulsos de alto voltaje y el alimento contiene células que, como consecuencia de la electroporación, se vuelven permeables. El alimento se expone a agentes alimenticios, los cuales se difunden hasta el interior de las células del alimento y mejoran las propiedades del alimento, cuando los gradientes de potencial eléctrico en el alimento son de aproximadamente 700 V/cm. La mejora concierne al aroma, ternura, sabor y textura.

35 El documento WO 03/055320 describe un proceso para mejorar las propiedades de las verduras cuando se congelan para el consumo. El proceso implica el escaldado de la verdura, infiltración con una solución de AFP (proteínas anticongelantes) y congelación.

- 40 El documento US 2 702 248 describe un método para conservar manzanas y particularmente el tratamiento de manzanas con soluciones de azúcar para mejorar la textura de la manzana.

El documento WO 2006/121397 describe un proceso para el tratamiento continuo de material celular vegetal con un campo eléctrico. El proceso provoca la formación de poros en las membranas celulares del material celular vegetal, es decir, la electroporación. El proceso de electroporación fomenta la transferencia de masa de las sustancias intracelulares en el material celular vegetal.

- 45 Sin embargo, es deseable disponer de un método mejorado para mejorar las propiedades del alimento vegetal y también productos alimenticios con propiedades mejoradas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a un material alimenticio vegetal mejorado, donde dicha mejora da pie a la posibilidad de conservar el material vegetal congelado y donde el material alimenticio vegetal conserva la textura así como el sabor tras la descongelación, es decir, el material alimenticio vegetal es tolerante a la congelación. La cristalización está implicada en el daño a la membrana, en una capacidad reducida de retención de agua, en la pérdida de nutrientes, la oxidación de lípidos así como la aparición de aromas desagradables. Influencias, las cuales tras la descongelación, dan lugar a un material alimenticio vegetal que tiene, entre otras cosas, una textura y un sabor desagradables.

10 La presente invención se refiere a un método de congelación de un producto alimenticio vegetal que comprende los pasos de: proporcionar un material alimenticio vegetal que comprenda al menos un 70% de agua (p/p), aplicar un campo eléctrico pulsado a dicho material alimenticio vegetal, exponer dicho material vegetal a una solución de un agente crioprotector, aplicar vacío o presión a dicho material alimenticio vegetal y solución seguida de un período de reposo de al menos 30 minutos, y congelar dicho material alimenticio vegetal.

15 También se describe un material alimenticio vegetal que comprende al menos un agente crioprotector presente en el espacio intracelular de las células de dicha planta. El material alimenticio vegetal conservará tanto un sabor como una textura agradables después de ser congelado y descongelado.

En la descripción detallada de las realizaciones de la invención se describirán en más detalle objetos y ventajas adicionales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 muestra un diagrama simplificado del diseño del tratamiento con PEF (campo eléctrico pulsado). Se aplicaron diez secuencias de pulsos de campo eléctrico rectangulares y bipolares con una intensidad de campo eléctrico nominal de 580 V/cm tal como se describe en la Sección 2. Las características de los pulsos se muestran en la figura.

25 La Figura 2 muestra la recuperación de las hojas de espinaca sometidas a campos eléctricos pulsados (PEF, por sus siglas en inglés). El eje "y" es una representación de la conductividad del tejido. Cuando se aplica el PEF sobre las hojas de espinacas (flecha), la apertura de poros en la membrana hace que el contenido celular se filtre, lo que aumenta la conductividad del tejido. Tras varios minutos, la conductividad vuelve a su valor original, lo que indica que las células se están recuperando. Durante este proceso de recuperación, las células recaptarán el líquido que hayan perdido. La figura también muestra que, en los experimentos realizados, las hojas con una resistencia eléctrica inicial elevada no disponían de la capacidad de recuperarse. Estas hojas no sobrevivieron al ciclo de congelación/descongelación, lo que subraya la importancia del proceso de recuperación para el éxito de este procedimiento que tiene como objeto proporcionar tolerancia a la congelación a las hojas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

35 Se describe un material alimenticio vegetal mejorado que tolera la congelación, es decir, conserva tanto un sabor como una textura agradables tras ser congelado y descongelado.

El material alimenticio vegetal de acuerdo con la presente invención comprende al menos un agente crioprotector presente en el espacio intracelular de las células de dicha planta. Dicho agente o agentes crioprotectores se seleccionan a partir del grupo constituido por carbohidratos y proteínas crioprotectores.

40 Se pretende que la expresión "agente crioprotector" se refiera a un agente, el cual protege el material vegetal durante la congelación de tal modo que tanto la textura como el sabor del material vegetal se mantengan agradables. El agente crioprotector también puede ser una proteína anticongelante, siempre y cuando esta actúe para impedir que el material alimenticio vegetal, tras ser congelado y descongelado, adquiera un mal sabor así como una estructura desagradable. Dichos carbohidratos crioprotectores se pueden seleccionar a partir del grupo constituido por sacarosa, trehalosa, maltosa y lactosa, y puede ser igualmente una proteína anticongelante. También puede estar constituido por una mezcla de agentes crioprotectores y proteínas anticongelantes. Algunos ejemplos sin carácter limitante de agentes crioprotectores son las proteínas crioprotectoras, la trehalosa, glucosa y otros azúcares, glicoles y otros alcoholes que contengan al menos dos grupos hidroxilo y sulfóxido de dimetilo.

50 Un ejemplo es la trehalosa. La trehalosa, cuya capacidad edulcorante equivale tan solo al 45% de la de la sacarosa, no es probable que afecte de manera adversa al sabor del tejido vegetal. Es más, la alta estabilidad de la trehalosa durante el proceso, debida a su singular estructura química, sugiere que no es muy probable que se degrade

durante el proceso en el que se incorpora al tejido vegetal. Otras ventajas de la trehalosa son sus propiedades para retener el agua, su atoxicidad, sus potentes propiedades vitrificantes, sus propiedades protectoras de la membrana y proteínas, y sus propiedades antioxidantes.

5 La expresión "proteína anticongelante (AFP por sus siglas en inglés)", que es un agente crioprotector, se refiere a proteínas producidas por ciertos vertebrados, plantas, hongos y bacterias. Las proteínas anticongelante se unen a los cristales de hielo pequeños para inhibir el crecimiento y recristalización que, de otro modo, serían letales. Algunos ejemplos sin carácter limitante de proteínas anticongelantes son las AFP de peces tales como las glucoproteínas anticongelantes y AFP de los tipos I-IV, AFP de insectos tales como la AFP de tipo V y AFP de plantas.

10 La concentración del agente crioprotector en la solución se puede seleccionar entre cualquier concentración adecuada dependiendo del agente que se vaya a usar, el tejido vegetal que se vaya a tratar, los diferentes campos eléctricos y otros parámetros de procesamiento usados. Por ejemplo, la concentración de trehalosa en la solución puede estar en el intervalo de aproximadamente un 10-60% p/p, tal como aproximadamente un 20-50% p/p, tal como aproximadamente un 40% p/p. Otros ejemplos incluyen un 10-15% p/p, tal como un 11, 12, 13 o 14%. Otros ejemplos incluyen una mezcla de trehalosa y una proteína anticongelante (AFP), donde la trehalosa está presente en una cantidad de aproximadamente un 10-15% p/p y la AFP en un 0,03-0,5%, tal como trehalosa en una cantidad de un 12% y AFP en una cantidad de un 0,2%.

El material vegetal

20 El material alimenticio vegetal, también denominado tejido vegetal, al cual es posible proteger de la pérdida de la estructura al ser congelado, es un material alimenticio vegetal que comprende al menos un 70% (p/p) de agua. Por ejemplo, un 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 90% o 95% (p/p) de agua. El agua, que forma cristales al ser congelada, destruye varios componentes del material vegetal, incluidas las membranas. Algunos ejemplos de materiales alimenticios vegetales son las frutas, bayas, verduras, hierbas, tubérculos y granos, todos ellos con un elevado contenido en agua. Algunos ejemplos específicos son la espinaca, ensalada, fresa, frambuesa, manzana, mango, papaya, guayaba, plátano o mora.

La expresión "espacios intracelulares" se refiere al espacio dentro de la membrana celular de las células del tejido vegetal. Normalmente, el espacio intracelular está lleno de agua que comprende sales y otros ingredientes.

30 La expresión "espacios extracelulares" se refiere al espacio exterior a las células y al espacio que está entre las células del tejido vegetal. Normalmente, estos espacios están llenos de un líquido, pero en los tejidos vegetales pueden estar llenados, al menos parcialmente, de gas o aire.

El método

35 En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener el material alimenticio vegetal tal como se define anteriormente, donde se ha descubierto inesperadamente que la combinación de un campo eléctrico pulsado, es decir, la electroporación, de un material alimenticio vegetal con un tratamiento a presión o vacío puede fomentar eficazmente la transferencia de agentes crioprotectores al interior de los espacios intracelulares del material/tejido vegetal y donde hay un período de descanso de al menos 30 minutos antes de la congelación del material alimenticio vegetal.

40 Los materiales vegetales, tal como se han definido anteriormente, tienen un elevado contenido en agua la cual forma cristales al congelarse que cambian el sabor así como las estructuras de la membrana vegetal y hace que el material alimenticio vegetal se deteriore. Combinando un campo eléctrico de pulso controlado (PEF) con infiltración a vacío (VI, por sus siglas en inglés) es posible por primera vez transferir una solución crioprotectora al interior de las células del material vegetal y por tanto mejorar sustancialmente la tolerancia a la congelación de los materiales vegetales.

El tejido vegetal puede prepararse rebanándolo o troceándolo, dependiendo de su tamaño y naturaleza, antes de someterlo al método de las realizaciones de la invención.

45 El tejido vegetal se puede introducir en la solución que comprende el agente crioprotector de maneras diferentes, tales como, y a modo ejemplo, inmersión del tejido vegetal en la solución, pulverización de una solución sobre el tejido vegetal o baño del tejido vegetal en la solución. La solución puede ser una solución con una viscosidad elevada o baja o incluso una solución de tipo gel.

Aplicación de vacío o presión

50 El método comprende el paso de aplicar vacío o presión al tejido vegetal.

Aplicando vacío o presión, puede reducirse el volumen de aire presente normalmente en los espacios extracelulares del tejido vegetal. Este volumen de aire se puede reemplazar por una solución que contenga el agente crioprotector tal como se ha definido anteriormente.

- 5 Un ejemplo sin carácter limitante sobre cómo introducir el agente crioprotector en solución en los espacios extracelulares del material/tejido vegetal es un proceso denominado infusión a vacío. En la presente, la expresión “infusión a vacío” se refiere a un proceso donde la cantidad de aire en los espacios extracelulares de un tejido se disminuye aplicando vacío y a continuación se introduce una solución que comprende el agente crioprotector cuando se restaura la presión externa.

La infusión a vacío también se puede llamar impregnación a vacío o infiltración a vacío.

- 10 El proceso de infusión a vacío se puede llevar a cabo cuando el tejido vegetal se sumerge en una solución que contiene al menos un agente protector tal como se ha definido anteriormente.

De esta manera la solución puede rellenar de manera casi inmediata los espacios extracelulares.

- 15 Otro ejemplo sin carácter limitante sobre cómo introducir el agente crioprotector en los espacios extracelulares del tejido vegetal es un proceso denominado impregnación a presión. En la presente, la expresión “impregnación a presión” se refiere a un proceso donde se disminuye el volumen de aire en los espacios extracelulares de un tejido aplicando presión y se combina con la introducción de un agente crioprotector en solución, cuya introducción en los espacios se fuerza mediante presión. El proceso de impregnación a presión se puede llevar a cabo cuando el tejido vegetal se sumerge en una solución que contiene un agente crioprotector.

- 20 El proceso de impregnación a presión se puede llevar a cabo cuando el tejido vegetal se sumerge en una solución que contiene el agente crioprotector. De esta manera, la solución puede rellenar de manera inmediata el espacio extracelular.

- 25 El vacío o presión se pueden aplicar desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 60 minutos, una única vez o de manera repetida. El período de mantenimiento de la aplicación del vacío depende del tejido vegetal y de la solución del agente crioprotector que se va a usar en el método. Las porciones mayores de tejido pueden necesitar un período de mantenimiento mayor, mientras que las porciones menores o más delgadas de tejido pueden necesitar un período de mantenimiento menor. El período de mantenimiento debería conllevar una eliminación máxima del aire para facilitar un reemplazamiento máximo por parte del agente crioprotector en solución. Los ejemplos de períodos de tiempo incluyen 1-30 minutos, tal como 5-15 minutos.

- 30 La presión o vacío puede aplicarse mediante cualquier medio conocido. Hay muchos dispositivos disponibles y relativamente económicos los cuales pueden usarse en el método.

- 35 El proceso de infusión a vacío variará para cada tejido vegetal particular dependiendo de la geometría y estructura celular. Se puede usar un nivel bajo de vacío con un tejido vegetal que tenga una relación elevada entre el área superficial y el volumen, y con tejido vegetal con una elevada permeabilidad. El tejido se puede deteriorar por una tasa de aplicación del vacío o la presión demasiado rápida. El vacío que se va a aplicar puede estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,01 atm a aproximadamente 0,5 atm, tal como 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 atm (0,01 atm = 1 kPa). A modo de ejemplo, las fresas tienen una relación baja entre el área superficial y el volumen, y tienen una estructura celular la cual tiene una baja conductividad para la impregnación. En este caso particular puede requerirse un vacío mayor.

El tejido vegetal puede pelarse y cortarse en trozos con el fin de mejorar el proceso.

- 40 Aplicación de un campo eléctrico al tejido vegetal

- 45 El método comprende el paso de aplicar un campo eléctrico al tejido vegetal. El campo eléctrico se puede aplicar antes, después o simultáneamente a la aplicación de vacío. Aplicando un campo eléctrico, se puede conseguir la electroporación, lo que da como resultado la apertura de poros u otras rutas de transferencia de masa en las membranas celulares de las células del tejido vegetal. Estas aberturas se pueden utilizar para el movimiento de material dentro y/o fuera de las células. Las aberturas pueden ser transitorias (es decir, electroporación reversible), pero en muchas aplicaciones de la electroporación, la electroporación es irreversible. La electroporación reversible es un prerrequisito para la viabilidad celular. En el método de acuerdo con una de las realizaciones de la invención, se aplica el campo eléctrico de modo tal que se produzca una electroporación reversible.

- 50 El potencial eléctrico se puede aplicar en pulsos (campo eléctrico pulsado, PEF) en forma de pulsos bipolares o monopolares. La forma de los pulsos puede ser rectangular, exponencial, oscilatoria o pulsos inversos de carga

instantánea. Se puede usar un pulso rectangular bipolar, estos pulsos son eficaces desde un punto de vista energético y la inversión regular de la polaridad ejerce un estrés sobre la membrana celular, fomentando la electroporación.

5 Los factores a considerar para determinar las condiciones de campo eléctrico adecuadas pueden incluir propiedades eléctricas asociadas con la electroporación tales como las siguientes: intensidad del campo eléctrico, duración del pulso, número de pulsos y frecuencia de los pulsos. Otros factores pueden incluir propiedades físicas y/o químicas del tejido vegetal que se va a electroporar tales como una o más de las siguientes: volumen, contenido acuoso, pH, temperatura y conductividad.

10 Cuando se trata el tejido vegetal de acuerdo con una realización, las condiciones de campo eléctrico se seleccionan con el fin de conseguir un tejido vegetal con una mayoría de células en un estado viable. Las condiciones de campo eléctrico extremas, usadas con frecuencia en la técnica anterior, no son aplicables ya que podrían conllevar la muerte celular.

15 Además, las condiciones de tratamiento del campo eléctrico se pueden elegir de de manera que se consiga una electroporación reversible en al menos una parte de las células. El hecho de que la formación de poros sea reversible o irreversible depende de parámetros tales como la amplitud, longitud, forma y tasa de repetición de los pulsos además del tipo de célula y tejido.

Se pueden usar cualesquiera medios o dispositivos conocidos con el fin de lograr el campo eléctrico de acuerdo con las realizaciones. Las características específicas del campo eléctrico se pueden seleccionar dependiendo del tejido vegetal que se va a tratar.

20 La intensidad del campo eléctrico puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,010 a aproximadamente 10 kV/cm, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 kV/cm. Por ejemplo 200, 300, 400, 500 o 580 kV/cm. Un campo eléctrico demasiado fuerte puede causar la muerte celular y un campo eléctrico demasiado débil no induce la formación de poros. La elección de la intensidad puede depender de factores tales como el tamaño celular y la velocidad con la que se quiere conseguir un efecto.

25 La duración de los pulsos rectangulares puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 ms. Cuanto mayor sea la duración del pulso, mayor será el tiempo de carga de la membrana y más se fomentará la permeabilización, aunque a expensas de un posible perjuicio en la capacidad de la membrana de resellarse/recuperarse.

30 El campo eléctrico pulsado se puede aplicar en forma de aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 secuencias de pulsos separadas por intervalos de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 segundos. Los efectos térmicos se pueden minimizar dividiendo la duración del tratamiento. Un número elevado de secuencias de pulsos puede suponer un resellado más lento o unas etapas mayores de resellado y efectos memoria. Esto podría suponer un período mayor de tiempo disponible para el transporte de masa a través de las membranas celulares en distancias considerables y fomentar una mayor absorción de la solución. Sin embargo, un tiempo de tratamiento muy largo con numerosas secuencias de pulsos puede conllevar un filtrado excesivo de solutos y un daño fisiológico irreparable.

35 Se puede seleccionar la duración del período de las secuencias de pulsos en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 ms. Cuanto menor sea la duración de las secuencias de pulsos, mayor será la eficacia a la hora de conseguir el mismo grado de permeabilización de la membrana, aunque el pico final de permeabilización será menor, comparado con el obtenido con secuencias de pulsos más largas. Una célula que ha sufrido permeabilización en menor grado puede tener una mayor capacidad para resellarse y recuperarse en un tiempo más corto. Este sería un aspecto a tener en cuenta durante el tratamiento a presión o vacío, el tiempo que tardaría el agente en solución en alcanzar el espacio extracelular antes de que pudiera ser absorbido por las células durante la etapa del "efecto memoria".

40 El intervalo entre dos pulsos consecutivos se puede seleccionar entre aproximadamente 1 μ s y aproximadamente 10 s, dependiendo de lo que sea apropiado para el tejido vegetal particular que se va a tratar.

Combinación del tratamiento de campo eléctrico y la aplicación de vacío o presión

50 En un método de acuerdo con una realización, el tejido vegetal se trata con una combinación de un tratamiento de campo eléctrico y un tratamiento a presión o vacío. Este tratamiento ha dado lugar a resultados inesperadamente buenos con una penetración elevada del agente en las células del tejido vegetal. Con este método, todas las células del tejido se tratarán de manera homogénea independientemente del grosor del tejido vegetal que se va a tratar.

En un método de acuerdo con una realización, el campo eléctrico se aplica en un paso anterior a la aplicación de vacío o presión. Mediante este tratamiento se puede conseguir una absorción celular continua mediante electroendocitosis en una escala de tiempo de minutos a horas en la que el gradiente transmembrana del agente actúa como un factor inductor.

- 5 Este método puede ser útil para tejidos vegetales que sean fisiológicamente débiles para soportar cambios metabólicos irreversibles debidos a un tratamiento de campo eléctrico, tales como tejidos vegetales delgados y de hoja, por ejemplo, las hojas de espinaca.

10 Una ventaja es que la relajación del tejido vegetal después del tratamiento a presión o vacío puede tener lugar simultáneamente con la recuperación celular del tratamiento de campo eléctrico, lo que conlleva un tiempo de tratamiento total menor.

15 En un método alternativo de acuerdo con una realización de la invención, el vacío o presión se aplican al tejido vegetal en un paso anterior a la aplicación del campo eléctrico. Mediante este tratamiento, la solución que contiene el agente se introducirá en los espacios extracelulares en primer lugar utilizando el vacío o presión seguido por el transporte inmediato al interior de las células durante el tratamiento eléctrico que provoca la electroporación reversible. Este método puede resultar útil para tejidos vegetales con una pequeña relación entre el área superficial y el volumen, tal como, y a modo de ejemplo, las fresas enteras.

Relajación y rehidratación

20 Después del tratamiento a presión o vacío, el tejido vegetal se someterá a un paso adicional donde el tejido vegetal se deja en la solución, o fuera de la solución, sin suministro ni consumo de energía, tal como se ha mencionado anteriormente. Este tratamiento se ha denominado en la presente “relajación” o “período de descanso”.

La relajación se puede llevar a cabo en cualquier tiempo apropiado comprendido entre aproximadamente 30 minutos y 5 horas, tal como 1, 2, 3 o 4 horas. La relajación se puede llevar a cabo en la misma solución utilizada en el tratamiento llevado a cabo previamente. La relajación también se puede llevar a cabo sin una solución y con el producto situado en un medio que comprenda aire o gas inerte, tal como nitrógeno, a presión ambiente.

25 Como alternativa a la relajación o en combinación con esta, el tejido vegetal se puede someter a un paso adicional donde el tejido vegetal se deja en agua sin suministro ni consumo de energía, tal como se ha mencionado anteriormente. Este tratamiento se denomina en la presente “rehidratación”. Mediante la rehidratación, las células del tejido vegetal pueden recuperar el agua perdida y alcanzar la turgencia de un tejido vegetal fresco. Este tratamiento puede ser particularmente útil para tejidos vegetales delgados y de hoja tal como, por ejemplo, la espinaca.

30 La rehidratación se puede llevar a cabo en un paso posterior a la relajación. El tiempo de tratamiento para la rehidratación puede estar comprendido entre aproximadamente 60 segundos y aproximadamente 48 horas. Los pasos de relajación y rehidratación pueden mejorar la viabilidad, estructura, textura, apariencia, etc., del tejido vegetal. La relajación y/o rehidratación se puede llevar a cabo antes de una congelación posterior.

35 Congelación

El tejido vegetal se puede congelar después de haberse tratado con el campo eléctrico y/o después de haberse tratado con presión o vacío.

40 El tejido vegetal se puede congelar hasta una temperatura inferior a aproximadamente -10 °C mediante cualesquiera medios adecuados disponibles. Algunos ejemplos sin carácter limitante son los congeladores convencionales, la inmersión en nitrógeno líquido, congelación con una corriente de aire o congelación a una presión elevada. Se puede utilizar una temperatura de congelador convencional de aproximadamente -18 °C así como otros medios de congelación con temperaturas inferiores a aproximadamente -20 °C tales como inferiores a -30 °C, -40 °C o inferiores a -50 °C.

45 Los medios para congelar el tejido vegetal y la velocidad de congelación se pueden elegir dependiendo del tejido específico que se va a tratar.

La siguiente es una descripción de uno o más ejemplos de la invención, aunque se pueden hacer modificaciones y mejoras adicionales sin alejarse del alcance de la invención. Se pretende que los ejemplos ilustren la invención pero sin limitarla de ninguna manera, modo ni forma, tanto explícita como implícitamente.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1**

Preparación de la muestra

5 Se trajeron hojas de espinaca frescas de los establecimientos de los supermercados ICA en Lund, Suecia, en forma de envases sellados de 150 g. Las muestras fueron originarias de Suecia, los Países Bajos, Italia y España. Los envases se colocaron en los estantes de verduras refrigerados de los supermercados. Después de la compra, se almacenaron en una cámara frigorífica (ambiente refrigerado manteniendo la temperatura a 4-8 °C). Se usaron las hojas envasadas dentro de su tiempo de vida útil, el cual estuvo comprendido entre 3-7 días antes de la fecha de caducidad.

10 Las muestras de hojas, incluidas las capas de la cutícula, tuvieron unas dimensiones de 3,0 cm (longitud) x 0,5 cm (anchura) x [0,05-0,07 cm] (grosor). Con una hoja de cuchillo afilada y una plantilla de cartón de 3,0 cm (longitud) x 0,5 (anchura) se cortó una muestra de una hoja (las muestras circulares se cortaron usando un descorazonador de manzanas con un diámetro de 1,5 cm). Para garantizar que el grosor de cada muestra de hoja fuera uniforme, se midió el grosor con calibradores vernier en 2-3 regiones diferentes. Se recogieron todas las muestras de hoja de
15 manera que no contuvieran ninguna vena central ni ninguna otra vena que sobresaliera, para mantener las superficies tan lisas como fuera posible.

La congelación y descongelación se llevaron a cabo tal como se describe a continuación con el fin de descubrir las condiciones útiles para el procedimiento completo tal como se describió anteriormente.

20 La congelación se llevó a cabo esencialmente por inmersión en nitrógeno líquido; en tanto que para minimizar el problema de la recristalización del hielo, se transfirió rápidamente la muestra congelada a agua a temperatura ambiente para que tuviera lugar una descongelación rápida. Las herramientas utilizadas en la congelación incluyeron dos electrodos de acero inoxidable, cada uno con un plano largo de 3,6 cm (longitud) x 0,9 cm (anchura), un clip metálico grande para sujetar papel y fórceps. Los electrodos fueron las "rebanadas" del sándwich. Se utilizó el clip para sujetar papel para asegurar el "sándwich", los fórceps para facilitar una inmersión rápida del "sándwich"
25 en el nitrógeno líquido durante la congelación y en el agua durante la descongelación. La muestra en el "sándwich" se manipuló de tal manera que no estuviera sometida a una compresión adicional.

Las condiciones de infusión a vacío, incluidos los períodos de mantenimiento del vacío, se analizaron tal como se describe a continuación con el fin de descubrir condiciones útiles para el procedimiento completo tal como se ha descrito anteriormente.

30 Se preparó una solución de trehalosa a una concentración de solubilidad máxima, la cual fue de 68,9 g de trehalosa/100 g de agua a 20 °C, es decir, aproximadamente un 40% p/v. Además, se constató de manera general que era mejor utilizar una solución con una concentración elevada, ya que una solución con una concentración baja puede tener una mayor tendencia a filtrarse a través de los poros abiertos durante la fase de relajación de la infusión a vacío, lo que por tanto da una ganancia de peso menor; mientras que una solución más concentrada no tiende a
35 fluir desde la matriz después de la penetración debido a su viscosidad moderadamente elevada.

Se evaluó el efecto de los diferentes períodos de mantenimiento del vacío sobre la fracción volumétrica de la solución de trehalosa ϕ_s que había penetrado en las hojas (%). Para comparar se utilizaron una solución isotónica de sacarosa (de Sigma) y una solución hipertónica de trehalosa (~40% p/v). La infusión a vacío se llevó a cabo de manera similar a las anteriores, en cada ocasión con tres o cuatro muestras que se pesaron previamente de manera colectiva. El período de mantenimiento del vacío se evaluó a 1, 3, 12 y 20 min. A la restauración total de la presión atmosférica siguió un período de relajación de 5 min en la misma solución. Después de la infusión a vacío y justo antes de la segunda pesada colectiva de las muestras, se eliminó rápidamente toda solución que estuviera adherida a la superficie de las muestras. A continuación, se secaron las muestras en el horno a 105 °C durante toda la noche, se enfriaron en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron colectivamente de nuevo. La diferencias de peso se utilizaron para determinar la ganancia sólida (GS%) y la fracción volumétrica de la solución de trehalosa ϕ_s que penetró en las hojas (%).
40
45

Finalmente, se llevó a cabo la infusión a vacío de la misma manera y con el período de mantenimiento del vacío determinado utilizando la solución de trehalosa de un ~40% (p/v), pero con un tiempo de relajación que fue lo suficientemente largo como para permitir que el tejido se recuperara del tratamiento de campo eléctrico pulsado. De manera similar se comprobó la penetración neta de la solución de trehalosa de un ~40% (p/v) tras el tiempo de relajación largo mediante los métodos combinados de secado en el horno y gravitacional, y donde se utilizaron las diferencias de pesada en el cálculo de la GS (%) y el ϕ_s (%). Para determinar la eficacia, se comparó la penetración neta con la porosidad eficaz de la hoja de espinaca.
50

Tabla 1: Utilizando solución de sacarosa isotónica de 11,5 °Bx, muestras holandesas

Período de mantenimiento (min)	φs medio en hoja (%)
3	21,9
12	22,3
20	22,6

Tabla 2: Utilizando una solución de trehalosa de un 40% (p/v), muestras italianas

Período de mantenimiento (min)	φs medio en hoja (%)
1	4,7
3	3,9
12	3,7

5

Tabla 3: Utilizando una solución de trehalosa de un 40% (p/v), muestras suecas

Período de mantenimiento (min)	φs medio en hoja (%)
12	10,1
20	13,0

10

No hubo un efecto aparente del período de aplicación evaluado sobre el grado de penetración de la solución cuando se utilizó la solución isotónica, remítase a las tablas 1-3. Esto aparentemente implicaba que ya se había alcanzado el equilibrio durante la fase de mantenimiento de la infusión a vacío y que se había retirado el máximo de aire de la matriz, en un intervalo tiempo tan corto como de 3 minutos o menos. Sin embargo, cuando se utilizó la solución hipertónica de trehalosa real, los φs medio condicionados por períodos de mantenimiento de 20 min fueron mayores que los condicionados por períodos de mantenimiento de 12 min. Por tanto, fijar el período de mantenimiento en 20 minutos podría proporcionar más fiabilidad a la hora de garantizar una eliminación máxima del aire de la matriz de la muestra, en presencia de una solución hipertónica.

15

La electroporación se llevó a cabo tal como se describe a continuación con el fin de determinar las condiciones útiles para la electroporación que se han de usar en el tratamiento a vacío y de electroporación tal como se describen anteriormente.

20

Se hizo un sándwich con una muestra de hoja, sin que esta se magullara, colocándola entre dos electrodos de acero inoxidable, cada uno con un plano largo de 3,6 cm (longitud) x 0,9 cm (anchura). Se colocó la muestra de tal manera que no se indujera un circuito cerrado durante el tratamiento de PEF. Se pegaron capas de cinta adhesiva Scotch (cinta Scotch@ Magic™) en el exterior del "sándwich" para minimizar la pérdida de agua por evaporación por parte de la muestra. El electroporador utilizado fue el CythorLab de Aditus™ y se programó por ordenador para que suministrara el tratamiento de pulso. Además, utilizando una herramienta de procesamiento de señales denominada secuencia de longitud máxima como pulso de medición, se programó el CythorLab para medir las fracciones separadas de reactancia y resistencia eléctrica de la muestra entre 10 Hz y 100 kHz antes, durante y después del tratamiento PEF. Eso fue así aunque solo se consideraron resultados en el marco de frecuencia de 3-10 kHz. Para la medición, el pulso de medición se fijó como un pulso bipolar con una amplitud de +1A y una longitud de secuencias de ondas de 131 ms. La velocidad del muestreo/medición mediante el pulso fue de 250 kHz. La combinación adecuada de parámetros de procesamiento abierto, es decir, la intensidad de campo eléctrico de los pulsos bipolares, longitud de la secuencia de pulsos, duración de la anchura del pulso y número de secuencias de electroporación se determinaron por prueba y error, y a continuación se utilizaron en el tratamiento de las muestras durante el ensayo real de la viabilidad de la congelación.

25

30

35

Se descubrió que los parámetros de tratamiento de PEF, con un intervalo de 10 s entre secuencias de pulsos, conllevaban lo siguiente: (i) una intensidad de campo de 580 V/cm; (ii) una anchura de pulso de 0,025 ms; (iii) una secuencia de pulsos de 20 ms y (iv) 10 electroporaciones (EP) de la secuencia de pulsos. Si únicamente se consideraran las muestras con un dG% (cambio en la conductancia en comparación con las medidas previas a la electroporación) comprendido en el intervalo del 20-45% inmediatamente posterior a la última EP, el cambio medio en el dY% (cambio en la admitancia en comparación con las medidas previas a la electroporación) tendría un valor tan alto como de un +110%.

5 En función de hojas de trabajo de Microsoft exhaustivas y preliminares de los resultados de las medidas de PEF (es decir, sujetas al tratamiento óptimo de PEF y que presentaban un dG% comprendido en el intervalo del 20-45% inmediatamente posterior a la última EP) obtenidos con cinco muestras de este tipo y con los controles (es decir, sin aplicar pulsos de permeabilización), se tabularon dY% y dB% (cambio en la susceptancia en comparación con las medidas previas a la electroporación) y se representaron a su vez en función del tiempo. Después de la última electroporación, tanto el dY% como el dB% o bien disminuyeron o bien se mantuvieron estables durante 5 min o menos antes de disminuir. El valor del min 25.º marca la restauración de la presión atmosférica, así como el comienzo del mecanismo hidrodinámico (MHD) de penetración en la matriz de la hoja debido al gran gradiente de presión. Se podría deducir a partir de las tendencias de las muestras que, 25 min después de la última electroporación, todavía tenía lugar una absorción considerable de la solución extracelular. Posteriormente, tras 2,5 h, el dY% y dB% volvieron al nivel anterior al tratamiento. Esto puede ser una buena indicación de la recuperación de la constitución electrolítica original de las células y, por tanto, sugiere una excelente recuperación fisiológica. Durante las 8-12 h de control posteriores no se observó un incremento significativo en el dY% y dB% de nuevo en estas cinco muestras. Basándose en estas observaciones, se tomó una decisión para el procedimiento de tratamiento completo a optimizar: de las muestras tratadas por PEF, únicamente aquellas que muestren un dG% comprendido en el intervalo del 20-45% inmediatamente posterior a la última EP deberían someterse a un tratamiento adicional (es decir, infusión a vacío, relajación, rehidratación, etc.).

20 El tratamiento de PEF refinado también se utilizó para tratar muestras con una impedancia superior o inferior a la de las cinco muestras mencionadas anteriormente. De manera similar, a partir de las hojas de trabajo preliminares de los resultados de PEF obtenidos para esas muestras, se tabularon el dY% y el dB% y se representaron posteriormente. Las tendencias mostraron que la influencia de la intensidad del tratamiento de PEF sobre la reversibilidad era un aspecto relativo, que dependía de la impedancia original de la muestra. El mismo tratamiento de PEF puede retrasar la recuperación o incluso causar una electroporación irreversible en las muestras con una impedancia inicial inferior. Sin embargo, en muestras con una impedancia inicial superior, el tratamiento de PEF puede tanto provocar la recuperación completa de las células o, de manera interesante, una recuperación significativa al principio pero un aumento en el filtrado de solutos nuevamente en un momento posterior.

Evaluación del ensayo de viabilidad, “ensayo del ángulo”

Con el fin de evaluar la eficiencia de la invención de acuerdo con las realizaciones, se empleó el siguiente ensayo de viabilidad. Los resultados finales están representados anteriormente.

30 Se colocó una muestra de hoja por el centro de su plano liso empleando un palillo y utilizando otro palillo para mantenerlo en posición. La inclinación de la muestra de hoja varió en función de su turgencia: una muestra viva sería capaz de permanecer horizontalmente en el aire mientras que una muestra muerta se doblaría sobre el palillo inferior y colgaría por ambos lados.

35 El principio subyacente del ensayo del ángulo consiste en que la membrana celular es el lugar principal de daño inducido por la congelación, de modo que si ocurriese cualquier daño durante la congelación, la membrana celular perdería su integridad, lo que provocaría que las células perdieran su turgencia y que el tejido de la hoja perdiera la capacidad de sostenerse a sí mismo.

EJEMPLO 2

Tasa de supervivencia de la espinaca tratada, procedimiento completo

40 El procedimiento completo del tratamiento de la espinaca se llevo a cabo tal como sigue:

1.Tratamiento de PEF

45 Con (i) ondas bipolares con una intensidad de campo eléctrico de 580 V/cm; (ii) anchura de pulso de 0,025 ms; (iii) secuencias de pulsos de 20 ms; (iv) 10 secuencias de pulsos separadas por intervalos de 10 s (remítase a la Figura 1). Únicamente las muestras que tuvieron un dG% comprendido en el intervalo del 20-45% inmediatamente posterior a la última EP se trataron en los pasos posteriores.

2.Infusión a vacío en una solución de trehalosa al 40%

Con (i) una aplicación gradual del vacío comprendida entre 2 min 5 s y 2 min 55 s; (ii) un período de mantenimiento de 20 min a una presión comprendida entre -80 y -86 kPa; (iii) una eliminación gradual del vacío, comprendida entre 1 min 30 s y 2 min 15 s.

50 3.Relajación

En una solución de impregnación de trehalosa al 40% (p/v) durante al menos 2,5 h.

4.Rehidratación

Al menos 2 h en agua desionizada para una recuperación total de la turgencia.

5.Congelación

5 Mediante el método de inmersión en nitrógeno líquido durante 6 s (muestras italianas) y 7 s (muestras holandesas).

6.Descongelación inmediatamente después de la congelación

En agua a temperatura ambiente.

Los resultados de los controles, con omisión del PEF o rehidratación o ambos, se muestran en la Tabla 4.

10 Para ser más rigurosos en la búsqueda de los resultados más fiables, especialmente en la evaluación del impacto del tratamiento de PEF, se realizó un ensayo con múltiples replicados preparados únicamente a partir de las espinacas holandesas. Se utilizaron dos controles, es decir, (i) muestras frescas congeladas y descongeladas sin ningún tratamiento anterior y (ii) muestras tratadas como el Control 3. A modo de diferencia, se utilizó una tiempo de congelación de 6 s en lugar de 7 s porque de las 11 muestras holandesas tratadas siguiendo el procedimiento optimizado, solo 1 sobrevivió al ciclo congelado-descongelado (es decir, supervivencia = 9,1%). Únicamente la
15 percepción de una matriz casi horizontal (sin ningún signo de combamiento) se consideró aceptable para la supervivencia. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Tasa de supervivencia de las muestras tratadas

	Tasa de supervivencia, evaluada por el ensayo del ángulo
Control Congelación-descongelación	3/16=18,8% De 16 muestras, 3 sobrevivieron al tratamiento
Control VI → Relajación → Rehidración → Congelación → Descongelación	4/14=28,6% De 14 muestras, 4 sobrevivieron al tratamiento
PEF → VI → Relajación → Rehidración → Congelación → Descongelación	9/16=56,3% De 16 muestras, 9 sobrevivieron al tratamiento

20 La tasa de supervivencia de las muestras holandesas tratadas con PEF fue significativamente el doble de la de las muestras tratadas siguiendo todos los pasos excepto el PEF. Por tanto, se puede concluir que hay una indicación positiva de la viabilidad de congelar hojas de espinaca, con la ayuda del PEF y de VI. El brillo verde brillante debido a la trehalosa hizo que las muestras tratadas de esta manera tuvieran un aspecto atractivo justo antes de la congelación.

25 Finalmente, se controló el período de almacenamiento de las muestras descongeladas con éxito con el paso del tiempo. Se guardaron las muestras en agua desionizada a 4 °C. Las muestras pudieron guardarse durante 7 días tras descongelarse.

La figura 2 muestra los resultados de la recuperación del material vegetal durante el período de descanso.

EJEMPLO 3: Tratamiento de fresas

30 Fresas frescas (*Fragaria x ananassa*) cv. Salsa se recogieron en modo autoservicio en una granja de Lund, Suecia (Höjebromölla bärodling). Se mantuvieron a 4 °C antes de su uso. Durante el estudio se seccionaron en mitades y se cortaron en rodajas de ~5 mm de grosor, utilizando una cuchilla afilada.

El procedimiento completo para el tratamiento de muestras de las fresas fue tal como sigue:

1.Infusión a vacío

Se sumergieron las fresas en 3 soluciones diferentes, con (i) una aplicación gradual del vacío comprendida en un intervalo de 1,5 min; (ii) un período de mantenimiento de 5 minutos a -60 kPa; (iii) una eliminación gradual del vacío comprendida en un intervalo de 1,5 min.

- 5 Solución 1: trehalosa* al 12% (p/p) (solución isotónica)
Solución 2: trehalosa al 12% (p/p), extracto crudo** de proteína anticongelante (AFP) al 0,2 % (p/v)
Solución 3: trehalosa al 12% (p/p), extracto crudo de AFP al 0,04% (p/v)

La trehalosa se obtuvo a partir de Cargill (C Ascend 16400).

** El extracto crudo consistió en zumo de pasto de trigo sin pasteurizar, secado por aspersion, obtenido a partir de Biotech INC, Canada. La concentración de AFP fue desconocida.

10 2.Tratamiento de PEF

Se trataron las fresas con ondas bipolares con las siguientes características: (i) una resistencia de campo eléctrico de 200 V/cm; (ii) anchura de pulso de 0,025 ms; (iii) secuencia de pulsos de 20 ms; (iv) 15 secuencias de pulsos separadas por intervalos de 10 s. El tratamiento se llevó a cabo a una temperatura inferior a 4 °C.

3.Congelación

- 15 Se guardaron las fresas en un envase hermético de un tamaño adecuado y, a continuación, se congelaron mediante el método de inmersión en nitrógeno líquido durante 20 s.

El concepto evaluado se confirmó sin lugar a dudas a partir de las muestras sumergidas en las soluciones 2 y 3, el cual muestra que diferentes materiales vegetales necesitan agentes crioprotectores con una composición ligeramente diferente así como diferentes PEF.

REIVINDICACIONES

1. Un método de congelación de un producto alimenticio vegetal que comprende los pasos de:
 - a. proporcionar un material alimenticio vegetal que comprenda al menos un 70% de agua (p/p)
 - b. aplicar un campo eléctrico pulsado a dicho material alimenticio vegetal
 - 5 c. exponer dicho material vegetal a una solución de un agente crioprotector
 - d. aplicar vacío o presión a dicho material alimenticio vegetal y solución
 - e. un período de reposo de al menos 30 minutos y
 - f. congelar dicho material alimenticio vegetal.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde se lleva a cabo en primer lugar el paso a, donde el paso b se lleva a cabo antes de la secuencia del paso c y el paso d o el paso b se lleva a cabo después de la secuencia del paso c y el paso d, y donde el paso e seguido por el paso f se lleva a cabo al final.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde se aplica vacío en el paso d.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el paso de rehidratación se lleva a cabo vinculado al período de reposo o después del período de reposo.
- 15 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho agente o agentes crioprotectores del paso c) se seleccionan a partir del grupo constituido por carbohidratos y proteínas crioprotectores.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho carbohidrato o carbohidratos crioprotectores se seleccionan a partir del grupo constituido por sacarosa, trehalosa, maltosa y lactosa.
- 20 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho agente crioprotector es una proteína anticongelante.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho agente crioprotector es trehalosa.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dichos agentes crioprotectores son trehalosa y una proteína anticongelante.
- 25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o 9, donde la proteína anticongelante se elige a partir del grupo constituido por las AFP de peces tales como glucoproteínas anticongelantes y AFP de los tipos I-IV, AAF de insectos tales como AFP de tipo V y AFP de plantas.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho campo eléctrico pulsado del paso b) tiene una intensidad de campo eléctrico de 100 a 600 V/cm.
- 30 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho campo eléctrico pulsado se aplica en forma de secuencias de 2 a 1000 pulsos separadas por intervalos de 0,1 a 100 segundos.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la longitud del período de las secuencias de pulsos se selecciona en el intervalo de 0,1 a 1000 ms.
- 35 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto alimenticio vegetal es espinaca, ensalada, fresa, frambuesa, manzana, mango, papaya, guayaba, plátano o mora.

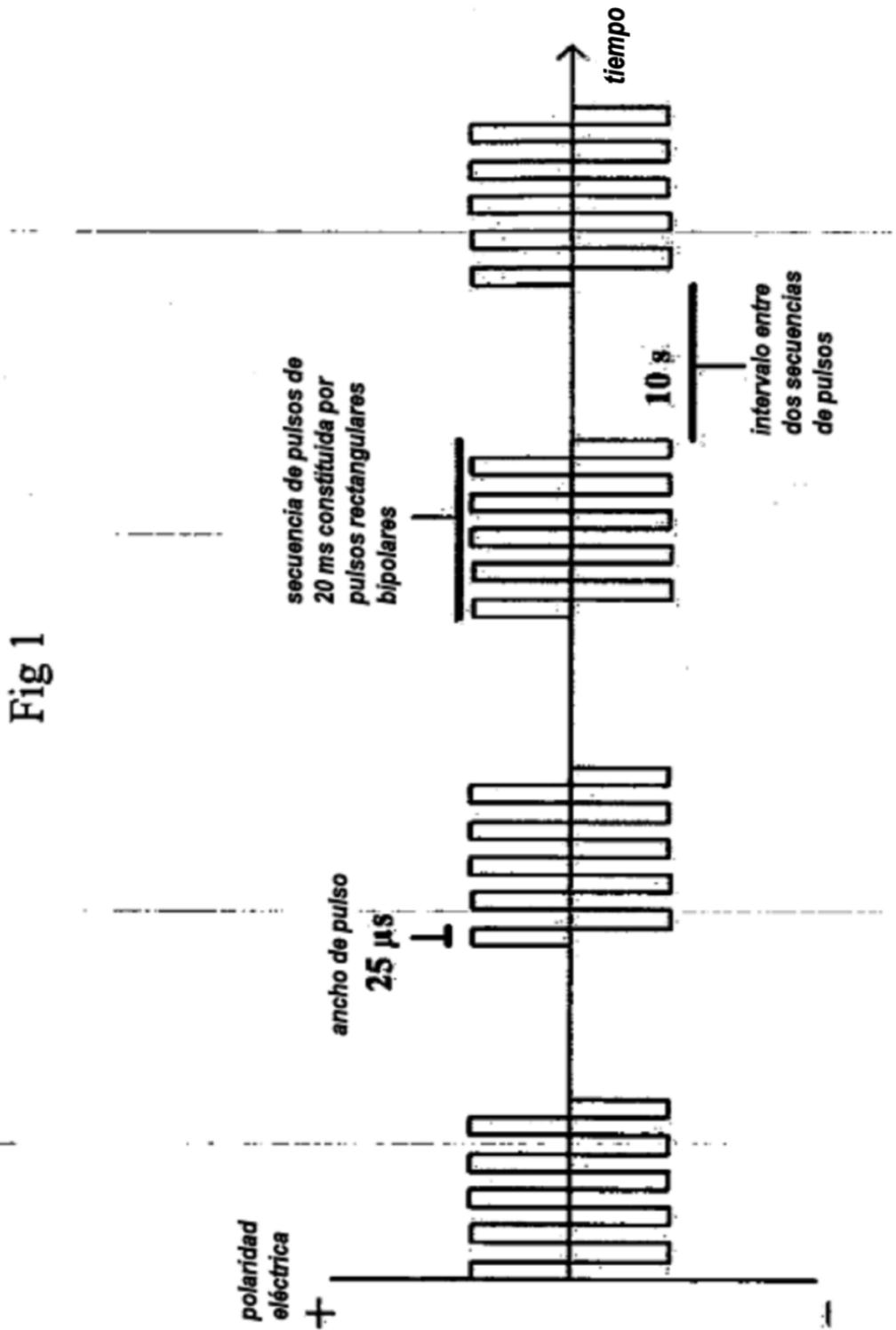


Fig 2

