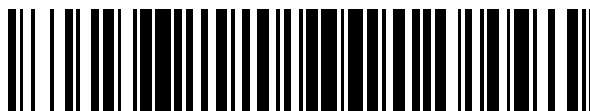


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 991**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)  
**A23L 1/015** (2006.01)  
**A21D 2/16** (2006.01)  
**A21D 2/24** (2006.01)  
**A21D 2/26** (2006.01)  
**C11B 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2007 E 07841267 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2068661**

54 Título: **Método destinado a eliminar los aromas de pescado en productos alimenticios mediante proteínas**

30 Prioridad:

**23.08.2006 US 823322 P**

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

**18.10.2013**

73 Titular/es:

**KELLOGG COMPANY (100.0%)  
ONE KELLOGG SQUARE P.O. BOX 3599  
BATTLE CREEK, MI 49016-3599, US**

72 Inventor/es:

**GARTER, BARBARA;  
ZHOU, SHENGYING y  
BROWN, ALISON**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 425 991 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 DESTINADO A ELIMINAR LOS AROMAS DE PESCADO EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS MEDIANTE PROTEÍNAS**

**Descripción**

ÁMBITO TÉCNICO

5 **[0001]** En general, esta invención se refiere a la incorporación de aceites y ácidos grasos inestables por oxidación en los alimentos; y, más en concreto, a un método que modera los aromas y sabores desagradables producidos por aceites y ácidos grasos inestables por oxidación, como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en productos alimenticios.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga son beneficiosos para la salud humana. En concreto, se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga son beneficiosos. Los tres ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de mayor interés son el ácido linolénico (18:3w-3), ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5w-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6w-3). Los beneficios para la salud asociados con un mayor consumo de estos ácidos grasos omega-3 incluyen una disminución del colesterol sérico, reducción de la presión arterial, reducción del riesgo de padecer enfermedades de corazón y una reducción del riesgo de ictus cerebral. Estos ácidos grasos omega-3 son también esenciales para el desarrollo neuronal normal y su disminución se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En el ojo y la retina de seres humanos, la proporción de DHA:EPA es 5:1 y su presencia es necesaria para el desarrollo ocular normal. También se cree que el ácido graso DHA es esencial para el desarrollo cognitivo óptimo de los niños. A la comida enriquecida con DHA se le suele denominar "alimento para el cerebro" en los países asiáticos. Estudios preliminares sugieren que los ácidos grasos omega-3 poliinsaturados de cadena larga pueden desempeñar un papel en la mediación de las lesiones inflamatorias crónicas y está documentado que su uso por parte de los sujetos con asma leve reduce la gravedad de la respuesta a la histamina de los asmáticos.

**[0003]** Existen muchas fuentes de estos ácidos grasos omega-3 poliinsaturados de cadena larga beneficioso. Algunas plantas proporcionan una abundante fuente de ácidos grasos linolénicos. Los animales marinos, como el pescado y los crustáceos, y las plantas marinas, como las microalgas, son las principales fuentes de DHA y EPA. En concreto, los pescados azules como la caballa y el salmón contienen altos niveles de DHA y EPA. Las microalgas marinas principalmente contienen DHA. Las microalgas marinas presentan una ventaja como fuente de DHA puesto que pueden producirse grandes cantidades de forma rápida usando métodos modernos y no se necesitan cultivos extensivos asociados con piscifactorías o con la dificultad de la pesca. Los ácidos grasos omega-3 se encuentran generalmente en forma de triglicéridos, es decir, uno o más de los ácidos grasos conectados al esqueleto de glicerol es un ácido graso omega-3, y no en forma de ácidos grasos libres. Ambas formas presentan beneficios para la salud y problemas de inestabilidad oxidativa. Por lo tanto, en esta especificación y en las reivindicaciones relacionadas no se hará distinción alguna entre estas dos

formas de ácidos grasos omega-3. El término ácido graso omega-3 hace referencia tanto a la forma de ácido graso libre como a la forma de triglicérido a no ser que se indique específicamente lo contrario. En esta especificación y en las reivindicaciones asociadas no se distinguirá entre las diversas fuentes de ácidos grasos omega-3 a no ser que se indique de forma específica.

- 5 **[0004]** Los efectos beneficiosos para la salud de los ácidos grasos omega-3, en especial EPA y DHA, necesitan cantidades relativamente grandes de ácidos grasos omega-3, lo que convierte en inviable obtener la cantidad diaria recomendada mediante el consumo de pescado. De esto modo, tanto EPA como DHA se envasan juntos en forma de cápsula. No es del agrado de los consumidores ingerir las cápsulas porque son grandes y duras para tragar y las cápsulas pueden desarrollar rápidamente un
- 10 aroma y sabor desagradables a pescado. Los intentos anteriores de añadir DHA y/o EPA directamente a los productos alimenticios han resultado infructuosos porque los ácidos grasos omega-3 inestables dan lugar rápidamente a un sabor y aroma a pescado en los alimentos y los hacen desagradables. Se cree que DHA y EPA son particularmente inestables en presencia de agua y a alta temperatura, lo que complica todavía más su uso en alimentos. A diferencia de otros ácidos
- 15 grasos, estos ácidos grasos omega-3 no pueden ser estabilizados en los alimentos simplemente añadiendo los antioxidantes típicos a los productos alimenticios. De modo similar, otros aceites y ácidos grasos son también inestables por oxidación en los alimentos y pueden hacer aumentar los olores y sabores desagradables. Entre los ejemplos de estos aceites o ácidos grasos inestables se incluyen: aceite de soja, aceite de linaza, aceite marino, microalgas marinas, ácido linoleico, ácido
- 20 linoléico, ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico.
- [0005]** Es deseable proporcionar un método simple para permitir la incorporación de ácidos grasos omega-3 en los alimentos que no implique etapas de procesamiento complicadas ni el uso de ingredientes únicos y que prolongue la vida útil del alimento. La vida útil es la duración de tiempo que el alimento puede conservarse sin desarrollar aromas o sabores a pescado.
- 25 EP 1 600 496 (Hayashibara Biochem) divulga un método para inhibir la formación de olores desagradables de ácidos grasos mediante el uso de un oligosacárido molecular relativamente alto.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

- 30 **[0006]** En términos generales, la presente invención proporciona un método de neutralización de productos aldehídos de autooxidación de lípidos que comprende las etapas de: proporcionar una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada con un grado de hidrólisis del 26% o mayor y una actividad de agua de 0.308 o mayor; exponer un alimento que contiene lípidos propensos a la autooxidación compuestos de al menos uno de ácido docosahexaenoico o ácido eicosapentaenoico a
- 35 la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada de tal manera que los productos aldehídos liberados por la autooxidación son neutralizados por la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y se extiende el tiempo de caducidad del alimento en al menos 12 semanas en condiciones de conservación de 29,4°C (85°F) y del 50% de humedad. Además, la invención proporciona el método de la reivindicación 6 y el producto alimenticio de la reivindicación 12.
- 40 **[0007]** Estas y otras características y ventajas de la presente invención serán más aparentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción detallada de un modo de realización

preferente. Los dibujos que acompañan la descripción detallada se describen a continuación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### 5 [0008]

La Figura 1 muestra la capacidad de neutralización de una serie de proteínas de lactosuero purificadas parcialmente hidrolizadas en aldehídos de prueba planeada como la capacidad de neutralización frente al grado de hidrólisis, y

10 la Figura 2 muestra el efecto de la actividad de agua de una proteína de lactosuero purificada parcialmente hidrolizada sobre su capacidad para neutralizar los aldehídos de prueba.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE UN MODO PREFERENTE

[0009] Como se ha indicado, los animales y plantas marinas son las principales fuentes de EPA y  
 15 DHA. Es muy conocido el uso de aceites de pescado o de aceites marinos como fuente de EPA y DHA. Recientemente, diversos fabricantes han desarrollado procesos altamente eficaces para cultivar microalgas marinas. Estas microalgas son una fuente de EPA y DHA de alto rendimiento y con carácter sostenible. Una fuente de EPA y DHA derivados de microalgas es Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD, EE. UU. Una segunda fuente es Nutrinova Nutrition Specialties and Food  
 20 Ingredients, DE. Los EPA y DHA extraídos de estas fuentes tienen forma de triglicéridos. En la presente invención, los ácidos grasos omega-3 pueden presentarse como polvos de flujo suelto o pueden proporcionarse en forma de aceites. Normalmente, los ácidos grasos omega-3 son cápsulas, un polvo de flujo suelto o una mezcla de aceite. Un ácido graso omega-3 que contiene una preparación de aceite se denomina HM por la Martek Biosciences Corp. que tiene aproximadamente  
 25 del 30 al 35% de DHA. Martek también ofrece un polvo que contiene ácidos grasos omega-3 llamado polvo KS35 de Martek DHA<sup>(TM)</sup>. En la presente solicitud y reivindicaciones puede usarse tanto la fuente Martek como otras fuentes a no ser que se indique específicamente no se distingue entre las dos formas.

[0010] La mayoría de los intentos en el pasado para incorporar ácidos grasos omega-3 en los  
 30 alimentos se han centrado en desarrollar métodos que eviten que tenga lugar la oxidación del ácido graso omega-3. Como se ha afirmado anteriormente, estos métodos han tenido poco éxito. Otros esfuerzos se han centrado en el uso de los envases transpirables que permiten que se reduzca la capacidad de los consumidores para detectar los productos de oxidación en el alimento. Otros esfuerzos se han dirigido a intentar determinar qué son los productos de oxidación y después  
 35 identificar cuáles causan los olores y sabores no deseados. La autooxidación de los lípidos en los alimentos conlleva la formación de una variedad de aldehídos entre los que se incluyen aldehídos saturados, aldehídos  $\alpha$ -,  $\beta$ -monoinsaturados, aldehídos poliinsaturados y aldehídos hidroxilados. Se han identificado diversos aldehídos monoinsaturados y poliinsaturados como los agentes potencialmente causantes del sabor y olor a pescado en los aceites marinos. Entre los que se  
 40 incluyen: cis-4-heptenal; 2,4-octadienal; y trans-2, cis-6-nonadienal. Otros aldehídos que se ha mostrado que aparecen durante la autooxidación de otros ácidos grasos poliinsaturados de cadena

larga son cis-4-heptenal y octanal.

**[0011]** La presente invención se refiere a un método para capturar los productos de autooxidación y así eliminar el aroma y sabor a pescado rancio en los alimentos. Este enfoque es diferente a aquellos utilizados por otros en el pasado. Se planteó la hipótesis de que la adición de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas parcialmente hidrolizadas o aminoácidos, de algún modo a los alimentos podría atrapar estos aldehídos liberados de los productos alimenticios y evitar el desarrollo de aromas y sabores a pescado o rancios en los alimentos que tienen ácidos grasos omega-3 u otros ácidos grasos inestables por oxidación y aceites incorporados a estos.

**[0012]** En un primer ensayo, se probaron una serie de cereales con diferentes niveles de proteína para comprobar su capacidad para neutralizar o eliminar una serie de aldehídos, tres de los cuales se han identificado positivamente como generados por autooxidación de los DHA y EPA, añadidos en el cereal en una cantidad conocida. Los cinco aldehídos de prueba elegidos fueron: cis-4-heptenal, octanal, trans-2-octenal, 2,4-octadienal, y trans-2-cis-6-nonadienal. Los cereales seleccionados fueron: Special K® vainilla, Special K® Protein Plus, Smart Start® Antioxidante, Smart Start® Healthy Heart y Corn Flakes®. Los productos de cereales se molieron utilizando un molinillo de café y un gramo de cada producto de cereales molidos se pesó en un vial con espacio de cabeza de 20 milímetros. Los cinco aldehídos de prueba y un etilo heptanoato estándar interno se disolvieron cada uno en heptano. Después, cada vial que contenía cereal molido se le añadieron 5 o 30 microgramos de cada aldehído de prueba y el control interno. Cada vial se tapó y conservó a temperatura ambiente durante tres días. Al final de la incubación, los aldehídos del espacio de cabeza restantes se analizaron por detección de ionización de llama-cromatografía de gas (GC-FID, en inglés). Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

**TABLA 1**

		Remaining headspace aldehyde content (FID area count)									
		A1		A2		A3		A4		A5	
Tipo de alimento	peso % proteína	Aumen to 5µg	Aumen to 30µg	Aumen to 5µg	Aumen to 30µg	Aumen to 5µg	Aumen to 30µg	Aumen to 5µg	Aumen to 30µg	Aumen to 5µg	Aumen to 30µg
Corn Flakes®	3.8	89	425	62	296	48	247	21	121	21	111
Special K® Vainilla	6.7	27	124	13	57	7	34	3	15	2	12
Special K® Protein Plus	34.6	11	49	5	21	2	9	1	4	0.8	3

Smart Start® Antioxidant	6.0	49	236	30	132	17	80	8	30	6	30
Smart Start® Healthy Heart	11.7	31	148	17	76	8	39	4	14	3	14
A1: cis-4-heptenal; A2: octanal; A3: trans-2-octenal; A4: 2,4-octadienal; A5: trans-2,cis-6-nonadienal											

**[0013]** Pueden realizarse diversas observaciones en relación con los datos. En primer lugar, los cereales Corn Flakes® con menos proteínas también tenían los niveles de espacio de cabeza residuales más altos de todos los aldehídos probados a nivel aumentado. En segundo lugar, en un tipo concreto de cereal, es decir, Special K® o Smart Start®, cuanto mayor sea el nivel de proteína menores serán los niveles de espacio de cabeza residuales de todos los aldehídos probados en ambos niveles aumentados. Por último, puede haber otros efectos del tipo de cereal ya que los niveles de espacio de cabeza residuales de todos los aldehídos ensayados, excepto para el aumento de 30 microgramos de 2,4-octadienal, fueron inferiores en Special K® vainilla que en el Smart Start® Healthy Heart a pesar del nivel más elevado de proteínas en Smart Start® Healthy Heart. Los datos sugirieron que las proteínas podían ser útiles en la captura o neutralización de los aldehídos producidos por los ácidos grasos omega-3 y otros lípidos en los alimentos. Por tanto, se llevaron a cabo las pruebas adicionales para determinar la eficacia de la proteína para neutralizar estos aldehídos de prueba.

**[0014]** En la siguiente serie de experimentos se examinó la capacidad de diversas proteínas para neutralizar los aldehídos de prueba. En cada caso, un gramo del material de prueba se añadió a un vial de espacio de cabeza de 20 milímetros. A continuación, a cada vial se añadieron 10 microgramos de cada uno de los aldehídos de prueba. Después de 1 hora a temperatura ambiente, el índice de neutralización de aldehídos (en adelante, AQI del inglés) se determinó usando GC-FID del espacio de cabeza como anteriormente se ha indicado. El AQI de una muestra concreta se calcula normalizando el AQI del almidón de maíz de 1 como control, es decir,  $AQI = \frac{\text{Capacidad de neutralización del aldehído (en adelante, AQC del inglés) de muestra}}{\text{AQC de almidón de maíz}}$ . El AQI se calcula empleando la fórmula mostrada a continuación en la que:  $A_{IS}$  es el área del pico del patrón interno;  $W_{IS}$  es el peso del patrón interno aumentado en microgramos;  $A_A$  es el área del pico del compuesto de aldehído aumentado; y  $W_A$  es el peso del compuesto aldehído aumentado en microgramos. En estos ensayos, el almidón de maíz, que no neutraliza ninguno de los aldehídos de prueba, se utilizó como patrón interno de control y su AQI se fijó en 1. Cuanto mayor sea el AQI, mayor será el efecto de neutralización. En la tabla, la proteína de lactosuero purificada se abrevia como WPI (en inglés). Los resultados se presentan en la Tabla 2 a continuación.

$$AQI = \frac{A_{IS} * W_A}{A_A * W_{IS}}$$

30

TABLA 2

	Índice de neutralización de aldehídos (AQI a 1 hora)						
	Almidón de maíz	Gluten	Dextrosa	Dextrina	WPI	Proteína de soja	Maltodextrina
<b>c4-Heptenal 1</b>	2	2	1	5	7	1	1
<b>Octanal 1</b>	1	1	1	1	3	5	1
<b>t2-Octenal</b>	1	4	1	1	18	28	1
<b>2,4-Octadienal</b>	1	5	1	1	22	20	1
<b>t2,c6-Nonadienal</b>	1	5	1	1	22	50	1
<i>10 microgramos de cada compuesto aldehídico se añadieron a 1 gramo de ingrediente alimentario</i>							
<i>Las muestras se conservaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis</i>							

**[0015]** Los resultados demuestran que las proteína de lactosuero purificada (WPI) y la proteína de soja fueron muy eficaces en la neutralización de los aldehídos en comparación con el almidón de maíz, gluten, dextrosa, dextrina y maltodextrina. En los siguientes experimentos, se determinó la dependencia de la dosificación del efecto de la proteína de lactosuero purificada y la proteína de soja. Cada proteína se mezcló con dextrosa en una serie de proporciones y el AQI de cada mezcla se determinó después de 16 horas a temperatura ambiente. Una vez más, cada vial de espacio de cabeza de 20 milímetros incluyó 1 gramo de la mezcla de dextrosa/proteína y se aumentaron 10 microgramos de cada uno de los aldehídos de prueba. El aldehído de espacio de cabeza se determinó como se ha indicado anteriormente, usando GC-FID. Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4 a continuación.

TABLA 3

	Índice de neutralización de aldehídos a las 16 horas (AQI)										
Porcentaje de proteína de soja en dextrosa	0	1	3	6	10	20	30	50	70	90	
<b>c4-Heptenal</b>	1,0	0,8	1,1	1,1	1,2	1,6	1,9	2,9	4,6	6,0	
<b>Octanal</b>	1,0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,7	1,9	2,7	4,5	6,0	
<b>t2-Octenal</b>	1,0	1,0	1,2	1,2	1,5	2,3	2,9	7,3	18,8	28,6	
<b>2,4-Octadienal</b>	1,0	0,9	1,1	1,2	1,3	1,8	2,2	3,9	8,7	13,3	
<b>t2-c4-Nonadienal</b>	1,0	1,1	1,3	1,4	1,7	2,9	3,9	10,4	25,1	36,6	

(continuación)

<i>10 microgramos de cada compuesto aldehídico se añadieron a 1 gramo de ingrediente alimentario</i>											
<i>Las muestras se conservaron a temperatura ambiente durante 16 horas antes del análisis</i>											

**TABLA 4**

Porcentaje de proteína de soja en dextrosa	Índice de neutralización de aldehídos a las 16 horas (AQI)										
	0	1	3	6	10	20	30	50	70	90	100
<b>c4-Heptenal</b>	1,0	1,5	2,9	1,9	2,6	2,3	2,8	3,6	5,0	4,6	5,3
<b>Octanal</b>	1,0	1,4	2,1	1,5	1,9	1,9	2,3	2,9	4,1	3,9	4,4
<b>t2-Octenal 1.0</b>	1,0	1,4	2,4	2,2	3,7	7,1	12,6	20,8	33,0	36,2	33,1
<b>2,4-Octadienal</b>	1,0	1,0	1,4	1,3	1,9	2,9	3,9	5,2	7,2	7,5	8,6
<b>t2-c4-Nonadienal</b>	1,0	1,4	2,4	2,7	4,9	11,5	19,1	33,0	45,2	46,4	58,2
<i>10 microgramos de cada compuesto aldehídico se añadieron a 1 gramo de ingrediente alimentario</i>											
<i>Las muestras se conservaron a temperatura ambiente durante 16 horas antes del análisis</i>											

5

**[0016]** Los resultados muestran una clara relación entre el nivel de WPI o de proteína de soja y la capacidad de neutralización de los aldehídos de prueba. Además, pueden observarse diferencias en la neutralización de un aldehído de prueba determinado dependiendo de la fuente de proteína. Puede que una combinación de proteínas sea mejor para la neutralización de todos los aldehídos.

10

**[0017]** En los siguientes experimentos, se determinó el efecto de hidrólisis de la WPI o la proteína de soja en la capacidad de neutralización. El grado de hidrólisis de una muestra se determinó usando la siguiente fórmula: Grado de hidrólisis = (nitrógeno amino de la muestra/nitrógeno total de la muestra)\* 100. El diseño experimental fue el mismo que en los experimentos anteriores, sin embargo, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 5. Los resultados indican que la neutralización mejorada puede lograrse utilizando proteínas parcialmente hidrolizadas comparadas con las proteínas mismas originales.

15

**TABLA 5**

ID de proteína	Índice de neutralización de aldehídos a las 4 horas					
	Proceso	C4-Heptenal	Octanal	t2-Octenal	2,4-Octadienal	t2-c6-Nonadienal
Almidón de maíz		1	1	1	1	1



HLA 109	WPI	7,5	6,6	15,7	6	16,6
HLA-168	WPI	1,9	1,6	2,4	1,4	2,6
BiPRO	WPI sin desnaturalizar	5,1	3,0	4,6	2,9	4,5
BioZate 1	WPI hidrolizada	35,3	35,0	33,3	20,3	46,9
BioZate 3	WPI hidrolizada	25,1	27,8	38,0	25,2	51,2
Thermax	WPI hidrolizada	56,5	65,0	126,6	74,2	120,2
Barflex	WPI hidrolizada	19,6	22,3	43,2	23,5	38,2
Hidrolizado de ácido de proteína de soja	Soja hidrolizada	156	16,1	31,3	10,4	43,6
Proteína de soja purificada 6070	SPI	1,8	1,2	1,5	1,0	1,2

**[0018]** En base a los resultados de la Tabla 5, los siguientes experimentos se diseñaron para determinar el efecto del grado de hidrólisis de una WPI sobre su capacidad para neutralizar los aldehídos de prueba. El protocolo de ensayo fue como se describe en la Tabla 5 usando diversas WPI que estaban parcialmente hidrolizadas a diferentes grados. La figura muestra claramente que a medida que el grado de hidrólisis aumenta, la capacidad de neutralización también lo hace; sin embargo, también se sabe que a medida que el grado de hidrólisis aumenta también lo hace el sabor amargo de la WPI parcialmente hidrolizada. Por tanto, puede haber un límite organoléptico al grado de hidrólisis que es útil. Los resultados se presentan en la Figura 1.

**[0019]** En otros ensayos, se determinó el efecto de la actividad de agua de la muestra de WPI parcialmente hidrolizada en su capacidad para neutralizar los aldehídos de prueba. Para este experimento, la WPI tenía un grado de hidrólisis del 26 calculado como anteriormente, y la actividad de agua varió de 0,07 a 0,466. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los resultados prueban que la actividad de agua aumentó al igual que la capacidad de neutralización. Esto es particularmente notable para los aldehídos 2,4-octadienal y trans-2-cis-6-nonadienal que se considera que son la causa del aroma a pescado asociado con la oxidación de DHA y EPA.

**[0020]** En otra serie de experimentos, se determinó la capacidad de varios aminoácidos para neutralizar los aldehídos de prueba. El proceso que se siguió fue el descrito en la Tabla 5. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 6. Una lectura por debajo del límite de detección (lld) significa que no se detectó ningún aldehído, es decir, se completó prácticamente la neutralización. Se puede observar que existen grandes diferencias entre los distintos aminoácidos en su capacidad para la neutralización. Algunos no son mejores que el almidón de maíz y otros son excelentes neutralizadores.

TABLA 6

ID de aminoácido	Índice de neutralización de aldehídos a las 4 horas				
	c4-Heptenal	Octanal	t2-Octenal	2,4-Octadienal	t2-c6-Nonadienal
Almidón de maíz	1	1	1	1	1
L-Lisina	1816,1	713,3	dld	dld	dld
L-Cisteína	443,5	523,8	dld	dld	dld
beta-Alanina	104,64	143,5	dld	dld	dld
L-Arginina	186,8	63,8	34,6	dld	dld
L-Cisteína clorhidrato de éster etílico	124,1	221,4	dld	dld	147,6
Ácido gamma-aminobutírico	137,2	128,5	4,7	11,7	231,6
Imidazol	0,8	0,5	42,9	dld	dld
L-Prolina	3,4	2,1	641,8	47,2	dld
L-Triptófano	31,0	22,0	131,8	15,8	dld
L-Leucina	4,9	3,0	22,6	1,8	32,4
L-Metionina	11,24	6,1	8,3	3,3	12,3
L-Treonina	11,3	12,6	3,2	1,2	3,4
L-Valina	4,7	3,2	15,9	2,3	27,3
Glicina	4,0	3,4	15,9	2,8	26,6
L-Alanina	3,0	3,1	6,8	1,6	8,8
L-Serina	6,2	5,6	4,7	1,3	5,5
L-Ácido glutámico	2,7	2,1	6,5	2,5	7,7
L-Ácido aspártico	2,2	1,9	3,1	1,6	3,0
L-Tirosina	0,5	0,6	2,2	1,9	3,2
L-Fenilalanina	1,1	0,9	1,3	0,9	1,3
*dld = por debajo del límite de detección					

[0021] Los aminoácidos L-Lisina, L-cisteína,  $\beta$ -alanina, L-Arginina, L-cisteína clorhidrato de éster etílico y ácido  $\gamma$ -aminobutírico son los de mayor efecto en la neutralización de los compuestos de aldehídos de prueba. Los AQI de estos aminoácidos son sustancialmente más altos que los de las proteínas y de las proteínas parcialmente hidrolizadas. Entre estos aminoácidos con mayor efecto,

existe una estructura funcional común, es decir, el grupo amino no está en la posición  $\alpha$  del aminoácido. En otras palabras, los aminoácidos más eficaces para la neutralización de los compuestos de aldehídos de prueba son los del grupo amino de la posición  $\beta$  o más lejana en la cadena de carbón del grupo de ácido carboxílico de la misma molécula o tienen un grupo sulfhidrilo como la cisteína.

En todos los experimentos descritos anteriormente, los efectos de la neutralización también se analizaron por inhalación de los productos al final de las incubaciones. Aquellos con neutralización significativa eran menos olorosos y en algunos no había olor detectable. Los resultados demuestran que la neutralización puede lograrse en comidas preparadas añadiendo proteína, proteína parcialmente hidrolizada o aminoácidos a los alimentos. La presente invención puede utilizarse para neutralizar los olores y sabores rancios o a pescado que se encuentran en los alimentos que contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como ácido linoleico, ácido linolénico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y los aceites mencionados anteriormente. La neutralización se puede producir en el espacio de cabeza interesencial en los alimentos y en el espacio libre de los envases de alimentos. El efecto de neutralización puede demostrarse en productos alimenticios a baja, intermedia y alta humedad. El efecto de neutralización tiene lugar a temperatura ambiente. Se plantea la hipótesis de que la reacción entre el aldehído y los aminoácidos, ya sea en un péptido o no, puede ocurrir a través de una adición de tipo Michael o a través de una reacción de base de Schiff. La invención puede usarse de una gran diversidad de modos. La fuente de aminoácidos puede ser una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada. En un método, la fuente de aminoácidos puede usarse para encapsular los ácidos grasos y los aceites inestables por oxidación. Como se ha analizado anteriormente, entre los ácidos grasos/aceites inestables típicos se incluyen: aceite de soja, aceite de linaza, aceite marino, aceite de microalgas marinas, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico. La encapsulación puede lograrse mediante una simple mezcla de la fuente de DHA o del aceite con la fuente de aminoácidos en agua, seguida de secado por atomización o en lecho fluidificado. Como alternativa, la fuente de aminoácidos y la fuente de DHA pueden mezclarse juntas de modo simple. El uso de una fuente de DHA en polvo facilita la mezcla con la fuente de aminoácidos. La fuente de aminoácidos está compuesta de proteínas de lactosuero parcialmente hidrolizadas. El nivel de fuente de aminoácidos puede variar dependiendo de lo necesario para mantener la neutralización durante el periodo de conservación deseado. El aceite encapsulado puede añadirse entonces a los productos alimenticios con la expectativa de que la comida se mantenga estable, es decir, sin aromas o sabores desagradables o a pescado, con respecto a los ácidos grasos inestables por oxidación durante más de un período de conservación significativo. En otro método, la fuente de aminoácidos podría añadirse en un sobre y el sobre podría colocarse, por ejemplo, en un paquete de la comida como una caja de cereales listos para consumir. En otro uso, la fuente de aminoácidos podría incorporarse sobre o dentro de la cubierta del sobre o material de embalaje. Se cree que todos estos métodos funcionarán para prolongar el periodo de conservación de los productos alimenticios que contienen ácidos grasos o aceites inestables por oxidación.

**[0022]** Las enseñanzas de los experimentos anteriores se aplicaron a un primer ejemplo de alimentos usando los conocimientos para probar la capacidad de una serie de combinaciones de

proteínas que incluyen cantidades variables de proteína parcialmente hidrolizada o no hidrolizada a partir de una variedad de fuentes para prevenir el desarrollo de aroma a pescado en barras de cereales formadas en frío que incluían el ácido graso omega-3 DHA. Tanto la fuente de DHA en polvo o aceite se probaron en el protocolo. La fórmula utilizada en la barra de cereales formada en frío con sabor a chocolate se presenta en la Tabla 7 a continuación. Las fuentes de proteína fueron las siguientes: Barflex en una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada, Provon 190 es una proteína de lactosuero no hidrolizada, Solae 313 es una proteína de soja parcialmente hidrolizada, Solae 661 es una proteína de soja no hidrolizada. La fuente de DHA era o polvo KS35 de Martek o aceite HM. Se crearon veinte condiciones como se indica en la Tabla 8 a continuación. Todas las barras incluían 100 miligramos de DHA por porción, lo que requiere del 1 al 4% en peso de la fuente de DHA y se llevaron ajustes en la cantidad de los otros componentes para cuadrarlo. Después de la formación, las barras formadas en frío se envasaron y almacenaron a 29,4°C (85°F) al 50% de humedad relativa. Se evaluaron muestras de cada condición para controlar el desarrollo de aroma o sabor a pescado por los especialistas organolépticos en el momento 0 y en una base semanal a partir de entonces durante un período de 12 semanas. Cada muestra recibió una clasificación del 1 al 5, siendo 5 el nivel más elevado de aroma o sabor a pescado. Las barras se formaron del siguiente modo: se combinaron la mezcla de aceite y la mezcla seca. Después, la mezcla se unió usando el jarabe aglutinante y se formó en frío una masa que se cortó en barras. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura de 46,1°C (115°F) o inferior. La formación en frío puede realizarse como se conoce en la técnica mediante extrusión, rodillos de compresión u otros métodos de formación en frío. La formación en frío hace referencia a un proceso en el que el calor externo no se añade al sistema de formación. Después, las barras de conformación en frío se recubrieron con un recubrimiento compuesto y se empaquetaron. Los resultados de los análisis se presentan en la Tabla 9 a continuación. Cada resultado es la media de al menos 4 evaluaciones en cada etapa.

25

**TABLA 7**

Componente	% en peso basado en el peso de la barra final
<b>Mezcla de aceite</b>	
Fuente DHA	1 - 4
Aceite vegetal	2 - 6
Manteca	2 - 8
<b>Mezcla seca</b>	
Cacao light	5 - 3
Combinación de proteínas	18
Chocolate	2 - 10
Agentes aumentadores	2 - 12
<b>Jarabe aglutinante</b>	

(continuación)

Azúcar	2 - 10
Jarabe de maíz de alto contenido en fructosa	15 - 25
Jarabe de maíz	2 - 10
Glicerina	1 - 5
Sabores y enriquecedores	1 - 5
<b>Recubrimiento compuesto</b>	20 - 30

**TABLA 8**

Número de experimento	% Barflex	% Provon 190	% Solae 313	% Solae 661	KS35	HM
1	80	20			+++	
2			20	80	+++	
3	50			50	+++	
4			80	20	+++	
5	50	50				+++
6		80	20			+++
7	80			20		+++
8	20	80				+++
9			20	80		+++
10			50	50	+++	
11		50	50		+++	
12	80			20		+++
13		20	80			+++
14		50	50		+++	
15	50	50			+++	
16	20	80			+++	
17	20			80	+++	
18		20	80			+++
19	20			80		+++
20			65	35		+++

5 **TABLA 9**

**TABLA 9**

#	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0	1
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	4	1.5	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	2	1	3	4	4	4	3	3	4
7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	3
10	2	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
11	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	0	1
12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
13	0	3	3	5	5	4	5	3	4	5	3	3	5
14	0	2	0.5	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
15	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
18	0	4	3.5	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5
19	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
20	0	4	4	4	5	5	4	4	4	5	5	4	5

**[0023]** Los resultados fueron bastante impresionantes con Barflex, una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada, puesto que fue muy superior a Solae 313, una proteína de soja parcialmente hidrolizada, en prácticamente todos los casos. Casi todas las condiciones que incluyen proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada, incluso en el nivel más bajo del 20% del total de la proteína, se mantuvieron en una clasificación de I o menos durante todo el período de prueba. Las muestras con Barflex y Provon 190 son los números 1, 5, 8, 15 y 16. Las muestras con Barflex y Solae 661 son los números 3, 7, 12, 17 y 19. Sin embargo, muchas de las muestras de proteína de soka parcialmente hidrolizada obtuvieron clasificación del 3 al 5 que se produjo al principio y se mantuvo. Las muestras con Solae 313 y Provon 190 son los números 6, 11, 13, 14 y 18. Las muestras con Solae 313 y Solae 661 son los números 2, 4, 9, 10 y 20. Los resultados muestran claramente los beneficios de la inclusión de la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada en el mantenimiento de la estabilidad de muestras de alimentos reales que incluían DHA y muestran que este efecto puede lograrse con tan poco como un 3,6% de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada en el producto alimenticio final.

**[0024]** En otro ejemplo de producto alimenticio, la fuente de DHA HM se combinó con proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada en una relación en peso del 25% de HM con el 75% de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada. La proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada estaba en una solución de agua en una proporción de 1 parte de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada por 20 partes de agua. El HM y la solución de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada se homogeneizaron juntos y después se secaron mediante atomización para formar unos polvos. Este polvo se añadió a continuación en una variedad de tipos de alimentos.

**[0025]** En el último ejemplo de alimento, el polvo de proteína y DHA secado por atomización descrito anteriormente se utilizó en una formulación para preparar un producto de una barra rellena de fruta cocida. Las etapas de procesamiento básicas fueron las siguientes: formación de la masa; formación del material de relleno basado en frutas; coextrusión del material de relleno y la capa de la masa a una temperatura baja de menos de aproximadamente 54,4°C (130°F) con corte de longitud, rodeando la masa al relleno basado en fruta y cocción de las barras a aproximadamente 198,9°C (190°F) durante 8 minutos; enfriamiento de las barras y envasado de las barras. Las barras se cocieron para lograr una actividad de agua de 0,7 o menor. El relleno basado en fruta es un relleno de fruta típico como se conoce en la técnica. Normalmente, el relleno está compuesto de: jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, jarabe de maíz, concentrado de puré de fruta, glicerina, azúcar, almidón de maíz modificado, citrato de sodio, ácido cítrico, alginato de sodio, saborizantes naturales y artificiales, fosfato dicálcico, celulosa modificada, colorantes y ácido málico. Cualquier material de relleno conocido puede utilizarse en la presente invención. La estabilidad de los ácidos grasos omega-3 no se ve alterada por la composición del relleno de la invención. En general, la barra acabada comprende entre el 55 y 65% en peso de masa siendo el resto relleno. Los productos de barras rellenas de fruta incluyen suficiente fuente de DHA para producir 40 miligramos de DHA por porción. Las fórmulas para las barras con y sin la proteína de DHA en polvo se incluyen en la Tabla 10 a continuación. El control, muestra 1, era adición de DHA a la masa sin fuente de aminoácidos. La muestra 2 incluye polvo de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y DHA descrito anteriormente. Los productos se almacenaron en diversas condiciones. En una primera condición, las

barritas se almacenaron a 29,4°C (85°F) al 50% de humedad relativa y se analizaron semanalmente para controlar el desarrollo del aroma o sabor a pescado. En estas condiciones, las barritas de control con DHA en ausencia de la proteína comenzaron a fallar a las 6 semanas y todas fallaron cerca de las 9 semanas. Todas desarrollaron aromas y sabores a pescados. No obstante, ninguna de las muestras que contienen el polvo de proteína con DHA desarrolló aroma o sabor a pescado en esta condición durante más de 12 semanas. En otro ensayo, las muestras se almacenaron a 21,1°C (70°F) al 50% de humedad relativa y se analizaron periódicamente para controlar el desarrollo de aroma o sabor a pescado. Las muestras de control fallaron en las 9 semanas mientras que las muestras hechas con DHA y proteína fueron estables durante al menos 6 meses.

**TABLA 10**

Componentes	Muestra 1 % en peso	Muestra 2% en peso
<b>Relleno de frutas</b>	35 - 45	35 - 45
<b>Capa de la masa</b>		
aceite de girasol de contenido oleico medio	6	6
polvo de proteína y DHA secado por atomización	0.0	1.2
polvo de DHA	1.5	0.0
jarabe de maíz de alto contenido en fructosa	5 - 15	5 - 15
azúcar	5--20	5 - 20
Mezcla de minerales y vitaminas	0 - 3	0 - 3
Saborizantes	0 - 3	0 - 3
Mezcla de los componentes anteriores		
A alta velocidad durante 6 minutos en una mezcladora Hobart		
Leche en polvo	0 - 2	0 - 2
Agua	5 - 10	5 - 10
Harina	20 - 35	20 - 35
Sal	0 - 1	0 - 1
Acondicionador de masa	0 - 1	0 - 1
Bicarbonato de sodio	0.3 - 0.7	0.3 - 0.7
Mezcla a alta velocidad durante 3 minutos		
Harina de avena	10 - 20	10 - 20
Mezcla a alta velocidad durante 1,5 minutos		

**[0026]** Los descubrimientos de la presente invención tienen una amplia aplicación a una variedad de



productos alimenticios. Los resultados demuestran que la combinación de una fuente de aminoácidos con fuentes de DHA o EPA estabiliza el DHA y EPA y previene el desarrollo de aromas y sabores a pescado después de tiempos de conservación prolongados. Preferentemente, la fuente de aminoácidos consta de al menos una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada. Puede lograrse la estabilización mediante combinación inicialmente de la fuente de aminoácidos con la fuente de DHA o EPA o mediante inclusión de una fuente de aminoácidos en un producto alimenticio que contiene una fuente de DHA o EPA. La presente invención es aplicable a una amplia gama de productos alimenticios entre los se incluyen: cereales listos para consumir, patatas fritas, nachos, tiras de maíz, galletas saladas, galletas, una masa para tostadora, barritas rellenas de frutas, una barrita de granola, barritas de cereales, espirales de queso cocidos, espirales de queso fritos y otros productos alimenticios. Es preferible que si la fuente de aminoácidos se combina inicialmente con la fuente de DHA o EPA que la proporción del peso sea 1 parte de DHA y/o EPA por 0,1-50 partes de fuente de aminoácidos, preferentemente proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada u otras proteínas parcialmente hidrolizadas. En un producto alimenticio preferentemente, una porción de 100 gramos incluye de 10 a 2000 miligramos de DHA y/o EPA y de 100 miligramos a 40 gramos de una fuente de aminoácidos. Como se describe anteriormente, la fuente de aminoácidos comprende preferentemente proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada. Se cree que las proporciones similares de proteína para lípido propenso a autooxidación son aplicables a lípidos diferentes de DHA y EPA.

**[0027]** La invención anterior se ha descrito de acuerdo con la normativa legal pertinente, por tanto, la descripción es ilustrativa, no limitativa. Los expertos en la materia advertirán las variaciones y modificaciones respecto al modo de realización divulgado y éstas forman parte del alcance de la invención. En consecuencia, el alcance de la protección jurídica concedida a esta invención sólo puede determinarse mediante estudio de las siguientes reivindicaciones.

25

**Reivindicaciones**

1. Un método para la neutralización de productos aldehídos de autooxidación de lípidos que comprenden las etapas de:

5

suministrar una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada que tiene un grado de hidrólisis del 26% o más y una actividad de agua de 0.308 o más;

10

exponer un producto alimenticio que contiene lípidos propensos a autooxidación que comprende al menos uno de entre ácido docosahexaenoico o ácido eicosapentanoico a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada de modo que los productos aldehídos liberados mediante autooxidación sean neutralizados por la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y la duración de conservación del producto alimenticio se extiende a al menos 12 semanas en las condiciones de almacenamiento de 29,4°C (85°F) y al 50% de humedad relativa.

15

2. Un método según la reivindicación 1, en el que la etapa de exposición del producto alimenticio a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende el embalaje del alimento en un material de embalaje que posee, aplicada sobre él o incorporada en su interior, la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada.

20

3. Un método según la reivindicación 1, en el que la etapa de exposición del producto alimenticio a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende el embalaje del alimento en un material de embalaje e incluye un sobre que contiene la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada en el material de embalaje.

25

4. Un método según la reivindicación 1, en el que la etapa de exposición del producto alimenticio a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende la adición de la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada directamente al producto alimenticio.

5. Un método según la reivindicación 1, en el que la relación de la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada con el lípido propenso a autooxidación es de 1 parte de lípido por 0,1-50 partes de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada.

30

6. Un método para la neutralización de productos aldehídos que provienen de autooxidación de lípidos propensos a autooxidación que comprenden las etapas de:

suministrar una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada que tiene un grado de hidrólisis del 26% o más y una actividad de agua de 0,308 o más;

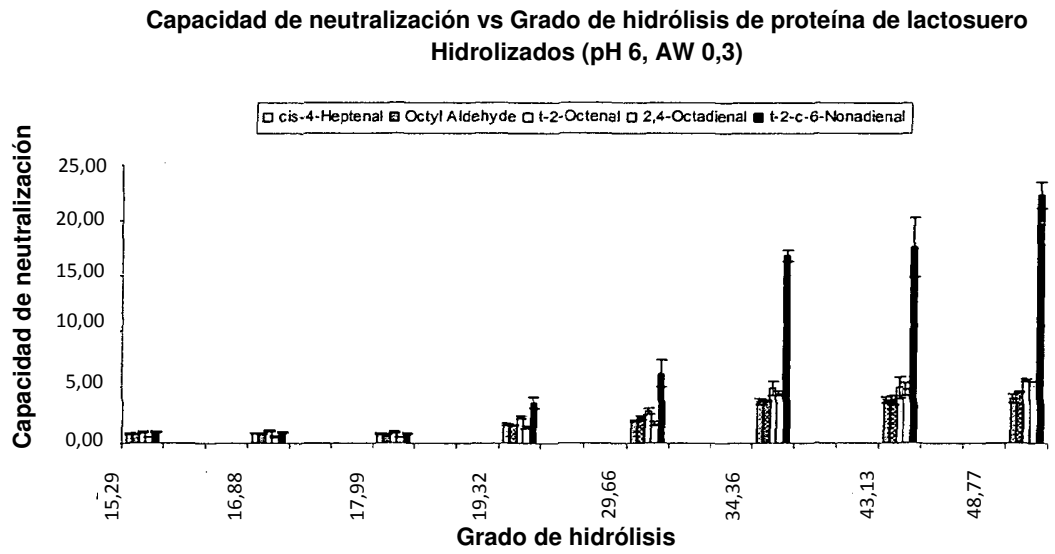
35

exponer un lípido propenso a autooxidación que comprende al menos uno de entre ácido docosahexaenoico o ácido eicosapentanoico a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada de modo que los productos aldehídos liberados mediante autooxidación sean neutralizados por la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y la duración de conservación del producto alimenticio se extienda a al menos 12 semanas en las condiciones de almacenamiento de 29,4°C (85°F) y al 50% de humedad relativa.

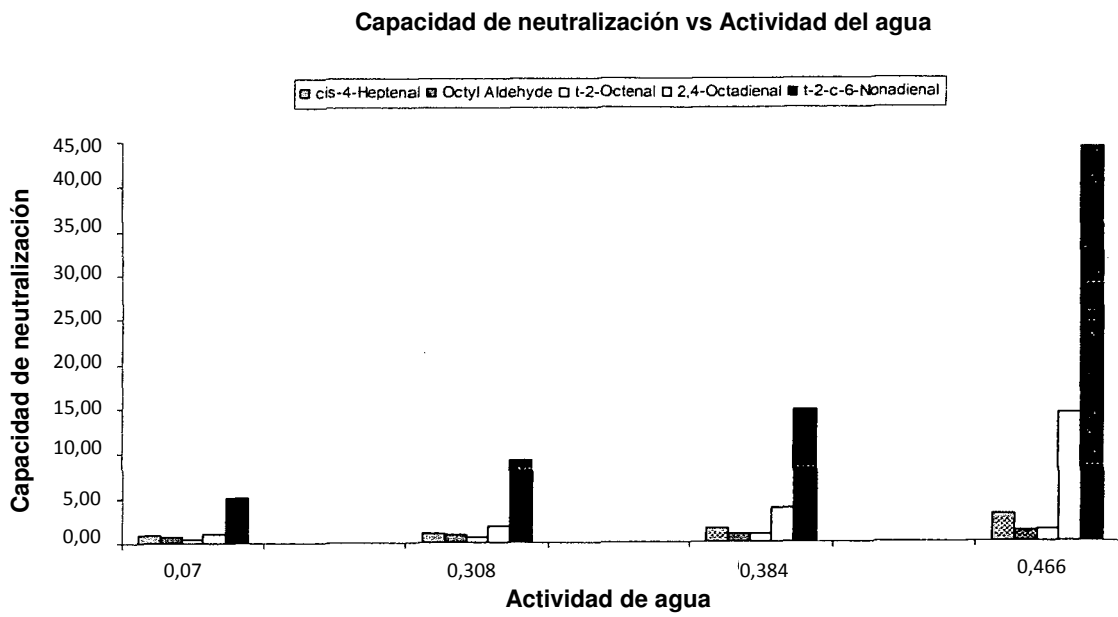
40

7. Un método según la reivindicación 6, en el que la etapa de exposición del lípido a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende el embalaje del lípido en un material de embalaje que posee, aplicada sobre él o incorporada en su interior, la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada.

8. Un método según la reivindicación 6, en el que la etapa de exposición del lípido a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende el embalaje del lípido en un material de embalaje e incluye un sobre que contiene la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada en el material de embalaje.
- 5 9. Un método según la reivindicación 6, en el que la relación en peso del lípido propenso a autooxidación con la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada es de 1 parte de lípido por 0,1-50 partes de proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada.
- 10 10. Un método según la reivindicación 6, en el que la etapa de exposición del lípido a la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada comprende la combinación de la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada con el lípido.
11. Un método según la reivindicación 6, en el que la proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y el lípido son combinados y secados para formar un material en polvo.
12. Un producto alimenticio que está compuesto por ácidos grasos omega-3 estabilizados que consta de:
- 15 una proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada que tiene un grado de hidrólisis del 26% o más y una actividad de agua de 0,308 o más;  
al menos un ácido graso omega-3 que consta de ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico o una mezcla de ambos; y  
dicho producto alimenticio conservado estable en condiciones de almacenamiento de  
20 29,4°C (85°F) y al 50% de humedad relativa durante al menos 12 semanas.
13. Un producto alimenticio según la reivindicación 12, en el que dicho producto alimenticio está compuesto de 0,1 a 40 gramos de dicha proteína de lactosuero parcialmente hidrolizada y de 10 a 2000 miligramos de este al menos un ácido graso omega-3 en 100 gramos de dicho producto alimenticio.
- 25 14. Un producto alimenticio según la reivindicación 12, en el que dicho producto alimenticio consta de al menos uno de los cereales listos para consumir, patatas fritas, una galleta salada, una galleta, una barrita de granola, una barrita de cereales, harina de avena lista para consumir, un producto de panadería, una masa para tostadora, un espiral de queso cocido y un espiral de queso frito.
- 30



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**