

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 508**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/03** (2006.01)  
**A23L 1/24** (2006.01)  
**A23L 1/22** (2006.01)  
**C12N 9/24** (2006.01)  
**C12N 9/42** (2006.01)  
**C12N 9/88** (2006.01)  
**A23L 1/212** (2006.01)  
**A23D 7/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2011 E 11710503 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2563163**

54 Título: **Producto comestible y uso de tal producto para aumentar la biodisponibilidad de micronutrientes comprendidos en verduras o fruta**

30 Prioridad:

**01.04.2010 WO PCT/CN2010/000421**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.01.2015**

73 Titular/es:

**UNILEVER NV (100.0%)  
Weena 455  
3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**BOUWENS, ELISABETH, CORNELIA, MARIA;  
CAO, XIUZHEN;  
FLENDRIG, LEONARDUS, MARCUS;  
VAN DER HIJDEN, HENDRIKUS, THEODORUS,  
WILHELMUS M. y  
HU, YINGCHUN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 527 508 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**

Producto comestible y uso de tal producto para aumentar la biodisponibilidad de micronutrientes comprendidos en verduras o fruta

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un producto comestible que contiene aceite y enzima para aumentar la biodisponibilidad de uno o más micronutrientes comprendidos en verduras o fruta.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Es bien conocido que la fruta y las verduras son una fuente importante de micronutrientes tales como vitaminas y minerales. Sin embargo, no es tan bien conocido que tras el consumo de verduras frescas o fruta fresca a menudo el cuerpo humano sólo puede utilizar una fracción de los micronutrientes contenidos en las mismas. Este fenómeno se denomina comúnmente la biodisponibilidad oral limitada de micronutrientes que están contenidos en una verdura fresca o fruta fresca particular. En este caso el término "biodisponibilidad oral" se refiere a la fracción de la cantidad total de un micronutriente ingerido que en última instancia alcanza la circulación sistémica. Por tanto, una biodisponibilidad oral del 20% significa que sólo el 20% de la cantidad de micronutriente ingerida alcanza la circulación sistémica.

25 La biodisponibilidad oral de un micronutriente que está contenido en verduras frescas o fruta fresca se determina mediante tres procedimientos sucesivos. En primer lugar, el micronutriente debe liberarse de la matriz de verdura o fruta a los jugos del tracto gastrointestinal. El grado en el que se libera el micronutriente de una verdura o fruta al tracto gastrointestinal se denomina bioaccesibilidad. En segundo lugar, el nutriente liberado debe entrar en el epitelio intestinal donde se incorpora en los quilomicrones que se transportan a través de la linfa al torrente sanguíneo cerca del corazón (absorción). Finalmente, con el fin de alcanzar la circulación sistémica el micronutriente que se ha transportado a la vena porta debe pasar el hígado sin metabolizarse. Por consiguiente, la biodisponibilidad oral de un micronutriente está determinada por su bioaccesibilidad, su absorción y su metabolismo.

30 En el caso de las verduras frescas y la fruta fresca la biodisponibilidad limitada de los micronutrientes está principalmente asociada con la bioaccesibilidad limitada, especialmente en el caso en el que el micronutriente es un micronutriente soluble en aceite tal como una vitamina o provitamina soluble en aceite. Por tanto, con el fin de potenciar eficazmente la biodisponibilidad oral de los micronutrientes en verduras frescas y fruta fresca, debe aumentarse la bioaccesibilidad de estos micronutrientes.

35 Brown *et al.* (Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressing as measured with electrochemical detection, *Am J Clin Nutr* (2004); 80, 396-403) han notificado los resultados de un estudio dirigido a la cuantificación de la aparición de carotenoides en quilomicrones en plasma después de que sujetos ingirieran ensaladas de verduras frescas con aliños para ensaladas sin contenido en grasas, de bajo contenido en grasas y de alto contenido en grasas. Los autores hallaron que tras la ingesta de ensaladas con ensalada sin contenido en grasas la aparición de carotenoides en quilomicrones en plasma era insignificante. Tras la ingesta de las ensaladas con aliños para ensaladas con bajo contenido en grasas, la aparición de los carotenoides en quilomicrones en plasma aumentó con relación a aquélla tras la ingesta de ensaladas con aliño para ensaladas sin contenido en grasas. De manera similar, la aparición de carotenoides en quilomicrones en plasma era más alta tras la ingesta de ensaladas con aliños para ensaladas de alto contenido en grasas que con aliños para ensaladas de bajo contenido en grasas. Sin embargo, el efecto beneficioso sobre la biodisponibilidad que puede lograrse con aliños de alto contenido en grasas es sobrepasado al menos en cierto grado por el alto contenido calórico indeseable de tales aliños. Además, el aumento de la biodisponibilidad oral que puede realizarse mediante estos aliños de alto contenido en grasas convencionales es limitado, probablemente porque estos aliños esencialmente no tienen ningún impacto sobre la bioaccesibilidad de los nutrientes solubles en aceite contenidos en la verdura fresca o la fruta fresca.

55 Por tanto, existe la necesidad de medios alternativos para aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes que están contenidos en verduras frescas y fruta fresca.

**Sumario de la invención**

60 Los presentes inventores lograron hallar una nueva forma de aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes que están contenidos en verduras y fruta. Los inventores han desarrollado un producto comestible que contiene aceite que, una vez consumido en el plazo de 30 minutos tras el consumo de una verdura o una fruta que contiene uno o más micronutrientes, aumenta sustancialmente la biodisponibilidad de dichos micronutrientes. El producto comestible de la presente invención se selecciona de aliños, mayonesa, salsas y postres y se caracteriza porque comprende el 13-99% en peso de una fase acuosa que tiene un pH en el intervalo de 2,0-5,5; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa seleccionada de pectinasa, celulasa y combinaciones de las mismas.

El documento JP 2000/157169 describe una emulsión de aceite en agua para su uso en la producción de pan, que comprende el 10-80% en peso de aceite, agua, el 5-30% en peso de vinagre, el 3-20% en peso de componente de huevo, una enzima glicolítica y opcionalmente el 1-3% en peso de un estabilizador, condimento, especia o similar.

5 Los inventores han hallado que si el presente producto comestible se consume aproximadamente al mismo tiempo que las verduras o fruta, la enzima degradadora de la pared celular activa puede aumentar la biodisponibilidad de los micronutrientes presentes en dichas verduras o fruta. Este aumento en la biodisponibilidad resulta de la interacción entre la enzima y los componentes de la ensalada tras la ingesta de la ensalada. La fase oleosa del producto comestible potencia adicionalmente el efecto potenciador de la biodisponibilidad de la enzima degradadora de la pared celular.

15 Aunque los inventores no desean restringirse a ninguna teoría, se cree que el efecto favorable de la enzima degradadora de la pared celular sobre la biodisponibilidad de los nutrientes contenidos en verduras frescas y/o fruta fresca puede atribuirse en gran parte al impacto de la enzima sobre la bioaccesibilidad de dichos micronutrientes. Mediante la degradación de los componentes que están contenidos en las paredes celulares de los componentes de la verdura o la fruta mientras estos componentes atraviesan el tracto gastrointestinal, se cree que la enzima contribuye a la liberación de micronutrientes que de lo contrario quedarían atrapados en estos componentes hasta alcanzar una parte de dicho tracto gastrointestinal en la que ya no pueden absorberse. Los componentes del aceite de la fase oleosa facilitan la absorción de los micronutrientes que se liberan como resultado de la actividad de la enzima degradadora de la pared celular. Por tanto, ya que el presente producto comestible potencia tanto la bioaccesibilidad como la absorción de micronutrientes contenidos en verduras o fruta, el producto comestible es sorprendentemente eficaz aumentando la biodisponibilidad de dichos micronutrientes.

25 La presente invención también se refiere al uso de un producto comestible para aumentar la biodisponibilidad de uno o más micronutrientes que están comprendidos en una verdura o una fruta, en el que dicho producto comestible comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa; y en el que dicho uso comprende el consumo del producto comestible en el plazo de 30 minutos tras el consumo de dicha verdura o fruta.

30 Además, la invención proporciona una ensalada que comprende al menos el 50% en peso de componentes de verduras y/o fruta y al menos el 3% en peso de un producto comestible que comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa.

### 35 **Descripción detallada de la invención**

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un producto comestible seleccionado de aliños, mayonesa, salsas y postres, y que comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa que tiene un pH en el intervalo de 2,0-5,5; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa seleccionada de pectinasa, celulasa y combinaciones de las mismas.

45 El término "aceite" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material lipídico que puede ser líquido o sólido a temperatura ambiente. En todo este documento, a menos que se indique lo contrario, los términos "aceite" y "grasa" se usan de forma intercambiable.

A menos que se indique lo contrario, el término "biodisponibilidad" tal como se usa en el presente documento debe interpretarse como "biodisponibilidad oral".

50 El término "consumo" tal como se usa en el presente documento se refiere a la ingesta de un material, por ejemplo el producto comestible que contiene aceite, la verdura o la fruta.

El producto comestible se selecciona del grupo que consiste en aliños, mayonesa, salsas y postres. Preferiblemente, el producto comestible es un aliño o una mayonesa. Lo más preferiblemente, el producto comestible es un aliño, especialmente un aliño para ensaladas. La fase acuosa del producto comestible de la presente invención se ha acidificado hasta un pH en el intervalo de 2,0-5,5, más preferiblemente de 2,5-5,0. Los ácidos de calidad alimenticia que pueden aplicarse adecuadamente en el producto comestible incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico, ácido fosfórico, ácido málico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido ascórbico y combinaciones de los mismos. Lo más preferiblemente, el ácido se selecciona de ácido acético, ácido cítrico y combinaciones de los mismos. Según una realización particularmente preferida, el producto comestible contiene al menos 0,1 g/l de un ácido de calidad alimenticia tal como se describe anteriormente en el presente documento.

65 Según aún otra realización ventajosa de la presente invención, la fase acuosa del aliño contiene el 0,01-10% en peso, más preferiblemente el 0,05-5% en peso de proteína. Los ejemplos de proteínas y fuentes de proteína que pueden incorporarse adecuadamente en la fase acuosa incluyen proteína de leche, proteína de huevo, proteína de arroz, proteína de maíz, proteína de soja, harina de mostaza y combinaciones de las mismas. La inclusión de

proteína no sólo tiene un impacto favorable sobre el sabor y la textura del aliño sino que también se cree que refuerza adicionalmente el efecto potenciador de la biodisponibilidad ventajoso del aliño.

5 El producto comestible de la presente invención puede combinarse adecuadamente con la verdura o la fruta antes de su consumo, por ejemplo vertiéndolo sobre dicha verdura o fruta. Con el fin de garantizar que el producto se adherirá a la verdura o fruta, es ventajoso incorporar uno o más viscosificantes. Ventajosamente, el producto comestible de la presente invención tiene una viscosidad de al menos 200 mPa.s, determinándose dicha viscosidad mediante un instrumento Brookfield, husillo RV3, 30 rpm, a 20°C. Incluso más preferiblemente, el producto comestible tiene una viscosidad de al menos 350 mPa.s.

10 Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el producto comestible comprende el 0,5-90% en peso de una fase oleosa y el 10-99% en peso de una fase acuosa. Incluso más preferiblemente, el producto comestible comprende el 1-90% en peso de una fase oleosa y el 10-99% de una fase acuosa. Los beneficios de la presente invención se aprecian particularmente en caso de que el producto comestible comprenda el 5-85% en peso, especialmente el 10-50% en peso de una fase oleosa. A pesar de las concentraciones relativamente bajas de la fase oleosa, estos productos comestibles pueden lograr un aumento significativo de la biodisponibilidad oral de los micronutrientes solubles en aceite presentes en una verdura o una fruta que se consume aproximadamente al mismo tiempo que el producto comestible. Por tanto, el efecto favorable sobre la biodisponibilidad de tales productos bajos en calorías puede ser igual o incluso superar el efecto observado para productos convencionales que tienen un contenido mucho mayor de aceite.

15 La fase oleosa del presente producto comestible contiene preferiblemente al menos el 80% en peso, más preferiblemente al menos el 90% en peso de glicéridos seleccionados del grupo de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos y combinaciones de los mismos.

20 Normalmente, en los productos comestibles de la presente invención la fase oleosa y la fase acuosa juntas representan al menos el 70% en peso del producto y el producto puede comprender además el 0-30% en peso de partículas sólidas, por ejemplo hierbas, especias, verdura o fruta. Con el fin de proteger estas últimas partículas frente a una digestión enzimática prematura, éstas pueden recubrirse con una capa protectora (por ejemplo grasa o cera).

25 Según una realización ventajosa, el producto comestible de la presente invención es una emulsión de aceite en agua. Según una realización alternativa, el producto comestible no está emulsionado y comprende una capa de fase acuosa y una capa de fase oleosa, por ejemplo un aliño que comprende una fase acuosa y una fase oleosa que reposa sobre la fase acuosa. Este último tipo de aliño habitualmente se agita para producir una emulsión que puede aplicarse sobre una ensalada.

30 La enzima degradadora de la pared celular vegetal en el presente producto comestible es preferiblemente una pectinasa puesto que se halló que las pectinasas son particularmente eficaces. Los ejemplos de pectinasas que son particularmente adecuadas para su uso en el presente producto comestible incluyen poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) y pectina liasas (EC 4.2.2.10). Naturalmente, también pueden usarse combinaciones de estas enzimas. Según una realización particularmente preferida, la pectinasa empleada en el producto comestible es poligalacturonasa, lo más preferiblemente endopoligalacturonasa.

35 Se entenderá que el producto comestible de la presente invención debe contener una cantidad suficiente de la actividad de enzima degradadora de la pared celular activa para lograr un aumento sustancial de la biodisponibilidad de los micronutrientes contenidos en una verdura o una fruta. Según una realización especialmente preferida, el producto comestible presenta suficiente actividad pectinasa para provocar una disminución de la viscosidad a 20°C y una velocidad de cizallamiento de  $1 \text{ s}^{-1}$  de al menos el 20% cuando se mezclan 30  $\mu\text{l}$  del producto con 2 ml de una disolución de pectina al 3,5% (p/p), usando el procedimiento de prueba descrito en los ejemplos. Más preferiblemente, el producto comestible presenta suficiente actividad pectinasa para provocar una disminución de la viscosidad de al menos el 40%, incluso más preferiblemente de al menos el 50% y lo más preferiblemente de al menos el 60% en el ensayo mencionado anteriormente.

40 La celulasa que puede emplearse en el presente producto comestible se selecciona adecuadamente de endocelulasa, exocelulasa y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, el producto comestible presenta suficiente actividad celulasa para provocar una disminución de la viscosidad a 20°C y una velocidad de cizallamiento de  $1 \text{ s}^{-1}$  de al menos el 20% cuando se mezclan 30  $\mu\text{l}$  del producto con 2 ml de una disolución de carboximetilcelulosa al 1,5% (p/p), usando el procedimiento de prueba descrito en los ejemplos. Más preferiblemente, el producto comestible presenta suficiente actividad celulasa para provocar una disminución de la viscosidad de al menos el 40%, incluso más preferiblemente de al menos el 50% y lo más preferiblemente de al menos el 60% en el ensayo mencionado anteriormente.

45 Los inventores han hallado que pueden obtenerse resultados sorprendentemente buenos si el producto comestible presenta actividad tanto pectinasa como celulasa significativas. Por tanto, según una realización particularmente preferida, el producto comestible presenta suficiente actividad pectinasa para provocar una disminución de la

viscosidad de al menos el 20% en el ensayo de pectinasa mencionado anteriormente y, además, el producto comestible presenta suficiente actividad celulasa para provocar una disminución de la viscosidad de al menos el 20% en el ensayo de celulasa mencionado anteriormente.

- 5 Es preferible que el producto comestible contenga sólo una cantidad limitada de sustrato que pueda digerirse por la enzima degradadora de la pared celular. Por consiguiente, en una realización preferida el producto comestible contiene menos del 0,5% en peso, más preferiblemente menos del 0,1% en peso y lo más preferiblemente menos del 0,03% en peso de pectina que puede digerirse *in situ* por la enzima degradadora de la pared celular. De igual manera, el producto comestible contiene preferiblemente menos del 0,5% en peso, más preferiblemente menos del 10 0,1% en peso y lo más preferiblemente menos del 0,03% en peso de celulosa que puede digerirse *in situ* por la enzima degradadora de la pared celular.

Otro aspecto de la invención se refiere a un producto comestible tal como se definió anteriormente en el presente documento, en el que el producto comestible se envasa en un recipiente sellado, portando dicho recipiente una o 15 más declaraciones indicando que el consumo del producto comestible aumenta la biodisponibilidad de los micronutrientes que están comprendidos en verduras o fruta.

Según una realización particularmente preferida, el producto comestible es un aliño para ensaladas y la una o más 20 declaraciones en el recipiente indican que el aliño para ensaladas puede usarse en una ensalada para aumentar la biodisponibilidad de los micronutrientes que están comprendidos en los componentes de verdura o fruta de la ensalada.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una ensalada que comprende al menos el 50% en peso de componentes de verdura y/o fruta y al menos el 3% en peso de un producto comestible que comprende el 10-99% 25 en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa. La enzima degradadora de la pared celular se selecciona ventajosamente de pectinasa, celulasa, hemicelulasa y combinaciones de las mismas.

Según una realización particularmente preferida, la ensalada comprende un producto comestible tal como se definió 30 anteriormente en el presente documento. Se prefiere particularmente una ensalada que comprende al menos el 40% en peso, preferiblemente al menos el 70% en peso de una o más verduras seleccionadas de lechuga, tomate, zanahoria, remolacha y combinaciones de los mismos.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un producto comestible para aumentar la biodisponibilidad de uno o más micronutrientes que están comprendidos en una verdura o una fruta, en el que dicho 35 producto comestible comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa; y en el que dicho uso comprende el consumo del producto comestible en el plazo de 30 minutos tras el consumo de dicha verdura o fruta. La enzima degradadora de la pared celular es seleccionada ventajosamente de pectinasa, 40 celulasa, hemicelulasa y combinaciones las mismas.

Según una realización particularmente preferida, el producto comestible que se usa para aumentar la biodisponibilidad de uno o más micronutrientes es un producto comestible tal como se definió anteriormente en el 45 presente documento.

Según una realización del uso mencionado anteriormente, el producto comestible y la verdura o fruta se consumen por separado, es decir se ingieren por separado, pero el periodo de tiempo entre estos dos eventos de consumo por separado no supera los 30 minutos. En este caso, el periodo de tiempo entre estos eventos de consumo se define 50 como el periodo de tiempo que comienza con el final del primer evento y que termina con el comienzo del otro evento. Según una realización particularmente preferida, el producto comestible se consume en el plazo de 20 minutos, lo más preferiblemente en el plazo de 10 minutos tras el consumo de la verdura o fruta. Según esta realización, debe entenderse que el producto comestible puede consumirse antes o después del consumo de la verdura o la fruta.

Según otra realización, particularmente preferida, el producto comestible se combina con la verdura o la fruta antes de su consumo. Los ejemplos de esta realización particular incluyen la combinación de una ensalada y un aliño para 55 ensaladas, la combinación de verduras cocidas y una salsa, y la combinación de fruta y un postre.

El producto comestible de la presente invención puede usarse adecuadamente para potenciar la biodisponibilidad de una amplia gama de micronutrientes, especialmente micronutrientes solubles en aceite. Los ejemplos de tales micronutrientes solubles en aceite incluyen provitamina A, vitamina E, vitamina K y licopeno. Los ejemplos de provitamina A cuya biodisponibilidad puede potenciarse eficazmente usando el presente producto comestible incluyen  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. 60

La fruta o verdura que contiene los micronutrientes puede ser fresca o estar cocida. Según una realización particularmente preferida, la verdura o fruta es una verdura fresca o una fruta fresca. 65

Según una realización particularmente preferida del presente uso, el producto comestible es un aliño para ensaladas y la verdura o fruta es un componente de una ensalada. Ventajosamente, dicho aliño para ensaladas se combina con la ensalada antes de su consumo. Preferiblemente, la ensalada comprende al menos el 40% en peso, más preferiblemente al menos el 70% en peso de una o más verduras frescas seleccionadas de lechuga, tomate, zanahoria, remolacha y combinaciones de los mismos.

Según el presente uso, el aliño para ensaladas puede combinarse con la ensalada de numerosas formas. Una forma conveniente de combinar el aliño con la ensalada es verter el aliño para ensaladas sobre una ensalada recién preparada.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitados.

### Ejemplos

#### Ensayo para determinar la actividad pectinasa:

Se prepara de la siguiente manera una disolución que contiene el 3,5% en peso de pectina de bajo metoxilo y que tiene un pH de 3,0:

- añadir 3,5 g de pectina cítrica LM (Grindsted® pectin LC 950 de Danisco) y ácido cítrico (0,19 g/l) a 96 g de agua desmineralizada con agitación continua y entonces añadir 0,876 g de NaCl;
- mezclar la disolución durante al menos 30 min;
- calentar la disolución durante 5 min a 100°C.

La actividad pectinasa se mide usando el siguiente procedimiento:

- tomar al menos dos muestras del producto que va a someterse a prueba;
- preparar una muestra control calentándolo hasta 10 minutos a 95°C para destruir la actividad pectinasa;
- añadir 30 ul de cada muestra a 2 ml de la disolución de pectina LM y transferirlos a un Eppendorf;
- dar la vuelta de arriba abajo el Eppendorf 3x;
- incubar las muestras durante 15 min a 37°C usando un agitador termostático Eppendorf a 1000 rpm;
- calentar las muestras durante 10 min a 95°C;
- medir la diferencia de viscosidad entre la muestra de prueba y la muestra control usando un reómetro TA AR 1000 (diámetro de cono-placa 4 cm, hueco de 71 micrómetros, ángulo 1,59°). Método: procedimiento de flujo; parámetros: mantenimiento de pico; se mantiene a 1 s<sup>-1</sup> de cizallamiento, duración 1 min (20 puntos de datos); equilibrado 1 min, a 20°C.

La actividad se facilita como el % de disminución de la viscosidad de la disolución de pectina en comparación con un aliño convencional (muestra sin actividad enzimática).

#### Ensayo para determinar la actividad celulasa:

El procedimiento es idéntico al procedimiento descrito anteriormente para el ensayo de pectinasa, excepto que en lugar de una disolución que contiene el 3,5% en peso de pectina LM, se emplea una disolución que contiene el 1,5% en peso de carboximetilcelulosa.

#### Ejemplo 1

Se prepararon aliños a base de la formulación representada en la tabla 1.

Tabla 1

Componente	% en peso
Disolución acuosa de sal y sacarosa	53,513
Vinagre blanco	17,400

Aceite vegetal	21,300
Hierbas y especias	3,500
Aromatizante y colorante	0,800
Goma xantana	0,180
EDTA disódico cálcico	0,007
Preparación enzimática	3,300
<b>Total</b>	<b>100</b>

Se incluyeron en los aliños las siguientes preparaciones enzimáticas disponibles comercialmente:

- 5 A. Depol™ 670L (Biocatalysts Ltd., Gales, R.U.)
- B. Glucanase 5XL (Biocatalysts Ltd., Gales, R.U.)
- C. Depol™ 40L (Biocatalysts Ltd., Gales, R.U.)
- 10 D. Cellulase C013L (Biocatalysts Ltd., Gales, R.U.)
- E. Ultrazyme™AFP L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)
- F. Viscozyme™ L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)
- 15 G. Rapidase® FC (DSM Food Specialties B.V, Delft, Países Bajos)
- H. Klerzyme® 150 (DSM Food Specialties B.V, Delft, Países Bajos)
- 20 I. Pectinase 62L (Biocatalysts Ltd., Gales, R.U.)

Todos los aliños así preparados presentaban una actividad pectinasa de al menos el 60% en el ensayo de pectinasa descrito anteriormente en el presente documento. La mayoría de los aliños presentaban además una actividad celulasa de al menos el 60% en el ensayo de celulasa descrito anteriormente en el presente documento.

25 Ejemplo 2

30 Se evaluó el efecto de las diferentes preparaciones enzimáticas sobre la bioaccesibilidad de nutrientes lipófilos contenidos en una ensalada mediante una prueba de bioaccesibilidad *in vitro*. Para este fin, se prepararon modelos de aliños según la receta descrita en la tabla 2.

Tabla 2

Componente	Control (% en peso)	Enzima (% en peso)
Disolución acuosa de sal y sacarosa	98,13	95,63
Ácido acético (100%)	0,62	0,62
Lecitina <sup>#</sup>	1,25	1,25
Preparación enzimática	-	2,5
<sup>#</sup> Epikuron™ 200, Cargill, Inc.		

35 Estos modelos de aliños se sometieron a una prueba de bioaccesibilidad *in vitro* usando el siguiente protocolo.

Se prepararon muestras de ensalada añadiendo 200 gramos de lechuga romana + 200 gramos de agua en una licuadora y procesándolas hasta obtener partículas de ensalada que eran comparables al tamaño tras masticar de manera normal. Se colocaron 50 gramos de esta mezcla de ensalada (que comprendía 25 gramos de ensalada) en un recipiente de reacción del modelo de digestión *in vitro*. Sobre esto, se añadieron 10 gramos del aliño para ensaladas pipeteando por separado la fase acuosa, la fase oleosa y la preparación enzimática del aliño. En el caso del control, se reemplazó la enzima por agua.

45 Se evaluaron los efectos sobre la bioaccesibilidad determinando el contenido de nutrientes de la verdura y midiendo la extracción *in vitro* de micronutrientes en jugos digestivos. Se prepararon jugos digestivos artificiales basados en la fisiología humana y se añadieron a los productos, se mezclaron y se incubaron según el pH fisiológico y los tiempos de tránsito intestinal. La fracción de micronutrientes que se libera de los componentes de ensalada al volumen

acuoso (disuelto o solubilizado en micelas mixtas) de los jugos digestivos tras la centrifugación y filtración representa la fracción bioaccesible. Puede calcularse la accesibilidad relativa *in vitro* de un micronutriente como la cantidad accesible *in vitro* con respecto a la cantidad total de ese nutriente presente en la verdura y expresarse como un porcentaje.

5

Se resumen los resultados del estudio en la tabla 3 ( $\beta$ -caroteno), tabla 4 (luteína) y tabla 5 (folato).

Tabla 3

$\beta$ -caroteno	% de Bioaccesibilidad (Promedio $\pm$ DE)	
	Control	Inversión
Depol™ 670L	48,2 $\pm$ 9,1	111,8 $\pm$ 9,0
Glucanase 5XL	56,1 $\pm$ 1,6	105,3 $\pm$ 7,7
Depol™ 40L	48,2 $\pm$ 9,1	98,8 $\pm$ 13,3
Cellulase C013L	57,1 $\pm$ 7,8	87,5 $\pm$ 7,1
Viscozyme™ L	53,8 $\pm$ 0,2	93,6 $\pm$ 2,9
Ultrazyme™ AFP L	57,1 $\pm$ 7,8	84,9 $\pm$ 0,3
Klerzyme® 150	61,4 $\pm$ 5,2	106,0 $\pm$ 5,4
Rapidase® FC	52,7 $\pm$ 2,4	104,9 $\pm$ 6,1

10

Tabla 4

Luteína	% de Bioaccesibilidad (Promedio $\pm$ DE)	
	Control	Inversión
Depol™ 670L	56,1 $\pm$ 5,6	91,8 $\pm$ 1,5
Glucanase 5XL	54,3 $\pm$ 2,9	95,6 $\pm$ 9,8
Depol™ 40L	56,1 $\pm$ 5,6	88,7 $\pm$ 10,7
Cellulase C013L	56,2 $\pm$ 4,0	87,2 $\pm$ 3,4
Viscozyme™ L	53,4 $\pm$ 1,5	83,5 $\pm$ 3,4
Ultrazyme™ AFP L	56,2 $\pm$ 2,9	83,2 $\pm$ 3,2
Pectinase 62L	56,2 $\pm$ 4,0	80,6 $\pm$ 1,7

Tabla 5

Folato	% de Bioaccesibilidad (Promedio $\pm$ DE)	
	Control	Inversión
Cellulase C013L	37,2 $\pm$ 1,2	90,6 $\pm$ 23,3

15

Estos resultados demuestran claramente que los productos comestibles que contienen enzimas degradadoras de la pared celular activas que tienen actividad pectinasa y/o celulasa pueden potenciar sustancialmente la bioaccesibilidad de micronutrientes que están contenidos en fruta o verduras si estos productos comestibles se consumen junto a tal fruta o tales verduras.

### Ejemplo 3

20

Se evaluó el efecto de la actividad pectinasa y celulasa sobre la bioaccesibilidad de nutrientes lipófilos contenidos en una ensalada usando la prueba de bioaccesibilidad *in vitro* descrita en el ejemplo 2. Esta vez, en lugar de preparaciones enzimáticas comerciales que normalmente presentan un amplio espectro de actividades enzimáticas, se usaron preparaciones enzimáticas altamente purificadas, es decir una endopoligalacturonasa pura (Polygalacturonase M2 (*A. aculeatus*), suministrada por Megazyme) y una celulasa pura (Carezyme 1000L®; C2605 Cellulase de *Aspergillus sp.*, suministrada por Sigma).

25

Las composiciones de los modelos de aliño empleados en la prueba de bioaccesibilidad se describen en la tabla 6.

30

Tabla 6

Componente	Aliño I	Aliño II	Aliño III

Disolución acuosa de sal y sacarosa	95,63% en peso	93,13% en peso	90,63% en peso
Ácido acético (100%)	0,62% en peso	0,62% en peso	0,62% en peso
Lecitina #	1,25% en peso	1,25% en peso	1,25% en peso
Poligalacturonasa	2,5% en peso		2,5% en peso
Celulasa		5,0% en peso	5,0% en peso

Los resultados obtenidos de la prueba de bioaccesibilidad (aumento de la biodisponibilidad) se representan en la tabla 7.

5

Tabla 7

<b>β-caroteno</b>	Bioaccesibilidad (%) ± DE
Aliño I	37,6 ± 0,3
Aliño II	48,8 ± 3,8
Aliño III	72,5 ± 7,1

Estos resultados muestran que la acción combinada de poligalacturonasa y celulasa produce un aumento sorprendentemente grande de la bioaccesibilidad de los micronutrientes lipófilos.

10 Ejemplo 4

Se evaluó el efecto de la actividad enzimática degradadora de la pared celular sobre la bioaccesibilidad de la vitamina C contenida en una ensalada usando la prueba de bioaccesibilidad *in vitro* descrita en el ejemplo 2.

15 Las composiciones de los modelos de aliño empleados en la prueba de bioaccesibilidad se describen en la tabla 8.

Tabla 8

<b>Componente</b>	Control (% en peso)	Enzima (% en peso)
Disolución acuosa de sal y sacarosa	98,13	95,63
Ácido acético (100%)	0,62	0,62
Lecitina #	1,25	1,25
Preparación enzimática	-	2,5
# Epikuron™ 200, Cargill, Inc.		

20 Los resultados obtenidos de la prueba de bioaccesibilidad después de la digestión de la ensalada con los respectivos aliños para ensaladas se representan en la tabla 9.

Tabla 9

	Ácido ascórbico bioaccesible (mg/l)	% de aumento en comparación con la referencia
1) Referencia	75	0
2) Cytolase	103	37
3) Viscozyme	103	37
4) Ultrazyme	105	40
5) Depol 392	89	19
6) Rapidase TF	90	20
7) Rapidase FC	88	17
8) Klerzyme	103	37
# Se midió la concentración de ácido ascórbico usando tiras Reflectoquant™ de Merck, Alemania		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un producto comestible seleccionado de aliños, mayonesa, salsas y postres, comprendiendo dicho producto comestible el 10-99% en peso de una fase acuosa que tiene un pH en el intervalo de 2,0-5,5; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y enzima degradadora de la pared celular vegetal activa seleccionada de pectinasa, celulasa y combinaciones de las mismas.
2. Producto comestible según la reivindicación 1, en el que la fase acuosa tiene un pH en el intervalo de 2,5-5,0.
- 10 3. Producto comestible según la reivindicación 1 ó 2, en el que la fase acuosa contiene al menos 0,1 g/l de ácido de calidad alimenticia seleccionado de ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico, ácido fosfórico, ácido ascórbico y combinaciones de los mismos.
- 15 4. Producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto contiene el 1-90% en peso de una fase oleosa.
- 20 5. Producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase oleosa y la fase acuosa juntas representan al menos el 70% en peso del producto y en el que el producto comprende hasta el 30% en peso de partículas sólidas o semisólidas.
- 25 6. Producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto tiene una viscosidad de al menos 200 mPa.s, determinándose dicha viscosidad mediante un instrumento Brookfield, husillo RV3, 30 rpm, a 20°C.
- 30 7. Producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima degradadora de la pared celular vegetal activa es pectinasa.
8. Producto comestible según la reivindicación 7, en el que la pectinasa se selecciona de poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) y pectina liasas (EC 4.2.2.10).
- 35 9. Producto comestible según la reivindicación 8, en el que la pectinasa es poligalacturonasa, preferiblemente endopoligalacturonasa.
- 40 10. Ensalada que comprende al menos el 50% en peso de componentes de verdura y/o frutas y al menos el 3% en peso de un producto comestible que comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa.
- 45 11. Ensalada según la reivindicación 10, en la que el producto comestible es un producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
12. Ensalada según la reivindicación 10 u 11, en la que la ensalada comprende al menos el 40% en peso, preferiblemente al menos el 70% en peso de una o más verduras seleccionadas de lechuga, tomate, zanahoria, remolacha y combinaciones de los mismos.
- 50 13. Uso de un producto comestible para aumentar la biodisponibilidad de uno o más micronutrientes que están comprendidos en una verdura o una fruta, en el que dicho producto comestible comprende el 10-99% en peso de una fase acuosa; el 0,1-90% en peso de una fase oleosa; el 0-40% en peso de partículas sólidas o semisólidas; y una enzima degradadora de la pared celular vegetal activa; y en el que dicho uso comprende el consumo del producto comestible en el plazo de 30 minutos tras el consumo de dicha verdura o fruta.
- 55 14. Uso según la reivindicación 13, en el que el producto comestible es un producto comestible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que el producto comestible es un aliño para ensaladas y en el que dicho aliño para ensaladas se combina con una ensalada que contiene la verdura o la fruta antes de su consumo.