

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 247**

51 Int. Cl.:

C08B 37/16	(2006.01)	A23C 19/068	(2006.01)
A23C 9/123	(2006.01)	A23D 7/005	(2006.01)
A23C 13/12	(2006.01)		
A23C 15/06	(2006.01)		
A23C 19/072	(2006.01)		
A23C 19/076	(2006.01)		
A23C 7/04	(2006.01)		
A23L 1/314	(2006.01)		
A23L 1/32	(2006.01)		
A23C 19/05	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2005 E 13161378 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2657256**

54 Título: **Procedimiento para regenerar β -ciclodextrina reticulada con colesterol atrapado en la misma**

30 Prioridad:

21.06.2005 KR 20050053676

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

18.06.2015

73 Titular/es:

**KWAK, HAE-SOO (100.0%)
101-601, Hyundai 2-cha Apartment Dunchon-
dong Gangdong-gu
Seoul 134-060, KR**

72 Inventor/es:

**KWAK, HAE-SOO;
KIM, SONG-HEE;
HAN, EUN-MI y
JUNG, TAE-HEE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 538 247 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

Procedimiento para regenerar beta-ciclodextrina reticulada con colesterol atrapado en la misma

- 5 La presente invención se refiere a la eliminación del colesterol de algunos alimentos utilizando β -ciclodextrina (en adelante denominada " β -CD") como trampa. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para capturar colesterol de algunos alimentos en β -CD reticulada y al reciclado de la β -CD con colesterol capturado utilizando un solvente orgánico.
- 10 Se informa de la existencia de una correlación positiva fuerte entre el nivel sanguíneo de colesterol y el riesgo de enfermedades del sistema circulatorio en el adulto. Por ello, los alimentos occidentales, entre ellos la leche, los productos lácteos, otros alimentos de origen animal, etc., los cuales son ricos en colesterol, han sido recientemente objeto de preocupación.
- 15 La mayoría de alimentos de origen animal presentan colesterol. Se estima su contenido en 219 mg/100 g de mantequilla, 137 mg/100 g de nata de 36% de materia grasa, 105 mg/100 g de queso Cheddar, 95 mg/100 g de queso crema, 87,5 mg/100 g de queso azul, 122,9 mg/100 g de queso fetta, 112 mg/100 g de manteca y 1.050 mg/100 g de yema de huevo.
- 20 La única manera de prevenir las enfermedades que resultan de la ingesta excesiva de colesterol es consumir alimentos de bajo o nulo contenido de colesterol. Se ha llevado a cabo una investigación activa en la reducción física, química y/o biológica del colesterol en los alimentos, entre ellos productos lácteos.
- 25 Uno de los métodos más eficaces para la reducción del contenido de colesterol en los productos lácteos es utilizar β -CD como absorbente. Este absorbente se une al colesterol formando un complejo de β -CD-colesterol insoluble en agua que puede separarse fácilmente mediante centrifugación.
- 30 La β -CD es uno de los oligosacáridos circulares unidos mediante α -(1,4) producidos por la reacción catalítica de la ciclodextrina glucosiltransferasa, un enzima presente en los microorganismos, con el almidón, y no resulta tóxico para el cuerpo (ver la figura 1). La β -CD presenta una cavidad en el centro de su estructura molecular, que forma un complejo de inclusión con diversos compuestos, incluyendo el colesterol. Además, la beta-CD es no tóxica, comestible, no higroscópica, químicamente estable y fácil de separar del complejo. Por lo tanto, la β -CD es un material adecuado para eliminar el colesterol de los alimentos.
- 35 La beta-CD, aunque presenta la ventaja de eliminar el colesterol de diversos alimentos con una eficiencia de aproximadamente 90% o superior, adolece de las desventajas de ser económicamente desfavorable y de provocar contaminación medioambiental debido al consumo de gran cantidad de β -CD debido a su recuperación ineficiente. Para superar estos problemas, se ha investigado la recuperación y reciclado de la β -CD. Se ha propuesto la utilización de solventes orgánicos en la recuperación y reciclado de la β -CD (ver la figura 2). Sin embargo, la β -CD puede recuperarse en cierta medida al aplicarse a la leche, pero resulta difícil de separar de algunos alimentos, tales como natas.
- 40 La utilización de la β -CD en la eliminación del colesterol se da a conocer en muchas patentes, por ejemplo en la patente coreana abierta a inspección nº de publicación 1999-0015191, titulada "Method for removing cholesterol from cream", nº 1999-0015192, titulada "Method for cholesterol removal using immobilized cyclodextrin derivatives"; nº 2004-0054319, titulada "Method for preparing cholesterol-removed whipping cream"; nº 2003-0078532, titulada "Method for removing cholesterol from cheese", y nº 2003-0035341, titulada "Cyclodextrin derivative immobilized on solid and preparation thereof".
- 45 Sin embargo, dichas técnicas presentan una tasa de eliminación baja y no resultan adecuadas para la aplicación industrial.
- 50 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento para eliminar el colesterol de alimentos que presente un beneficio económico elevado.
- 55 Conduciendo a la presente invención, la investigación intensiva y completa sobre la eliminación beneficiosa económicamente e industrialmente aplicable del colesterol de los alimentos, llevada a cabo por los presentes inventores, ha resultado en el descubrimiento de que la β -CD reticulada puede extraer el colesterol de una variedad de alimentos con una eficacia elevada y que el complejo de β -CD reticulada-colesterol formado de esta manera puede recuperarse fácilmente mediante la utilización de solventes orgánicos. La recuperación de la β -CD mediante la utilización de un solvente orgánico es simple, económicamente favorable y fácilmente aplicable industrialmente.
- 60 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para reducir el nivel de colesterol de alimentos con una elevada eficiencia con un beneficio económico.
- 65 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para regenerar la beta-ciclodextrina

reticulada, presentando la beta-ciclodextrina reticulada el colesterol capturado en la misma, que comprende recolectar la beta-ciclodextrina reticulada en una capa orgánica, separar la capa orgánica y evaporar la capa orgánica, proporcionando beta-ciclodextrina reticulada, en el que el agente de reticulación es ácido adípico y la capa orgánica está formada de una mezcla de ácido acético e isopropanol.

En dicho procedimiento, se lleva a cabo la etapa de recolección mediante la mezcla de un solvente orgánico con la beta-ciclodextrina a una temperatura de entre 40°C y 60°C durante 1 a 3 horas bajo agitación a 50-150 rpm y la etapa de separación se lleva a cabo mediante enfriamiento de la mezcla hasta la temperatura ambiente para separar las capas y eliminar el sobrenadante.

El tratamiento con la β-CD reticulada preparada según la presente invención puede eliminar el colesterol en una cantidad máxima de 93% de la leche, 91% de la nata, 93% de la manteca y 95% de la yema de huevo. Además, la β-CD reticulada que captura el colesterol en la misma puede regenerarse utilizando un solvente orgánico según la presente invención, mostrando tasas de eliminación del colesterol excelentes, de 90% tras la séptima ronda de regeneración y de hasta 81% tras la décima ronda de regeneración en leche y tasas de eliminación del colesterol de 90% tras la sexta ronda de regeneración y de 83% incluso tras la décima ronda de regeneración en nata. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de eliminación del colesterol económicamente beneficioso porque evita la contaminación medioambiental y el incremento de coste atribuido a la eliminación de la β-CD tras una única utilización.

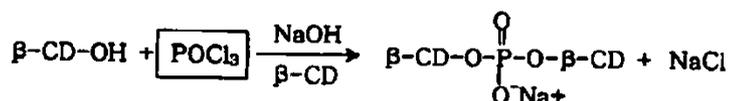
La figura 1 es una fórmula química que muestra la estructura de la β-CD.

La figura 2 es una vista que muestra el procedimiento de regeneración de la beta-ciclodextrina reticulada.

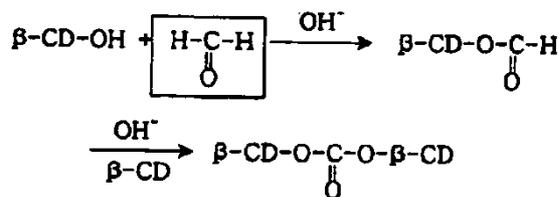
La reticulación de la β-CD puede llevarse a cabo utilizando un agente de reticulación, tal como fósforo, oxiclورو, trimetafosfato sódico, formaldehído, ácido adípico, etc. De ellos, el ácido adípico puede añadirse a los alimentos sin limitación debido a que es un aditivo que ha sido autorizado por la FDA estadounidense como GRCS (generalmente reconocido como seguro). Además, se ha identificado el ácido adípico como sustancia de sabor ácido utilizable y un conservante alimentario en el registro de aditivos alimentarios coreano.

En presencia de un álcali, el ácido adípico reacciona con dos grupos hidroxilos de la β-CD. Es decir, el ácido adípico forma enlaces mono- o diéter intra- o intermoleculares con la β-CD de manera que se reticula la β-CD.

Como agente de reticulación para la β-CD, el cloruro de fosforilo o el oxiclورو de fósforo funciona de la manera siguiente:



En presencia de formaldehído, la β-CD se reticula de la manera siguiente:



Los materiales de ensayo para la reducción de colesterol en la presente invención son la leche disponible comercialmente (3,6% materia grasa), nata (36% materia grasa) que se prepararon a partir de leche cruda suministrada por Binggrae, Co. Ltd, Corea, utilizando un separador de nata, manteca que se extrajo de grasa de cerdo mediante tratamiento térmico, y yema de huevo que se obtuvo de huevos comerciales.

Entre otros materiales se incluyen el alcohol isoamílico y el ácido sulfúrico para el análisis cuantitativo de materia grasa láctea, colesterol (pureza del 99%), 5α-colestano, ambos obtenidos de Sigma Chemical Co., y β-CD (pureza del 99,1%), obtenida de Nihon Shokunin Cako Co. Ltd. (Osaka, Japón) para la construcción de una curva estándar, ácido adípico (Acros Organics, USA) para la reticulación de la β-CD, y ácido acético e isopropanol, ambos con una pureza del 99,0%, para la recuperación de la β-CD.

Se determinó la materia grasa láctea mediante una prueba de Gerber, en la que los lípidos separados mediante centrifugación se miden utilizando un separador.

Para el análisis de CG, se mezcló 1 g de una muestra con 500 μl de un estándar interno de 1 ml (5α-colestano 1

ml/ml etanol al 99,8%) en un tubo de tapa enroscable, seguido de la saponificación con 5 ml de una solución etanólica 2 M de hidróxido de potasio a 60°C durante 30 min. con 5 ml de solución etanólica 2 M de hidróxido de potasio. Tras enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente, se extrajo el colesterol con 5 ml de hexano. Se repitió este procedimiento cuatro veces.

El extracto en un agrupado de las capas de hexano se transfirió a un matraz de fondo redondo y se secó a 40°C bajo vacío. El concentrado obtenido de esta manera se disolvió en 1 ml de hexano y se almacenó en un microtubo. El volumen de inyección de la muestra para la CG fue de 2 µl y la cuantificación del colesterol puede llevarse a cabo mediante la comparación del tiempo de retención y el área de pico del colesterol de la muestra y el colestano de estándar interno.

Se proporciona un procedimiento para reciclar la β-CD reticulada tras su aplicación a la eliminación del colesterol, en el que se utiliza un solvente orgánico para disolver el complejo de β-CD reticulada-colesterol en el mismo y se separa el sobrenadante y se evapora para recuperar la β-CD reticulada.

Resulta adecuada para la regeneración de la β-CD en la presente invención una mezcla de ácido acético e isopropanol en una proporción en volumen de 1:9 a 9:1, y más preferentemente de 3:1. El butanol, hexano o etanol, aunque capaz de regenerar la β-CD, no resulta apropiado para la utilización en alimentos.

Tras capturar el colesterol en la β-CD reticulada, se añade un solvente orgánico y se agitó a 50-150 rpm a una temperatura de entre 40°C y 60°C durante 1 a 3 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se separa el sobrenadante y se evapora, recuperando la β-CD.

Podrá alcanzarse una mejor comprensión de la presente invención a partir de los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo pero no limitativos de la presente invención.

Ejemplo de referencia 1: preparación de β-CD reticulada

Una suspensión de 100 g de β-CD en 80 ml de agua destilada se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se le añadió ácido adípico. Se ajustó el pH de esta suspensión a pH 2 con NaOH 1 M y después se sometió a una reacción de reticulación durante 16 horas a temperatura ambiente bajo agitación. A continuación, se reajustó el pH de la reacción a 5,5 con ácido acético.

Se separó el producto de reticulación con un papel de filtro (Whatman nº 2), se lavó tres veces con 150 ml de agua destilada, se secó a 60°C durante 6 horas y se pasó por un tamiz de malla 100, proporcionando β-CD entrecruzado.

Ejemplo de referencia 2: eliminación del colesterol de la leche con β-CD reticulada

1) Concentración de β-CD reticulada

Para determinar la cantidad de β-CD reticulada que resulta más eficaz para reducir el colesterol en la leche, se añadió β-CD reticulada en cantidad de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5% en peso basado en el peso de la leche en considerando el hecho de que sólo 1,85 g de β-CD se disuelven en 100 g de agua a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo ensayos bajo las condiciones de agitación a 800 rpm a 10°C durante 10 min. y centrifugación a 175xg a 10°C durante 10 min.

Los resultados del ensayo de tasa de eliminación de colesterol se proporcionan en la Tabla 1, a continuación. Tal como se observa en la Tabla 1, se midió la β-CD reticulada con ácido adípico para eliminar el colesterol de la leche a una tasa máxima de 93,13% utilizada en una cantidad de 1% basado en el peso de leche, a una tasa mínima de 85,05% utilizada en una cantidad de 0,5% y a tasas intermedias de 93,02%, 92,64% y 92,58% utilizada en cantidades de 1,5%, 2,0% y 2,5%, respectivamente.

Tabla 1: tasa de eliminación del colesterol según la concentración de β-CD reticulada

β-CD (%)	Tasa de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
0,5	85,05
1,0	93,13
1,5	93,02
2,0	92,64
2,5	92,58

¹⁾ no significativo (P<0,05),

Factores de eliminación del colesterol; temp. de mezcla 10°C, velocidad de agitación: 800 rpm; tiempo de mezcla: 10 min., materia grasa de la leche: 3,6%.

2) Temperatura de mezcla

5 Generalmente se mantuvo la leche a 4°C o menos durante el almacenamiento y distribución. Para examinar el efecto de la temperatura sobre la tasa de eliminación del colesterol, se mezcló con la β -CD reticulada con ácido adípico a diversas temperaturas, de entre cero y 20°C, y se proporcionan los resultados en la Tabla 2, a continuación.

10 Se midió la tasa de eliminación del colesterol a diferentes temperaturas: 85,14% a 0°C, 85,33% a 5°C, 92,38% a 10°C, 92,56% a 15°C y 93,08% a 20°C. Aunque la tasa de eliminación del colesterol más alta se observó a 20°C, se cree que la temperatura óptima para eliminar el colesterol de la leche es 10°C, considerando el hecho de que la leche se mantiene fresca a 4°C.

Tabla 2: efecto de la temperatura sobre la eliminación del colesterol de la leche utilizando β -CD reticulada

Temp. de mezcla (°C)	Tasa de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
0	85,14
5	85,33
10	92,38
15	92,56
20	93,08

15

¹⁾ no significativo (P<0,05),

Factores de eliminación del colesterol; β -CD reticulada 1%; velocidad de agitación: 800 rpm; tiempo de mezcla: 10 min., materia grasa de la leche: 3,6%.

20

3) Tiempo de mezcla

25 Se examinaron las tasas de eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en leche durante diversos tiempos de mezcla y se proporcionan los resultados en la Tabla 3, a continuación.

25

30 Se eliminó el colesterol a una tasa de eliminación máxima de 92,48% durante un periodo de mezcla de 5 min. Se estimó una tasa de eliminación del colesterol de 86,94% tras 1 min. de mezcla, de 92,01% tras 10 min. de mezcla, de 90,44% tras 15 min. de mezcla y de 90,42% tras 20 min. de mezcla. La continuación tras un tiempo umbral no presentó ninguna influencia adicional sobre la capacidad de la β -CD de capturar el colesterol en la misma y, de esta manera, no incrementó la tasa de eliminación.

30

Tabla 3: efecto del tiempo de mezcla sobre la eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en la leche

Tiempo de mezcla (min.)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1	86,94
5	92,48
10	92,01
15	90,44
20	90,42

35

¹⁾ no significativo (P<0,05),

Factores de eliminación del colesterol; β -CD reticulada, 1%; velocidad de agitación: 800 rpm; tiempo de mezcla: 10 min., materia grasa de la leche: 3,6%.

40

4) Velocidad de agitación

La β -CD reticulada se sometió a ensayo para la tasa de eliminación del colesterol según las velocidades de agitación y se proporcionan los resultados en la Tabla 4, a continuación.

45

Se eliminó el colesterol a una tasa máxima de eliminación de 92,05% a una velocidad de agitación de 400 rpm. Se estimó una tasa de eliminación del colesterol de 91,63% a 600 rpm, de 90,81% a 800 rpm, de 88,72% a 1.000 rpm y de 87,22% a 1.200 rpm. Respecto a la reducción de la tasa de eliminación del colesterol con el incremento de la velocidad de agitación a más de 400 rpm, se supone que el estado estable del complejo de β -CD-colesterol se rompería, entrando en un estado inestable, con la agitación excesiva.

50

En el Ejemplo 2, las condiciones óptimas para la eliminación del colesterol de la leche utilizando β -CD reticulada con ácido adípico se encontró que eran de 1% para la cantidad de β -CD reticulada, 10% de temperatura de mezcla, 5 min. de tiempo de mezcla y 400 rpm de velocidad de mezcla, bajo las que se eliminó el colesterol a una tasa media

de 92,39%.

Tabla 4: efecto de la velocidad de agitación sobre la eliminación del colesterol de la leche con β -CD reticulada

Velocidad de agitación (rpm)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
400	92,05
600	91,63
800	90,81
1.000	88,72
1.200	87,22

¹⁾ no significativo (P<0,05).

Factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 1%; temp. de mezcla: 10°C; tiempo de mezcla: 10 min., materia grasa de la leche: 3,6%.

Ejemplo de referencia 3: eliminación del colesterol de la nata utilizando β -CD reticulada

1. Concentración de β -CD reticulada

Se midieron las tasa de eliminación del colesterol de la β -CD reticulada según sus cantidades en la nata y se proporcionan los resultados en la Tabla 5, a continuación.

Al utilizar la β -CD reticulada con ácido adípico en una cantidad de 10% en peso basado en el peso de nata, se eliminó el colesterol a una tasa máxima de 90,72%. La tasa de eliminación del colesterol era de 81,73% con una cantidad de 1% de β -CD reticulada, de 85,32% con una cantidad de 5%, de 90,54% con una cantidad de 15% y de 89,98% con una cantidad de 20%.

Tabla 5: tasa de eliminación de colesterol según la concentración de β -CD reticulada

β -CD (%)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1	81,73
5	85,32
10	90,72
15	90,54
20	89,98

¹⁾ no significativo (P<0,05); factores de eliminación del colesterol: temp. de mezcla: 40°C; velocidad de agitación: 1.400 rpm; tiempo de mezcla: 30 min., materia grasa de la leche: 36%.

2) Temperatura de mezcla

Para examinar el efecto de la temperatura sobre la tasa de eliminación del colesterol, se mezcló leche con la β -CD reticulada con ácido adípico a diversas temperaturas, de entre 40°C y 60°C, y se proporcionan los resultados en la Tabla 6, a continuación.

Se estimó la tasa de eliminación de colesterol más alta en 91,03% a 40°C. De la nata se eliminó el colesterol a una tasa de 90,56% a 45°C, de 88,72% a 50°C, de 86,32% a 55% y de 85,01% a 60°C. Generalmente la nata se mantiene a 4°C o menos durante el almacenamiento y distribución. A temperaturas bajas, se incrementa la viscosidad de la nata. De hecho, el ensayo resulta difícil de realizar a una temperatura inferior a 40°C. Por lo tanto, la temperatura óptica a la que la β -CD puede eliminar el colesterol de la nata se cree que es de 40°C. Se supone que la reducción de la tasa de eliminación del colesterol con los incrementos de la temperatura de mezcla se debe al hecho de que los lípidos se separan de la nata a temperaturas altas y a la presencia de una capa superior, que presenta una menor oportunidad de entrar en contacto con la β -CD.

Tabla 6: efecto de la temperatura de mezcla sobre la eliminación del colesterol de la nata utilizando β -CD reticulada

Temp. de mezcla (°C)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
40	91,03
45	90,56
50	88,72
55	86,32
60	85,01

¹⁾ no significativo (P<0,05); factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 10%; velocidad de agitación:

1.400 rpm; tiempo de mezcla: 30 min., materia grasa de la leche: 3,6%.

3) Tiempo de mezcla

5 Se examinaron las tasas de eliminación del colesterol utilizando β -CD reticulada en nata en diversos tiempos de mezcla y se proporcionan los resultados en la Tabla 7, a continuación.

10 Se eliminó el colesterol a una tasa de eliminación máxima de 91,20% con un periodo de mezcla de 30 min. Se estimó una tasa de eliminación de colesterol de 84,27% tras 10 min. de mezcla, de 85,05% tras 20 min. de mezcla, de 90,98% tras 40 min. de mezcla y de 90,64% tras 50 min. de mezcla. La prolongación del periodo de tiempo sobre un nivel umbral no presentó ninguna influencia adicional sobre la capacidad de la β -CD de capturar colesterol en la misma y, de esta manera, no incrementó la tasa de eliminación.

15 Tabla 7: efecto del tiempo de mezcla sobre la eliminación del colesterol utilizando β -CD reticulada en nata

Tiempo de mezcla (min.)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
10	84,27
20	85,05
30	91,20
40	90,98
50	90,64

¹⁾ no significativo (P<0,05); factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 10%; velocidad de agitación: 1.400 rpm; temp. de mezcla: 40°C, materia grasa de la leche: 3,6%.

20 4) Velocidad de agitación

Se sometió a ensayo la β -CD reticulada para la tasa de eliminación del colesterol según las velocidades de agitación y se proporcionan los resultados en la Tabla 8, posteriormente.

25 Se eliminó colesterol a una tasa de eliminación máxima de 92,74% a una velocidad de agitación de 1.400 rpm. Se estimó una tasa de eliminación del colesterol de 85,32% a 800 rpm, de 87,49% a 1.000 rpm, de 90,91% a 1.200 rpm y de 88,82% a 1.600 rpm. La tasa de eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en la nata se incrementó con el incremento de la velocidad de agitación. Además, se supuso que una velocidad de agitación de 1.600 rpm o superior provocaba la separación de los lípidos de la nata y la existencia de una capa superior, que presenta poca oportunidad de entrar en contacto con la β -CD.

30 Tabla 8: efecto de la velocidad de agitación sobre la eliminación del colesterol de la nata utilizando β -CD reticulada

Velocidad de agitación (rpm)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
800	85,32
1.000	87,49
1.200	90,91
1.400	92,74
1.600	88,82

35 ¹⁾ no significativo (P<0,05); factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 10%; temperatura de mezcla: 40°C; tiempo de mezcla: 30 min.: 30 min.; materia grasa de la leche: 3,6%.

40 En el Ejemplo 3, se descubrió que las condiciones óptimas para la eliminación del colesterol de la nata utilizando β -CD reticulada con ácido adípico eran de 10% para la cantidad de β -CD reticulada, de 40°C para la temperatura de mezcla, de 30 min. para el tiempo de mezcla y de 1.400 rpm para la velocidad de mezcla, bajo la que se eliminó el colesterol a una tasa media de 91,42%.

Ejemplo de referencia 4: eliminación del colesterol de la manteca utilizando β -CD reticulada

45 1) Concentración de β -CD reticulada

Para determinar qué cantidad de β -CD reticulada es la más eficaz para reducir el colesterol en la manteca, se añadió β -CD reticulada en cantidades de 1%, 3%, 5%, 7% y 8% en peso basado en el peso de manteca. Los ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones de agitación a 150 rpm a 30°C durante 1 h y centrifugando a 240xg a 27°C durante 15 min.

Se proporcionan los resultados de ensayo de tasa de eliminación del colesterol en la Tabla 9, posteriormente. Tal como se observa en la Tabla 9, se midió la β -CD reticulada con ácido adípico para eliminar el colesterol de la

manteca a una tasa máxima de 93,02% utilizada en una cantidad de 5% en peso basado en el peso de manteca, a una tasa mínima de 64,05% utilizada en una cantidad de 1%, y a tasas intermedias de 85,13%, 92,92% y 92,58% utilizada en cantidades de 3%, 7% y 9%, respectivamente.

5 Tabla 9: tasa de eliminación del colesterol según la concentración de la β -CD reticulada en manteca

β -CD (%)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1	64,05
3	85,13
5	93,02
7	92,92
19	92,58

1) no significativo ($P < 0,05$); factores de eliminación del colesterol: temperatura de mezcla: 30°C; velocidad de agitación: 150 rpm; tiempo de mezcla: 1h, manteca 27%.

10

2) Temperatura de mezcla

15 La manteca se solidifica rápidamente a temperaturas inferiores a 10°C. Se llevaron a cabo ensayos de mezcla a diversas temperaturas superiores a 10°C con el fin de evitar la degradación de la calidad, manteniendo simultáneamente la manteca en fase líquida. Para examinar el efecto de la temperatura sobre la tasa de eliminación del colesterol, se mezcló leche con la β -CD reticulada con ácido adípico a diversas temperaturas de entre 10°C y 50°C y se proporcionan los resultados en la Tabla 10, a continuación.

20 La tasa de eliminación de colesterol más alta se midió en 92,38% a 30°C. De la nata se eliminó el colesterol a una tasa de 90,11% a 10°C, de 90,322% a 20°C, de 92,31% a 40°C y de 92,08% a 60°C.

Tabla 10: efecto de la temperatura sobre la eliminación del colesterol de la manteca con β -CD reticulada

Temp. de mezcla (°C)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
10	90,11
20	90,32
30	92,38
40	92,31
50	92,08

25 1) no significativo ($P < 0,05$); factores de eliminación del colesterol: β -CD: 5%; velocidad de agitación: 150 rpm; tiempo de mezcla: 1h, manteca 27%.

3) Tiempo de mezcla

30 Se examinaron las tasas de eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en manteca durante diversos tiempos de mezcla y se proporcionan los resultados en la Tabla 11, a continuación.

35 Se eliminó el colesterol a una tasa de eliminación máxima de 92,01% durante un periodo de mezcla de 1 h. Se midió la tasa de eliminación del colesterol en 87,14% tras 0,5 h de mezcla, en 91,47% tras 1,5 h de mezcla y en 91,48% tras 2,0 h de mezcla. La prolongación del tiempo sobre un nivel umbral no presentó ninguna influencia sobre la capacidad de la β -CD reticulada de capturar el colesterol en la misma, en comparación con otras condiciones y, de esta manera, no incrementó la tasa de eliminación.

40 Tabla 11: efecto del tiempo de mezcla sobre la eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en manteca

Tiempo de mezcla (h)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
0,5	87,14
1,0	92,01
1,5	91,47
2,0	91,47

1) no significativo ($P < 0,05$); factores de eliminación del colesterol: β -CD: 5%; velocidad de agitación: 150 rpm; temp. de mezcla: 30°C, manteca 27%.

45 4) Velocidad de agitación

Se sometió a ensayo la β -CD reticulada para la tasa de eliminación del colesterol en manteca según la velocidad de agitación y se proporcionan los resultados en la Tabla 12, a continuación.

El colesterol fue eliminado a la tasa de eliminación más alta, de 93,11%, a una velocidad de agitación de 150 rpm. Se midió una tasa de eliminación del colesterol de 89,05% a 50 rpm, de 90,48% a 100 rpm, de 93,00% a 200 rpm y de 92,85% a 250 rpm. Respecto a la reducción de la tasa de eliminación del colesterol con el incremento de la velocidad de agitación a una velocidad superior a 150 rpm, se supuso que el estado estable del complejo de β -CD-colesterol entrando en un estado inestable, con la agitación excesiva.

En el Ejemplo 4 se descubrió que las condiciones óptimas para la eliminación del colesterol de la manteca por la β -CD reticulada con ácido adípico eran de 5% para la cantidad de β -CD reticulada, 30°C de temperatura de mezcla, 1 h de tiempo de mezcla y 150 rpm de velocidad de mezcla, bajo las que se eliminó el colesterol a una tasa media de 92,63%.

Tabla 12: efecto de la velocidad de agitación sobre la eliminación del colesterol de la manteca por la β -CD reticulada

Velocidad de agitación (rpm)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
50	89,05
100	90,48
150	93,11
200	93,00
250	92,85

¹⁾ no significativo ($P < 0,05$); factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 5%; temp. de mezcla: 30°C, tiempo de mezcla: 1 h, manteca 27%.

Ejemplo de referencia 5: eliminación del colesterol de la yema de huevo por β -CD reticulada

1) Concentración de β -CD reticulada

Para determinar qué cantidad de β -CD reticulada resulta más eficaz para reducir la cantidad de colesterol de la yema de huevo, se añadió β -CD reticulada en cantidades de 10%, 15%, 20%, 25% y 30% en peso basado en el peso de la yema de huevo considerando su contenido excesivo de colesterol. Los ensayos se llevaron a cabo bajo las condiciones de agitación a 800 rpm a 40°C durante 30 min. y centrifugación a 520xg a 20°C durante 10 min. Los resultados de ensayo de tasa de eliminación de colesterol se proporcionan en la Tabla 13, a continuación.

Tal como se observa en la Tabla 13, se midió la β -CD reticulada con ácido adípico para eliminar el colesterol de la leche a una tasa máxima de 95,75% utilizada en una cantidad de 25% en peso basado en el peso de yema de huevo, a una tasa mínima de 78,53% utilizada en una cantidad de 10%, y a tasas intermedias de 82,73%, 93,28% y 93,68% utilizada en cantidades de 15%, 20% y 30%, respectivamente. Al considerar la rentabilidad económica, se obtuvo una cantidad óptima de 20%.

Tabla 13: tasa de eliminación del colesterol según la concentración de β -CD reticulada en yema de huevo

β -CD (%)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
10	78,53
15	82,73
20	93,28
25	95,75
30	93,68

¹⁾ no significativo ($P < 0,05$); factores de eliminación del colesterol: temp. de mezcla: 40°C; velocidad de agitación: 800 rpm, tiempo de mezcla: 30 min.

2) Temperatura de mezcla

Para examinar el efecto de la temperatura sobre la tasa de eliminación del colesterol, se mezcló yema de huevo con la β -CD a diversas temperaturas y se proporcionan los resultados en la Tabla 14, a continuación.

De la yema de huevo se eliminó el colesterol a una tasa de 82,69% a 30°C, de 87,99% a 35°C, de 90,05% a 40°C, de 88,07% a 45°C y de 88,15% a 50°C. Para alcanzar la tasa de eliminación de colesterol más alta se determinó que la temperatura óptima era de 40°C.

Tabla 14: efecto de la temperatura sobre la eliminación del colesterol de la yema de huevo por la β -CD reticulada

Temp. de mezcla (°C)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
30	82,69

35	87,99
40	90,05
45	88,07
50	88,15

¹⁾ no significativo (P<0,05); factores de eliminación del colesterol: β-CD reticulada: 20%; velocidad de agitación: 800 rpm, tiempo de mezcla: 30 min.

5 3) Tiempo de mezcla

Se examinaron las tasas de eliminación de colesterol de la β-CD reticulada en yema de huevo en diversos tiempos de mezcla y se proporcionan los resultados en la Tabla 15, a continuación.

10 Se eliminó el colesterol a la tasa más alta, de 91,49%, en un tiempo de mezcla de 30 min. Se midió una tasa de eliminación de colesterol de 84,54% tras 10 min. de mezcla, de 88,07% tras 20 min. de mezcla, de 91,39% tras 40 min. de mezcla y de 78,92% tras 50 min. de mezcla. Por lo tanto, se determinó que 30 min. eran óptimos para eliminar el colesterol de la yema de huevo.

15 Tabla 15: efecto del tiempo de mezcla sobre la eliminación del colesterol de la β-CD reticulada en yema de huevo

Tiempo de mezcla (min.)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
10	84,54
20	88,07
30	91,49
40	91,30
50	78,92

¹⁾ no significativo (P<0,05).

20 Factores de eliminación del colesterol: β-CD reticulada: 20%; velocidad de agitación: 800 rpm, temp. de mezcla: 40°C.

4) Velocidad de agitación

25 Se sometió a ensayo la β-CD reticulada para la tasa de eliminación del colesterol de la yema de huevo según la velocidad de agitación y se proporcionan los resultados en la Tabla 16, a continuación.

30 Se eliminó el colesterol a la tasa de eliminación máxima, de 91,64%, a una velocidad de agitación de 800 rpm. Se midió una tasa de eliminación del colesterol de 85,10% a 400 rpm, de 90,50% a 600 rpm, de 88,59% a 1.000 rpm y de 75,89% a 1.200 rpm.

Tabla 16: efecto de la velocidad de agitación sobre la eliminación del colesterol de la yema de huevo por la β-CD reticulada

Velocidad de agitación (rpm)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
400	85,10
600	90,50
800	91,64
1.000	88,59
1.200	75,89

35 ¹⁾ no significativo (P<0,05).

Factores de eliminación del colesterol: β-CD reticulada: 20%; temp. de mezcla: 40°C; tiempo de mezcla: 30 min.

40 5) Factor de dilución

Se examinaron las tasas de eliminación del colesterol de la β-CD reticulada a diversas diluciones de yema de huevo en agua destilada y se proporcionan los resultados en la Tabla 17, a continuación.

45 Se eliminó el colesterol a la tasa más alta, de 94,55%, al diluir la yema de huevo en un volumen igual de agua destilada. Se midió una tasa de eliminación del colesterol de 76,52% en una mezcla 1:05 de yema de huevo y agua destilada, de 93,24% en una mezcla 1:1,5 de yema de huevo y agua destilada, de 93,53% en una mezcla 1:2 de yema de huevo y agua destilada y de 84,61% en una mezcla 1:3 de yema de huevo y agua destilada.

Tabla 17: eliminación del colesterol de la yema de huevo con β -CD reticulada según el factor de dilución

Yema de huevo:agua de dilución	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1:0,5	76,52
1:1	94,55
1:1,5	93,24
1:2	93,53
1:3	84,61

¹⁾ no significativo (P<0,05).

5

Factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 20%; temp. de mezcla: 40°C; tiempo de mezcla: 30 min.

6) Velocidad de centrifugación

10 Se examinaron las tasas de eliminación del colesterol de la β -CD reticulada en yema de huevo a diversas velocidades de centrifugación y se proporcionan los resultados en la Tabla 18, posteriormente. Al centrifugar la yema de huevo a 460xg, la β -CD reticulada mostró la tasa de eliminación de colesterol más alta, de 90,92%. Se midieron tasas de eliminación del colesterol de 89,60% a 400xg, de 89,30% a 520xg, de 89,27% a 580xg y de 7,88% a 640xg. La velocidad de 460xg es la óptima para eliminar el colesterol de la yema de huevo.

15

En el Ejemplo 5, las condiciones óptimas para la eliminación del colesterol de la yema de huevo por la β -CD reticulada con ácido adípico fueron de 20% para la cantidad de β -CD reticulada, 1:1 para el factor de dilución en agua destilada, 40°C para la temperatura de mezcla, 30 min. para el tiempo de mezcla, 800 rpm para la velocidad de mezcla y 460xg para la velocidad de centrifugación, bajo las que se eliminó el colesterol a una tasa media de 92,70%.

20

Tabla 18: eliminación del colesterol de la yema de huevo con β -CD reticulada

Velocidad de centrifugación (xg)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
400	89,60
460	90,92
520	89,30
580	89,27
640	87,88

25 ¹⁾ no significativo (P<0,05).

Factores de eliminación del colesterol: β -CD reticulada: 20%; temp. de mezcla: 40°C; tiempo de mezcla: 30 min.

Ejemplo 6: recuperación y reciclado de la β -CD reticulada

30

Para examinar la eficiencia de reciclado de la β -CD reticulada en leche y nata, se recuperaron los complejos de β -CD-colesterol, se mezclaron en una proporción de volúmenes de 6:1 con una mezcla de solventes orgánicos (ácido acético:isopropanol=3:1) y se trataron durante 10 min. en un limpiador ultrasónico. Bajo agitación durante 2 horas a 50°C y 100 rpm, se extrajeron muestras cada 5 min. y se dejaron en reposo durante 5 min.

35

Se enfriaron las muestras hasta la temperatura ambiente y se centrifugaron a 630xg durante 5 min. para precipitar la β -CD, seguido de secado del precipitado a 50°C durante 6 horas en un horno de secado con el fin de recuperar la β -CD.

40 La β -CD regenerada con solventes orgánicos se sometió a ensayo para la eficiencia de reciclado en leche y se proporcionan los resultados en la Tabla 19, a continuación. Tras la primera ronda de regeneración, se midió una eficiencia de reciclado de la β -CD reticulada de 100% o superior. Incluso tras la quinta ronda de regeneración, la β -CD regenerada también mostró una eficiencia de reciclado de 100% o superior. Hasta la quinta ronda de regeneración, la β -CD regenerada se recicló prácticamente de manera perfecta. La eficiencia de reciclado de la β -CD regenerada fue de 90,94% tras la novena ronda de regeneración y de 88,13% tras la décima ronda de regeneración, siendo la media de 97,30% en leche.

45

Tabla 19: eliminación del colesterol de la β -CD reticulada regenerada de la leche

Rondas de regeneración	Eficiencia de reciclado (%)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1	100,13	92,51
2	99,92	92,32
3	99,72	92,13

4	99,81	92,21
5	100,03	92,42
6	99,39	91,83
7	98,04	90,58
8	96,88	89,51
9	90,94	84,02
10	88,13	81,42
Media	97,30	89,90

¹⁾ no significativo (P<0,05).

5 Condiciones de regeneración: solventes orgánicos (ácido acético:isopropanol=3:1): β -CD=6:1; velocidad de centrifugación: 1.500 rpm; tiempo de centrifugación: 5 min.; secado: 6 h; contenido de grasa: 3,6%.

10 Ejemplo 7: eliminación del colesterol de la nata con β -CD reticulada regenerada

10 Se aplicó a nata β -CD reticulada regenerada tal como en el Ejemplo 5 y se proporcionan los resultados en la Tabla 20, a continuación.

15 Tras la primera ronda de regeneración, se midió una eficiencia de reciclado de la β -CD reticulada de 100% o superior. Además, tras la tercera ronda de regeneración, la β -CD regenerada también mostró una eficiencia de reciclado de 100,02%. De esta manera, hasta la tercera ronda de regeneración, la β -CD regenerada se recicló de manera prácticamente perfecta. La eficiencia de reciclado de la β -CD regenerada fue de 90,27% tras la décima ronda de regeneración, siendo de hasta 97,82% de media para la nata.

Tabla 20: eliminación del colesterol de la β -CD reticulada regenerada de la nata

Rondas de regeneración	Eficiencia de reciclado (%)	Tasas de eliminación del colesterol (%) ¹⁾
1	100,03	91,45
2	99,96	91,38
3	100,02	91,44
4	98,94	90,45
5	98,91	90,42
6	99,19	90,68
7	97,79	89,40
8	97,57	89,20
9	94,55	86,44
10	90,27	83,40
Media	97,82	89,43

20 ¹⁾ no significativo (P<0,05).

25 Condiciones de regeneración: solventes orgánicos (ácido acético:isopropanol=3:1): β -CD=6:1; velocidad de centrifugación: 1.500 rpm; tiempo de centrifugación: 5 min.; secado: 6 h; contenido de grasa: 3,6%.

30 Ejemplo de referencia 8: yogur

30 Para la aplicación de la β -CD reticulada al yogur, se añadió β -CD reticulada en una cantidad de 1% a leche, seguido de agitación (10°C, 5 min., 400 rpm) y centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Se homogeneizó la leche bajo una presión de 1.000 psi a 50°C y se le añadió leche desnatada en una cantidad de 3,7% y con un cultivo inóculo en una cantidad de 0,02% a 40°C. La mezcla láctea se fermentó a 43°C durante 6 horas en un incubador, se estabilizó a 10°C durante un día y se almacenó a 4°C. Tras retirarla, se analizó cuantitativamente 1 g de la leche fermentada mediante cromatografía de fases y se descubrió que se había eliminado el colesterol de la misma a una tasa de 91,38%.

35 Ejemplo de referencia 9: nata montada

40 A partir de leche cruda pasteurizada a 72°C durante 15 min. se separó la nata a 55°C y se estandarizó a nata con un contenido de lípidos de 36%. Se incubó la nata durante la noche a 5°C y se le añadió β -CD reticulada en una cantidad de 10%, seguido de agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm) y centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Tras el tratamiento con un emulsionante (α -celulosa: 0,2%; Avicell: 0,2%; alginato sódico: 0,2%; éster de azúcar: 0,1%; sacarosa: 0,3%), se homogeneizó a 60°C bajo una presión de 100 psi. La nata homogeneizada se enfrió a 4°C y se maduró durante 24 horas. Utilizando un EGS tipo 06 (E3290 modelo 296, Alemania), se emulsionó la nata. La cromatografía de gases de 1 g de la nata mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 88,94%.

45

Ejemplo de referencia 10: mantequilla

Se añadió β -CD reticulada en una cantidad de 10% a nata con un contenido de lípidos de 36%, que seguidamente se agitó (40°C, 30 min., 1.400 rpm). Se llevó a cabo la centrifugación (25°C, 10 min., 140xg) para eliminar el colesterol y β -CD reticulada de la nata. Tras la incubación durante un día, se batió la nata a una temperatura de entre 8°C y 10°C a una velocidad constante. Al empezar a formarse partículas de mantequilla, se hizo girar la mantequera durante 10 revoluciones a una velocidad más baja y seguidamente se extrajo la leche cuajada. A continuación, se lavó la mantequera a velocidades bajas con agua de enfriamiento, al igual que la leche cuajada extraída. Se amasó un conjunto de partículas de mantequilla para eliminar el agua de las mismas y se añadió sal en una cantidad de 1% a la mantequilla. Tras conformar en un molde, se envasó al vacío la mantequilla y se almacenó a -20°C. El análisis de cromatografía de gases de 1 g de la mantequilla mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 91,10%.

Ejemplo de referencia 11: queso cheddar

A partir de leche cruda pasteurizada a 72°C durante 15 min. se separó la nata a 55°C y se estandarizó a un contenido de grasas de 36%. Se añadió β -CD reticulada en una cantidad de 10% veces la cantidad de nata para eliminar el colesterol, seguido de centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Se mezcló la nata en la que se había reducido el colesterol, con leche desnatada, se homogeneizó a una presión de 1.000 psi, se mezcló uniformemente a 32°C con un cultivo inóculo (0,004%) y se dejó en reposo durante 30 min. Tras la adición de CaCl_2 a 10% (0,03%) y cuajo (0,19%), se dejó en reposo durante 45 min. Tras formarse adecuadamente, se cortaron los cuajos y se agitaron lentamente durante 15 min. y después se calentaron a intervalos reguladores hasta 38°C durante 3 min. Al alcanzar una acidez de 0,15-0,17%, se drenó el suero. Tras apilarse los cuajos en la cara interna de la tina para queso, se repitió un procedimiento de cheddarización ("cheddaring") a intervalos de 15 min. hasta alcanzar la acidez el 0,5%. Tras completarse el procedimiento de cheddarización, se trituraron los cuajos, seguido de la adición de sal en una cantidad de 2,0% a los mismos. Los cuajos de queso se prensaron durante la noche a una presión de 2,5 kg/cm². Los bloques de queso resultante se cortaron en tamaños predeterminados, se envasaron al vacío y se maduraron a 7°C.

La cromatografía de gases de 1 g d queso cheddar mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 88,24%.

Ejemplo de referencia 12: queso mozzarella

A partir de la leche cruda pasteurizada con 3,6% de materia grasa a 72°C durante 15 min., se separó la nata a 55°C y se estandarizó a un contenido de grasa de 36%. Se añadió β -CD reticulada en una cantidad de 10% veces la cantidad de la nata a fin de eliminar el colesterol, seguido de agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm) y centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). La nata tratada con β -CD se mezcló con leche desnatada, se homogeneizó bajo una presión de 70 kg/cm², se mezcló uniformemente a 20°C con 0,004% de un cultivo inóculo y 0,03% de CaCl_2 al 10% y se dejó en reposo durante 30 min. Tras la adición de 0,019% de cuajo, se dejó en reposo durante 30 min. para formar los cuajos, que seguidamente se cortaron utilizando un cuchillo de cuajo y se dejó en reposo durante 15 min. Se calentó la masa cuajada a 45°C durante 40 min. Tras alcanzar una acidez de entre 0,18% y 0,19%, se drenó el suero. Al alcanzar la acidez del suero el 0,23%, se lavaron los cuajos de queso con la misma cantidad de agua, calentada a 45°C, que la cantidad de suero drenada. A una acidez del suero de 0,5%, se voltearon los cuajos a intervalos de 15 min., seguido de calentamiento a 75°C. Se exprimieron los cuajos durante aproximadamente 10 min. y se enfriaron a 4°C durante 2 horas. Tras sumergir durante 2 horas en una solución salina al 23%, la masa cuajada se envasó al vacío y se almacenó a 4°C.

La cromatografía de fases de 1 g de queso mozzarella mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 86,98%.

Ejemplo de referencia 13: queso crema

Se pasteurizó leche cruda a 72°C durante 15 s y se separó la nata de la misma a 55°C. Se estandarizó la nata a un contenido de materia grasa de 36% y se mezcló con 10% de β -CD reticulada bajo agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm), seguido de centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Esta nata nuevamente se estandarizó a un contenido de grasa de 11% y se homogeneizó a 50°C bajo una presión de 680 psi. Tras enfriar a 30°C, se mezcló la nata con 0,05% de un cultivo iniciador y se dejó en reposo durante 30 min. Tras la adición de 0,005% de cuajo y 0,03% de CaCl_2 se dejó en reposo durante 30 min. El cuajo resultante se cortó utilizando un cuchillo de cuajo y se incubó a 30°C durante 6 horas hasta que la acidez del suero alcanzó un pH de 4,7. Tras el tratamiento térmico a 45°C durante 20 min., se drenó el suero y se voltearon los cuajos 1 y 2 horas después de drenar. Se llevó la incubación a 28°C durante 4 horas y después a 20°C durante la noche. Se añadió 1% de sal antes de almacenar a 4°C.

La cromatografía de gases de 1 g del queso crema mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 91,36%.

Ejemplo de referencia 14: queso azul

Se pasteurizó leche cruda a 72°C durante 15 s y se separó la nata a 55°C de la misma. La nata se estandarizó a un contenido de grasas de 36% y se mezcló con 10% de β -CD reticulada bajo agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm), seguido de centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Nuevamente esta nata se homogeneizó, inicialmente bajo una presión de 500 psi y después secundariamente bajo una presión de 1.000 psi. La nata se mezcló con leche desnatada y 2% de un cultivo iniciador y se dejó reposar durante 1 hora. Tras la adición de 0,0154% de cuajo, se dejó en reposo durante 30 min. Utilizando un cuchillo de cuajo se cortó la cuajada resultante en tamaños predeterminados. Estos se calentaron a 30°C hasta que la acidez del suero se incrementó a 0,03%. Durante el calentamiento se agitaron los cuajos cada cinco min. y se calentaron a 33°C inmediatamente antes de drenar el suero. Se añadió 2% de sal y 0,061% de *Penicillium roqueforti* a los cuajos, que seguidamente se voltearon a intervalos de 15 min. durante 2 horas. Tras la incubación durante la noche, se salaron los cuajos cuatro o más veces durante 5 días. Seis días después de la incubación, el queso se envolvió en Cryovac, se punzó en un diámetro de 0,3 cm utilizando una aguja, y se maduró. Tras un tiempo de maduración adecuado, el queso se envolvió nuevamente en hoja de aluminio y se almacenó a 2,2°C.

La cromatografía de gases de 1 g de queso azul mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 89,26%.

Ejemplo de referencia 15: queso fetta

Se pasteurizó leche cruda a 72°C durante 15 s y se separó la nata de la misma a 55°C. Se estandarizó la nata a un contenido de grasa de 36% y se mezcló con 10% de β -CD reticulada, bajo agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm), seguido de centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). Esta nata nuevamente se estandarizó a un contenido de grasa de 5% y se homogeneizó bajo una presión de 500 psi. Tras enfriar a 32°C, se mezcló la nata con 0,02% de un cultivo iniciador. Una hora después, tras la adición de 0,02% de cuajo, se dejó en reposo durante 30 min. El cuajo resultante se cortó utilizando un cuchillo de corte, se dejó en reposo durante 20 min. y se agitó bien durante 20 min. Tras la incubación a pH 4,6, se exprimió el cuajo en un recipiente durante 20 horas. Se cortó el cuajo en tamaños predeterminados, se sumergió en una solución salina al 23% y se espolvorearon partículas de sal gruesa en una cantidad de 14% antes de madurar durante 2 a 3 meses.

La cromatografía de gases de 1 g del queso fetta mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 90,86%.

Ejemplo de referencia 16: helado

Se mezcló nata con un contenido de grasa de 26% con 10% de β -CD reticulada bajo agitación (40°C, 30 min., 1.400 rpm), seguido de centrifugación (25°C, 10 min., 140xg). En un tanque de mezcla mantenido a 50°C se mezcló la nata con leche desnatada en polvo, azúcar, un estabilizante (carboximetil-celulosa) y agua. Se pasteurizó la mezcla a 72°C durante 15 min. y se homogeneizó a 60°C en dos etapas (primera: 175 kg/cm²; segunda: 35 kg/cm²), seguido de la maduración a 4°C durante 24 horas. En un congelador para helados, se mantuvo el helado a -3,8°C durante 7 min., se envasó a -20°C y se estabilizó a -26°C durante 2 horas antes del almacenamiento a -20°C durante un par de semanas.

La cromatografía de gases de 1 g de helado mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 88,46%.

Ejemplo de referencia 17: salchichas

Se utilizó manteca como ingrediente para salchichas. Se mezclaron 100 g de manteca con 5% de β -CD reticulada y una cantidad igual de agua. Tras agitar a 27°C a 150 rpm durante 1 hora, se llevó a cabo la centrifugación a 230xg durante 15 min. para extraer la manteca en la que se había reducido el contenido de colesterol. A esta manteca se le añadió 2% de NaCl y un agente colorante (0,1% de KNO₃ y 0,01% de NaNO₂). Tras el almacenamiento a 4°C durante 3 días, la manteca solidificada se molió a 10°C o menos. En un bol frío se mezcló con 20% de agua fría y se cortó a 10°C durante 10 min. Este material se mezcló bien con especias, ligantes, condimentos, antioxidantes y colorantes comestibles y después con 5% de almidón de maíz. La mezcla se llevó a cabo cuidadosamente durante 10 min. de manera que se evitase la infiltración de aire. Al empezar a observarse que la mezcla adquiría viscosidad, se terminó la mezcla. La mezcla resultante se envolvió con película envolvente Kureharon, se trató térmicamente a 63°C durante 30 min. y se envasó al vacío a 4°C.

La cromatografía de gases de 1 g de la salchicha mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 92,02%.

Ejemplo de referencia 17: mayonesa

Se separaron huevos marrones en yemas y claras y las yemas se pasaron por un tamiz de malla 50 para eliminar la membrana vitelina y las chalazas. Las yemas de huevo desnudas se diluyeron en un volumen igual de agua destilada, se mezclaron con 10% de β -CD reticulada a 20°C durante 10 min. bajo agitación a 400 rpm y se centrifugaron a 20°C a 140xg durante 10 min. para eliminar los complejos de β -CD-colesterol. Utilizando un mezclador, se mezclaron 140 g de las yemas de huevo de las que se había eliminado colesterol, con cantidades

pequeñas de azúcar y sal, seguido de 800 ml de aceite de soja y 35 ml de vinagre de manera alternativa. Tras completar la emulsificación, se llevó a cabo la mezcla a baja velocidad, proporcionando mayonesa.

5 La cromatografía de gases de 1 g de la mayonesa mostró que se había eliminado el colesterol a una tasa de 87,90%.

Aplicabilidad industrial

10 El tratamiento con la β -CD reticulada preparada según la presente invención, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, puede eliminar el colesterol en cantidades máximas de 93% de la leche, 91% de la nata, 93% de la manteca y 95% de la yema de huevo. Además, la β -CD reticulada que captura el colesterol puede regenerarse utilizando un solvente orgánico según la presente invención, mostrando tasas de eliminación del colesterol excelentes, de 90% tras la séptima ronda de regeneración y de hasta 81% tras la décima ronda de regeneración en leche y tasas de eliminación del colesterol de 90% tras la sexta ronda de regeneración y de 83%
15 incluso tras la décima ronda de regeneración en nata.

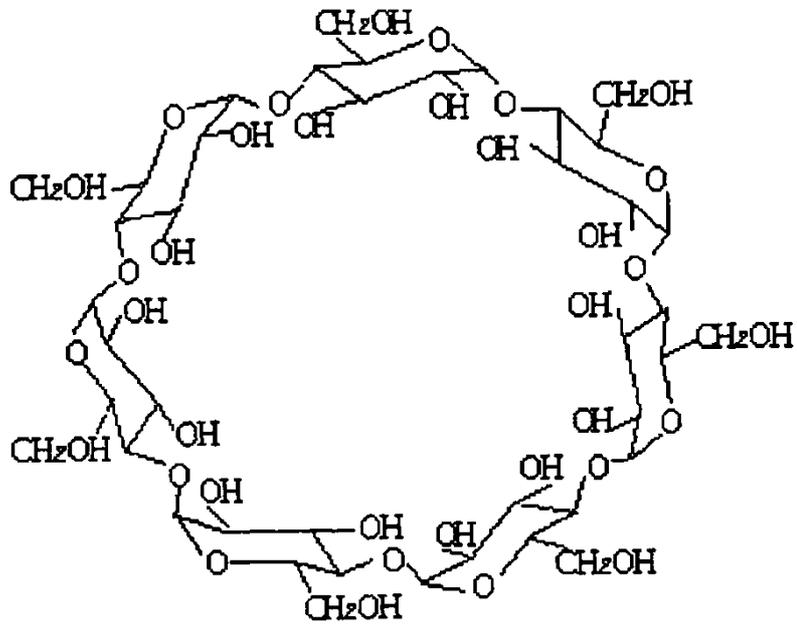
Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de eliminación del colesterol económicamente rentable debido a que evita la contaminación ambiental y el incremento del coste atribuido a la eliminación de la β -CD tras un único uso.
20

Además, la presente invención puede contribuir a la salud de las personas al proporcionar productos alimentarios con menor contenido de colesterol, tales como productos lácteos, productos cárnicos, productos de huevo, etc.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para regenerar una beta-ciclodextrina reticulada, presentando la beta-ciclodextrina reticulada
colesterol atrapado en la misma, que comprende recoger la beta-ciclodextrina reticulada en una capa orgánica,
5 separar la capa orgánica y evaporar la capa orgánica para proporcionar la beta-ciclodextrina reticulada,
en el que el agente de reticulación es el ácido adípico,
en el que la capa orgánica está formada por una mezcla de ácido acético e isopropanol, y
10 en el que la etapa de recolección se lleva a cabo mezclando un solvente orgánico con la beta-ciclodextrina a 40-
60°C durante 1 a 3 horas bajo agitación a 50-150 rpm y la etapa de separación se lleva a cabo enfriando la
mezcla hasta la temperatura ambiente para separar las capas y liberar el sobrenadante.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

