

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 060**

51 Int. Cl.:

C09K 15/06 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A23L 2/44 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)
A23L 3/3544 (2006.01)
C07D 311/32 (2006.01)
C09K 15/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2005** **E 05822387 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 1783193**

54 Título: **Material antioxidante, agente antideterioro, y alimento o bebida**

30 Prioridad:

27.12.2004 JP 2004377302

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

06.05.2016

73 Titular/es:

POKKA SAPPORO FOOD & BEVERAGE LTD.
(100.0%)
4 2 29, Sakae, Naka ku
Nagoya shi, Aichi 460 8415, JP

72 Inventor/es:

FUKUMOTO, SYUICHI;
TSURUHAMI, KAZUTAKA y
MORI, SHIGEHARU

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 060 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

Material antioxidante, agente antideterioro, y alimento o bebida

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un material antioxidante.

5 Técnica anterior

Se sabe que puede obtenerse un limón fermentado sometiendo al menos una materia prima de fermentación, seleccionada de una cáscara de limón, la membrana de un segmento y la pulpa, a un tratamiento fermentativo microbiano utilizando *Aspergillus saitoi* (véase el documento de patente 1). Este limón fermentado se produce mediante una reacción que genera 8-hidroxihesperetina mediante la transformación microbiana de la hesperidina contenida en la materia prima de fermentación. Este limón fermentado muestra unos efectos antioxidantes altos y puede fomentar con facilidad un uso mayor y más eficaz de los limones. Como alternativa, el documento de patente 2 describe un limón fermentado obtenido sometiendo una materia prima de fermentación, que consiste en un fruto de limón, o una de sus partes, a un tratamiento fermentativo microbiano empleando *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*.

El documento de patente 3 describe agentes que contienen una aglicona flavonoide, por ejemplo, eriodictiol y diosmetina, derivada del limón, como componente activo. Estas agliconas flavonoides pueden producirse convirtiendo glicósidos flavonoides derivados del limón en aglicona. La agliconización se realiza, por ejemplo, mediante un tratamiento con β -glucosidasa o una fermentación microbiana con microorganismos del género *Aspergillus*.

El documento de patente 4 describe un captador de radicales libres con el uso combinado de vitamina C, que se obtiene incluyendo, como ingredientes activos, eriocitrina (eriodictiol 7-rutinósido) y/o una sustancia que contiene eriocitrina y vitamina C.

[Documento de patente 1] Publicación de patente japonesa abierta a consulta pública n.º 2002-355004

[Documento de patente 2] Publicación de patente japonesa abierta a consulta pública n.º 2003-102429

[Documento de patente 3] Publicación de patente japonesa abierta a consulta pública n.º 2004-267155

[Documento de patente 4] Publicación de patente japonesa abierta a consulta pública n.º 2002-029975

Descripción de la invención***Problemas a ser resueltos por la invención***

Los presentes inventores han desarrollado, a través de estudios profundos, un material antioxidante que muestra unos efectos antioxidantes mayores que los efectos esperados de los limones fermentados convencionales y, en consecuencia, han logrado esta invención. El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una material antioxidante que muestra con facilidad unos efectos antioxidantes altos. El material antioxidante puede estar contenido en un agente antideterioro que muestra con facilidad unos efectos inhibidores altos sobre el deterioro, o en un alimento o bebida que muestra con facilidad unos efectos antioxidantes altos y unos efectos inhibidores del deterioro altos.

Medios para resolver los problemas

Para lograr el objeto, un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un material antioxidante que contiene una aglicona flavonoide (aglicona) y vitamina C.

La aglicona flavonoide es eriodictiol y/o diosmetina obtenidos mediante el tratamiento con glicosidasa de una materia prima que contiene un glicósido flavonoide derivado de limones, limas o sudachis empleando una β -glicosidasa derivada de *Penicillium multicolor*.

El material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la presente invención puede estar contenido en un agente antideterioro o en un alimento o una bebida.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de eriocitrina, etc., en el ejemplo 1 de la presente invención;

la figura 2 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de eriocitrina, etc., en el ejemplo 1;

la figura 3 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de diosmina, etc., en el ejemplo 1;

la figura 4 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de diosmina, etc., en el ejemplo 1;

la figura 5 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de eriocitrina, etc., en el ejemplo 1;

5 y la figura 6 es una gráfica que muestra los cambios en las concentraciones de diosmina, etc., en el ejemplo 1.

Mejor modo de realizar la invención

A continuación se proporciona una explicación detallada de una realización de la presente invención.

10 Un material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la realización contiene una aglicona flavonoide (en lo sucesivo denominada aglicona) derivada de cítricos, por ejemplo, limones, limas o sudachis, y vitamina C (ácido ascórbico) como ingredientes eficaces. Este material antioxidante muestra unos efectos útiles, por ejemplo, unos efectos antioxidantes e inhibidores sobre el deterioro muy altos, mediante los efectos sinérgicos de la aglicona y la vitamina C. La aglicona se obtiene mediante el tratamiento de una materia prima que contiene un glicósido flavonoide derivado de un cítrico, con β -glucosidasa derivada de *Penicillium multicolor* para formar sus agliconas.

15 Se prefiere que este material antioxidante se produzca a través de una etapa de mezclado de la aglicona obtenida mediante el tratamiento, para formar las agliconas con la vitamina C. Sin embargo, cuando el contenido en vitamina C en la materia prima es tan alto como en la fruta de limón, y puede suprimirse una reducción en la vitamina C provocada por el tratamiento para formar las agliconas, resulta menos necesario realizar la etapa de mezclado. Concretamente, este material antioxidante necesita contener vitamina C en al menos una cantidad detectable con un dispositivo de detección conocido en la técnica y, preferiblemente, contiene vitamina C que se mezcla en la etapa de mezclado. En un procedimiento para producir este material antioxidante, pueden realizarse etapas de procesamiento (por ejemplo, las etapas de dilución, condensación, extracción, purificación y secado) distintas de la etapa de someter el glicósido flavonoide al tratamiento para formar las agliconas y la etapa de mezclado.

25 Este material antioxidante contiene los ingredientes eficaces que muestran unos efectos antioxidantes altos. El material antioxidante puede mostrar, por ejemplo, un efecto saludable alto mediante la supresión de la degeneración oxidativa de biocomponentes, provocada por el oxígeno activo. El material antioxidante puede estar contenido para su uso, por ejemplo, en un alimento o bebida (alimento saludable), productos farmacéuticos, cuasifármacos y cosméticos. Además, el material antioxidante puede suprimir, de modo eficaz, diversos tipos de deterioro de productos, por ejemplo, el deterioro oxidativo de grasas y aceites, el deterioro de componentes aromatizantes, la descomposición de pigmentos y la pérdida de color de pigmentos. Puesto que este material antioxidante contiene los ingredientes eficaces que muestran unos efectos antioxidantes altos, el material antioxidante puede estar contenido para su uso en alimentos o bebidas, tales como alimentos saludables. El alimento o la bebida incluyen productos de bebidas o productos alimentarios, tales como bebidas isotónicas, bebidas de té, hojas de té, hierbas, productos lácteos (por ejemplo, leche y yogur), productos alimentarios que contienen agentes gelificantes (por ejemplo, pectina y carragenano), excipientes (por ejemplo, lactosa y dextrina), componentes aromatizantes, edulcorantes, y grasas y aceites. El alimento o la bebida pueden procesarse en diversas formas y utilizarse, por ejemplo, como comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, y también pueden utilizarse como jarabe o caramelo.

40 Se emplea eriodictiol y/o diosmetina como la aglicona. Preferiblemente, se emplea eriodictiol porque muestra unos efectos antioxidantes altos. Estas agliconas se obtienen tratando el glicósido flavonoide contenido en las hojas o los frutos del cítrico que contienen la materia prima, o un componente del fruto, para formar sus agliconas. El glicósido flavonoide tiene una estructura en la que la aglicona y el azúcar están unidos mediante un enlace glicosídico. Concretamente, la aglicona se genera (se libera) mediante una reacción enzimática (reacción de glicosidasa) que rompe el enlace glicosídico del glicósido flavonoide. En esta reacción enzimática, se genera (se libera) simultáneamente azúcar como subproducto.

50 Se emplea cualquiera de las hojas o los frutos de los cítricos que contienen la sustancia, o una porción de un componente del fruto, como materia prima. Preferiblemente, se emplea un extracto de glicósido flavonoide extraído de un componente distinto del zumo del cítrico. Como alternativa, puede utilizarse el zumo del cítrico o glicósido flavonoide purificado (aislado) a partir del extracto, como materia prima. Preferiblemente, se emplea un disolvente hidrófilo, por ejemplo, agua, alcohol (metanol o etanol), y alcohol hídrico, como disolvente para obtener el extracto. Se emplea más preferiblemente metanol, una disolución acuosa de este, o agua, y aún más preferiblemente agua, porque el agua puede obtenerse a bajo precio. Un fruto cítrico consiste principalmente en zumo, una piel (albedo y

flavado), una membrana de los segmentos, y la pulpa. Debido a que las hojas y el fruto de los cítricos tienen un contenido en aglicona menor que 0,01% en peso, apenas contienen aglicona. Además, por razones de ahorro del tiempo requerido para producir la materia prima y la fácil promoción del uso eficaz del fruto de los cítricos, lo más preferido es utilizar un residuo del zumo exprimido del fruto del cítrico del que ya se ha exprimido el zumo, o un extracto de este, como materia prima. El residuo del zumo exprimido contiene una piel (albedo y flavado), una membrana de los segmentos, una porción de pulpa, y una cantidad pequeña de zumo que no ha sido exprimido y, en especial, contiene una gran cantidad del glicósido flavonoide.

El glicósido flavonoide tiene una estructura en la que la aglicona y el monosacárido o disacárido están unidos mediante un enlace glicosídico. Los ejemplos de este glicósido flavonoide incluyen: eriocitrina o eriodictiol-7-glucósido, glicósido compuesto de eriodictiol y rutinosa (L-ramnosil-D-glucosa); diosmina o diosmetin-7-glucósido, glicósido compuesto de diosmetina y rutinosa; y 6,8-di-C- β -glucosildiosmina (DGD) o 6-C- β -glucosildiosmina (GD), glicósido compuesto de diosmetina y glucosa. Estos glicósidos flavonoides tienen un efecto antioxidante alto. Por otra parte, la aglicona es eriodictiol o diosmetina. Estas agliconas tienen un efecto antioxidante y una absorbabilidad *in vivo* significativamente mejorada, comparado con los del glicósido flavonoide. De estas dos agliconas, el eriodictiol, que ha demostrado tener un efecto antioxidante especialmente alto, se emplea de la manera más preferible.

Cuando una materia prima que contiene vitamina C en grandes cantidades se somete a la formación de sus agliconas, la vitamina C apenas se reduce mediante el tratamiento para formar las agliconas, y permanece en el material antioxidante. Por tanto, cuando se realiza el tratamiento para formar las agliconas empleando un fruto, un glicósido flavonoide más o menos purificado o un zumo que contiene vitamina C, la aglicona resultante puede mostrar el efecto sinérgico con la vitamina C sin someterse a la etapa de mezclado de mezclar la vitamina C preparada por separado con la aglicona. En este caso, se prefiere que el fruto del cítrico se trate directamente para formar sus agliconas. También se prefiere que el glicósido flavonoide más o menos purificado se trate para formar sus agliconas, o bien debe tratarse una materia prima compuesta por el fruto o el glicósido flavonoide más o menos purificado suplementado con zumo para formar sus agliconas. Por el contrario, cuando se requiera la aglicona con una alta pureza, se prefiere tratar el glicósido flavonoide altamente purificado para formar sus agliconas. El tratamiento para formar las agliconas de la presente invención es un tratamiento con glicosidasa. El tratamiento para formar las agliconas también puede ser un tratamiento fermentativo microbiano.

El tratamiento fermentativo microbiano es un tratamiento realizado inoculando la materia prima con un microorganismo del género *Aspergillus* y cultivando el microorganismo bajo condiciones de fermentación dadas durante un periodo dado. Este tratamiento fermentativo microbiano libera a la aglicona del glicósido flavonoide por medio de una β -glicosidasa producida por el microorganismo (en especial, las hifas vegetativas). Los ejemplos de microorganismo incluyen moho koji negro y moho koji amarillo. Los ejemplos de moho koji negro incluyen *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus awamori*. Los ejemplos de moho koji amarillo incluyen *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, y *Aspergillus tamarii*. De estos microorganismos, pueden utilizarse el moho koji negro *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, debido a su excelente eficacia de conversión de la reacción para producir la aglicona.

Un procedimiento para inocular la materia prima con el microorganismo incluye un procedimiento en el que las esporas del microorganismo se rocían directamente y se unen a la materia prima. Como alternativa, también es posible la siguiente inoculación. La inoculación se logra realizando un tratamiento de precultivo en el que un medio que contiene el microorganismo se cultiva con agitación por adelantado bajo condiciones aerobias. El medio precultivado después se rocía y se une a la materia prima completa. Como alternativa, la materia prima se sumerge en el medio precultivado. El tratamiento fermentativo microbiano puede realizarse con facilidad bajo condiciones aerobias. Por tanto, puede utilizarse un recipiente de cultivo con una base ancha y poca profundidad, por ejemplo, una placa de cultivo que tenga una base cerrada, en el tratamiento fermentativo microbiano. La materia prima puede colocarse uniformemente para que se extienda por la parte interior de la base del recipiente de cultivo. La temperatura de fermentación puede ser de 10 a 40 °C, o de 20 a 40 °C, siempre que sean las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo. El tratamiento fermentativo microbiano puede realizarse en la oscuridad, siempre que sean las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo. Para realizar el tratamiento fermentativo microbiano para formar las agliconas de modo más específico y eficaz, las condiciones para este tratamiento fermentativo microbiano pueden ajustarse como sigue. El tratamiento fermentativo microbiano se realiza con una hifa vegetativa del microorganismo del género *Aspergillus* en estado de alta actividad β -glicosidasa y baja actividad de otras enzimas (por ejemplo, hidroxilasa). Las condiciones principalmente incluyen un periodo de fermentación. El periodo de fermentación para obtener la aglicona en grandes cantidades se termina, antes de que se complete la formación de esporas de la hifa vegetativa del microorganismo, en algún momento de la formación de esporas, o al inicio de la formación de esporas. Cuando se realiza el tratamiento del precultivo, el periodo de fermentación puede ser de 2 a 12 días, de 2 a 8 días, o de 3 a 7 días. Si este periodo de fermentación es menor que 2 días, no se genera una cantidad suficiente de la aglicona.

Por otra parte, si el periodo de fermentación es mayor que 12 días, la aglicona generada puede descomponerse o modificarse, lo cual conduce a un menor rendimiento de la aglicona. Cuando no se realiza el tratamiento del precultivo, el periodo de fermentación puede ser de 1 a 3 semanas, o de 1 a 2 semanas.

5 El producto fermentado obtenido mediante el tratamiento fermentativo microbiano es mucho más frágil y es probable que se desmenuce, debido a que se produce la descomposición de sus fibras debida a la fermentación. En este producto fermentado están presentes contenidos sólidos, por ejemplo, la materia prima sin fermentar cuya fibra no se descompone lo suficiente debido a la fermentación que aún está en curso y el micelio de la cepa inoculada formado durante la fermentación. El volumen del contenido en sólidos es aproximadamente una décima parte del de la materia prima antes del tratamiento fermentativo microbiano.

10 Cuando la aglicona en este producto fermentado se purifica, inicialmente se realiza un tratamiento de eliminación de los contenidos sólidos para retirar los contenidos sólidos que están compuestos principalmente por el microorganismo inoculado y la materia prima no fermentada. Este tratamiento de eliminación del contenido en sólidos es un tratamiento en el que los contenidos sólidos se retiran sumergiendo el producto fermentado que contiene los contenidos sólidos en un disolvente polar para transferir y extraer la aglicona hacia el disolvente. El
15 disolvente después se filtra con una gasa, un tamiz grueso o similares. Como alternativa, este tratamiento de eliminación del contenido en sólidos es un tratamiento en el que los contenidos sólidos se retiran mediante una centrifugación ligera de la disolución (por ejemplo, una centrifugación de 2000 x g durante 30 minutos). Cuando el producto fermentado se extrae en un disolvente polar, la temperatura de extracción puede ser la temperatura ambiente (25 °C) y el tiempo de extracción puede ser de 2 horas o más, para lograr una alta eficacia de extracción.

20 Puede utilizarse metanol, etanol, una disolución acuosa de estos, o agua, como disolvente polar. Como alternativa, también es posible emplear un alcohol inferior (por ejemplo, butanol e isopropanol) o una de sus disoluciones acuosas, como disolvente polar. Puede utilizarse metanol, una disolución acuosa de este, o agua, como disolvente polar, porque el coste de tratar una gran cantidad del producto fermentado es bajo. Puede utilizarse agua porque el coste de purificación es bajo. Para matar a los microorganismos para terminar la fermentación microbiana, puede
25 utilizarse metanol, etanol, o una disolución acuosa de estos, con una alta concentración (por ejemplo, 20% o más en volumen).

Además, puede realizarse un tratamiento de eliminación del componente de fibras para separar y eliminar el componente de fibras hidrosolubles compuesto principalmente por la pectina contenida en el producto fermentado, después del tratamiento de eliminación de los contenidos sólidos. Este tratamiento de eliminación del contenido en
30 fibras es un tratamiento en el que el componente de fibras se retira mediante la centrifugación del producto fermentado que se ha sometido al tratamiento de eliminación de contenidos sólidos para que precipite el componente de fibras hidrosoluble hacia el interior de la base de un tubo de centrífuga o similar. En este tratamiento de eliminación del contenido en fibras, el producto fermentado se centrifuga con una fuerza centrífuga del orden de 11000 x 3 g durante 20 minutos en el caso de utilizar metanol o etanol como disolvente polar.
35 Además, el producto fermentado se centrifuga con una fuerza centrífuga más fuerte que la fuerza centrífuga descrita anteriormente en el caso de utilizar agua o una disolución acuosa como disolvente polar.

Por otra parte, el tratamiento con glicosidasa de la presente invención es un tratamiento en el que se realiza una reacción enzimática que rompe un enlace glicosídico del glicósido flavonoide contenido en la materia prima, mediante la acción de una β -glicosidasa derivada de *Penicillium multicolor* sobre la materia prima.

40 En esta reacción enzimática se genera una aglicona, así como un azúcar como subproducto, a partir del glicósido flavonoide en la materia prima. En este tratamiento con glicosidasa, se prefiere que la reacción enzimática se realice añadiendo β -glicosidasa a un extracto (disolución extraída) de un componente de un fruto cítrico distinto al zumo, o al zumo del cítrico, para potenciar la eficacia del tratamiento. Como alternativa, en el tratamiento con glicosidasa, la reacción enzimática puede realizarse poniendo en contacto un vehículo inmovilizante con el zumo o
45 el extracto para la actividad enzimática de la β -glicosidasa. Puede utilizarse una disolución condensada o diluida del zumo del cítrico como el zumo del cítrico descrito anteriormente.

Como β -glicosidasa, puede utilizarse la β -glicosidasa (denominada en lo sucesivo la glicosidasa de referencia) producida por un microorganismo del género *Aspergillus*. Como β -glicosidasa de la presente invención, puede utilizarse la β -glicosidasa (denominada en lo sucesivo la glicosidasa) producida por *Penicillium multicolor* como la
50 β -glicosidasa descrita anteriormente.

La glicosidasa de referencia es la glicosidasa hidrolasa (heterosidasa) que tiene una actividad enzimática que rompe el enlace β -1,6 entre la aglicona y la D-glucosa que constituyen el glicósido flavonoide. La glicosidasa de referencia también tiene, por ejemplo, una actividad enzimática que libera p-nitrofenol (pNP) cuando reacciona con para-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG), un glicósido que actúa como sustrato.

55 Es posible utilizar, como glicosidasa de referencia, cualquier enzima purificada del sobrenadante de un cultivo o

una masa de células disgregadas (esporas o hifas vegetativas) del microorganismo del género *Aspergillus* utilizado como material de partida, empleando un color que surge de pNP durante la descomposición del sustrato como marcador. Como alternativa, lo más conveniente es el uso directo del sobrenadante de un cultivo del microorganismo del género *Aspergillus*, o una masa de células disgregadas del microorganismo del cual se ha retirado la materia insoluble. Cuando se emplea el sobrenadante de un cultivo en este tratamiento con glicosidasa, puede utilizarse la glicosidasa de referencia derivada de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus shirousamii*, o *Aspergillus japonicus*, porque su actividad en el sobrenadante del cultivo de cualquiera de estas especies es significativamente mayor. Puede utilizarse el sobrenadante de un cultivo o una masa de células disgregadas en el momento del inicio de la formación de las esporas del microorganismo del género *Aspergillus*, porque la actividad de la primera glicosilasa es significativamente mayor. Puede utilizarse una masa de células que han crecido en un medio con un alto contenido en el glicósido flavonoide, o en un medio sin carbohidratos.

En el tratamiento con glicosidasa empleando la glicosidasa de referencia, la temperatura del tratamiento puede ser de 10 a 60 °C, de 20 a 40 °C, o de 30 a 40 °C, para potenciar con facilidad la actividad de la primera glicosidasa. El tiempo de tratamiento puede ser de 1 a 24 horas, de 1 a 12 horas, o de 2 a 6 horas. Aunque el pH en el momento del tratamiento con la glicosidasa puede ser de 2 a 9, de 4 a 8, o de 5 a 6, puede estar en un intervalo de pH (aproximadamente pH 2,5 a 3,5) que muestra, por ejemplo, el zumo de cítricos y una disolución del residuo del zumo exprimido. La glicosidasa de la presente invención es una glicosidasa hidrolasa y tiene una actividad enzimática que rompe un enlace β -1,6 entre la aglicona y la D-glucosa que constituyen el glicósido flavonoide. La glicosidasa también tiene una actividad enzimática que genera eriodictiol-7-glucósido y después eriodictiol a partir de eriocitrina, y que genera diosmetina-7-glucósido y después diosmetina a partir de diosmina. Concretamente, la glicosidasa tiene la propiedad de ser una enzima de descomposición de rutinosa que rompe el enlace β -1,6 entre la L-ramnosa y la D-glucosa. Además, la glicosidasa tiene, por ejemplo, una actividad enzimática que libera pNP cuando se hace reaccionar con para-nitrofenil- β -primeverósido (pNPP), un glicósido que actúa como sustrato.

Es posible utilizar, como glicosidasa, cualquiera de las purificadas a partir del sobrenadante de un cultivo o una masa de células disgregadas de *Penicillium multicolor* como material de partida, empleando un color que surge de pNP durante la descomposición del sustrato de pNPP como marcador. Como alternativa, lo más conveniente es el uso directo del sobrenadante de un cultivo de *Penicillium multicolor*, o una masa de células disgregadas del microorganismo (*Penicillium multicolor*) del cual se ha retirado la materia insoluble. Se prefiere utilizar una masa de células que han crecido en un medio con un alto contenido en el sustrato o el glicósido flavonoide, preferiblemente en un medio sin carbohidratos.

En el tratamiento con glicosidasa empleando la glicosidasa de la invención, la temperatura del tratamiento es preferiblemente de 10 a 70 °C, más preferiblemente de 40 a 60 °C, para potenciar con facilidad la actividad de la glicosidasa. A la luz de la estabilidad de la enzima con respecto a la temperatura, la temperatura del tratamiento es más preferiblemente una temperatura del orden de 50 °C, en la cual puede obtenerse con más eficacia un efecto del tratamiento más estable. El tiempo del tratamiento es preferiblemente de 0,2 a 24 horas, más preferiblemente de 0,5 a 2 horas. Aunque el pH en el momento del tratamiento con la glicosidasa puede ser de 2 a 9, más preferiblemente de 4 a 8, aún más preferiblemente de 6 a 8, para potenciar con facilidad la actividad de la glicosidasa, puede estar dentro de un intervalo de pH (aproximadamente pH 2,5 a 3,5) que muestra, por ejemplo, el zumo de cítricos y una disolución del residuo del zumo exprimido.

Cuando la glicosidasa de referencia y las glicosidasas de la invención se añaden a la materia prima, se prefiere que las glicosidasas se inactiven o se retiren después de completar el respectivo tratamiento con glicosidasa. Por otra parte, el material antioxidante que tiene un mayor contenido en aglicona puede obtenerse con facilidad purificando (condensando) el glicósido flavonoide por adelantado mediante el uso de un adsorbente antes del tratamiento descrito anteriormente para formar las agliconas. Preferiblemente, se emplea un adsorbente sintético, por ejemplo, Amberlite XAD, fabricada por Organo, como adsorbente. Como alternativa, el material antioxidante que tiene un mayor contenido en aglicona puede obtenerse con facilidad purificando (condensando) la aglicona mediante el uso del adsorbente después del tratamiento para formar las agliconas. Puede realizarse la purificación con el adsorbente para recuperar el glicósido flavonoide presente en el material antioxidante debido a un tratamiento enzimático insuficiente. Además, la purificación con el adsorbente tiene la ventaja de que las impurezas en la materia prima pueden eliminarse con eficacia.

Un primer alimento o bebida (alimento saludable) puede contener el material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la realización. Los ingredientes eficaces, es decir, la aglicona y la vitamina C, del material antioxidante muestran unos efectos antioxidantes altos. Por tanto, el primer alimento o bebida puede mostrar, por ejemplo, unos efectos saludables altos mediante la supresión de la degeneración oxidativa de biocomponentes, provocada por el oxígeno activo. El primer alimento o bebida puede ingerirse por vía oral en varias dosis (2 a 3 dosis o más) diarias. Se puede ingerir un primer alimento o bebida cuando está en un estado que pueda exponerse a un estrés oxidativo, por ejemplo, antes y después de un ejercicio vigoroso, cuando se está expuesto a estrés, y antes o después de fumar.

Cuando son adultos los que ingieren el primer alimento o bebida, la aglicona puede ingerirse de 0,1 a 10 g, o de 0,5 a 2 g, diarios. En el primer alimento o bebida, si la cantidad de aglicona ingerida es menor que 0,1 g diarios, los efectos antioxidantes ejercidos por los ingredientes eficaces pueden no ser potenciados con eficacia. Por otra parte, resulta poco rentable ingerir la aglicona en una cantidad mayor que 10 g. En el caso de niños, la cantidad de la aglicona ingerida puede ajustarse dependiendo principalmente de sus pesos corporales, y, como guía, puede ser la mitad de la cantidad para adultos. De forma similar, cuando son adultos los que ingieren el primer alimento o bebida, la vitamina C puede ingerirse de 0,1 a 10 g, o de 0,1 a 2 g diarios. En el primer alimento o bebida, si la cantidad de vitamina C ingerida es menor que 0,1 g diarios, los efectos antioxidantes ejercidos por los ingredientes eficaces pueden no ser potenciados con eficacia. Por otra parte, resulta poco rentable ingerir la vitamina C en una cantidad mayor que 10 g. Además, la concentración de vitamina C contenida en el primer alimento o bebida puede ser de 10 ppm o mayor, de 100 ppm al 0,5% en peso, o de 1000 ppm al 0,3% en peso. Si la concentración es menor que 10 ppm, la vitamina C no produce con eficacia el efecto sinérgico con la aglicona, mientras que resulta poco rentable utilizar la vitamina C a una concentración mayor que 0,5% en peso.

Un agente antideterioro puede contener el material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la realización. Los ingredientes eficaces, es decir, la aglicona y la vitamina C, del material antioxidante muestran unos efectos inhibidores altos del deterioro. Por tanto, el material antioxidante puede suprimir, de modo eficaz, diversos tipos de deterioro de productos, por ejemplo, el deterioro oxidativo de grasas y aceites, el deterioro de componentes aromatizantes, la descomposición de pigmentos y la pérdida de color de pigmentos. Este agente antideterioro puede utilizarse como agente antideterioro oxidativo para grasas y aceites frente al deterioro térmico y al deterioro oxidativo de aceite vegetal, aceite de pescado y similares. Además, este agente antideterioro puede utilizarse como agente antideterioro para componentes aromatizantes frente al deterioro térmico y al deterioro oxidativo de agentes aromatizantes. Este agente antideterioro puede utilizarse como inhibidor de la pérdida de color para pigmentos frente al deterioro térmico y al deterioro por la luz de los pigmentos naturales.

Un segundo alimento o bebida puede contener el agente antideterioro preparado mediante el procedimiento de la realización y puede tener una propiedad conservante potenciada por los ingredientes activos. El segundo alimento o bebida puede producirse añadiendo vitamina C, por ejemplo, a un alimento o bebida que contenga la aglicona, o un material de estos, o, por el contrario, añadiendo la aglicona, por ejemplo, a un alimento o bebida que contiene vitamina C, o un material de estos. El segundo alimento o bebida puede incluir productos de grasas y aceites, productos de aromatizantes, y productos suplementados con pigmentos. El contenido en aglicona del segundo alimento o bebida puede ser de 10 ppm o mayor, de 100 ppm al 0,5% en peso, o de 1000 ppm al 0,3% en peso. Si el contenido es menor que 10 ppm, puede que el segundo alimento o bebida no produzca el suficiente efecto inhibidor sobre el deterioro, mientras que el uso de la aglicona a un contenido mayor que 0,5% en peso no resulta rentable y puede cambiar considerablemente y el sabor y el aroma del alimento o bebida. Por otra parte, la concentración de vitamina C contenida en el segundo alimento o bebida puede ser igual que en el primer alimento o bebida.

Las ventajas producidas por las realizaciones se describirán a continuación.

El material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la realización contiene la aglicona derivada del cítrico y vitamina C como ingredientes eficaces. Por tanto, este material antioxidante puede utilizarse en una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, alimentos saludables, productos farmacéuticos, cuasifármacos, cosméticos, antioxidantes y agentes que eliminan el oxígeno activo, debido a los efectos antioxidantes altos producidos por los ingredientes eficaces. En este contexto, la aglicona muestra una excelente absorbabilidad *in vivo*, en especial cuando se ingiere por vía oral, y un efecto antioxidante alto y, por tanto, muestra con facilidad un efecto saludable alto. Cuando este material antioxidante se incluye para su uso en productos farmacéuticos, cuasifármacos o cosméticos, las cantidades de la aglicona y la vitamina C ingerida, administrada o usada por día pueden ser las mismas que las cantidades de la aglicona y la vitamina C ingeridas en la descripción del alimento o bebida descrito anteriormente. Este material antioxidante también puede suprimir con eficacia el deterioro oxidativo de grasas y aceites, el deterioro del aroma de los compuestos aromatizantes, y la descomposición o la pérdida de color de pigmentos. Por tanto, este material antioxidante puede añadirse a alimentos o bebidas que contengan grasas y aceites, componentes aromatizantes, o pigmentos, potenciando con facilidad con ello la propiedad conservante del alimento o bebida. Además, este material antioxidante tiene efectos para suprimir el deterioro térmico y el deterioro producido por la propia luz y, como tal, es muy útil y económico.

En especial, cuando la vitamina C con una concentración no menor que 500 ppm, más preferiblemente 1000 ppm, que es mayor que la de la vitamina C contenida en zumo de cítricos, está contenida en el material antioxidante y el alimento o bebida, los efectos antioxidantes se potencian sinérgicamente con facilidad. En general, la vitamina C también está contenida en un glicósido flavonoide que contiene una materia prima que, sin embargo, resulta eliminada durante el desarrollo de la purificación de la aglicona. Por consiguiente, la vitamina C puede mezclarse con la aglicona purificada, produciendo con ello unos efectos antioxidantes significativamente altos.

En la presente invención, la aglicona se genera con facilidad y de modo adecuado tratando un glicósido flavonoide derivado de un cítrico para formar sus agliconas (tratamiento de glicósidos). También puede utilizarse un tratamiento fermentativo microbiano. En el tratamiento con glicosidasa, la aglicona puede generarse con una

eficacia muy alta a partir del glicósido flavonoide empleando la glicosidasa derivada de *Penicillium multicolor*. Concretamente, la glicosidasa tiene una reactividad enzimática y una especificidad de sustrato significativamente alta por el glicósido flavonoide concreto (eriocitrina o diosmina) contenido en grandes cantidades en los limones, las limas y los sudachis, comparado con las enzimas disponibles en el mercado (enzimas conocidas en la técnica). Por tanto, la glicosidasa puede generar la aglicona con una eficacia muy alta. Por esta razón, el uso de la glicosidasa potencia con facilidad la tasa de conversión del glicósido flavonoide en la aglicona. Por tanto, la aglicona puede producirse con facilidad en grandes cantidades. Además, el coste de producción puede reducirse con facilidad.

Por otra parte, en el tratamiento fermentativo microbiano que emplea el limón fermentado convencional descrito anteriormente, la hesperidina (glicósido) se hidroliza para producir hesperetina (aglicona). Después, se desarrolla una reacción de modificación que añade un grupo hidroxilo a la hesperetina a medida que continúa el tratamiento de fermentación. Por tanto, es muy probable que se produzca una reacción incierta frente a un glicósido flavonoide distinto de la hesperidina, por ejemplo, una reacción de modificación análoga y una reacción que descomponga el glicósido, bajo las condiciones para el tratamiento fermentativo microbiano para producir el limón fermentado convencional. Por consiguiente, es difícil obtener una aglicona de interés con alto rendimiento. Por contraste, el tratamiento fermentativo microbiano puede iniciarse inoculando la materia prima con esporas o hifas de un microorganismo del género *Aspergillus* y terminarse antes de que se complete la posterior formación de esporas del microorganismo. Por tanto, puede realizarse con facilidad una transformación microbiana principalmente con las hifas vegetativas del microorganismo. Por tanto, la aglicona puede obtenerse con facilidad con un rendimiento alto terminando el tratamiento fermentativo microbiano antes de que se produzca la reacción de modificación, tal como una reacción de hidroxilación, o una reacción de descomposición. En general, es casi imposible generar la aglicona solo exprimiendo el zumo de un fruto cítrico o mediante extracción desde el fruto. Además, es casi imposible generar la aglicona en etapas de procesamiento distintas de los tratamientos para formar las agliconas.

Puede obtenerse una gran cantidad de glicósido flavonoide con mucha facilidad utilizando un residuo de zumo exprimido de un fruto cítrico del cual ya se ha exprimido el zumo, comparado con la utilización de zumo de cítricos. Como alternativa, puede obtenerse una gran cantidad de glicósido flavonoide con mucha facilidad utilizando un extracto de glicósido flavonoide extraído del resto de zumo exprimido como la materia prima que contiene el glicósido flavonoide, comparado con la utilización de zumo de cítricos. Puesto que una gran cantidad del residuo del zumo exprimido se desecha cuando, por ejemplo, se produce una bebida que contiene el zumo de cítrico, el residuo de zumo exprimido resulta disponible a unos precios muy bajos. Además, el uso del residuo de zumo exprimido es lo más preferido a la luz de la ley de reciclaje de alimentos.

El segundo alimento o bebida que contiene el material antioxidante preparado mediante el procedimiento de la invención puede tener una propiedad conservante significativamente excelente, debido al alto efecto inhibidor sobre la descomposición producida por los ingredientes eficaces en el material antioxidante. Por tanto, este alimento o bebida puede suprimir la reducción en la calidad con una eficacia significativa. Por consiguiente, es posible almacenarlo a lo largo de un periodo de tiempo más largo, y también es posible determinar un nuevo periodo de conservación de la calidad que sea mucho mayor. Esto contribuye en gran medida a la reducción de los costes, porque la cantidad de alimentos o bebidas que se desechan debido a que han excedido el periodo de conservación de la calidad se puede reducir con mucha facilidad. Es necesario que la conservación de la calidad después de la producción de alimentos o bebidas dependa menos, por ejemplo, del control de la temperatura a temperaturas bajas. Por otra parte, este alimento o bebida puede contener los ingredientes eficaces derivados de un producto natural y tener una absorbabilidad *in vivo* significativamente excelente. Por tanto, es fácil utilizar el alimento o bebida como aditivo alimentario.

Ejemplo 1 - Preparación de la muestra 1: Producción de una aglicona mediante un tratamiento con glicosidasa

Un residuo de zumo exprimido de limón se sumergió en una cantidad 10 veces mayor (en peso) de metanol durante 24 horas para obtener con ello un extracto de glicósido flavonoide de limón. El extracto obtenido se condensó a presión reducida con un evaporador y después se adsorbió sobre una resina Amberlite (XAD16; fabricada por Organo) para eliminar la pectina, los carbohidratos, etc., en la mayor medida posible. Se condensó un eluato eluido de este con metanol hídrico al 40% y se liofilizó para obtener con ello un polvo de la mezcla de glicósido flavonoide de limón (glicósido de limón del ejemplo comparativo 1). Este polvo contiene aproximadamente 30% de eriocitrina y aproximadamente de 2 a 5% de diosmina. Este glicósido de limón del ejemplo comparativo 1 se disolvió en agua, y se purificó la eriocitrina empleando el sistema de fraccionamiento de HPLC 1 descrito a continuación en la condición de HPLC 1 descrita a continuación. La eriocitrina purificada después se condensó y se liofilizó para obtener con ello un polvo de eriocitrina (eriocitrina del ejemplo comparativo

2).

Sistema de fraccionamiento de HPLC 1

Bomba: Shimadzu LC-8A, Controlador del sistema: Shimadzu SCL-8A, Autoinyector: Shimadzu SIL-8A, Detector: Shimadzu SPD-8A (detector espectrofotométrico de UV), Recolector de fracciones: Shimadzu FCV-100B

5 *Condición de HPLC 1*

Columna: YMC-Pack ODS-A (50 d.i. x 250 mm), Eluyente: metanol/agua= 50/50 (en v/v), Caudal: 100 ml/min, Longitud de onda de detección: 270 nm

Tratamiento con glicosidasa de eriocitrina y diosmina

10 La eriocitrina del ejemplo comparativo 2 o la diosmina fabricada por Wako Pure Chemical Industries se disolvieron a una concentración final de 5 mM en tampón acetato-ácido clorhídrico 20 mM. Se produjo una disolución de glicósido cuyo pH se ajusta a 3,0 por medio del tampón, y una disolución de glicósido cuyo pH se ajusta a 5,0 por medio del tampón. Debido a que la diosmina es refractaria al agua, la disolución de glicósido se produjo después de disolver la diosmina antes en sulfóxido de dimetilo. Estas disoluciones de glicósido se suplementaron con 100 ppm o 10 ppm de β -glicosidasa para producir disoluciones de reacción que, a su vez, se sometieron a un tratamiento con glicosidasa con agitación con un agitador a aproximadamente 30 °C. La β -glicosidasa es una enzima con actividad enzimática de descomposición de β -primeverósido, que se ha sido purificada de una cepa de *Penicillium multicolor* IAM 7153 por los presentes inventores utilizando un color desarrollado a partir de pNP como marcador, y tiene una actividad β -glicosidasa de 173 unidades/g. Una unidad define la cantidad de enzima capaz de hidrolizar pNPP para liberar 1 mmol de pNP a 30 °C durante 1 minuto. Se formaron muestras de partes alícuotas de varios mililitros a partir de las disoluciones de reacción después de 0, 0,5, 1, 2, 4, 5, y 8 horas después de la adición de la glicosidasa. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Las muestras resultantes se enfriaron con rapidez y se crioconservaron. Las muestras obtenidas se analizaron empleando el sistema de análisis de HPLC 2 descrito a continuación en la condición de HPLC 2 para confirmar los cambios en la concentración de cada sustancia provocados por el tratamiento con glicosidasa. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

Sistema de análisis de HPLC 2

Bomba: Shimadzu LC-10AD, Controlador del sistema: Shimadzu SCL-10A, Autoinyector: Shimadzu SIL-10A, Detector: Shimadzu SPD-10A (detector espectrofotométrico de UV), Horno de la columna: Shimadzu CTO-10A

Condición de HPLC 2

30 Columna: YMC-Pack ODS-A (4,6 d.i. x 250 mm), Eluyente: metanol/agua = 40/60 (en v/v), Caudal: 1 ml/min, Longitud de onda de detección: 270 nm

Tal como puede observarse en las figuras 1 a 4, se observa una disminución rápida en la concentración con ambas eriocitrina (figuras 1 y 2) y diosmina (figuras 3 y 4) inmediatamente después de la adición de la glicosidasa, y se confirmó la generación de sus respectivas agliconas, eriodictiol y diosmetina. Se obtuvieron unas tasas de conversión tan altas como de aproximadamente 50 al 60% para la conversión de eriocitrina a eriodictiol, y de aproximadamente 80% para la conversión de diosmina a diosmetina. Este resultado demuestra que la presente enzima estimula la conversión a la aglicona con una eficacia muy alta sin pérdida. Se confirmó que la conversión a la aglicona se desarrolla con casi la misma eficacia en la disolución de pH 5,0, que está dentro del intervalo de pH óptimo de la glicosidasa, y en la disolución de pH 3,0 con casi la misma eficacia. Por ejemplo, el pH de los zumos de limón, lima y sudachi y el pH de la disolución de glicósido flavonoide extraído están cerca de 3. Por tanto, se confirmó que la actividad enzimática de la presente enzima casi no resultó afectada en los zumos de limón, lima y sudachi, o una disolución de glicósido flavonoide obtenida a partir de cualquiera de estos, y que la presente enzima puede utilizarse en estas disoluciones. Aunque se añadan 10 ppm de la glicosidasa, se demostró que la conversión a la aglicona se desarrolla suficientemente en un tiempo suficiente. En el tratamiento descrito a continuación, se realizó una investigación con respecto al tiempo de tratamiento, con la adición de 10 ppm de β -glicosidasa por mM de sustrato como guía.

Conversión del flavonoide de limón a la aglicona y su purificación

50 El glicósido de limón del ejemplo comparativo 1 se disolvió en una concentración final de eriocitrina de 1 mM en tampón acetato de sodio-ácido clorhídrico 20 mM. Se produjo una disolución de glicósido cuyo pH se ajusta a 3,0 por medio del tampón, y una disolución de glicósido cuyo pH se ajusta a 5,0 por medio del tampón. Estas disoluciones de glicósido se suplementaron con 10 ppm de β -glicosidasa para producir disoluciones de reacción que, a su vez, se sometieron a un tratamiento con glicosidasa con agitación con un agitador a aproximadamente

30 °C. Se formaron muestras de partes alícuotas de varios mililitros a partir de las disoluciones de reacción después de 0, 0,5, 1, 2, 4, 5, y 8 horas después de la adición de la glicosidasa. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Las muestras resultantes se enfriaron con rapidez y se crioconservaron. Las muestras obtenidas se analizaron con la condición de HPLC 1 descrita anteriormente para confirmar los cambios en la concentración de cada sustancia provocados por el tratamiento con glicosidasa. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6.

Tal como se observa en las figuras 5 y 6, se confirmó que la eriocitrina y la diosmina, glicósidos flavonoides extraídos del limón, mostraron una alta tasa de conversión cercada al 70% habiendo realizado el tratamiento durante aproximadamente 2 horas. No se observó una disminución en la actividad enzimática dependiente del pH. Por tanto, también se confirmó que el tratamiento del glicósido del limón no necesita ajuste del pH. A continuación, la disolución de reacción (pH 3,0) después de 8 horas tras la adición de la glicosidasa se adsorbió sobre la resina Amberlite. Se liofilizó un eluato eluido de este con metanol hídrico al 60% (aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1). Este eluato (aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1) se analizó con la condición de HPLC 2 descrita anteriormente para investigar con ello el grado de purificación de la aglicona. Como resultado, se confirmó que la aglicona se purificó de manera muy eficaz por medio de la purificación con el adsorbente.

Investigación de la especificidad de sustrato de la enzima

Para confirmar la utilidad de la glicosidasa se realizó un ensayo sobre la conversión a la aglicona empleando enzimas disponibles en el mercado. Las enzimas utilizadas fueron 4 enzimas con base de celulosa (celulasa A "Amano" 3 y celulasa T "Amano" 4) y enzimas con base de pectinasa (pectinasa G "Amano" y pectinasa PL "Amano") fabricadas por Amano Enzyme, así como la glicosidasa. La glicosidasa de limón del ejemplo comparativo 1 se disolvió a una concentración de 50 ppm en un disolvente para producir una disolución acuosa (cuyo pH se ajustó a 3,0). La disolución acuosa, a su vez, se suplementó con 500 ppm o 50 ppm de cada una de las enzimas para sufrir una reacción enzimática a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 horas. Cada una de estas muestras que se había sometido a la reacción enzimática se calentó a 95 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Se cuantificaron las concentraciones de eriocitrina y eriodictiol en las muestras resultantes bajo la condición de HPLC 2 descrita anteriormente para determinar la tasa de conversión de la eriocitrina. Como resultado, cuando se añadieron 500 ppm de la pectinasa PL "Amano", la tasa de conversión de la eriocitrina a eriodictiol fue del 22%, mientras que cuando se añadieron 500 ppm y 50 ppm de la glicosidasa, la tasa de conversión fue del 67% y 74%, respectivamente. En otros ensayos, la tasa de conversión fue de casi 0%. Así, se confirmó que la tasa de conversión de la glicosidasa fue mucho mayor que la tasa de conversión por las enzimas disponibles en el mercado.

Tratamiento con glicosidasa de zumo de cítricos

Se suplementaron zumos de limón, lima y sudachi con un alto contenido en eriocitrina, con la glicosidasa y se investigó la conversión en aglicona. Se emplearon estos 3 zumos y un zumo concentrado disponible en el mercado y se ajustaron respectivamente a Brix 10. El pH de todos los zumos estaba cerca de 3. La glicosidasa se añadió a una concentración final de 10 ppm a estos zumos para realizar la reacción enzimática a temperatura ambiente durante 5 horas. Cada una de estas muestras que se había sometido a la reacción enzimática se calentó a 95 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Se cuantificaron las concentraciones de eriocitrina y eriodictiol en las muestras resultantes bajo la condición de HPLC 2 descrita anteriormente para determinar la tasa de conversión de la eriocitrina. Como resultado, la tasa de conversión de la eriocitrina a eriodictiol fue del 54%, 49%, y 56% en el zumo de limón, el zumo de lima y el zumo de sudachi, respectivamente, y se confirmó que era alta en estos zumos. Así, se confirmó que la glicosidasa era útil en la conversión de la aglicona para estos zumos de cítricos.

Mediciones de la actividad captadora de radicales

Cada muestra mostrada en la tabla 1 descrita a continuación se estudió para la actividad captadora de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Concretamente, la glicosidasa de limón del ejemplo comparativo 1, la eriocitrina del ejemplo comparativo 2, la aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1, o eriodictiol, neoeriocitrina, vitamina C, o α -tocoferol obtenidos de Funakoshi se disolvieron a la concentración de 500 ppm en un disolvente para producir una disolución acuosa. Después, una parte alícuota de 100 μ l de la disolución acuosa se suplementó con 1 ml de tampón Tris 0,1 M (pH 7,4). El disolvente utilizado para el α -tocoferol fue metanol. Como alternativa, cada muestra descrita anteriormente y vitamina C se disolvieron a la concentración de 500 ppm cada uno en un disolvente para producir una disolución acuosa; una parte alícuota de 100 μ l de esta después se suplementó con 1 ml de tampón Tris 0,1 M. Después, se añadieron 2 ml de una disolución de DPPH (disolución obtenida disolviendo DPPH a una concentración de 500 μ M en etanol) a las disoluciones y se mezcló a fondo. Las disoluciones resultantes se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad para que se desarrollase la reacción. Se cuantificó la cantidad de DPPH en cada disolución de reacción (10 μ l) mediante una medición

empleando el sistema de análisis de HPLC 2 descrito en la condición de HPLC 3. En el procedimiento de evaluar la actividad captadora de radicales, se considera que la cantidad de DPPH que permanece en la muestra de la sección de ensayo sin glicósido ni aglicona (control) es el 100%. Además, se midió la cantidad DPPH que permanece en la disolución de reacción suplementada con cada muestra y se indica mediante el porcentaje (%) con respecto a la cantidad de DPPH en la sección de control. Debido a que la actividad captadora de radicales de la sección suplementada con eriodictiol y vitamina C es casi del 100%, el ensayo se volvió a realizar con la cantidad de la muestra reducida a la mitad. Concretamente, se disolvieron eriodictiol y vitamina C a una concentración de 500 ppm cada uno en un disolvente para producir una disolución acuosa; una parte alícuota de 50 µl de esta después se suplementó con 1 ml de tampón Tris 0,1 M. Se midió la actividad captadora de radicales de la disolución resultante como se describió anteriormente. El valor numérico obtenido se dobló para corregir con ello los datos. El resultado se muestra en la tabla 1.

Sistema de análisis de HPLC 2

Bomba: Shimadzu LC-10AD, Controlador del sistema: Shimadzu SCL-10A, Autoinyector: Shimadzu SIL-10A, Detector: Shimadzu SPD-10A (detector espectrofotométrico de UV), Horno de la columna: Shimadzu CTO-10A

Condición de HPLC 3

Columna: TSK-GEL octil-80Ts (4,6 d.i. x 150 mm), Eluyente: metanol/agua = 30/70 (v/v), Caudal: 1 ml/min, Longitud de onda de detección: 517 nm

Tabla 1

	Actividad captadora de radicales DPPH	Tasa de inhibición frente a la oxidación de linoleato de metilo
Control	0,00%	0,00%
Glicósido de limón	6,18%	7,11%
Glicósido de limón + vitamina C	24,18%	17,59%
Aglicona tratada con enzimas	15,97%	14,19%
Aglicona tratada con enzimas + vitamina C	35,91%	25,44%
Eriocitrina	28,64%	8,00%
Eriocitrina + vitamina C	51,09%	18,77%
Eriodictiol	75,70%	20,99%
Eriodictiol + vitamina C	101,10%	32,53%
Neoeriocitrina	30,70%	9,24%
Vitamina C	14,00%	8,32%
α-tocoferol	44,82%	16,97%

Tal como puede observarse en la tabla 1, la aglicona tratada con enzimas, la eriocitrina, y el eriodictiol tienen una alta actividad antioxidante principalmente bajo condiciones de sistemas acuosos. La actividad antioxidante de la aglicona tratada con enzimas, la eriocitrina, y el eriodictiol resultó notablemente potenciada en las secciones suplementadas cuando se mezclaron con la vitamina C. Además, se demostró que la actividad antioxidante de la aglicona tratada con enzimas, la eriocitrina, y el eriodictiol resultó también sinérgicamente potenciada en el glicósido de limón cuando se mezclan con la vitamina C. La eriocitrina o el eriodictiol purificados suplementados con vitamina C mostraron un efecto sinérgico en casi la misma tasa que la del glicósido de limón o de la aglicona tratada con enzimas suplementados con vitamina C. Por consiguiente, se confirmó que el efecto sinérgico observado en el glicósido de limón y la aglicona tratada con enzimas se atribuye al efecto sinérgico de la eriocitrina o el eriodictiol y la vitamina C. Por tanto, se demostró que un material antioxidante en el que cualquiera de estas flavanonas se mezcla con la vitamina C tiene una actividad antioxidante muy alta y es útil como material antioxidante que suprime el deterioro provocado por la oxidación. Cuando la aglicona tratada con enzimas o, con el

objetivo de inhibir el deterioro, el eriodictiol, se añade a un alimento o bebida que contiene vitamina C, por ejemplo, zumo, puede suponerse con facilidad que el alimento o la bebida tenga unos efectos inhibidores sobre el deterioro que son más potentes que los efectos inhibidores sobre el deterioro esperados de las cantidades añadidas de estos.

5 *Medición de los efectos inhibidores sobre la generación de lípidos peroxidados*

Cada muestra que aparece en la tabla 1 descrita anteriormente se estudió para los efectos inhibidores sobre la generación lípidos peroxidados, utilizando el linoleato de metilo como sustrato. Concretamente, se añadieron 100 μ l de cada disolución acuosa utilizada en el párrafo de la medición de la actividad captadora de radicales y 89 mg (100 μ l) de linoleato de metilo a un pequeño tubo de ensayo con un diámetro interno de 14 mm y se mezclaron bien. Al mismo tiempo, se añadieron solo 100 μ l de disolvente para la disolución de acuosa, en lugar de la disolución acuosa, para preparar un control. Los disolventes en estas mezclas de disoluciones se retiraron completamente en un secador de vacío empleando una bomba de vacío. Las disoluciones resultantes se dejaron en la oscuridad a 40 °C durante 18 horas. Después, se añadieron 5 ml de una disolución de BHT al 0,08% (2,6-di-t-butil-4-metilfenol)/hexano. Se midió la cantidad de peróxido generada a partir del linoleato de metilo utilizando el sistema de análisis de HPLC 2 mostrado a continuación en la condición de HPLC 4. En un procedimiento para medir y evaluar la actividad antioxidante, primero se determinó el área total de picos de HPLC de los lípidos peroxidados (13-hidroperóxido y 9-hidroperóxido) generados a partir del linoleato de metilo en la sección de control del ensayo. Este valor determinado se consideró el 100%. Se determinó el área total de picos de HPLC de los lípidos peroxidados en la sección de ensayo suplementados con cada muestra. Este valor determinado se indicó mediante el porcentaje (%) con respecto al área total de picos de HPLC del control para determinar con ello la tasa de inhibición frente a la oxidación del linoleato de metilo. El resultado se muestra en la tabla 1 descrita anteriormente.

Sistema de análisis de HPLC 2

Bomba: Shimadzu LC-10AD, Controlador del sistema: Shimadzu SCL-10A, Autoinyector: Shimadzu SIL-10A, Detector: Shimadzu SPD-10A (detector espectrofotométrico de UV), Horno de la columna: Shimadzu CTO-10A

Condición de HPLC 4

Columna: TSK-GEL octil-80Ts (4,6 d.i. x 250 mm), Eluyente: n-hexano/1,4-dioxano/alcohol isopropílico = 98/1/1 (en v/v/v), Caudal: 1 ml/min, Longitud de onda de detección: 235 nm

Tal como puede observarse en la tabla 1 descrita anteriormente, el glicósido de limón, la aglicona tratada con enzimas, la eriocitrina, y el eriodictiol tiene una alta actividad antioxidante principalmente bajo condiciones de sistemas oleosos. La actividad antioxidante del glicósido de limón, la aglicona tratada con enzimas, la eriocitrina, y el eriodictiol fue ejercida sinérgicamente en las secciones suplementadas con estos mezcladas con la vitamina C. La eriocitrina o el eriodictiol purificados suplementados con vitamina C ejercieron un efecto sinérgico en casi la misma tasa que la del glicósido de limón o de la aglicona tratada con enzimas suplementados con vitamina C. Por consiguiente, se confirmó que los efectos sinérgicos observados en el glicósido de limón y la aglicona tratada con enzimas se atribuye a los efectos sinérgicos de la eriocitrina o el eriodictiol y la vitamina C. Por tanto, se demostró que un material antioxidante en el que cualquiera de estas flavanonas se mezcla con la vitamina C tiene una actividad antioxidante muy alta y es útil como material antioxidante que suprime el deterioro provocado por la oxidación.

40 *Verificación del efecto inhibidor sobre la oxidación de un liposoma con biomembrana*

Se empleó un liposoma de un único compartimento (SUV: vesícula unilaminar pequeña) como modelo de biomembrana para evaluar la potencia antioxidante. Para preparar las SUV, primero se suplementaron 100 mg de lecitina de yema de huevo con 1 ml de cloroformo y se disolvió completamente, y después se eliminó completamente el cloroformo en un matraz de cuello corto. La película lipídica obtenida se hinchó mediante la adición de 10 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) que contenía 500 ppm del glicósido de limón del ejemplo comparativo 1, la eriocitrina del ejemplo comparativo 2, la aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1, o eriodictiol (fabricado por Funakoshi). La mezcla resultante se agitó a fondo y se dispersó completamente con una máquina de lavado ultrasónico. La película lipídica hinchada por la adición de solo 10 ml de tampón fosfato se ensayó como control de la misma manera. Después, la disolución de liposomas multicapa obtenida se burbujeó con nitrógeno gaseoso durante 5 minutos y después se sonicó a 180 W durante 20 minutos en un generador ultrasónico potente para preparar vesículas unilaminares pequeñas (SUV).

La peroxidación de las SUV preparadas de esta forma se estimuló forzosamente mediante la adición de AAPH (2,2'-azobis(2-aminodipropano)), un iniciador de radicales, a las SUV. Como resultado se genera un peróxido como producto principal en el liposoma. Después, se genera un producto secundario, tal como malondialdehído, durante

el desarrollo de la autooxidación. Se añade un reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar una sustancia roja (sustancia positiva a TBA), un producto de la reacción de aldehídos. Su grado de coloración se midió con un espectrofotómetro a $\lambda = 535$ nm y se empleó para determinar la tasa de oxidación de la membrana liposómica (%).

Como resultado, la tasa de oxidación de la membrana liposómica fue del 60,54% para el glicósido de limón del ejemplo comparativo 1, mientras que la tasa de oxidación de la membrana liposómica fue del 11,56% para la aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1. Por consiguiente, se demostró que la aglicona tratada con enzimas produce una alta actividad antioxidante. La tasa de oxidación es del 76,87% para α -tocoferol. La tasa de oxidación de la membrana liposómica fue del 9,52% y 6m80% para la eriocitrina del ejemplo comparativo 2 y el eriodictiol, respectivamente. Así, se demostró que la aglicona de limón y el eriodictiol ejercen un efecto antioxidante alto en una biomembrana y son útiles como inhibidores de la oxidación de biomembranas que erradican las lesiones oxidativas de las superficies de membranas celulares en organismos.

Mediciones de la tasa de eliminación del oxígeno activo

Se mezcló la xantina oxidasa (0,5 ml (5,6 unidades)) con 0,3 ml de xantina 1 mM (fabricada por Wako Pure Chemical Industries), 0,3 ml de nitro azul de tetrazolio 0,25 mM (fabricado por Wako Pure Chemical Industries), y 2,3 ml de tampón carbonato de sodio 0,05 M (pH 10,2). Las xantina oxidasa empleada es un reactivo (fabricado por Wako Pure Chemical Industries) diluido en 100 veces con tampón carbonato de sodio 0,05 M. La mezcla se suplementó con 0,1 ml (concentración: 1000 ppm) del glicósido de limón del ejemplo comparativo 1 o de la aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1 y se incubó. Debido a que se produce azul de formazano en el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a $\lambda = 560$ nm utilizando un espectrofotómetro (espectrofotómetro HITACHI U2000) después de 3 minutos de incubación. Se empleó una sección de ensayo sin la adición de la muestra (glicósido y aglicona) como control. Como blanco, se añadió tampón carbonato de sodio en lugar de la xantina oxidasa para realizar los mismos procedimientos. El valor obtenido restando la absorbancia del ensayo del blanco de la absorbancia de la disolución suplementada con cada muestra se dividió entre la absorbancia del control para determinar con ello una tasa de eliminación del oxígeno activo (%). Como resultado, la tasa de eliminación de oxígeno activo fue del 26,7% para el glicósido de limón del ejemplo comparativo 1, mientras que la tasa de eliminación del oxígeno activo fue del 74,8% para la aglicona tratada con enzimas del ejemplo de ensayo 1. Por consiguiente, se demostró que la aglicona tratada con enzimas produce una alta actividad antioxidante. La tasa de oxidación es del 238,2% para α -tocoferol. Así, se demostró que la aglicona de limón tiene una alta capacidad para eliminar el oxígeno activo y es útil como agente de eliminación del oxígeno activo in vivo.

Ejemplo de referencia 2 - Preparación de la muestra 2: Producción de la aglicona mediante un tratamiento fermentativo microbiano

Una cepa de *Aspergillus saitoi* IAM 2210 precultivada por adelantado a 30 °C durante una semana en un medio de caldo de cultivo de dextrosa de patata en la oscuridad se inoculó sobre un residuo de zumo exprimido de limones para realizar el tratamiento fermentativo microbiano bajo condiciones de temperatura constante a 30 °C durante 10 días. Después, el residuo de zumo exprimido de limón que contenía la cepa se sumergió en 10 veces (en peso) de metanol durante 24 horas para obtener con ello un extracto de aglicona de limón. El extracto obtenido se condensó a presión reducida con un evaporador y después se adsorbió sobre una resina de Amberlite (XAD16) para retirar la pectina, los carbohidratos, etc., en la mayor medida posible. Se condensó un eluato eluido de este con metanol hídrico al 40% y se liofilizó para obtener con ello un polvo de aglicona de limón tratada con fermentación (aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 3). Se analizó la composición (contenido) del flavonoide contenido en cada uno del glicósido de limón del ejemplo comparativo 1 y la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 3 empleando el sistema de análisis de HPLC 2 descrito a continuación bajo la condición de HPLC 5 descrita a continuación. El resultado se muestra en la tabla 2. En la tabla 2, "traza" significa que la sustancia casi no pudo detectarse bajo la condición de HPLC 5 descrita a continuación, y "nd" significa que la sustancia fue indetectable bajo la condición de HPLC 5 descrita a continuación.

Sistema de análisis de HPLC 2

Bomba: Shimadzu LC-10AD, Controlador del sistema: Shimadzu SCL-10A, Autoinyector: Shimadzu SIL-10A, Detector: Shimadzu SPD-10A (detector espectrofotométrico de UV), Horno de la columna: Shimadzu CTO-10A

Condición de HPLC 5

Columna: YMC-Pack ODS-A (4,6 d.i. x 250 mm), Eluyente: metanol/agua = 30/70 (v/v), Caudal: 1 ml/min, Longitud de onda de detección: 270 nm

Tabla 2

	Glicósido de limón (ejemplo comparativo 1)		Aglicona tratada con fermentación (ejemplo comparativo 3)	
Eriocitrina	716,0 mg	1,20 mM	113,7 mg	0,19 mM
Nairutina	29,7 mg	0,05 mM	traza	-
Hesperidina	213,0 mg	0,35 mM	41,9 mg	0,07 mM
Eriodictiol	traza	-	175,8 mg	0,61 mM
Naringenina	nd	-	5,1 mg	0,02 mM
Hesperetina	traza	-	41,4 mg	0,14 mM
Contenido por 100 g de polvo				

Medición de la actividad β -glicosidasa en el sobrenadante del cultivo

Cada cepa mostrada en la tabla 3 descrita a continuación se sometió a un tratamiento de precultivo a 30 °C durante 2 semanas en medio de caldo de cultivo de dextrosa de patata en la oscuridad. El medio en el momento del inicio de la formación de esporas se centrifugó para recoger el sobrenadante del cultivo resultante, que a su vez se empleó como muestra de disolución de enzima 1. Como alternativa, después del tratamiento de precultivo a 30 °C durante 4 semanas en la oscuridad, el medio, en el momento en que termina la formación de esporas, se centrifugó para separar el sobrenadante del cultivo de un precipitado. El sobrenadante del cultivo se empleó como muestra de disolución de enzima 2. Además, el precipitado se suspendió mediante la adición de agua en la misma cantidad que la del sobrenadante del cultivo y se sonizó para romper las células. La masa de células rotas resultante de la cual se había eliminado la materia insoluble mediante centrifugación se empleó como muestra de disolución de enzima 3.

Después se dispensaron 2 ml de una disolución de pNPG 1 mM disueltos en tampón fosfato-citrato 0,1 M (pH 5,0) en un tubo de ensayo y se precalentaron a 30 °C durante 5 minutos en un baño de agua a temperatura constante. Se añadió una parte alícuota de 0,5 ml de las muestras de disolución de enzima a este tubo de ensayo para realizar una reacción enzimática. La cantidad de pNP generado se midió empleando un espectrofotómetro (espectrofotómetro HITACHI U2000) a $\lambda = 420$ nm. Como control, la disolución de pNPG de sustrato se suplementó por adelantado con una disolución de carbonato de sodio y después con cada muestra de disolución de enzima para realizar los mismos procedimientos. La cantidad de enzima que genera 1 μ mol de pNP por hora bajo esta condición se consideró como 1 unidad. Se determinó la actividad β -glicosidasa (unidades) en la parte alícuota de 0,5 ml de cada muestra de disolución de enzima a partir de una curva de calibración construida por adelantado con una disolución patrón de pNP según la fórmula de cálculo descrita a continuación. El resultado se muestra en la tabla 3.

Actividad β -glicosidasa (unidades) = absorbancia (420 nm)/0,223 (unidades)

Tabla 3

Cepa	Muestra de disolución de enzima		
	1	2	3
<i>A. awamori</i> RIB 2804	1,53	1,71	1,81
<i>A. shirousamii</i> IAM 2414	1,79	1,15	1,32
<i>A. shirousamii</i> RIB 2503	0,02	0,54	0,50
<i>A. usamii</i> RIB 2001	0,05	1,27	1,04
<i>A. niger</i> ATCC 10549	0,07	1,03	1,54
<i>A. niger</i> ATCC 38857	0,02	1,79	1,53
<i>A. japonicus</i> ATCC 20236	0,93	1,24	1,40

A. <i>saitoi</i> IAM 2210	0,00	1,70	1,89
Todas las mediciones se indican en las unidades mencionadas anteriormente.			

Tal como puede observarse en la tabla 3, se demostró que casi todas las cepas poseían una fuerte actividad β -glicosidasa atribuible a la glicosidasa de referencia en el momento que terminó la formación de esporas (muestras de disolución de enzima 2 y 3). Debido a que las cepas de *A. awamori* y *A. shiroyamii* IAM 2414 tienen una actividad β -glicosidasa potente en el sobrenadante del cultivo en el momento de iniciarse la formación de esporas (muestra de disolución de enzima 1), se descubrió que las disoluciones de cultivo de estas cepas pueden utilizarse como enzimas para el tratamiento con glicosidasa mediante esterilización y filtración. Debido a que, por ejemplo, la actividad hidrolasa es extremadamente débil en este momento del inicio de la formación de esporas, es menos probable que se produzca la descomposición y otras reacciones de transformación microbianas de la aglicona generada. Por tanto, es posible obtener la aglicona con más eficacia. Cuando el tratamiento fermentativo microbiano se realiza utilizando estas cepas de *A. awamori* y *A. shiroyamii* IAM 2414, puede suponerse con facilidad que su periodo de fermentación microbiana puede acortarse fácilmente, comparado con la utilización de otras cepas. Por el contrario, también se descubrió que otras cepas, tales como las cepas de *A. niger* (en especial, ATCC 10549), que muestran menos actividad β -glicosidasa extracelular, pero que sí tienen una alta actividad intracelular, son adecuadas para su uso en el tratamiento fermentativo microbiano.

Ensayo del efecto inhibidor del deterioro del componente aromatizante

Una disolución acuosa ajustada a Brix 4,8 y pH 3,0 mediante el uso de glucosa y ácido cítrico se suplementó con 0,1% de una esencia de limón (fabricada por Takasago International) para preparar una disolución de jarabe. Se preparó una sección suplementada con muestra o sin muestra de esta disolución de jarabe con o sin la adición del glicósido de limón del ejemplo comparativo 1, la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 4 (indicada mediante la denominación aglicona en la tabla 4), o vitamina C. Estas secciones se sometieron a una pasteurización ultrarrápida calentando hasta 87 °C y después se introdujeron en botellas de PET incoloro transparente. Se añadió el glicósido de limón del ejemplo comparativo 1 de modo que su concentración en eriocitrina se llevó hasta la concentración añadida mostrada en la tabla 4. También se añadió la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 4, de modo que su concentración final de eriodictiol se lleva hasta la concentración añadida mostrada en la tabla 4. Además, se estudió si la adición o no de la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 4 afectaba al aroma de la disolución de jarabe completa, y se determinó que la adición de eriodictiol a 30 ppm o menos no afectaba al aroma en gran medida. Se empleó una muestra para cada una de estas secciones para realizar los ensayos de deterioro por calentamiento y radiación ultravioleta tal como se describe a continuación.

Ensayo de deterioro por calentamiento: Ensayo 1-1 (30 ppm) y ensayo 1-2 (3 ppm)

Una muestra de cada sección se dejó sin tratar y se conservó a 60 °C o 4°C (refrigeración) durante 4 días en la oscuridad, seguido de la evaluación sensorial por 12 panelistas bien entrenados. En el procedimiento de evaluación, los panelistas evaluaron las respectivas puntuaciones de las secciones, y la muestra conservada mediante refrigeración puntúa como la puntuación máxima de 5, para determinar una puntuación promedio. Los mismos panelistas realizaron cuatro ensayos de evaluación sensorial en el mismo día. El resultado se muestra en la tabla 4.

Ensayo de deterioro por radiación ultravioleta: Ensayo 2-1 (30 ppm) y ensayo 2-2 (3 ppm)

Una muestra de cada sección se conservó mediante refrigeración bajo condiciones de radiación ultravioleta (UV) (6 horas de radiación), con una cámara de exposición a luz ultravioleta de larga vida (fabricada por Suga Test Instruments) o en la oscuridad, seguido de la evaluación sensorial por 12 panelistas bien entrenados. En el procedimiento de evaluación, los panelistas proporcionaron las respectivas puntuaciones para las secciones, y la muestra conservada en la oscuridad puntúa como la puntuación máxima de 5, para determinar una puntuación promedio. Los mismos panelistas realizaron cuatro ensayos de evaluación sensorial en el mismo día. El resultado se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Condición de ensayo	Concentración añadida	Puntuación promedio de la evaluación sensorial			
		Frescura	Jugosidad	Intensidad del	Evaluación

					aroma	global
Ensayo 1-1 60 °C 4 días	Sección sin muestra	-	2,0	2,2	2,1	2,1
	Glicósido de limón	30 ppm	3,0	3,0	2,8	3,0
	Aglicona	30 ppm	4,1	4,1	4,5	4,2
	Aglicona Vitamina C	30 ppm 30 ppm	4,2	4,3	4,5	4,4
Ensayo 1-2 60 °C 4 días	Sección sin muestra	-	2,0	2,2	2,1	2,2
	Glicósido de limón	3 ppm	3,2	3,2	3,0	3,2
	Aglicona	3 ppm	3,8	3,9	4,2	4,0
	Aglicona Vitamina C	3 ppm 3 ppm	4,0	4,0	4,3	4,2
Ensayo 2-1 UV 6 horas	Sección sin muestra	-	2,0	2,2	2,1	2,2
	Glicósido de limón	30 ppm	3,2	3,8	3,6	3,5
	Aglicona	30 ppm	4,0	4,0	4,5	4,1
	Aglicona Vitamina C	30 ppm 30 ppm	4,1	4,1	4,6	4,4
Ensayo 2-2 UV 6 horas	Sección sin muestra	-	2,4	2,4	2,4	2,6
	Glicósido de limón	3 ppm	3,2	3,2	3,8	3,5
	Aglicona	3 ppm	3,8	3,8	4,3	4,0
	Aglicona Vitamina C	3 ppm 3 ppm	4,0	4,0	4,3	4,2

Tal como puede observarse en la tabla 4, cuando se conservan a un temperatura cálida de 60 °C durante 4 días, la sección suplementada con glicósido de limón recibe mejores puntuaciones que las de la sección sin muestra en todas las categorías de evaluación, y la sección suplementada con aglicona tratada con fermentación recibe mejores puntuaciones que las de la sección suplementada con glicósido de limón en todas las categorías de evaluación, y se puntuó como que producía un efecto notable en la intensidad del aroma. La sección suplementada con la aglicona tratada con fermentación y con vitamina C recibió mejores puntuaciones que las de la sección suplementada solo con la aglicona tratada con fermentación en todas las categorías de evaluación en el ensayo 1-1 y el ensayo 1-2. Aunque se evaluó de la misma manera una sección suplementada con muestra con la adición del glicósido o la aglicona a una concentración de 1 ppm, los panelistas no observaron diferencias significativas en la evaluación sensorial. Estos resultados demuestran que la adición de eriocitrina o eriodictiol a una concentración de 3 ppm o mayor a la disolución de jarabe produce un significativo efecto inhibitor sobre el deterioro del aroma provocado por el calentamiento, y que la adición de eriocitrina o eriodictiol junto con vitamina C potencia notablemente el efecto.

Por otra parte, cuando se someten a la radiación ultravioleta, la sección suplementada con glicósido de limón recibe mejores puntuaciones que las de la sección sin muestra en todas las categorías de evaluación, y la sección suplementada con aglicona tratada con fermentación recibe mejores puntuaciones que las de la sección suplementada con glicósido de limón en todas las categorías de evaluación, y se demostró que tenía un efecto inhibitor sobre el deterioro del aroma provocado por la radiación ultravioleta. La sección suplementada con la aglicona tratada con fermentación y con vitamina C recibió igual o mejor puntuación que las de la sección suplementada solo con la aglicona tratada con fermentación en todas las categorías de evaluación en el ensayo 2-1 y en el ensayo 2-2. Estos resultados demuestran que la adición de aglicona de limón a una concentración de 3 ppm o mayor a la disolución de jarabe ejerce unos efectos inhibidores significativos sobre el deterioro del aroma provocado por la radiación ultravioleta.

Cuando se compara entre el ensayo 1 y el ensayo 2, parece existir una tendencia a suprimir con eficacia el deterioro por la radiación ultravioleta, más que por el calentamiento, aunque depende de las condiciones de ensayo. Los panelistas indicaron en sus respuestas que las secciones suplementadas con muestra tienen un regusto refrescante en general. Así, se confirmó que la adición de vitamina C preparada por separado a la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 4 muestra unos efectos mucho mayores que el total de sus efectos individuales y produce un efecto sinérgico. Cuando el eriodictiol preparado por separado se añade a un alimento o bebida que contiene vitamina C, por ejemplo, zumo, puede suponerse con facilidad que se esperan unos efectos inhibidores sobre el deterioro más potentes que los efectos inhibidores sobre el deterioro esperados de la cantidad añadida de eriodictiol.

Ensayo del efecto inhibitor de la pérdida de color de un pigmento

Una disolución acuosa ajustada a Brix 4,8 y pH 3,0 mediante el uso de glucosa y ácido cítrico se suplementó con 0,1% en peso de un pigmento de antocianina (pigmento de repollo rojo) para preparar una disolución de jarabe. Se preparó una sección suplementada con muestra o sin muestra de esta disolución de jarabe con o sin la adición de la aglicona tratada con fermentación del ejemplo comparativo 4 a una concentración de eriodictiol de 30 ppm o ambas la aglicona y la vitamina C. Estas secciones se sometieron a una pasteurización ultrarrápida calentando hasta 87 °C y después se introdujeron en botellas de PET incoloro transparente. Después, una muestra de cada una de estas secciones se irradia con rayos ultravioleta durante 8 horas y después se conserva mediante refrigeración o se conserva calentando a 45 °C en la oscuridad durante 2 semanas. Se midió la absorbancia a $A = 460$ nm con un espectrofotómetro (espectrofotómetro HITACHI U2000) para determinar la tasa de pigmento remanente (%). El resultado se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

	Concentración añadida	Porcentaje de pigmento residual (%)	
		UV 8 horas	45 °C, 2 semanas
Sección sin muestra	-	11,48	40,98
Aglicona	30 ppm	41,81	67,23
Aglicona Vitamina C	30 ppm 30 ppm	53,21	75,32

Tal como puede observarse en la tabla 5, los efectos inhibidores del deterioro de los componentes de pigmentos naturales extraídos de verduras, por ejemplo, antocianina y carotenoide, mejoraron mediante la adición de la aglicona de limón y mejoraron significativamente mediante la adición de la aglicona de limón simultáneamente con la vitamina C. Además, los efectos se produjeron en especial con respecto a la irradiación con ultravioleta, y la aglicona tratada con fermentación y la vitamina C son útiles para inhibir el deterioro de la materia colorante natural.

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de preparación de un material antioxidante que contiene una aglicona flavonoide y vitamina C, en el que la aglicona flavonoide es eriodictiol y/o diosmetina, **caracterizándose** dicho procedimiento por:

proporcionar una materia prima que contiene un glicósido flavonoide derivado de limones, limas o sudachis; y

5 tratar la materia prima con β -glicosidasa derivada de *Penicillium multicolor* para obtener una aglicona flavonoide a partir del glicósido flavonoide en la materia prima.

2.- El procedimiento según la reivindicación 1, **que se caracteriza** además por mezclar la vitamina C con la aglicona flavonoide obtenida mediante el tratamiento de la materia prima con la β -glicosidasa.

Fig. 1

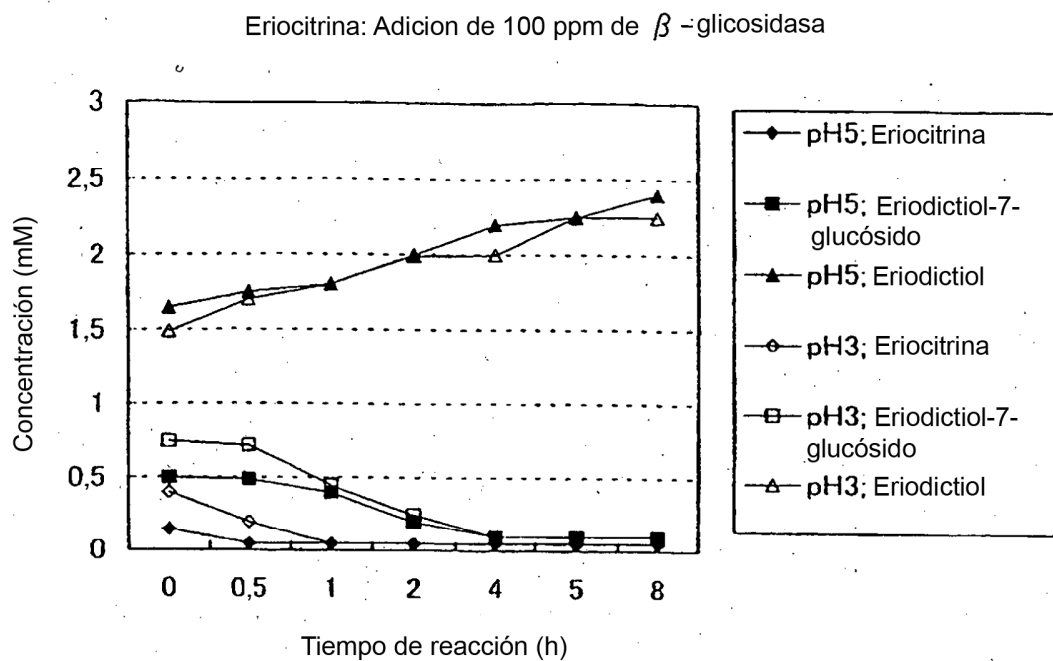


Fig. 2

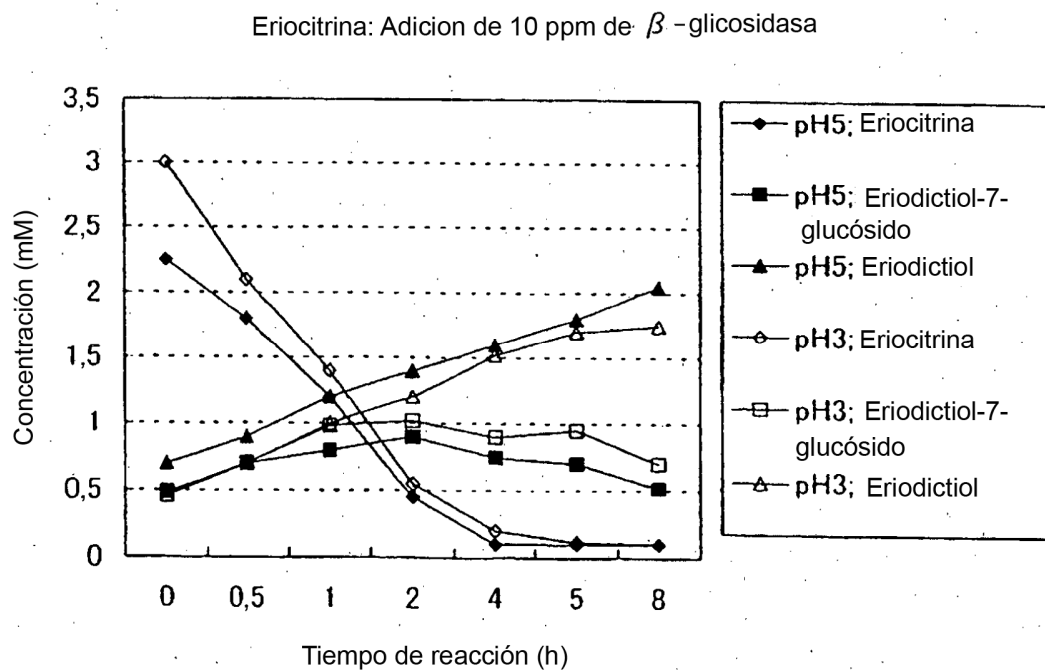


Fig. 3

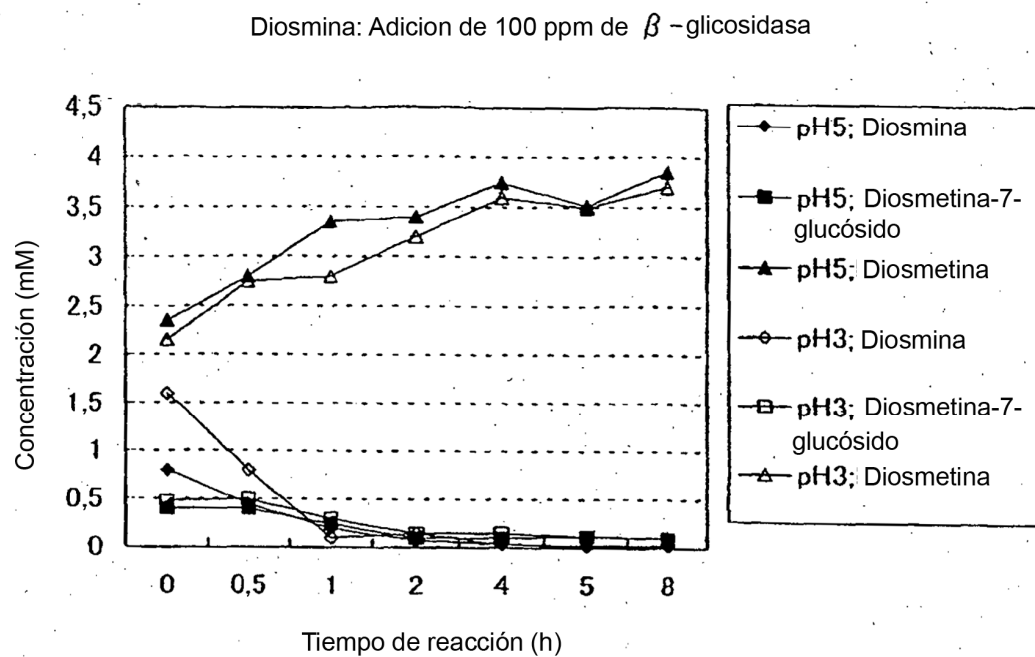


Fig. 4

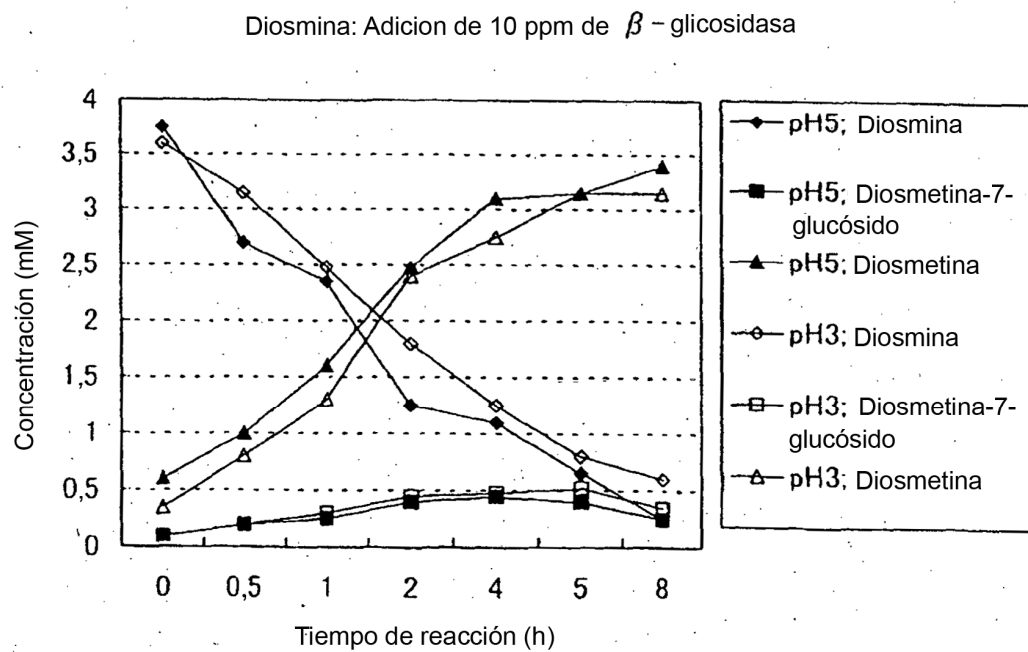


Fig. 5

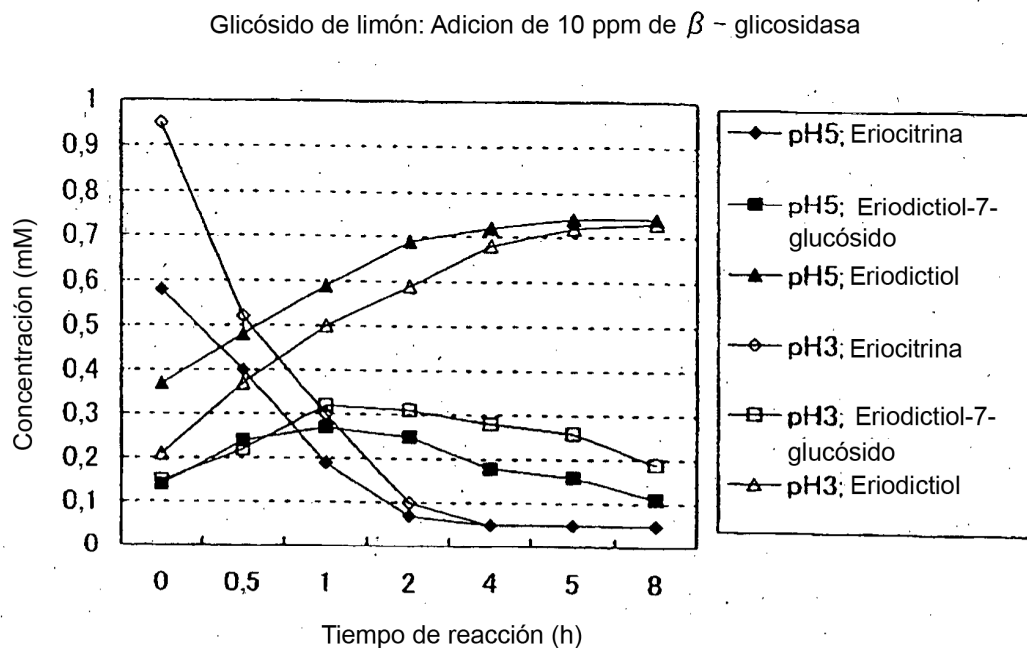


Fig. 6

