

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 865**

51 Int. Cl.:

**A23L 21/15** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**A23L 29/231** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2003 PCT/DK2003/000461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2004 WO04005352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2003 E 03735333 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 1517925**

54 Título: **Proceso para fabricar pectinas no esterificadas amidadas, su composición y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**02.07.2002 DK 200201033**

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

**30.01.2018**

73 Titular/es:

**CP KELCO APS (100.0%)  
VED BANEN 16  
4623 LILLE SKENSVED, DK**

72 Inventor/es:

**CHRISTENSEN, STEEN, HØJGAARD;  
HANSEN, KARIN, MEYER y  
TRUDSØE, JENS, ESKIL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 651 865 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**

Proceso para fabricar pectinas no esterificadas amidadas, su composición y usos de las mismas

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere en particular a un procedimiento para la fabricación de pectinas amidadas de bajo contenido de éster, que proporcionan geles de alta consistencia. Además, la invención se refiere a las pectinas obtenibles a partir de este proceso, y los usos de dichas pectinas.

**Antecedentes de la técnica**

- 10 La pectina es un polisacárido complejo asociado con las paredes celulares de las plantas. Se compone de una cadena principal de ácido alfa poligalacturónico unida en 1,4 intervenida por residuos de ramnosa y modificada con cadenas laterales de azúcares neutros y componentes no de azúcar, tales como acetilo, metilo, y grupos de ácido ferúlico.

- 15 Las cadenas laterales de azúcares neutros, que incluyen arabinanos y arabinogalactanos, están unidos a los residuos de ramnosa en la cadena principal. Los residuos de ramnosa tienden a agruparse juntos en la cadena principal. Por lo tanto, con las cadenas laterales unidas esta región se denomina como la región pelosa y el resto de la cadena principal se denomina por lo tanto como la región lisa.

- Las pectinas se utilizan tradicionalmente como aditivos alimentarios. Sin embargo, su uso también se ha extendido al área farmacéutica. Las pectinas han sido utilizadas durante mucho tiempo como un agente antidiarreico y pueden mejorar las funciones intestinales. El efecto antidiarreico se piensa que es en parte debido a la actividad antimicrobiana de la pectina.

- 20 Las pectinas también son eficaces contra las úlceras gastrointestinales y enterocolitis. Las pectinas también influyen en la proliferación celular en los intestinos. También tienen un efecto de disminución del colesterol en la sangre y muestran inhibición de la aterosclerosis. Este efecto es el resultado de las interacciones entre las pectinas y las sales biliares. Las pectinas también han demostrado afectar la red de fibrina en los individuos con hipercolesterolemia.

- 25 La capacidad de interactuar con muchos iones metálicos divalentes hace de las pectinas un agente desintoxicante fuerte.

- 30 La resistencia de la pectina a la degradación en el tracto gastrointestinal superior y su completa disolución en el colon hace a la pectina muy adecuada para el suministro específico del colon. La coacervación con gelatina permite la formación de microglóbulos adecuados para productos de liberación controlada. Además, la pectina se utiliza en formulaciones de comprimidos.

- Según Kertesz, Z. I: The Pectic Substances, Interscience Publishers, Inc., Nueva York, 1951, las materias pécticas se producen en todos los tejidos vegetales. Sin embargo, de importancia industrial son particularmente las manzanas, remolacha, lino, pomelos, limones, limas, naranjas, patatas y girasol. Últimamente, también la pectina en Aloe vera ha demostrado utilidad industrial.

- 35 Históricamente, la pectina se ha utilizado principalmente como agente gelificante para mermeladas o similares que contienen fruta, o con sabor a fruta, sistemas ricos en azúcar. Ejemplos de ello son las tradicionales mermeladas, mermeladas con contenido de azúcar reducido, gelatinas transparentes, geles de confitería con sabor a fruta, geles de confitería sin sabor a fruta, glaseados reversibles por calor para la industria de la panadería, mermeladas resistentes al calor para la industria de panadería, ondulaciones para su uso en helados, y preparados de frutas para yogures.

- 40 Una parte sustancial de la pectina se utiliza hoy para la estabilización de bebidas de leche de bajo pH, incluyendo bebidas fermentadas y mezclas de zumo de fruta y leche.

Últimamente, se ha encontrado que las pectinas son eficaces para el tratamiento del ardor de estómago causado por el reflujo ácido del esófago.

- 45 Los residuos de ácido galacturónico en la pectina están parcialmente esterificados y se presentan como el éster metílico. El grado de esterificación se define como el porcentaje de grupos carboxilo esterificados. La pectina con un grado de esterificación ("DE") por encima del 50% se denomina pectina de contenido de éster de metilo alto ("HM") o pectina de contenido de éster alto y la pectina con un DE menor del 50% se denomina pectina de éster de metilo bajo ("LM") o pectina de contenido de éster bajo. La mayoría de las pectinas que se encuentran en frutas y verduras son pectinas HM. Los grupos éster de acetato pueden además ocurrir en el carbono -2 o -3 de los residuos de ácido galacturónico. El grado de esterificación del acetato ("DAC") se define como el porcentaje de residuos de ácido galacturónico que contienen un grupo éster de acetato. La mayoría de las pectinas nativas tienen un bajo DAC, una excepción es la pectina de la remolacha azucarera.

- 50

Las pectinas son solubles en agua e insolubles en la mayoría de disolventes orgánicos. Las pectinas con un nivel muy bajo de esterificación de metilo y los ácidos pépticos son para fines prácticos solamente solubles en forma de una sal de potasio o sal de sodio.

5 Las pectinas son más estables a pH 3-4. Por debajo de pH 3, los grupos acetilo y metoxi y las cadenas laterales de azúcares neutros se eliminan. A temperaturas elevadas, estas reacciones se aceleran y se produce la escisión de enlaces glicosídicos en el esqueleto de galacturonano. En condiciones neutras y alcalinas, los grupos de éster de metilo se saponifican y la cadena principal de poligalacturonano se rompe a través de la escisión de los enlaces glicosídicos por eliminación beta en los extremos no reductores de los residuos de ácido galacturónico metoxilados.

10 LM son resistentes a condiciones neutras y alcalinas ya que no hay ninguno o sólo un número limitado de grupos de éster de metilo.

Hay muchos biocatalizadores que pueden específicamente modificar y degradar las moléculas de pectina. Estos biocatalizadores incluyen endo- y exo-poligalacturonasa, liasa de peptato, metilesterasa de peptina, acetilesterasa de pectina, y ramnogalacturonasa.

15 Según Rastall, R.: LFRA Ingredients Handbook, Leatherhead Food RA, marzo de 1999, las peptinasas de especies de *Aspergillus* incluyen:

Biocatalizador	EC nº	Sustrato	Acción	pH óptimo	Temperatura óptima
Liasa de peptina	4.2.2.10	Peptina de contenido de éster alto	Eliminación endo a-1,4 b	5-5,5	50
Metilesterasa de peptina	3.1.1.11	Peptina de contenido de éster alto	Desesterificación aleatoria	4-4,5	55
Endopoligalacturonasa	3.2.1.15	Peptina de contenido de éster bajo	Despolimerización endo a-1,4	4-4,5	45-50
Exopoligalacturonasa	3.2.1.67	Peptina de contenido de éster bajo	Hidrólisis exo a-1,4	5	55
Arabinogalactanasa	3.2.1.90	Regiones pelosas de la peptina	Hidrólisis endo b-1,3 1,6	4	50
Mananasa	3.2.1.78	Regiones pelosas de la peptina	Hidrólisis endo b-1,4	3-6	80

Los suministradores incluyen Gist-Brocades, Novo Nordisk A/S, Róhm, Shin Nihon, y Solvay.

20 Tanto las peptinas HM como LM pueden formar geles, pero por mecanismos totalmente diferentes. La peptina HM forma geles en presencia de concentraciones altas de co-solutos, tales como azúcar a pH bajo. Las pectinas LM forman geles termorreversibles en presencia de calcio. Además, la pectina de la remolacha del azúcar puede formar geles a través de la reticulación de los grupos ferulados como se divulga por Rombouts (documento de patente de los Estados Unidos US 4.672.034).

25 Las pectinas tienen un estatus regulatorio favorable como aditivo alimentario. Se clasifican como generalmente reconocidas como seguras ("GRAS") en los Estados Unidos y de ingesta diaria admisible ("IDA") en Europa.

30 En el documento de patente de los Estados Unidos 2.480.710, Bryant describe un procedimiento para la fabricación de una pectina amidada. Un tipo de pectina de configuración lenta con un contenido de metoxilo de 7,5% a 10% se suspende en IPA al 65% con hidróxido de amonio al 10% (28% de amoniaco), y la mezcla se agita durante dos horas a 25° C. Después de drenar el alcohol amoniaco, se añade IPA al 65%. A continuación se añade HCl concentrado para acidez, lo que origina un pH de una dispersión al 1% de la pectina amidada de 3-4. Un pH mayor de 5 y por debajo de 3 es probable que cause modificaciones adicionales no deseables durante el secado. La suspensión se filtra y se aclara primero con IPA al 65% y después IPA al 90% y después se seca. La conversión es como sigue



La cantidad deseada de amoniaco varía de 2 a 16 veces la cantidad teóricamente necesaria para des-esterificar completamente el material de partida original.

En lugar de utilizar una pectina aislada, se puede utilizar un precipitado de pectina húmeda.

5 En el documento de patente de los Estados Unidos US 2.478.170, William et al. describen que una pectina de contenido bajo de éster se puede preparar por la desesterificación parcial de cualquier pectina o protopectina. William et al usan un material de pectina de partida, que está sin modificar y que muestra un grado de esterificación de aproximadamente 80%. Ácido, álcali o un biocatalizador catalizan esta desesterificación. En la descripción, el álcali se utiliza como el agente de desesterificación para llegar a un grado de esterificación de 20% a 30%.

10 En el documento de patente de los Estados Unidos US 2.448.818, McCreedy et al. describen el uso de pectinesterasa cítrica para transformar pectina in situ en pectina de bajo contenido de éster que tiene un contenido de metoxilo del 6%, correspondiente a un grado de esterificación de aproximadamente 37%. El biocatalizador utilizado es de origen natural en los cítricos, y tales estererasas de plantas son conocidas por originar una desesterificación tipo bloque.

15 En el documento de patente de los Estados Unidos US 3.622.559, Wiles et al. hacen un material de partida de peptina por medio de una extracción ácida a aproximadamente 70° C durante 1-2 horas. Esto conduce a una pectina que tiene un peso molecular (Pm) de 180.000 a 200.000 Daltones y un contenido de metoxilo del 10% (DE = 61%) a 10,5% (DE = 64%). Esta pectina puede ser desesterificada adicionalmente mediante el tratamiento de la pectina con un ácido o una mezcla de amoníaco-alcohol. Este proceso conduce a una pectina de bajo contenido de éster que tiene un peso molecular (Pm) de 120.000 a 200.000 Daltones. En el documento de patente de los Estados Unidos  
20 US 4.065.614, Nelson da a conocer una pectina amidada que tiene un grado de amidación de al menos 27%. El material de pectina de partida debe tener un grado de esterificación superior al 60%, y la amidación se lleva a cabo utilizando una mezcla de amoníaco líquido en un disolvente orgánico adecuado tal como isopropanol. La reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de -15 - +15° C hasta que el grado de amidación ha alcanzado al menos 27%. El material de partida de pectina se revela como cualquiera de las pectinas de alto contenido de éster  
25 disponibles en el comercio.

En el documento de patente de Dinamarca DK 157.616 B, Buhl et al. revelan una pectina amidada que tiene un grado de amidación de 5-25%, un grado de esterificación de al menos 50% y un peso molecular promedio de 15.000 - 75.000 Daltones. El material de partida de pectina se prepara según una extracción con ácido convencional, y la amidación se lleva a cabo en una mezcla de amoníaco líquido e isopropanol a 0° C.

30 En el documento de patente internacional WO 98/58968, Larsen et al. describen un procedimiento para la fabricación de fracciones seleccionadas de pectina con alto contenido de éster. El procedimiento consiste en dos o más etapas de extracción, caracterizado porque cada paso del procedimiento implica la extracción de la pectina de la etapa anterior a pH más bajo. Las fracciones de pectina de alto contenido de éster también son útiles como materiales de partida para la fabricación de pectinas desesterificadas. El material de partida de pectina para la  
35 desesterificación tiene un DE por encima de 50%, y se trata con un agente de desesterificación para obtener una fracción de pectina que tiene un grado de esterificación, que se reduce en al menos 5% con respecto al de la fracción de pectina de alto contenido de éster y un grado de amidación en el intervalo de 0-25%. Los agentes de desesterificación son ácidos, álcalis o combinaciones de los mismos.

40 En el documento de patente internacional WO 00/08952, Madsen et al. describen una composición de pectina que no proporciona gelificación sustancial. Se describe que el grado de esterificación y/o el grado de estructura de bloque pueden ser modificados utilizando biocatalizadores obtenidos de plantas o bacterias.

45 En el documento de patente internacional WO 00/15830, Christensen et al. divulgan un procedimiento para el tratamiento de la pectina con una metilesterasa de peptina. La metilesterasa de peptina no se deriva de la planta, pero tiene al menos una propiedad de metilesterasa de peptina vegetal. Esa propiedad es la desesterificación en bloque de la pectina, y se divulga la pectina tratada que contiene al menos 70% de grupos éster.

En el documento de patente de los Estados Unidos US 6,069,000, Andersen et al. divulgan un biocatalizador con actividad de pectinesterasa. Los inventores creen que el rendimiento mejorado de la pectinesterasa de la invención es debido al modo de acción del biocatalizador de la invención que proporciona preferiblemente una distribución en bloque de los grupos ácidos en la pectina.

50 En el documento de patente de los Estados Unidos US 5.707.847, Christgau et al. han descrito un biocatalizador que exhibe actividad de metilesterasa de peptina. El biocatalizador se puede utilizar para la desmetilación de pectinas, por ejemplo, de cítricos, manzana, girasol y/o de la remolacha azucarera. El biocatalizador se puede utilizar para producir pectinas de baja metilación a partir de peptinas de alta metilación.

55 En esta referencia, la esterasa microbiana de pectina es comparable en su efecto al ácido y álcali, es decir la desesterificación es aleatoria en su naturaleza.

El documento de patente internacional WO 99/37685 describe pectinas para uso en materiales de tipo pasta.

En los procedimientos convencionales de desesterificación de la pectina, los procesos químicos implican el uso de tratamiento ácido o alcalino de la pectina de alto contenido de éster. Estos procesos son conocidos por originar la despolimerización de la pectina de alto contenido de éster durante la desesterificación y, en consecuencia, la desesterificación química típicamente debe tener lugar a temperaturas bajas. Esto por otra parte hace el proceso de desesterificación lento y, además, las inversiones en equipos de refrigeración hacen que tales pectinas desesterificadas sean más costosas de producir. Además, puesto que como se sabe los procesos químicos eliminan los grupos de éster de una manera aleatoria, las pectinas desesterificadas resultantes son menos de bloque con respecto a los grupos de ácido carboxílico.

Se conocen procesos enzimáticos para desesterificar pectinas de alto contenido de éster ya sea de manera aleatoria o de manera de tipo bloque. Además, se sabe que la desesterificación enzimática reduce o elimina la despolimerización de la pectina de alto contenido de éster durante la desesterificación. Sin embargo, la desesterificación enzimática adolece del hecho de que no puede conseguirse un grado de esterificación por debajo de aproximadamente 25% tal como se divulga por Smythe (documento de patente de los Estados Unidos US 2.599.531). Además, no se ha descrito ningún procedimiento enzimático, lo que producirá pectinas amidadas.

Por lo tanto, sigue existiendo el problema de que las pectinas de bajo contenido de éster amidadas hechas convencionalmente todavía sufren de descomposición glicosídica y agregación durante la amidación. Esto conduce a pectinas amidadas con una conformación cambiada debido a la agregación.

La existencia de agregados de peptina en solución han sido descritas en la bibliografía (Sorochan et al. 1971. Carbohydr. Res. volumen 20, páginas 243-248; Jordan, R. C. y Brant, D. A. 1978. Biopolymers. volumen 17, páginas 2885-2895; Davis et al. 1980. Int. J. Biol. Macromol. volumen 2, páginas 330-332). Los agregados de peptina se forman en solución bajo condiciones no gelificantes y podrían considerarse precursores para la gelación, documento de patente número 6.143.337 para Fishman, et al. Se especula que esta agregación causa que la peptina amidada llegue a ser menos soluble, lo que conduce a un poder de gelificación más bajo que el teóricamente posible. Adicionalmente, las peptinas no amidadas de bajo contenido de éster que tienen un grado de esterificación por debajo del 25% han sido hechas hasta ahora o por desesterificación ácida o por desesterificación alcalina, y para estas peptinas de bajo contenido de éster existe el mismo problema, a saber que las hidrólisis ácidas o alcalinas reducen el peso molecular de la peptina y consecuentemente producen una peptina de bajo contenido de éster con más bajo poder gelificante que el posible teóricamente.

En consecuencia, existe una necesidad para un procedimiento, que ofrezca

\* Un método para reducir el grado de esterificación por debajo del 25% con menos ruptura de los enlaces glicosídicos en el esqueleto de la pectina.

• Pectinas no amidadas de bajo contenido de éster con un grado de esterificación por debajo del 25% que tienen un peso molecular más alto y una conformación no agregada o menos agregada para proporcionar un aumento de poder gelificante.

• Un método para preparar pectinas amidadas con mayor peso molecular y una conformación menos agregada.

• Pectinas de bajo contenido de éster de peso molecular más alto y una conformación no agregada o menos agregada para proporcionar un aumento de poder gelificante.

### Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento como se reivindica por el cual un extracto de pectina primero se desesterifica usando un biocatalizador. En segundo lugar, la peptina desesterificada de peso molecular alto resultante es adicionalmente desesterificada y amidada usando métodos convencionales. La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de pectina amidada de bajo contenido de éster que comprende las etapas de:

- obtener un material de pectina de partida, poner en contacto el material de pectina de partida con una metil esterasa de peptina (E. C. 3.1. 1.11) como un biocatalizador capaz de desesterificar el material de partida de peptina,
- permitir que dicho biocatalizador desesterifique el material de peptina de partida para producir una peptina desesterificada,
- monitorizar la desesterificación del material de peptina de partida; y
- terminar la desesterificación cuando la peptina desesterificada tenga un grado de esterificación entre el 60% y el 30%,
- desesterificar adicionalmente dicha peptina desesterificada por contacto de la peptina desesterificada con un ácido o un álcali capaz de desesterificar y permitir que el ácido o álcali desesterifique adicionalmente dicha

pectina desesterificada hasta un grado de esterificación por debajo del 25% para producir una peptina de bajo contenido de éster; y

- poner en contacto dicha pectina desesterificada con amoníaco para producir una peptina amidada de bajo contenido de éster.

5 La presente invención también se refiere a una peptina amidada, según las reivindicaciones.

Las peptinas amidadas de la presente invención son útiles como material alimentario, más particularmente mermeladas y gelatinas y productos lácteos. Las peptinas amidadas de la presente invención son también útiles en productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal y productos para el hogar.

#### Breve descripción de los dibujos

10 Fig. 2.3 presenta los datos de la Tabla 2.3 con la consistencia de gel en el eje y, y la concentración de calcio en el eje x.

Fig. 2.4 presenta los datos de la Tabla 2.4, en la que el eje y representa los valores de la tensión crítica, y el eje x representa la concentración de calcio.

Fig. 2.5 es un gráfico con la concentración de calcio a lo largo del eje x y la resistencia a la rotura en el eje y.

15 Fig. 2.6 presenta los datos de la Tabla 2.6, con la concentración de calcio a lo largo del eje x y la consistencia del gel a lo largo del eje y.

Fig. 3.1 es un gráfico de los datos en la Tabla 3.1, la DE en el eje x y el factor de Mark-Houwink en el eje y.

Fig. 3.2 es un gráfico de los datos de la Tabla 3.2 con DE a lo largo del eje x y la resistencia a la rotura a lo largo del eje y.

20 Fig. 4.1 es un gráfico de los datos de la tabla 4.1 relativos al ensayo N° 1 y muestra la consistencia de geles de peptinas amidadas hechos con material de partida de peptinas de diferentes DE. Para cada DE de peptina de partida, la representación también muestra cómo la consistencia del gel está influenciada por las varias concentraciones de iones de calcio.

25 Fig. 4.2 es un gráfico de los datos de la tabla 4.1 relativos al ensayo N° 2 y muestra la consistencia de geles de peptinas amidadas hechos con material de partida de peptinas de diferentes DE. Para cada material de partida de peptina DE, el gráfico también muestra cómo la consistencia del gel está influenciada por las varias concentraciones de iones de calcio.

#### Mejores modos de llevar a cabo la invención

30 Si bien no se desea estar ligado por la teoría, durante un proceso de amidación el material de peptina cambiará de peso molecular y de conformación. Las moléculas de peptina se verán influenciadas por dos fenómenos. Uno es la eliminación beta, por la cual la molécula se despolimeriza a un peso molecular inferior y el otro es la agregación, por la cual las moléculas cambian de conformación y el peso molecular se incrementa. Se ha encontrado recientemente que cuanto más alto es el % de DE antes de la amidación, más agregado se vuelve el producto final. Esta agregación, junto con una eliminación beta más pronunciada para la peptina de alto % de DE, se presume que son los responsables de la disminución de la consistencia del gel que se observa a medida que el % de DE de la peptina antes de la amidación se incrementa. La agregación extrema conducirá a la insolubilidad del polímero y también podría esperarse que sea responsable de la formación de microgeles o de la pre-gelificación, lo que resulta en estructuras de gel indebidas. Por lo tanto, la peptina que se utiliza para la amidación debe ser desesterificada para minimizar la tendencia a la agregación. Para lograr una peptina amidada posterior con alto poder de gelificación, el paso de desesterificación también debe llevarse a cabo bajo condiciones que minimicen la despolimerización.

Ahora se ha descubierto que usando primero una desesterificación biocatalítica (o sea, enzimática), la despolimerización y la agregación durante la desesterificación química y amidación subsiguientes se reducen considerablemente. El resultado son peptinas esterificadas y amidadas con baja tendencia a la agregación y simultáneamente de alto peso molecular hasta ahora desconocidas.

45 La desesterificación con biocatalizador se realiza a un grado de esterificación de entre 60% y 30% antes de la amidación. En una realización preferida, la desesterificación con biocatalizador se lleva a cabo a un grado de esterificación de entre 45% y 30%.

En una realización más preferida, la desesterificación con biocatalizador se lleva a cabo a un grado de esterificación de entre 45% y 40%.

50 En una realización aún más preferida, la desesterificación con biocatalizador se lleva a cabo a un grado de esterificación del 42%.

Estas diferencias con las pectinas conocidas dan como resultado una serie de ventajas: las pectinas desesterificadas hechas según la presente invención producen geles acuosos de mayor rigidez y resistencia a la rotura que las pectinas desesterificadas conocidas, y la presente invención hace que sea fácil de controlar con precisión el grado de esterificación y la distribución de los grupos éster y/o grupos amida.

5 El procedimiento consiste en los pasos siguientes:

En primer lugar, la pectina de alto grado de esterificación se extrae de un material de partida que contiene pectina según métodos conocidos, o sea, extracción, ya sea en agua ácida o alcalina a temperatura elevada. Opcionalmente, el extracto puede ser concentrado según técnicas conocidas. Alternativamente, pectina comercial de alto contenido de éster, seca o previamente extraída, purificada, aislada y seca, se vuelve a disolver, y

10 opcionalmente se concentra.

En segundo lugar, si es necesario, la solución de pectina se ajusta a fin de proporcionar las condiciones deseadas para la actividad del biocatalizador. Estos ajustes pueden implicar el cambio o control de la temperatura de la solución de pectina, pH o la concentración iónica.

15 Si hay que ajustar el pH de la solución de pectina al pH óptimo del biocatalizador utilizado, y, en los casos en que la actividad del biocatalizador va a aumentar a valores de pH más bajos, la fuerza iónica del precipitado o suspensión se puede aumentar con sales, tales como el cloruro de sodio.

Mientras se agita, se deja que el biocatalizador actúe sobre la pectina, y el grado de esterificación es fácilmente controlado mediante la adición necesaria de álcali para mantener el pH de la reacción. De esta manera, es fácil obtener una pectina desesterificada con un determinado grado de esterificación. El proceso también puede llevarse

20 a cabo de forma continua. En este caso se puede utilizar equipo de valoración en línea para controlar el grado de esterificación, y la longitud del tubo en el que la desesterificación se lleva a cabo y la tasa de flujo del material a ser esterificado determinarán el grado final de esterificación. Otros métodos para determinar el grado de esterificación, tales como el uso de la espectrometría de infrarrojo cercano (NIR), se pueden utilizar para monitorizar el grado de esterificación.

25 En tercer lugar, a cualquier grado deseado de esterificación, la desesterificación enzimática puede terminarse con calor, ácido o álcali.

Sin embargo, se ha descubierto que se obtiene particularmente alta viscosidad intrínseca y alto factor de Mark-Houwink que, aunque no se desea estar ligado por la teoría, se atribuye a la baja agregación, cuando la desesterificación del material de partida se termina cuando el grado de esterificación se ha reducido a dentro del

30 rango de 30-60%. Esto conduce a un poder de gelificación particularmente alto de las pectinas amidadas resultantes. Además, se ha descubierto que, cuando la desesterificación se lleva a cabo dentro de la misma gama, es decir, de 30-60% utilizando medios convencionales, la agregación de la pectina amidada resultante será similar a la agregación de la pectina amidada hecha por primera desesterificación con el biocatalizador. Sin embargo, utilizando el enfoque convencional, el peso molecular será más bajo que es el caso cuando se usa el biocatalizador.

35 Además se obtendrán pectinas amidadas que tienen menor poder de gelificación que las pectinas amidadas hechas por primera desesterificación usando un biocatalizador. En cuarto lugar, la pectina desesterificada se precipita en alcohol si la desesterificación se llevó a cabo en solución. Después del prensado, el pH de la mezcla de precipitado de la pectina desesterificada y alcohol es entonces o bien reducido con ácido o aumentado con álcali según la técnica convencional. Al hacerlo, pueden alcanzarse grados de esterificación por debajo del 25% sin una pérdida

40 significativa de peso molecular de la pectina desesterificada. Si el álcali utilizado es el amoníaco, se obtienen pectinas desesterificadas y amidadas sin una pérdida significativa de peso molecular de las pectinas desesterificadas y amidadas

La amidación se lleva a cabo suspendiendo la pectina desesterificada precipitada en isopropanol al 60-70%, preferiblemente 70% en el que se disuelve amoníaco al 20-30% (v/v), preferiblemente al 25-26% (v/v). Esta suspensión se mantiene de 0° C a temperatura ambiente, preferiblemente 0 - 10° C y más preferiblemente a

45 aproximadamente 5° C durante un tiempo suficiente para provocar el grado deseado de amidación. Después de la terminación de la amidación, la pectina amidada se drena y se lava con isopropanol al 50 - 70%, preferiblemente 60% y el pH se ajusta a 4,2 - 4,4 con un álcali tal como NaOH o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Por último, la pectina amidada se lava con isopropanol al 40 - 60% preferiblemente 50%, se prensa y se seca a una temperatura por debajo de 75° C. Finalmente, el producto final resultante se seca y se muele según métodos convencionales.

Este procedimiento conduce a pectinas desesterificadas y amidadas de funcionalidad desconocida hasta ahora, particularmente con respecto a las propiedades del gel en medios acuosos, incluyendo la consistencia del gel, resistencia a la rotura, viscosidad y a geles que muestran un menor grado de sinéresis y altas temperaturas de gelificación y altas temperaturas de fusión. Además, las pectinas amidadas de la presente invención son ventajosas

55 debido a su mayor solubilidad en sistemas acuosos.

Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que estos atributos resultan de una despolimerización sustancialmente más baja de la pectina según la presente invención junto con una menor tendencia a la agregación.

Estas propiedades mejoradas de la pectina amidada según la presente invención, son útiles en la fabricación de productos alimenticios, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y productos para el hogar.

5 Las pectinas amidadas de la presente invención son particularmente útiles en los productos alimenticios tales como mermeladas y jaleas tanto de alto como de bajo contenido de sólidos solubles con o sin fruta. Ejemplos de tales usos finales son mermeladas tradicionales, mermeladas con contenido reducido de azúcar, jaleas transparentes, geles de confitería con sabor a fruta, geles de confitería sin sabor a fruta, glaseados reversibles por el calor para la industria de la panadería, mermeladas resistentes al calor para la industria de la panadería, ondulaciones para su uso en helados, y preparaciones de fruta para yogur.

10 Las pectinas amidadas de la presente invención también son particularmente útiles en productos lácteos tales como yogures, natillas, flanes, pudines, coberturas y rellenos.

Ejemplos de productos farmacéuticos en los que se pueden usar pectinas amidadas de la presente invención incluyen comprimidos, cápsulas, productos para el cuidado de heridas y productos de ostomía que utilizan pectinas en sus formulaciones.

15 Ejemplos de productos de cuidado personal en los que se pueden usar pectinas amidadas de la presente invención incluyen diversas cremas, lociones y pastas de dientes que utilizan pectinas en sus formulaciones.

Ejemplos de productos para el hogar en los que se pueden usar pectinas amidadas de la presente invención incluyen varios geles ambientadores, productos de limpieza y formulaciones detergentes que utilizan pectinas en sus formulaciones.

Definición de los términos reológicos:

20 La tensión crítica, como se determina en un Rheostress RS-100 es una medida de la resistencia a la rotura del gel. Los valores obtenidos con este tipo de equipos se caracterizan por ser independientes del aparato particular utilizado.

25 La resistencia a la rotura, medida por el analizador TA.XT2 es un método destructivo de medición de la fuerza necesaria para romper un gel, y este método produce valores que no son necesariamente independientes del aparato utilizado.

La consistencia del gel tal como se mide en un RheoStress RS-100 es una forma no destructiva de la medición de la dureza de un gel.

La resistencia del gel tal como se mide en el analizador TA.XT2 es de manera similar una medida de la dureza del gel.

30 La viscosidad intrínseca es la viscosidad de una solución infinitamente diluida del polímero. Una viscosidad intrínseca baja indica un polímero que está fuertemente enrollado o ramificado o agregado y se asemeja a una conformación esférica. Una viscosidad intrínseca alta indica un polímero que es más similar a una varilla y, por tanto, menos en espiral, menos ramificado y menos agregado. Estas indicaciones son sólo ciertas si los polímeros en cuestión son del mismo peso molecular.

35 Cuando se va a comparar la conformación de polímeros de diferente peso molecular, se utiliza el factor de Mark-Houwink, "a". Un valor bajo de "a" significa un polímero, que es más esférico o agregado en conformación, mientras que un alto valor de "a" significa un polímero, que es menos agregado y, por tanto, más en forma de varilla. El factor de Mark-Houwink está dado por la expresión "viscosidad intrínseca" =  $KM^a$ , en la que "viscosidad intrínseca" representa la viscosidad intrínseca del polímero determinado por el método de medición de viscosidad de la solución, K es una constante y M es el peso molecular del polímero y "a" representa el factor de Mark-Houwink.

40

Determinación del grado de esterificación (DE) y ácido galacturónico (GA) en pectinas no amidadas.

Principio:

45 Este método es una modificación del método de la FAO/OMS para la determinación del % de DE y del % de GA en pectinas que no contiene amida y éster de acetato (Compendio de especificaciones de aditivos de alimentos, Adición 9, Comité Mixto de FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios), (Compendium of food additive specifications, Addendum 9, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 57<sup>a</sup> sesión, Roma, Italia, 5 - 14 junio de 2001).

Procedimiento - Determinación del % de DE y del % de GA:

(Alcohol de ácido: 100 ml de IPA al 60% + 5 ml HCl fumante al 37%)

1. Pesar 2,000 g de pectina en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
- 50 2. Añadir 100 ml de alcohol de ácido y agitar en un agitador magnético durante 10 minutos.

## ES 2 651 865 T3

3. Filtrar a través de un crisol filtrante de vidrio pesado, seco.
4. Enjuagar el vaso de precipitados completamente con 6 x 15 ml de alcohol de ácido.
5. Lavar con IPA al 60% hasta que el filtrado esté libre de cloruro\* (aproximadamente 500 ml).
- 5 6. Lavar con 20 ml de IPA al 100%.
7. Secar la muestra durante 2 horas y media a 105° C.
8. Pesar el crisol después de secar y enfriar en el desecador.
9. Pesar con precisión 0,4000 g de la muestra en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
10. Pesar dos muestras para determinación doble.
- 10 11. Humedecer la pectina con aproximadamente 2 ml de IPA al 100% y añadir, aproximadamente 100 ml de agua desionizada libre de dióxido de carbono mientras se agita en un agitador magnético.

\*(Prueba de cloruro: transferir aproximadamente 10 ml de filtrado a un tubo de ensayo, agregar aproximadamente 3 ml de HNO<sub>3</sub> 3N, y añadir unas gotas de AgNO<sub>3</sub>. El filtrado estará libre de cloruro si la solución es transparente, de lo contrario habrá una precipitación de cloruro de plata).

- 15 La muestra está ahora lista para la titulación, ya sea por medio de un indicador o mediante el uso de un medidor de pH/autobureta.

Procedimiento - Determinación del % de DE solamente:

(Alcohol de ácido: 100 ml de IPA al 60% + 5 ml HCl fumante al 37%)

1. Pesar 2,00 g de pectina en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
- 20 2. Añadir 100 ml de alcohol de ácido y agitar en un agitador magnético durante 10 minutos.
3. Filtrar a través de un embudo Buchner con papel de filtro.
4. Enjuagar el vaso de precipitados con 90 ml de alcohol de ácido.
5. Lavar con 1.000 ml de IPA al 60%.
6. Lavar con aproximadamente 30 ml de IPA al 100%.
- 25 7. Secar la muestra durante aproximadamente 15 minutos en un embudo Buchner con succión al vacío.
8. Pesar aproximadamente 0,40 g de la muestra en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
9. Pesar dos muestras para la doble determinación.
10. Humedecer la pectina con aproximadamente 2 ml de IPA al 100% y añadir aproximadamente 100 ml de agua desionizada mientras se agita en un agitador magnético.
- 30 La muestra está ahora lista para la titulación, ya sea por medio de un indicador o mediante el uso de un medidor de pH/autobureta.

Titulación utilizando el indicador:

1. Añadir 5 gotas de indicador de fenolftaleína y valorar con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (registrar como título V<sub>1</sub>).
- 35 2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N mientras se agita. Dejar reposar durante 15 minutos exactamente. Durante el reposo la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.
3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N mientras se agita y agitar hasta que el color desaparezca.
4. Añadir 3 gotas de fenolftaleína y valorar con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (registrar como título V<sub>2</sub>).

Prueba ciega:

## ES 2 651 865 T3

1. Añadir 5 gotas de fenolftaleína a 100 ml de agua libre de dióxido de carbono o agua desionizada (del mismo tipo que el usado para la muestra), y valorar en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (1-2 gotas).

5 2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N y dejar reposar la muestra sin tocar durante exactamente 15 minutos. Durante el reposo la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.

3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N y 3 gotas de fenolftaleína, y valorar hasta el cambio de color con NaOH 0,1 N (registrar como B<sub>1</sub>).

Titulación usando medidor de pH / autobureta:

Usando autobureta tipo ABU 80, se pueden aplicar los siguientes ajustes:

	Muestra con %DE<10	Prueba ciega
Banda proporcional	0,5	5
Demora segundos	50	5
Velocidad-V <sub>1</sub>	10	5
Velocidad-V <sub>2</sub>	15	5

10 1. Valorar con NaOH 0,1 N hasta pH 8,5 (registrar el resultado como título V<sub>1</sub>).

2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N mientras se agita, y dejar la muestra en reposo sin agitación durante exactamente 15 minutos. En reposo la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.

3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N mientras se agita y agitar hasta que el pH sea constante.

15 4. Posteriormente, valorar con NaOH 0,1 N hasta pH 8,5 (registrar el resultado como título V<sub>2</sub>).

Prueba ciega:

1. Valorar 100 ml de agua libre de dióxido de carbono o desionizada (mismo tipo que el usado para la muestra) a pH 8,5 con NaOH 0,1 N (de 1 a 2 gotas).

20 2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N con agitación y dejar reposar la muestra de prueba ciega sin agitación durante exactamente 15 minutos. Durante el reposo la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.

3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N mientras se agita, y agitar hasta que el pH sea constante.

4. Valorar a pH 8,5 con NaOH 0,1 N (registrar como B<sub>1</sub>).

Cálculo:

$$V_t = V_1 + (V_2 - B_1)$$

25 % de DE (grado de esterificación) =  $((V_2 - B_1) \times 100) / V_t$

% de DFA (grado de ácido libre) = 100 - % DE

% de GA\* (grado de ácido galacturónico) =  $(194,1 \times V_t \times N \times 100) / 400$

\*Sobre la base de libre de ceniza y libre de humedad

194,1: Peso molecular del ácido galacturónico

30 N: Normalidad corregida para la NaOH 0,1 N utilizada para la valoración (es decir, 0,1002 N)

400: Peso en mg. de la muestra lavada y secada para la titulación

% Pectina pura =  $(\text{Cantidad de peptina lavada con ácido y secada} \times 100) / (\text{cantidad pesada de pectina})$

Determinación del grado de amidación (DA) y el grado de esterificación (DE), en la pectina

Principio:

5 Este método es una modificación del método de la FAO/WHO para la determinación del % de DE, y % de DA en la pectina: Compendium of food additive specifications, Addendum 9, Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives (Compendio de especificaciones de aditivos de alimentos, Adición 9, Comité Mixto de FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios), 57ª sesión, Roma, Italia, 5-14 de junio de 2001, páginas 3-4), que no contiene éster de acetato.

Procedimiento:

(Alcohol de ácido: 100 ml de IPA al 60% + 5 ml de HCl fumante al 37%)

1. Pesar 2,000 g de pectina en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
- 10 2. Añadir 100 ml de alcohol de ácido y agitar en un agitador magnético durante 10 minutos.
3. Filtrar a través de un embudo Buchner y papel de filtro seco, de tipo fuerte, viscoso, super rápido, o similar.
4. Enjuagar el vaso de precipitados completamente con 6 x 15 ml de alcohol de ácido.
5. Lavar con IPA al 60% hasta que el filtrado esté libre de cloruro\* (aproximadamente 500 ml).
6. Lavar con 20 ml de IPA al 100%.
- 15 7. Secar durante aproximadamente 15 minutos en un embudo Buchner con succión de vacío.
8. Pesar el crisol después del secado y de enfriamiento en un desecador.
9. Pesar aproximadamente 0,4000 g de la muestra en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml.
10. Pesar dos muestras para la determinación doble.
- 20 11. Humedecer la pectina con aproximadamente 2 ml de IPA al 100% y añadir aproximadamente 100 ml de agua libre de dióxido de carbono mientras se agita en un agitador magnético. En estas condiciones, la pectina amidada no entrará en esta solución. Sin embargo, la pectina amidada será soluble en las condiciones alcalinas posteriores.

\*(Prueba de cloruro: transferir aproximadamente 10 ml de filtrado a un tubo de ensayo, añadir aproximadamente 3 ml de  $\text{HNO}_3$  3 N, y añadir unas gotas de  $\text{AgNO}_3$ . El filtrado estará libre de cloruro si la solución es transparente, de lo contrario habrá un precipitado de cloruro de plata.)

25 La muestra está ahora lista para la titulación, ya sea por medio de un indicador o mediante el uso de un medidor de pH/autobureta.

Indicador:

1. Añadir 5 gotas de indicador de fenolftaleína y valorar con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (registrarlo como título  $V_1$ ).
- 30 2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N mientras se agita. Dejar reposar durante 15 minutos exactamente. Mientras está en reposo, la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.
3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N y agitar en un agitador magnético hasta que el color desaparezca.
4. Añadir 3 gotas de fenolftaleína y valorar con NaOH 0,1 N hasta que cambie el color (registrarlo como título  $V_2$ ).

Prueba ciega:

- 35 1. Añadir 5 gotas de fenolftaleína a 100 ml de agua libre de dióxido de carbono, y valorar en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (1-2 gotas).
2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N y dejar reposar la muestra sin tocar durante exactamente 15 minutos. Mientras está en reposo, la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.
- 40 3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N y 3 gotas de fenolftaleína, y valorar hasta el cambio de color con NaOH 0,1 N (registrarlo como  $B_1$ ).

Medidor de pH/Autobureta:

1. Valorar con NaOH 0,1 N a pH 8,5 (registrar el resultado como título  $V_1$ ).

## ES 2 651 865 T3

2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N, y dejar reposar la muestra sin tocar durante exactamente 15 minutos. Mientras está en reposo, la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.

3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N y agitar en un agitador magnético hasta que el pH sea constante.

4. Posteriormente, valorar con NaOH 0,1 N hasta pH 8,5 (registrar el resultado como título  $V_2$ ).

5 Prueba ciega:

1. Valorar 100 ml de agua libre de dióxido carbono hasta pH 8,5 con NaOH 0,1 N (1-2 gotas).

2. Añadir 20,00 ml de NaOH 0,5 N y dejar reposar la muestra de la prueba ciega sin tocar durante exactamente 15 minutos. Mientras está en reposo, la muestra debe estar cubierta con papel de aluminio.

3. Añadir 20,00 ml de HCl 0,5 N, y agitar en un agitador magnético hasta que el pH sea constante.

10 4. Valorar hasta pH 8,5 con NaOH 0,1 N (registrarlo como  $B_1$ ).

La destilación se lleva a cabo en un Kjeltex (aparato de destilación).

Kjeltex: Siga las instrucciones dadas para la iniciación y cierre.

1. Transferir cuantitativamente la muestra al tubo de destrucción enjuagando el vaso de precipitados con un total de 100 ml de agua libre de dióxido de carbono en tres pasos.

15 2. Colocar el matraz de recepción, que contiene 150 ml de agua libre de dióxido de carbono y 10,00 ml de HCl 0,1 N, en el aparato.

3. Añadir al menos 20 ml de NaOH al 10% al tubo de destrucción que incluye la muestra.

4. Ajustar el tiempo de destilación a 5 minutos y medio.

20 5. Valorar el destilado con NaOH 0,1 N hasta pH 6,2 (registrarlo como título  $V_3$ ) o añadir 8 gotas de rojo de metilo y valorar con NaOH 0,1 N hasta el cambio de color (registrar como título  $V_3$ ).

La muestra de la prueba ciega se destila y se valora como la muestra (registrar como título  $B_2$ ).

Cálculo:

$$\blacksquare V_t = V_1 + (V_2 - B_1) + (B_2 - V_3)$$

$$\blacksquare \text{DE (grado de esterificación)} = (V_2 - B_1) \times 100/V_t$$

25  $\blacksquare \text{DA (grado de amidación)} = (B_2 - V_3) \times 100/V_t$

Determinación del peso molecular ( $P_m$ ) y la viscosidad intrínseca ( $IV$ ).

Para ello, se utiliza cromatografía de exclusión por tamaños de alto rendimiento (HPSEC) con detección triple.

Principio:

30 Se fracciona una muestra de pectina según el volumen hidrodinámico, usando la cromatografía de exclusión de tamaño. Después de la separación, la muestra es analizada por un sistema de detección triple, que consiste en un detector de índice de refracción (RI), un detector de dispersión de luz láser en ángulo recto (RALLS) y un viscosímetro diferencial. La información de estos detectores conduce a la determinación del peso molecular ( $P_m$ ) y la viscosidad intrínseca ( $IV$ ). El factor de Mark-Houwink se calcula usando el peso molecular y la viscosidad intrínseca como se obtiene utilizando este método.

35 Materiales:

\* Bomba Modelo 515, Waters, Hedehusene, Dinamarca.

\* Desgasificador, Gynkotek, Polygen Escandinavia, Arhus, Dinamarca.

\* Horno de columna, Waters, Hedehusene, Dinamarca.

\* Autoinyector AS-3500, con módulo de preparación de la muestra, Dionex Dinamarca, Rødovre, Dinamarca.

40 \* 3 Columnas TSK-GMPWXL de lecho mixto linear, Supelco, Bellefonte PA, Estados Unidos.

\* Fase líquida: tampón de acetato de litio 0,3 M pH 4,8, Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza.

## ES 2 651 865 T3

\* Detector dual, RI, Viscometry, modelo 250, Viscotek, Houston, Texas, Estados Unidos.

\* RALLS Modelo 600, Viscotek, Houston, Texas, Estados Unidos.

Método:

5 Se pesan aproximadamente 2 mg de la muestra en un vial de 2000 ml. La muestra se disuelve a continuación en el inyector automático, con el siguiente programa: se añade 8 ml de etanol, luego 1300 ml de tampón de acetato (0,3 M, pH 4,8), la muestra se calienta a 75° C y se mezcla durante 9,9 minutos. Se diluyen 300 ml de la preparación con 900 ml de tampón de acetato, a continuación, se mezclan durante 9,9 minutos. La muestra se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se inyectan 100 ml de la muestra con un bucle completo de 100 ml y el caudal es de 0,8 ml/min. Hay dos detectores en línea, un detector de dispersión de luz láser de ángulo recto (RALLS) (Viscotek) y un detector dual que consiste en un detector de índice de refracción y un viscosímetro (Viscotek).

10 El valor del incremento de índice de refracción específico (dn/dc) de la pectina se fija en 0,144. Los datos de los detectores se procesan con el software de tri-SEC (Viscotek).

• Medidas reológicas de los geles sintéticos

Materiales:

15 \* Citrato de potasio,  $K_3C_6H_5O_7$ , 3,933 g,  $H_2O$ , pro analysis, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania.

\* Benzoato de sodio, 1,0 g, pro analysis, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania.

\* Muestra de pectina a analizar, 3,12 g.

\* Azúcar 124,08 g.

\* X ml de  $CaCl_2$ , 0,1 M pro analysis, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania.

20 \* Ácido cítrico al 50% p/v, 18 + Y ml, pro analysis, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania.

\* Aceite, líquido a temperatura ambiente.

\* Agua de intercambio iónico, 260 g.

\* 6 placas de cristalización, diámetro: 61 mm, altura: 9 mm.

\* Cinta adhesiva transparente de pegado por presión.

25 \* Analizador de textura TA.XT2, Stable Micro Systems, Inglaterra.

\* RheoStress RS 100, Haake Fisons, Reciprotor Engineering A/S, DK-4930 Maribo, Dinamarca.

\* Sistema de medida para RheoStress RS 100: cápsula/husillo Z20 DIN, Haake Fisons, Reciprotor Engineering A/S, DK-4930 Maribo, Dinamarca.

\* Placa de calefacción eléctrica, Buch & Holm A/S, DK-2730 Herlev, Dinamarca.

30 \* Recipiente de 1 litro

\* Agitador de hoja eléctrico, RW 20, Janke & Kunkel, IKA-Werk, Bie Berntsen y AS, Rødovre, Dinamarca.

\* Balanza, Mettler PJ 6000, Mettler Instruments, Greifensee-Zurich, Suiza.

Método:

35 Se mezclan 117 g de tampón IPPA (3,933 g de citrato de potasio/l, 18 ml de ácido cítrico/l, 1,0 g de benzoato de sodio/l) y 260 g de agua de intercambio iónico en un recipiente de 1 litro. La muestra de pectina a analizar se mezcla en seco con 24 g de azúcar. Después se añaden el azúcar y la mezcla de pectina a la preparación que se ha descrito anteriormente y se calienta a ebullición, mientras se agita a 500 rpm, a continuación, se añade 100,08 g de azúcar y se continúa la ebullición hasta que todo el azúcar se haya disuelto. Se añade agua de intercambio iónico, hasta un peso de 520 g. Se mezclan Y ml de  $CaCl_2$  y ácido cítrico tal que el pH de la preparación final es 3,0 +/- 0,1

40 y se añade esta mezcla a la solución en ebullición de la pectina y el azúcar mientras se agita a 1000 rpm. El peso de la solución se ajusta a 520 g con la adición de agua de intercambio iónico y se vierte en 6 placas de cristalización (equipadas con cinta adhesiva sensible por presión transparente) y una cápsula de reómetro precalentada Z20 DIN a 90° C. La cápsula se cubre con aceite para evitar la evaporación.

45 Las 6 placas de cristalización se dejan durante la noche a 25° C, a continuación, se determina la resistencia a la rotura del gel, junto con la distancia de rotura usando un TA.XT2 analizador de Textura.

Valores de Y:

Ca <sup>2+</sup> (4 mg/ml) añadido (ml)	Ca <sup>2+</sup> (ppm)
0	0
2	15,4
4	30,8
8	61,5
12	92,3
16	123,1

Análisis del analizador de textura TA.XT2:

Se utiliza un émbolo de 0,5 pulgadas y se aplican los siguientes ajustes:

- 5 Velocidad de antes del ensayo: 1,0 mm/s  
 Velocidad de ensayo: 0,5 mm/s  
 Velocidad de después: 5,0 mm/s  
 Velocidad de la prueba de rotura: 1,00 mm/s  
 Distancia: 7,00 mm
- 10 Fuerza: 10 g  
 Tiempo: 5,00 segundos  
 Cuenta: 5  
 Tipo: auto  
 Fuerza del gatillo: 0,5/1,0 g

- 15 Análisis con RheoStress RS-100:

Tan pronto como la muestra se vierte en la cápsula del reómetro y se cubre con aceite, se inicia un barrido de temperatura (velocidad de enfriamiento: 1° C/minuto, desde 90 hasta 25° C, frecuencia 1 Hz, tensión 0,1-5 Pa) con el fin de determinar la temperatura de gelificación. Al final del barrido de temperatura a 25° C, se mide la consistencia de gel (G') a una frecuencia de 0,5 Hz, tensión de 0,1-5 Pa (dependiendo de la muestra). Por último, se realiza un barrido de tensión a 25° C (frecuencia 0,5 Hz, tensión 0,1 - 446 Pa). La tensión crítica se da como el último valor de G', G'' y la tensión correspondiente antes de la rotura después del endurecimiento a 25° C durante 30 minutos.

**Ejemplos**

Extracción de pectina de la cáscara

- 25 Se extrajeron una variedad de materiales de partida que contenían pectina con el fin de proporcionar material para la posterior desesterificación con métodos convencionales y desesterificación con biocatalizadores.

Se utilizaron tres materiales de partida de pectina diferentes. Estos fueron la cáscara seca de limón, naranja, y lima. La materia seca de los materiales de partida fue de aproximadamente 90 - 95%.

- 30 Para cada material de partida de pectina, se añadió 30 kg de cáscara seca a un tanque de acero inoxidable de 1000 litros que contenía una mezcla de 3,52 litros de ácido nítrico al 65% y 931 litros de agua de intercambio iónico. La mezcla se agitó mientras se calentaba a 70° C. con agitación continua, la mezcla se dejó reaccionar a 70° C durante 6 horas.

- 35 Después de la reacción, el extracto caliente se tamizó en un tamiz vibratorio (Vester Aby vibrador con tamaño de malla de 0,25 mm, Dinamarca). De aquí en adelante al extracto caliente se añadieron 50 ml de resina de intercambio de iones por litro de extracto (Rohm & Haas, Amberlite SR IL, Alemania). El intercambio iónico se llevó a cabo durante 30 minutos mientras se agitaba, y el extracto intercambiado de iones resultante se filtró en un filtro de

tambor de vacío raspado a 70° C. Antes de la filtración, el tambor de vacío se revistió con aproximadamente 4 cm de filtro de tierra de diatomeas (Celite 545).

A continuación, el extracto filtrado se evaporó al vacío a aproximadamente un tercio del volumen.

Este extracto concentrado se utilizó en los siguientes ejemplos para desesterificación.

5 Resultados:

Material de partida	DE de extracto %	Pm de extracto Da	Viscosidad intrínseca dl/g
Cáscara de limón	65,7	100.300	4,267
Cáscara de naranja	65,1	113.800	3,941
Cáscara de lima	64,3	124.950	5,003

Tabla 1: grado de esterificación, peso molecular y viscosidad intrínseca de los extractos utilizados para la desesterificación adicional

Después de la extracción, el grado de esterificación estaba en el intervalo de aproximadamente 64% a aproximadamente 69%, dependiendo del material de partida utilizado. El peso molecular mostró un intervalo de aproximadamente 100.000 Daltones a aproximadamente 125.000 Daltones para materiales de partida a base de cítricos.

Ejemplo Comparativo 1

Desesterification usando ácido:

A partir de los materiales de pectina de partida, 60 litros de extracto concentrado se enfrió a 50° C en un tanque de acero inoxidable agitado con camisa. Se añadió 456 g de ácido nítrico al 65%, mientras se agitaba, y la mezcla se dejó reaccionar a 50° C hasta que se obtuvo un grado deseado de esterificación de aproximadamente 40%. Cuando esto se logró, 30 litros de la mezcla de reacción se precipitó en 90 litros de isopropanol al 80%, se lavó durante aproximadamente 5 minutos en isopropanol al 60%, se prensó en una prensa hidráulica y se utilizó aproximadamente 100 g de material prensado para medir la materia seca, grado de esterificación, peso molecular, etc. El material prensado restante se dividió en dos porciones pesadas para amidación más tarde.

Se hizo reaccionar adicionalmente los 30 litros restantes de extracto concentrado hasta un grado de esterificación de aproximadamente 30% y después se trataron según la muestra anterior.

Resultados:

Material de partida	Grado de esterificación %	Peso molecular Da	Delta de Pm %
Pectina de limón	39,3	62.600	-37,6
65,7% DE	33,0	65.800	-34,4
Cáscara de naranja	36,6	60.100	-47,2
65,1% DE	28,3,	58.000	-49,0
Cáscara de lima	40,0	73.550	-41,1
64,3% DE	31,5	66.500	-46,8

Tabla 2: Cambios en el peso molecular por la desesterificación por ácido

Cuando se utilizaron los materiales de partida de pectina para la desesterificación por ácido, el peso molecular de las pectinas desesterificadas se redujo en aproximadamente 34% y 49%. Por lo tanto, cuando se desesterificó la pectina utilizando el proceso de desesterificación de ácido convencional, la reducción en el peso molecular fue sustancial.

Ejemplo 1: Parte del proceso reivindicado

30 Desesterificación usando un biocatalizador:

Los materiales de pectina de partida, 60 litros de extracto concentrado se enfriaron a 45° C en un tanque de acero inoxidable agitado con camisa. El pH del extracto se ajustó a 4,5 con una solución de carbonato de sodio al 10%. Se

añadieron 540 unidades por litro de extracto de concentrado (método) de Rheozym (Novozyme, Dinamarca). El pH del extracto se mantuvo constante a 4,5 mediante la adición de una solución de carbonato de sodio al 10%. El cálculo siguiente se utilizó para determinar el cambio en el grado de esterificación en la pectina que resulta de la cantidad de carbonato de sodio añadido:  $\Delta DE = (40,56541)$  (gramos de sosa por gramo de pectina) + 3,383.

- 5 Cuando la cantidad calculada de carbonato de sodio se había añadido con el fin de alcanzar un grado de esterificación de 40%, se transfirieron 30 litros de la mezcla de reacción a otro tanque de acero inoxidable agitado con camisa. El pH se ajustó a 2,5 con ácido nítrico diluido para parar la reacción de biocatalizador, y la mezcla se calentó a 80° C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 minutos para inactivar el biocatalizador.

La mezcla se enfrió por debajo de 50° C y se trató de forma idéntica a las muestras en el Ejemplo Comparativo 1.

- 10 Los 30 litros restantes de extracto concentrado se hicieron reaccionar adicionalmente hasta un grado calculado de esterificación de aproximadamente 30% y después se trataron según la muestra anterior.

Resultados:

Material de partida	Grado de esterificación %	Peso molecular Da	Delta de Pm %
Cáscara de limón	36,2	92.200	-8,1
65,7% DE	28,6	93.350	-6,9
Cáscara de naranja	39,9	101.950	-10,4
65,1% DE	31,2	100.550	-11,6
Cáscara de lima	39,1	114.750	-8,2
64,3% DE	29,8	108.500	-13,2

Tabla 1.1: Cambios en el peso molecular por la desesterificación con biocatalizador

- 15 Cuando se utilizaron los materiales de pectina de partida para la desesterificación por biocatalizador, el peso molecular de las pectinas desesterificadas se redujo en aproximadamente un 7% y 13%. Así, el uso de biocatalizadores para la desesterificación de la pectina resultó en mucha menos despolimerización de los materiales de pectina de partida.

Del Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 1 se deduce que la relación R entre el peso molecular del material de pectina de partida y el peso molecular del material de pectina desesterificada fue la siguiente:

Muestra	Limón		Naranja		Lima	
	DE	R	DE	R	DE	R
Inicio	65,7	1,00	65,1	1,00	64,3	1,00
Ácido	39,3	1,60	36,6	1,89	40,0	1,70
	33,0	1,52	28,3	1,96	31,5	1,88
Bio	36,2	1,09	39,9	1,12	39,1	1,09
	28,6	1,07	31,2	1,13	29,8	1,15

- 20 Tabla 1.2: Compendio de los cambios en el peso molecular

Por lo tanto, mediante el uso de biocatalizador para la desesterificación, la relación R aumentó sustancialmente menos que cuando la desesterificación fue provocada con un ácido convencional. De hecho, mientras que la desesterificación convencional resultó en un aumento de R de 1 a tan alto como 1,96, la desesterificación con biocatalizador resultó en un incremento de solamente tan alto como 1,15.

- 25 Ejemplo 2: Parte del proceso reivindicado

Amidación:

Las ocho muestras del Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 1 fueron amidadas. Se transfirió 17 litros de isopropanol al 70% a un tanque con camisa con agitación de 30 litros de acero inoxidable equipado con una tapa hermética. Se añadió 6 litros de solución de amoníaco al 25% y se enfrió a una temperatura de 5° C. Se añadió 1 kg de material prensado del Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 1.

- 30

En cada uno del Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 1, se amidaron cuatro muestras. De éstas, dos muestras se desesterificaron a un mayor grado de esterificación, y dos a un menor grado de esterificación.

5 Tanto para el superior como el inferior grado de esterificación, se deseaba un grado de amidación más alto y más bajo, y para lograr esto, se llevó a cabo la amidación a 5° C durante 2 horas y media o durante 5 horas. Después del tiempo de reacción especificado, se drenó el material prensado reaccionado, se lavó con 20 litros de isopropanol al 60%, se drenó de nuevo, se añadió 20 litros de isopropanol al 60% y el pH se ajustó a 4,2 - 4,4 con ácido nítrico diluido y se drenó. Finalmente, este material drenado se lavó con 20 litros de isopropanol al 50%, se drenó, se prensó y se secó a 70° C durante la noche.

Resultados:

10 Viscosidad intrínseca

15 Durante la amidación, se produce un cambio conformacional en la pectina, que se ha atribuido al grado de agregación de la pectina. La viscosidad intrínseca de una pectina está influenciada tanto por el grado de agregación como por el peso molecular de la pectina. Puesto que se ha encontrado que la viscosidad intrínseca de una pectina está directamente relacionada con la consistencia del gel en los geles hechos con esa pectina, la viscosidad intrínseca es el parámetro preferido para realizar el seguimiento. Por tanto, hemos definido  $R_2$  como la relación entre la viscosidad intrínseca del material de pectina de partida en la Tabla 1 y la viscosidad intrínseca de la pectina amidada resultante de una amidación de dicho material de partida de pectina.

Amidación después de la desesterificación con ácido:

Cáscara	DE al inicio %	DE al final %	DA al final %	IV <sub>p</sub> dl/g	R <sub>2</sub>
Limón	33,0	14,7	13,3	3,417	1,25
	33,0	9,5	15,8	3,352	1,27
	39,3	20,2	15,4	3,714	1,15
	39,3	9,5	21,8	3,534	1,21
Naranja	28,3	15,0	13,6	2,832	1,39
	28,3	9,6	13,7	2,794	1,41
	36,6	17,7	14,4	3,253	1,21
	36,6	10,4	22,1	3,098	1,27
Lima	31,5	14,3	13,0	3,545	1,41
	31,5	10,0	15,6	3,245	1,54
	40,0	20,4	14,6	3,901	1,28
	40,0	12,8	21,6	3,571	1,40

Tabla 2.1: Viscosidad intrínseca de las pectinas amidadas que han sido primero desesterificadas con ácido

20 Notas a las columnas:

1 "Cáscara" denota el material inicial de pectina.

2 "DE al inicio" denota el grado de esterificación resultante de la primera desesterificación con ácido.

3 "DE al final" indica el grado de esterificación después de la amidación.

4 "DA al final" indica el grado de amidación después de la amidación.

25 5 "Pm" indica el peso molecular después de la amidación.

6 "IV<sub>p</sub>" indica la viscosidad intrínseca después de la amidación.

Los datos en la Tabla 2.1 muestran los siguientes cambios en la viscosidad intrínseca:

- Limón: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 15- 27%

- Naranja: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 21- 41%

- Lima: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 28-54%

Amidación después de la desesterificación biocatalítica:

Cáscara	DE al inicio %	DE al final %	DA al final %	IV <sub>p</sub> dl/g	R <sub>2</sub>
Limón	28,6	12,9	9,5	3,644	1,17
	28,6	10,2	12,7	3,874	1,10
	36,2	17,7	14,2	4,148	1,03
	36,2	11,0	17,0	3,711	1,15
Naranja	31,2	15,6	10,9	3,354	1,18
	31,2	9,3	15,8	3,337	1,18
	39,9	20,7	13,2	3,806	1,04
	39,9	11,3	19,8	3,582	1,10
Lima	29,8	12,8	11,4	4,281	1,17
	29,8	7,9	16,1	4,266	1,17
	39,1	18,1	16,1	4,569	1,09
	39,1	10,9	21,7	4,422	1,13

Tabla 2.2: Viscosidad intrínseca de las pectinas amidadas que han sido primero desesterificadas con biocatalizador

Notas a las columnas:

- 5 1 "Cáscara" denota el material inicial de pectina.
- 2 "DE al inicio" denota el grado de esterificación resultante de la primera desesterificación con biocatalizador.
- 3 "DE al final" indica el grado de esterificación después de la amidación.
- 4 "DA al final" indica el grado de amidación después de la amidación.
- 5 "Pm" indica el peso molecular después de la amidación.
- 10 6 "IV<sub>p</sub>" indica la viscosidad intrínseca después de la amidación.

Los datos en la Tabla 2.2 muestran los siguientes cambios en la viscosidad intrínseca:

- Limón: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 3-17%
- Naranja: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 4-18%
- Lima: la desesterificación con ácido produce una disminución de la viscosidad intrínseca de 9-17%

15 Mediciones reológicas de los geles sintéticos

Resistencia del gel en RheoStress RS-100

Cáscara	Proceso de desest.	DE al final %	DA al final %	Resistencia del gel a 25° C, Pa					
				Contenido de calcio, ppm					
				0	15,4	30,8	61,5	92,3	123,1
Limón	Ácido	9,5	21,8	56,4	111	153	399	Pre-gel	Pre-gel
	Biocatalizador	11,0	17,0	202	459	545	668	792	1060
Naranja	Ácido	17,7	14,4	0,1	1,19	16,9	217	326	364
	Biocatalizador	20,7	13,2	0,5	3,6	29,6	218	361	369

Cáscara	Proceso de desest.	DE al final %	DA al final %	Resistencia del gel a 25° C, Pa					
				Contenido de calcio, ppm					
				0	15,4	30,8	61,5	92,3	123,1
Lima	Ácido	12,8	21,6	102	104	139	383	722	904
		14,3	13,0	0,18	0,48	5,6	209	492	596
	Biocatalizador	10,9	21,7	190	399	526	688	1250	1010
		12,6	11,4	0,78	1,97	18	275	892	927

Tabla 2.3: Consistencia de gel de los geles de pectina amidada a diversas concentraciones de calcio

La figura 2.3 presenta los datos de la Tabla 2.3 con la consistencia de gel en el eje y, y la concentración de calcio a lo largo del eje x.

- 5 Cuando se comparó cada conjunto individual de pectina amidada basado en el material de partida, se observó que para cada material de partida, la consistencia del gel de la pectina amidada que había sido desesterificada con biocatalizador produjo geles con mucha más consistencia del gel. Esto fue particularmente notable para los materiales de partida de limón y lima, mientras que el efecto sobre la consistencia del gel de la desesterificación con biocatalizador fue menos pronunciado con la naranja.

Tensión crítica en Rheostress RS-100

Cáscara	Proceso de desester.	DE al final %	DA al final %	Tensión crítica, Pa					
				Contenido de calcio, ppm					
				0	15,4	30,8	61,5	92,3	123,1
Limón	Ácido	9,5	21,8	20,18	31,4	76,04	76,04	118,3	76,04
	Biocatalizador	11,0	17,0	118,3	286,6	286,6	286,6	286,6	118,3
Naranja	Ácido	17,7	14,4	NG	12,97	76,04	286,6	286,6	286,6
	Biocatalizador	20,7	13,2	NG	48,86	184,2	TS	TS	TS
Lima	Ácido	12,8	21,6	48,86	48,86	48,86	76,04	48,86	76,04
		14,3	13,0	NG	NG	31,4	184,2	286,6	286,6
	Biocatalizador	10,9	21,7	118,3	184,2	286,6	286,6	184,2	118,3
		12,6	11,4	NG	3,44	76,04	TS	TS	TS

10 Tabla 2.4: tensión crítica de los geles de pectina amidada a diversas concentraciones de calcio

Nota:

- NG denota que no se formó ningún gel y por lo tanto, la muestra no se pudo medir.
- TS denota un gel demasiado fuerte y, por tanto, fuera del intervalo de medición del aparato.

- 15 En cuanto a la resistencia del gel, la tensión crítica aumentó mucho cuando se utilizó un biocatalizador para la desesterificación en comparación con la tradicional desesterificación con ácido.

Resistencia a la rotura en el Analizador de textura TA.XT2

Cáscara	Proceso de desest.	DE al final %	DA al final %	Resistencia a la rotura a 25° C, gramos					
				Contenido de calcio, ppm					
				0	15,4	30,8	61,5	92,3	123,1
Limón	Ácido	9,5	21,8	14,10	5,10	5,50	7,80	10,20	8,70

Cáscara	Proceso de desest.	DE al final %	DA al final %	Resistencia a la rotura a 25° C, gramos					
				Contenido de calcio, ppm					
	Biocatalizador	11,0	17,0	18,20	34,10	46,00	54,60	37,30	25,00
Naranja	Ácido	17,7	14,4	NG	11,70	13,50	31,30	42,00	36,40
	Biocatalizador	20,7	13,2	5,83	14,53	21,53	29,26	39,93	43,97
Lima	Ácido	12,8	21,6	14,10	5,10	5,50	7,80	10,20	8,70
		14,3	13,0	-	-	20,20	46,30	57,90	43,40
	Biocatalizador	10,9	21,7	18,20	34,10	46,00	54,60	37,30	25,00
		12,6	11,4	-	-	32,6	76,20	101,20	94,40

Tabla 2.5: resistencia a la rotura de los geles de pectina amidada a diversas concentraciones de calcio

Notas:

■ NG denota que no se formó ningún gel y por lo tanto, la muestra no se pudo medir.

■ - Denota que no se han generado los valores.

- 5 Para los materiales de partida de limón y de lima, la diferencia de resistencia a la rotura fue marcadamente diferente cuando se compararon la desesterificación convencional usando ácido con la desesterificación con biocatalizador. Cuando se desesterificó con biocatalizador, la resistencia a la rotura de los geles hechos con las pectinas amidadas resultantes fue mucho más alta que las resistencias a la rotura correspondientes de pectinas amidadas hechas a partir de materiales de partida desesterificados con la desesterificación ácida convencional. El efecto fue también
- 10 evidente para el material de partida de naranja.

Resistencia del gel en el Analizador de textura TA.XT2

Cáscara	Proceso de desest.	DE al final %	DA al final %	Resistencia del gel a 25° C, gramos					
				Contenido de calcio, ppm					
				0	15,4	30,8	61,5	92,3	123,1
Limón	Ácido	9,5	21,8	-	2,30	5,10	5,40	6,70	4,60
	Biocatalizador	11,0	17,0	4,60	7,60	15,10	15,80	13,10	8,50
Naranja	Ácido	17,7	14,4	-	0,93	1,67	4,70	7,77	9,00
	Biocatalizador	20,7	13,2	0,70	1,07	1,73	3,57	5,50	7,40
Lima	Ácido	12,8	21,6	6,80	2,40	2,40	4,40	5,10	4,80
		14,3	13,0	5,20	9,60	16,20	18,90	15,70	12,60
	Biocatalizador	10,9	21,7	-	-	1,30	4,90	9,40	11,90
		12,6	11,4	-	-	1,70	8,80	14,60	19,20

Tabla 2.6: Resistencia de gel de los geles de pectina amidada a diversas concentraciones de calcio

Nota:

■ "-" denota que no se han generado los valores.

- 15 El patrón fue el mismo. Las pectinas amidadas a base de limón y lima mostraron un marcado aumento en la resistencia del gel cuando se usó biocatalizador para desesterificar el material de partida antes de la amidación. Con respecto a la resistencia del gel, el material de partida de naranja no pareció ser afectado por el proceso de desesterificación antes de la amidación.

Ejemplo 3

Efecto del grado de esterificación del material de partida para la amidación en el factor de Mark-Houwink y el efecto en gel de frambuesa.

En este ejemplo, el material de partida para la amidación se había preparado según el Ejemplo 2. Sin embargo, antes de la amidación, el material de partida fue desesterificado utilizando un biocatalizador a un cierto nivel.

DE al inicio, %	"a" de la pectina amidada resultante
58	0,83
52	0,84
46	0,86
42	0,91
33	0,93
30	0,96

5 Tabla 3.1: Factor de Mark-Houwink en diversos grados de esterificación

El gráfico muestra un aumento del factor de Mark-Houwink a medida que el DE del material de partida disminuye. Por lo tanto, indica que a medida que se redujo el DE del material de partida antes de la amidación, se logró una pectina amidada con menos agregados. Esto conduce a una pectina amidada de mejor solubilidad, por lo tanto, una pectina amidada que produjo geles más resistentes. El gráfico también indica un máximo local a aproximadamente 10 42% de DE, lo que indica que se estaba haciendo una pectina amidada particularmente en forma de varilla a partir de tal material de partida.

Para fundamentar aún más la ventaja particular de utilizar un material de partida con un DE específico, se hicieron jaleas de frambuesa con tres de las pectinas amidadas según el Ejemplo 2.

Materiales:

Producto	Contenido	Concentración	Proveedor
Solución A	Jugo de frambuesa	300 g/l	Rynkeby, Ringe, Dinamarca
	Azúcar	160 g/l	
	Agua desionizada	185 g/l	Danisco A/S, Dinamarca
	Agua de grifo	185 g/l	
Solución B	Pectina	0,56 g/l	
	Agua desionizada	160 g/l	
Solución C	Benzoato de sodio	2 ml/kg	Merck, Darmstadt, Alemania
	Sorbato de potasio	2 ml/kg	Merck, Darmstadt, Alemania
Solución D	Ácido cítrico (50% v/p)	5 ml/kg	Merck, Darmstadt, Alemania

15

Balanza Mettler PJ 6000 (Mettler-Toledo, Copenhagen, Dinamarca)

Recipiente de 2 l

Placa de calefacción eléctrica (Blomberg)

Mezclador de Waring (Waring Products División)

20 Vidrio soplado, Pyrex

TA.TXT2

Método

Se mezclaron zumo de frambuesa, azúcar y agua (solución A). La preparación se hirvió hasta que todo el azúcar se había disuelto. La pectina se disolvió en agua caliente (90° C) (solución B), usando un mezclador de Waring en cizallamiento alto. Se añadió entonces la pectina (B) a la solución A, mientras que la preparación se agitaba continuamente. Después de la adición de la solución de pectina, la preparación se hirvió durante aproximadamente 2 minutos, mientras se agitaba. A continuación se añadió agua hasta 1000 g de peso neto. A continuación se añadieron los conservantes (solución C). Finalmente se añadió el ácido cítrico (solución D). Entonces se ajustó de nuevo el peso neto con agua hasta 1000 g. La preparación se llenó en vasos de vidrio soplado y se dejó durante la noche a 25° C, a continuación, se determinaron la consistencia del gel y la resistencia a la rotura, junto con la distancia de rotura utilizando el analizador TA.TXT2.

5

10 Análisis con TA.TXT2:

Se usó un émbolo de 1/2 pulgada y se aplicó el programa siguiente: velocidad de antes de la prueba 2,0 mm/s, velocidad de la prueba 0,5 mm/s, velocidad después de la prueba 10,0 mm/s, velocidad de la prueba de rotura 1,00 mm, distancia 24,00 mm, fuerza 40 g, tiempo 0,09 segundos, recuento 5, tipo auto, fuerza de gatillo 2,5 g.

DE al inicio %	Resistencia a la rotura, gramos	Evaluación de los geles
58	337	El gel más blando, aceptable. Sin pregelación
42	813	El gel más resistente. Sin pregelación
30	769	Gel resistente, pregelación indicada

Tabla 3.2: resistencia a la rotura de los geles de pectina amidada

15 Por lo tanto, se prepararon pectinas amidadas que produjeron geles particularmente solubles y por lo tanto resistentes a partir de materiales que habían sido desesterificados con biocatalizador a un grado de esterificación en el intervalo de aproximadamente 30% a aproximadamente 45%.

Ejemplo 4

20 Efecto del grado de esterificación del material de partida para la amidación en el factor de Mark-Houwink y el efecto en un gel sintético.

En este ejemplo, el material de partida para la amidación se había preparado según el Ejemplo 2. Sin embargo, antes de la amidación, el material de partida se había desesterificado a un cierto nivel según la Tabla 3.1 usando un biocatalizador.

25 Además, se han utilizado las pectinas para hacer geles sintéticos según el método descrito previamente (mediciones reológicas de geles sintéticos).

Se utilizaron dos pectinas de partida diferentes. En la Prueba nº 1, la pectina de partida tenía un peso molecular mayor que la pectina de partida en la Prueba nº 2:

Nº de Prueba	DE al inicio, %	Peso molecular en Daltones
1	46	152.100
	38	149.550
	34	156.500
2	61	110.950
	49	121050
	36	113650

Tabla 4.1: Peso molecular y viscosidad intrínseca de las pectinas desesterificadas antes de la amidación

Nº de Prueba	DE al inicio, %	a	DE al final, %	DA al final, %	Resistencia del gel a 25° C, Pa		
					Contenido de calcio, ppm		
					61,5	92,3	123,1

Nº de Prueba	DE al inicio, %	a	DE al final, %	DA al final, %	Resistencia del gel a 25° C, Pa		
1	46	0,794	21,1	18,4	356	475	577
	38	0,815	10,8	19,2	951	1540	1910
	34	0,831	9,2	17,6	1460	2090	2530
2	61	0,857	26,5	21,5	98	97	64
	49	0,872	21,0	19,3	315	468	497
	36	0,933	10,0	16,7	927	1530	1680

Tabla 4.2: Dos pectinas amidadas realizadas con diferentes materiales de partida y el efecto del DE al inicio en el factor de Mark-Houwink y la resistencia del gel

Los resultados de los Ensayos números 1 y 2 son como sigue:

5 En la Prueba nº 1, mientras que las muestras individuales de pectina amidada fueron similares en peso molecular y el grado de amidación, las consistencias de gel de estas pectinas amidadas no fueron tan comparables, como puede verse en la tabla 4.2. Los resultados demuestran que el grado de esterificación de la pectina desesterificada antes de la amidación en última instancia tiene un efecto sobre la consistencia de gel de la pectina amidada resultante. Sin estar ligado por la teoría, los cambios conformacionales en las pectinas amidadas, como se indica por el incremento del factor de Mark Houwink, "a", resultan en pectinas amidadas que exhiben resistencias de gel mejoradas. Por lo tanto, la tabla 4.2 indica que el uso de un biocatalizador para desesterificar un material de pectina de partida antes de la amidación, da como resultado una pectina amidada con aumento de la resistencia del gel.

10 En la Prueba nº 2, también se demuestra el mismo fenómeno que en la Prueba nº 1. Sin embargo la Prueba nº 2 adicionalmente demuestra que el grado de esterificación de la pectina desesterificada con biocatalizador está preferiblemente por debajo del 60% para que la pectina amidada resultante muestre un aumento significativo de consistencia de gel cuando se compara con pectinas desesterificadas con ácido.

15 El valor de la disminución del grado de esterificación del material de partida por debajo de 60% antes de la amidación con el fin de aumentar la resistencia de gel se fundamenta en las figura 4.1 y figura 4.2.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una pectina amidada de bajo contenido de éster que comprende las etapas de:
- 5 obtener un material de pectina de partida, poner en contacto el material de pectina de partida con una metil esterasa de pectina (E. C. 3.1. 1.11) como un biocatalizador capaz de desesterificar el material de pectina, permitir que dicho biocatalizador desesterifique el material de pectina de partida para producir una pectina desesterificada, monitorizar la desesterificación del material de pectina de partida; y
- 10 terminar la desesterificación cuando la pectina desesterificada tiene un grado de esterificación entre 60% y 30%, desesterificar adicionalmente dicha pectina desesterificada poniendo en contacto la pectina desesterificada con un ácido o un álcali capaz de desesterificación y permitiendo que el ácido o álcali desesterifique adicionalmente dicha pectina desesterificada hasta un grado de esterificación por debajo de 25% para producir una pectina de bajo contenido de éster; y
- 15 poner en contacto dicha pectina desesterificada con amoniaco para producir una pectina amidada de bajo contenido de éster.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde se permite que el biocatalizador desesterifique el material de pectina de partida a un grado de esterificación entre 45% y 30% antes de desesterificar adicionalmente y amidar dicha pectina desesterificada.
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde se permite que el biocatalizador desesterifique el material de pectina de partida a un grado de esterificación entre 45% y 40% antes de desesterificar adicionalmente y amidar dicha pectina desesterificada.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde se permite que el biocatalizador desesterifique el material de pectina de partida a un grado de esterificación de 42% antes de desesterificar adicionalmente y amidar dicha pectina desesterificada.
- 25 5. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la metil esterasa de pectina (E. C. 3.1. 1.11) desesterifica de forma aleatoria.
6. El procedimiento según las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la pectina desesterificada por el biocatalizador es adicionalmente desesterificada y concurrentemente amidada poniendo en contacto dicha pectina desesterificada con amoniaco y permitiendo que el amoniaco desesterifique adicionalmente y concurrentemente amide dicha pectina desesterificada para producir una pectina amidada de bajo contenido de éster.
- 30 7. La pectina amidada de bajo contenido de éster, obtenible a partir de un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizada por que tiene una relación,  $R_2$ , de la viscosidad intrínseca de la pectina desesterificada de partida a la viscosidad intrínseca de la pectina amidada en el intervalo de 1,03 a 1,15, como se determina por HPSEC con detección triple, y un grado de esterificación de 30% o menos y un grado de amidación de 18% o menos.
- 35 8. La pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 7, caracterizada por que tiene una relación,  $R_2$ , en el intervalo de 1,04 a 1,15, como se determina por HPSEC con detección triple.
9. La pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 7, caracterizada porque muestra un factor de Mark-Houwink, "a", por encima de 0,8.
- 40 10. La pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 9, caracterizada porque muestra un factor de Mark-Houwink, "a", en el intervalo de 0,8-1,0.
11. La pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 10, caracterizada porque muestra un factor de Mark-Houwink, "a", en el intervalo de 0,85-0,95.
- 45 12. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según las reivindicaciones 7-11 en los productos alimenticios.
13. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 12 en mermeladas y jaleas.
14. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según la reivindicación 12 en productos lácteos.

15. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según las reivindicaciones 7-11 en productos farmacéuticos.
16. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según las reivindicaciones 7-11 en productos de cuidado personal.
- 5 17. El uso de una pectina amidada de bajo contenido de éster según las reivindicaciones 7-11 en productos para el hogar.

Fig. 2.3

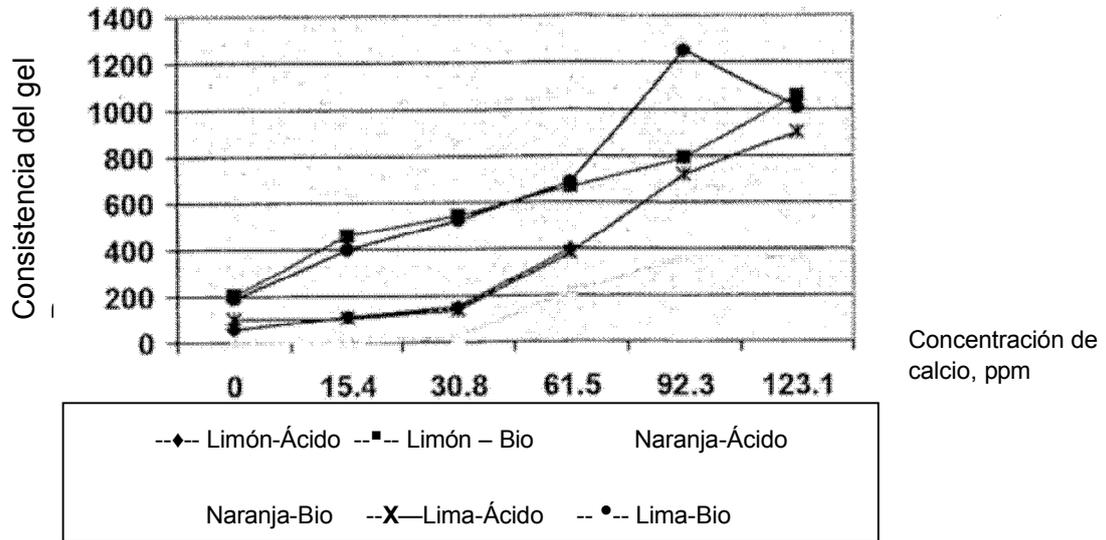


Fig. 2.4

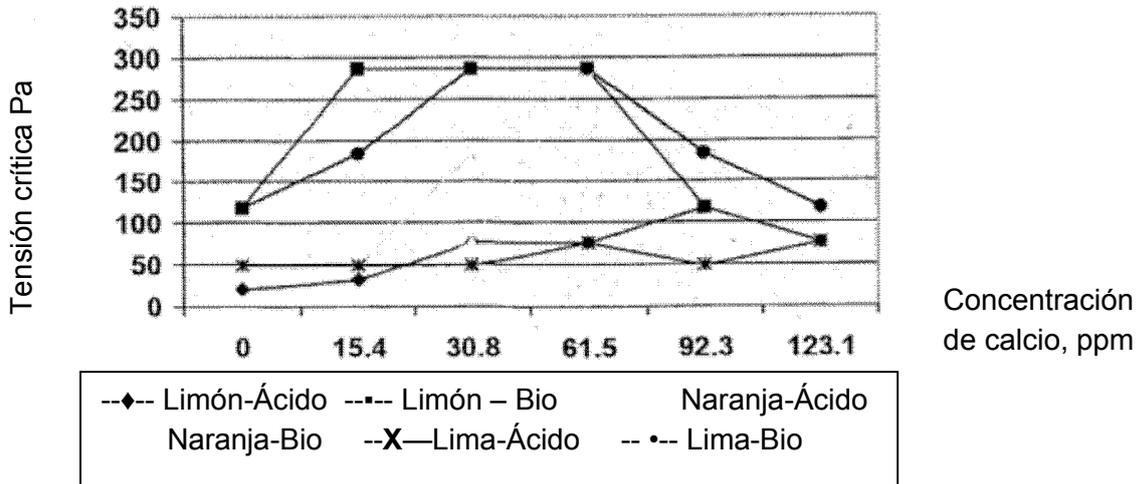


Fig. 2.5

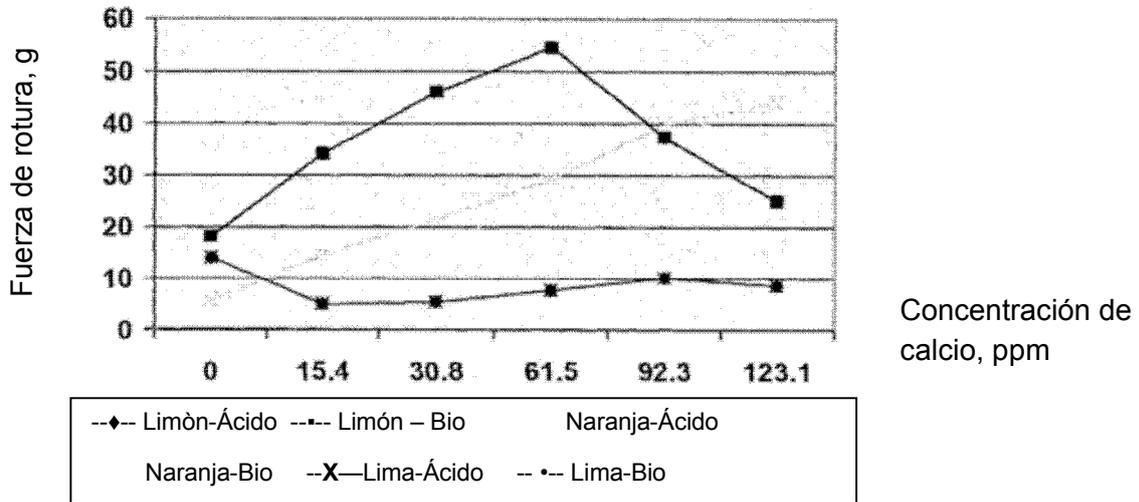


Fig. 2.6

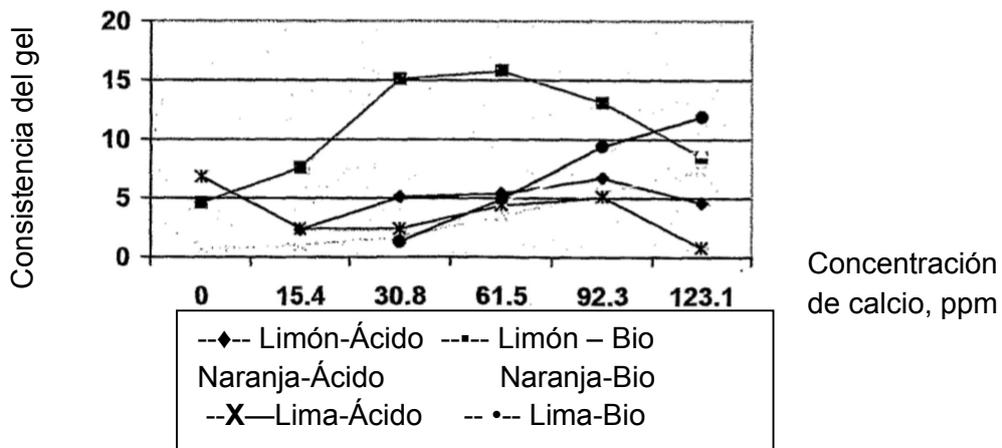


Fig. 3.1

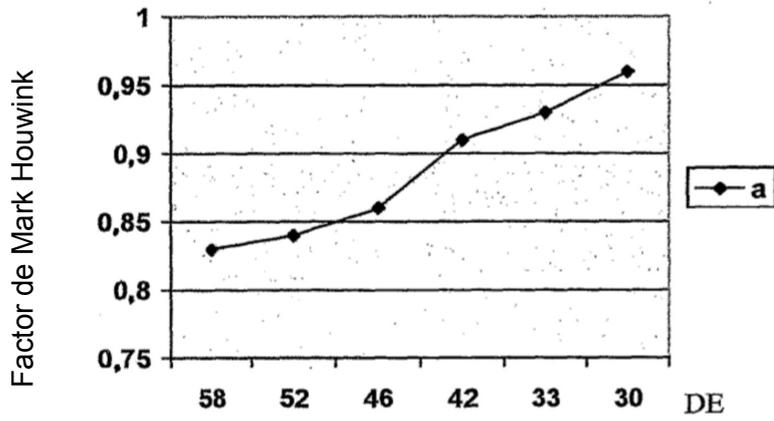


Fig. 3.2

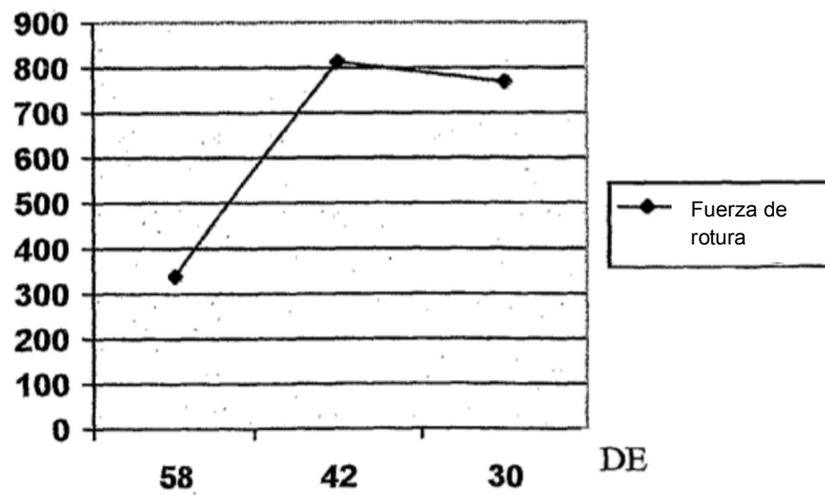


Fig. 4.1

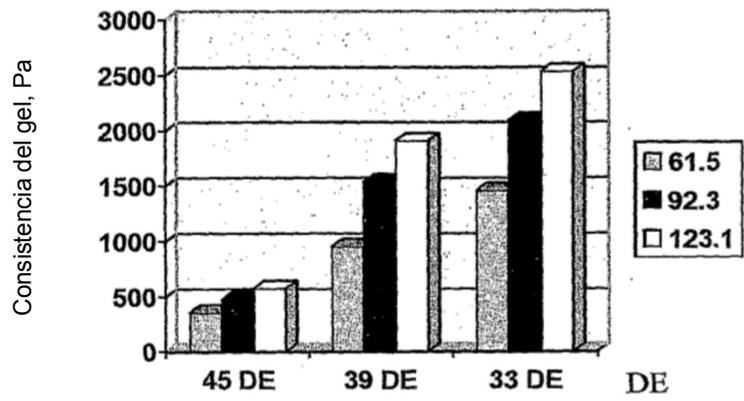


Fig. 4.2

