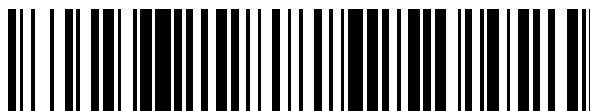


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 084**

51 Int. Cl.:

A23L 27/21

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2016 PCT/EP2016/054877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2016 E 16708418 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3270711**

54 Título: **Conjugados de azúcar-dipéptido**

30 Prioridad:

19.03.2015 EP 15159896

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

08.04.2019

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**SMARRITO-MENOZZI, CANDICE MARIE;
VITON, FLORIAN;
HOFMANN, THOMAS y
KRANZ, MAXIMILLIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 708 084 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

Conjugados de azúcar–dipéptido

5 **Sector de la invención**

La presente invención, se refiere a un procedimiento para elaborar un conjugado de azúcar-dipéptido. De una forma particular, la invención, se refiere a un procedimiento para elaborar un conjugado azúcar-dipéptido, para elaborar un conjugado el cual comprende la formación de una mezcla eutéctica, líquida, de por lo menos dos compuestos líquidos, a una temperatura de 25 °C y agua, y calentar la mezcla eutéctica, líquida; en donde, la mezcla eutéctica líquida, comprende un dipéptido y un azúcar reductor. Un aspecto adicional de la invención, es un procedimiento para preparar un producto alimenticio.

15 **Antecedentes de la invención**

Muchos alimentos que se consumen hoy, son ricos en sabor “umami”. Umami, representa el sabor del aminoácido L-glutamato y de los 5'ribonucleótidos, tales como el 5'-monofosfato de guanosina (GMP) y el monofosfato de 5'-inosina (IMP), y, algunas veces, se le denomina como el quinto sabor. La palabra umami, deriva del japonés, para delicioso y, el sabor umami, puede describirse como un sabor “sabroso”, “caldoso”, o “carnoso”. La sensación de umami, es debida a la activación de las células receptoras del sabor, las cuales se encuentran recopiladas en las papilas gustativas, y distribuidas a través de diferentes papilas de la lengua, y del epitelio del paladar (véase, Chandrashekar et al., 2006, Nature, 444, 288 - 294). Su efecto, es el de equilibrar el sabor, y el de redondear el sabor total de un plato. De una forma adicional, el umami, mejora la palatabilidad o apetitosidad de una gran variedad de productos. El glutamato de origen natural, puede encontrarse, por ejemplo, en varias preparaciones alimenticias de carnes y vegetales (véase, Ghirri et al., 2012, International Journal of Food Sciences and Nutrition, - Diario Internacional de las Ciencias Alimenticias y de la Alimentación -, 63 (7), 872 - 881).

El sabor carnosos, umami o sabroso de un producto alimenticio, puede conseguirse y / o mejorarse, de una forma adicional, procediendo a añadir, por separado, glutamato monosódico (MSG) y / o los ribonucleótidos GMP e IMP, en dichas recetas culinarias. En la industria alimenticia, se han venido desarrollando muchos potenciadores o mejoradores del sabor, tales como los consistentes en el MSG y / o ribonucleótidos, y éstos se encuentran comercialmente disponibles, en todo el mundo. Se encuentran disponibles, así, de este modo, una gran variedad de potenciadores del sabor, listos para su uso, para varias aplicaciones culinarias diferentes, y en varias formas diferentes, tales como las consistentes en pastas, en materias en polvo, en cubos comprimidos, o en gránulos.

La adición de dichos aditivos culinarios, ayuda a proporcionar exquisitez y unas propiedades atractivas del sabor, a los productos alimenticios a los cuales se hayan añadido éstos. De hecho, en todo el mundo, la exquisitez y el sabor atractivo, se percibe como uno de los atributos clave de una comida de alta calidad. Sin embargo, no obstante, en muchas partes del mundo, la adición de MSG y / o de ribonucleótidos, ha recibido una mala prensa, y ésta se percibe como más y más negativa, por parte de los consumidores. Si bien el MSG y dichos ribonucleótidos, son de origen natural, en muchos productos alimenticios, tales como los consistentes en los tomates y en los productos cárnicos, y éstos han probado ser seguros, por parte de varias organizaciones, incluyendo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, según sus siglas en español, o WHO, según sus siglas en inglés), y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA – de su siglas, en idioma inglés, correspondientes a European Food Safety Authority] -), una publicación en el New England Journal of Medicine (Kwok, RHM, 1968 New England Journal of Medicine, 278 (14), 796), en el diario médico New England Journal of Medicine (Kwok, RHM, 1968 New England Journal of Medicine, 278 (14), 796), desató una especulación, entre los consumidores, en cuanto a los efectos nocivos del MSG y de los ribonucleótidos, los cual condujo, a muchos consumidores, a rechazar productos los cuales contuvieran grandes cantidades de dichos compuestos añadidos. Existe por lo tanto una gran necesidad, en cuanto al hecho de poder disponer de soluciones industriales, las cuales permitan reducir el uso de MSG y de ribonucleótidos añadidos, a los productos alimenticios, o los productos potenciadores del sabor, sin comprometer, no obstante, un sabor umami y asegurando todavía una sabrosidad superior de los productos culinarios.

Por ejemplo, en una reciente publicación científica de A. Dunkel y T. Hofmann (Dunkel y Hofmann, 2009, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9867 - 9877), el fraccionamiento dirigido a la identificación sensorial de una sopa de pollo doblemente hervida, de preparación reciente, condujo a la identificación de dipéptidos de β -alanilo, L-anserina, L-carnosina y β -alanilglicina como contribuyentes a la orosenación (sensación en boca) espesa-agria y carnosos-clara (carnosos-blanca). El análisis cuantitativo, seguido de experimentos de recombinación y omisión, revelaron, por primera vez, el hecho de que, cuando se encuentran presentes conjuntamente con el ácido L-glutámico y iones de sodio y / o de potasio, las concentraciones sub-umbriles de estos tres péptidos de β -alanilo, potencian la orosenación típica espesa-agria, y el carácter típico claro-carnosos, para la carne de aves (de corral). Esta es una primera etapa en el descubrimiento de nuevos compuestos, los cuales sean capaces de impartir una riqueza del sabor, y potencial el efecto del sabor umami del MSG y, así, por lo tanto, permitir un uso reducido del MSG.

La patente europea EP 2 119 372 A, da a conocer una composición saborizante, la cual es de utilidad para producir, potenciar o modificar el sabor del pollo, la cual comprende un dipéptido N-alfa-beta-alanilo.

En nuestras solicitudes de patente co-pendientes EP 15153278.5 y EP 15153288.4, procedemos a describir de qué modo los conjugados de dipéptidos de azúcares, tienen un efecto mucho más fuerte sobre la potenciación o mejora del sabor, que el de sus correspondientes agliconas. De hecho, estos conjugados de azúcares, potencian la percepción de umami, y éstos inducen una orosensación espesa-agria y carnosa clara de una receta culinaria, a unos niveles de umbral o límite, muy inferiores, que los de sus correspondientes agliconas. Así, por lo tanto, los conjugados de azúcares-dipéptidos (tales como los consistentes en las moléculas de azúcar- dipéptido β -alanilo), son potenciadores o mejoradores más potentes de la sabor o aroma y del sabor umami, que sus correspondientes agliconas, tales como los dipéptidos β -alanilo). Éstos permiten, de una forma adicional, la reducción de las cantidades y de los usos de MSG y / o de ribonucleótidos, en productos alimenticios culinarios, sin comprometer la riqueza del sabor y / o reduciendo el típico y muy deseado sabor umami de dichos productos. Estos permiten, así mismo, también, la generación de sabrosos concentrados alimenticios de sabor umami, los cuales contiene una menor cantidad, o ninguna, de MSG y / o ribonucleótidos, y que todavía proporcionan un fuerte y típico sabor umami, si se aplican a un producto alimenticio. Éstos permiten, así mismo, también, incluso generar tales tipos de concentrados alimenticios sabrosos de sabor umami, los cuales sean mucho más fuertes y más concentrados, en cuanto o lo referente a proporcionar un sabor umami a un producto alimenticio, mediante su aplicación.

Los conjugados de azucares-dipéptidos, pueden generarse in situ, durante el procesado térmico de las primeras materias alimenticias, tal como, por ejemplo, el consistente en la formación de moléculas de azúcar-dipéptido β -alanilo, mediante la condensación de la glucosa con dipéptidos β -alanilo, tales como la carnosina y la anserina. Sin embargo, no obstante, la generación de conjugados de azúcar-dipéptido, en tales tipos de esquemas, es difícil de controlar y proporcionan reducidos rendimientos productivos. Los conjugados azúcar-dipéptido, pueden sintetizarse, tal como, por ejemplo, en disolventes orgánicos, pero, no obstante, estos disolventes, no son a menudo apropiados para su incorporación en los productos alimenticios, y así, por lo tanto, éstos deben someterse a etapas de purificación, las cuales son muy caras.

Existe así, por lo tanto, una necesidad, en cuanto al hecho de poder ser capaces de generar conjugados de azúcar – dipéptidos, con unos altos rendimientos productivos, y mediante unas condiciones susceptibles de poderse repetir. De una forma particular, existe una necesidad en cuanto al hecho de poder ser capaces de generar conjugados de azúcar-dipéptidos, mediante la utilización de materiales y de procedimientos, los cuales sean apropiados para una producción segura de ingredientes alimenticios. De una forma ideal, la totalidad de los materiales de la mezcla de reacción, son apropiados para su uso en productos alimenticios, de tal forma que, la mezcla, pueda incorporarse directamente. Sería ventajoso el hecho de que pudiera minimizarse el número de diferentes materiales presentes en la mezcla de reacción, de una forma especial, de materiales los cuales sean poco o escasamente percibidos por parte de los consumidores, en los productos alimenticios.

El objeto de la presente invención, es el de mejorar el estado actual de la técnica, y el proporcionar una solución alternativa o mejorada del estado anterior de la técnica, y el de superar por lo menos algunos de los inconvenientes los cuales se han descrito anteriormente, arriba. De una forma particular, el objeto de la presente invención, es el de proporcionar una solución alternativa o una solución mejorada, para elaborar conjugados de azúcar - dipéptidos. El objeto de la presente invención, se consigue mediante el contenido de las reivindicaciones independientes. Cualquier referencia a los documentos correspondientes al arte anterior de la técnica, en esta especificación, no debe considerarse como una admisión, en cuanto al hecho de que, tal arte anterior de la técnica, sea ampliamente conocidos, o que éste forme parte de los conocimientos generales en el sector. Tal y como se utiliza en esta especificación, las palabras “comprende”, “comprendiendo”, y palabras similares, no deben interpretarse, en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, éstos pretenden significar “incluyendo, pero no, de una forma limitada a”.

Resumen de la invención

Correspondientemente en concordancia, la presente invención, proporciona, en un primer aspecto, un procedimiento para producir un conjugado de azúcar-dipéptido, comprendiendo, el procedimiento, la formación de una mezcla eutéctica, líquida, de por lo menos dos compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, y agua, encontrándose presente, el agua, en una cantidad insuficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, individualmente, o en una cantidad tal, que todos los compuestos sólidos, a una temperatura de 25 °C, se saturen simultáneamente, a una temperatura de 25 °C; y calentar la mezcla eutéctica, líquida, a una temperatura mayor de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 10 minutos; en donde, la mezcla eutéctica, líquida, comprende un dipéptido y un azúcar reductor. En un segundo aspecto, la invención, se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto alimenticio, el comprende la generación de un conjugado de azúcar-dipéptido, en concordancia con la presente invención; proporcionando componentes alimenticios y combinando el conjugado de azúcar-dipéptido y productos alimenticios, para formar un producto alimenticio.

Los inventores, han encontrado, de una forma sorprendente, el hecho de que, procediendo a hacer reaccionar un dipéptido y un azúcar reductor, en una mezcla líquida eutéctica, con reducido contenido de humedad, éstos eran capaces de lograr unos mayores rendimientos productivos, que los que se consiguen con un sistema de metanol / glicerol. No es deseable el hecho de utilizar metano, como disolvente, para procesar un ingrediente alimenticio, ya que éste es tóxico. Procediendo a hacer reaccionar el dipéptido y azúcar reducido, en la mezcla líquida eutéctica,

con reducido contenido de humedad, se generaban unos rendimientos productivos mayores que la que se consigue con la misma reacción, en una solución acuosa, y podría llevarse a cabo a unas temperaturas más reducidas que las que se utilizan para la solución acuosa, sin la adición de sales y de tampones.

5 **Descripción resumida de los dibujos**

La figura 1, es un cromatograma de HPLC-UV, de una carnosina térmicamente tratada, con glucosa.

10 La figura 2, muestra el rendimiento productivo de la formación de 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a diferentes valores del pH.

La figura 3, muestra el rendimiento productivo de la formación de 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a varias temperaturas de calentamiento.

15 La figura 4, muestra el rendimiento productivo de la formación de 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a diferentes tiempos de calentamiento.

La figura 5, muestra el rendimiento productivo de la formación de 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, en una mezcla eutéctica, líquida.

20 **Descripción detallada de la invención**

Por consiguiente, la presente invención, se refiere, en parte, a un procedimiento para producir un conjugado de azúcar-dipéptido, comprendiendo, el procedimiento, la formación de una mezcla eutéctica, líquida, de por lo menos dos compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, y agua, encontrándose presente, el agua, en una cantidad insuficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, individualmente, o en una cantidad tal, que todos los compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, se saturan simultáneamente, a una temperatura de 25 °C; y calentar la mezcla eutéctica, líquida, a una temperatura mayor de 30 °C (tal como, por ejemplo, a una temperatura mayor de 40 °C, por ejemplo, a una temperatura mayor de 50 °C), durante un transcurso de tiempo de por lo menos 10 minutos (tal como, por ejemplo, durante un tiempo de por lo menos 30 minutos, por ejemplo, durante un tiempo de por lo menos 1 hora); en donde, la mezcla eutéctica, líquida, comprende un dipéptido y un azúcar reductor. Los por lo menos dos compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, pueden ser un dipéptido y un azúcar reductor.

35 La mezcla eutéctica, líquida, puede comprender glucosa y sacarosa. Así, por ejemplo, una mezcla eutéctica, líquida, puede formarse procediendo a disolver 5,0 g de glucosa y 9,5 g de sacarosa, en 30 ml de agua y, a continuación, procediendo a concentrar la solución resultante, para proporcionar una mezcla eutéctica, líquida, con 1,6 g de agua. Ambas, la glucosa y la sacarosa, son sólidas, a una temperatura de 25 °C. A raíz de la literatura especializada, unos valores de únicamente aprox. 3,3 g de sacarosa, se disolverían en 1,6 g de agua, a una temperatura de 25 °C, de tal forma que, la solubilidad de la sacarosa, en agua, no es lo suficientemente alta, como para que, 9,5 g de sacarosa, se disuelvan en 1,6 g de agua. De una forma similar, únicamente aprox. 1,7 g de glucosa, se disolverían en 1,6 g de agua, a una temperatura de 25 °C, de tal forma que, la solubilidad de la glucosa, en agua, no es lo suficientemente alta, como para que, 5,0 g de glucosa, se disuelvan en 1,6 g de agua. Sin embargo, no obstante, mediante glucosa y sacarosa, conjuntamente, la mezcla, puede existir como un líquido homogéneo, una mezcla eutéctica, líquida. El punto de fusión de esta mezcla eutéctica, líquida, es muy inferior que el punto de fusión de los compuestos los cuales forman la mezcla eutéctica (a ésta se le hace referencia, algunas veces, como un disolvente eutéctico intenso, un sistema eutéctico intenso (DES - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a deep eutectic system] -)). La mezcla eutéctica, líquida, formada a partir de por lo menos dos compuestos, sólidos a una temperatura de 25 °C y agua, en el procedimiento de la invención, pueden tener un punto de fusión el cual sea por lo menos 20 °C más baja que el punto de fusión individual más bajo, de los compuestos los cuales forman la mezcla eutéctica, líquida, tal como, por ejemplo, por lo menos 30 °C más baja que el punto de fusión individual más bajo de los compuestos los cuales forman la mezcla eutéctica, líquida. Los conjugados de azúcar y dipéptido, son moléculas la cuales pueden formarse mediante la reacción entre un azúcar y un dipéptido. En el contexto de la presente invención, el término dipéptido, se refiere a dos aminoácidos los cuales se encuentran unidos por un enlace peptídico individual. Los ejemplos de conjugados de azúcares y dipéptidos, son los 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-N-metil-L-histidina, 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-glicina, xilulosil-N-β-alanil-L-histidina, xilulosil-N-β-alanil-N-metil-L-histidina y xilulosil-N-β-alanil-L-glicina.

60 Los azúcares reductores, los cuales o bien tengan un grupo aldehído o bien sean capaces de formar uno en solución, mediante isomerismo. El grupo funcional aldehído, permite el que el azúcar, actúe como un agente reductor. El azúcar reductor, en el procedimiento de la invención, puede seleccionarse a partir del grupo consistente en xilosa, fructosa y glucosa. Así, por ejemplo, el azúcar reductor, puede ser glucosa. Y así, por ejemplo, el agente reductor puede ser xilosa. El dipéptido, en el procedimiento de la invención, puede ser un dipéptido de β-alanilo, pudiéndose seleccionar el dipéptido en cuestión, por ejemplo, de entre el grupo consistente en la carnosina, la anserina y la β-alanilglicina. Estos dipéptidos, proporcionan potentes intensificadores o mejoradores del sabor o aroma y del sabor umami, cuando se forman, convirtiéndose en conjugados de azúcares. Por ejemplo, el agente

reductor, puede ser glucosa y, el dipéptido, puede ser carnosina. Por ejemplo, el agente reductor, puede ser glucosa y, el dipéptido, puede ser anserina. Por ejemplo, el agente reductor, puede ser glucosa y, el dipéptido, puede ser β -alanilglicina. Por ejemplo, el agente reductor, puede ser xilosa y, el dipéptido, puede ser carnosina. Por ejemplo, el agente reductor, puede ser xilosa y, el dipéptido, puede ser anserina. Por ejemplo, el agente reductor, puede ser xilosa y, el dipéptido, puede ser β -alanilglicina.

El conjugado de azúcar-dipéptido del procedimiento de la invención, puede ser un ingrediente alimenticio. Es ventajoso el que, el procedimiento de la invención, puede llevarse a cabo mediante la totalidad de materiales los cuales sean comestibles. El término "comestible", se refiere a sustancias las cuales pueden comerse de una forma segura. Mientras que, no refiriéndose a las sustancias las cuales se permiten para su consumo, en cualquier jurisdicción en particular, los materiales comestibles los cuales se utilizan en el procedimiento de la invención, pueden comprender, por ejemplo, materiales los cuales estén aprobados para el consumo humano, por parte de la entidad estadounidense U.S. Food and Drug Administration (FDA – Administración Estadounidense de los alimentos y de los fármacos).

Es ventajoso el que, el procedimiento de la invención, puede proporcionar unos altos rendimientos productivos del producto, sin la necesidad de proceder a la adición de sales inorgánicas, para, por ejemplo, controlar el valor pH. Tales tipos de sales inorgánicas, se aportan a la mezcla generada por el procedimiento. Para los materiales alimenticios, puede ser beneficioso el limitar el número de ingredientes, tal como, por ejemplo, para reducir el número de ingredientes los cuales aparecen en la lista de los ingredientes del producto alimenticio. La mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede contener menos de 500 ppm de sales inorgánicas y, por ejemplo, la mezcla eutéctica, líquida, puede encontrarse exenta de sales inorgánicas.

Las mezclas eutécticas, líquidas, pueden formarse de diversos modos, así por ejemplo, los compuestos sólidos, pueden disolverse directamente en una cantidad de agua, la cual sea insuficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, de una forma individual. Esto, de una forma general, funciona bien para las altas cantidades de agua, ayudándose, la disolución, mediante agitación. La mezcla eutéctica, líquida, puede también formarse procediendo a combinar los compuestos sólidos, y almacenándolos en una atmósfera hasta que se haya formado la mezcla líquida, si bien, no obstante, este proceso, puede tardar demasiado tiempo para una aplicación industrial. Para las mezclas eutécticas, líquidas, las cuales tengan reducidas cantidades de agua, puede ser más fácil el proceder, en primer lugar, a disolver los compuestos sólidos, en un exceso de agua y, a continuación, retirar algo de agua, mediante evaporación, para dejar una mezcla eutéctica, líquida. Así, por ejemplo, la mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede formarse procediendo a disolver, en primer lugar, por lo menos dos compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, en una cantidad de agua la cual sea suficiente para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, de una forma individual y, a continuación, concentrando la solución resultante, hasta que, el agua, se encuentre presente en una cantidad suficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a una temperatura de 25 °C, de una forma individual.

El dipéptido y el azúcar reductor, en el procedimiento de la invención, no necesita necesariamente encontrarse presente en unas cantidades estequiométricas exactas. Así, por ejemplo, el dipéptido y el azúcar reductor, pueden encontrarse presentes en un factor de relación molar comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1 : 0,02 y 1 : 50, tal como, por ejemplo, en un factor de relación molar situado entre 1 : 0,5 y 1 : 45.

La mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender dipéptido de β -alanilo, y agua. Así, por ejemplo, para formar 1-desoxi-D-fructosil-N- β -alanil-L-histidina, la mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender glucosa, carnosina y agua, y a título de ejemplo adicional de la mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la presente invención, ésta puede consistir en glucosa, carnosina y agua. La mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender un poliol, tal como un azúcar, sólido, a una temperatura de 25 °C. La mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender un poliol, sólido, a una temperatura de 25 °C, glucosa, dipéptido de β -alanilo, y agua. Así, por ejemplo, para formar para formar 1-desoxi-D-fructosil-N- β -alanil-L-histidina, la mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender glucosa, sacarosa, carnosina y agua, y así, a título de ejemplo adicional, la mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede consistir en glucosa, sacarosa, carnosina y agua.

La mezcla eutéctica, líquida, en el procedimiento de la invención, puede comprender glucosa, y el factor de relación de la glucosa con respecto al agua, en la mezcla eutéctica, líquida, puede ser de valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1 : 9,5 y 1 : 2,5, tal como, por ejemplo, de un factor de relación molar situado entre 1 : 5 y 1 : 3. Estos factores de relación, proporcionan una resultados particularmente buenos.

El conjugado de azúcar-dipéptido formado por el procedimiento de la invención, puede utilizarse para potenciar el sabor o aroma y / o el sabor umami de un producto alimenticio. Un producto alimenticio de este tipo, puede ser un producto listo para comerse. Éste puede también ser, así mismo, un concentrado saborizante, el cual se utilice para condimentar aún todavía otro producto alimenticio. En un aspecto adicional, la invención, proporciona un procedimiento para preparar un producto alimenticio, el cual comprende la preparación de conjugado de azúcar-dipéptido, en concordancia el procedimiento de la invención; proporcionar componentes alimenticios y combinar el

conjugado de azúcar-dipéptido y componentes alimenticios, para formar un producto alimenticio. Así, por ejemplo, el producto alimenticio preparado mediante el procedimiento de la invención, puede ser un condimento o sazónador, un producto auxiliar para cocinar (tal como, por ejemplo, el consistente en un caldo o consomé concentrando); una salsa, tal como, por ejemplo, un concentrado de salsa; un sopa, tal como, por ejemplo, un concentrado de sopa, o un producto alimenticio para animales de compañía o doméstico, tal como por ejemplo, un producto alimenticio húmedo, para animales de compañía o domésticos, o un producto alimenticio seco, para animales de compañía o domésticos.

Aquellas personas expertas en la técnica especializada, entenderán el hecho de que, éstos, podrán combinar libremente la totalidad de las características o rasgos distintivos de la presente invención, los cuales se dan a conocer aquí. De una forma particular, las características o rasgos distintivos los cuales se describen para las diferentes formas de presentación de la presente invención, puede combinarse. Allí en donde existan equivalentes conocidos para los rasgos distintivos o características específicas, tales equivalentes, se incorporan aquí, tal y como se hace referencia, de una forma específica, en esta especificación. Otras ventajas y características o rasgos distintivos de la presente invención, resultarán evidentes, a raíz de las figuras y de los ejemplos no limitativos que se facilitan.

Ejemplos

Ejemplo 1 (Comparativo): Síntesis de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina a partir de glucosa y carnosina (β-alanil-L-histidina) en metanol / glicerol.

Compuestos químicos: Se procedió a comprar bisulfito sódico y glicerol, de procedencia de la firma Sigma; glucosa, de procedencia de la firma SDFine Chemicals; carnosina, de procedencia de la firma ChemImprex; y metanol y ácido acético, de procedencia de la firma Merck. La totalidad de los reactivos comercialmente disponibles en el mercado, se utilizaron tal y como éstos se recibieron, de sus respectivos proveedores.

Se procedió a llevar a cabo una cromatografía de capa fina (TLC – de sus iniciales en idioma inglés), analítica, en placas de procedencia de la firma Merck, del tipo RP-18 F254s (Merck) plates. Las placas de la TLC, se visualizaron mediante luz UV de onda corta, utilizando un colorante reactivo de ninhidrina

Los espectros de ¹H NMR (360,13 MHz) y de ¹³C NMR (9,56 MHz), se registraron en un espectrómetro del tipo Bruker DPX-360, equipado con un cabezal de sonda, de gradiente z, multinuclear, de banda ancha. Los desplazamientos (cambios) químicos (en ppm), se expresaron con respecto a una referencia interna (TMS ó TSP). Las multiplicidades, se reportan del siguiente modo: s = doblete, t = triplete, q = cuádruplete, m = multiplete, bs = singlete ancho.

Se procedió a suspender la D-Glucosa (23 g, 127,37 mmol, 2,8 eq.) y el bisulfito sódico (1,6 g, 12,389 mmol, 0,28 eq.) en metanol (38 mL) y glicerol (19 mL). Después de un proceso de agitación, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 100 °C, se procedió a la adición de carnosina (10 g, 44,22 mmol, 1,0 eq.) y ácido acético (5,1 mL) y, la mezcla resultante, se calentó, durante un transcurso de tiempo de 3,5 horas, a una temperatura de 100 °C. Se procedió, a continuación, a enfriar la masa de reacción y, ésta, se diluyó con 38 mL de agua. Después, la mezcla de reacción, se purificó, mediante la utilización de una columna cargada con una resina de intercambio de iones del tipo Amberlite IRN-77 (100 g). Para la elución, se utilizó NH₃, en un porcentaje del 0 – 0,4%, como gradiente, en agua, para la elución. Finalmente, se aislaron 6,8 g 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina; R_f (n-Butanol : Ácido acético: Agua, 3 : 2 : 2): 0,21; MS (M⁺): m/z 388,16; ¹H NMR (óxido de deuterio) δ 2,77 [m, 2H], 3,13 [dd, J = 15,4, 8,2 Hz, 1H], 3,21 – 3,27 [m, 1H], 3,28 – 3,32 [m, 2H], 3,3 – 3,44 [m, 2H], 3,63 – 3,75 [m, 1H], 3,76 – 3,85 [m, 2H], 3,87 – 3,91 [m, 1H], 3,99 – 4,03 [m, 2H], 4,53 [dd, J = 8,2, 5,2 Hz, 1H], 7,28 [d, J = 1.0 Hz, 1H], 8,61 [d, J = 1,4 Hz, 1H]; ¹³C NMR (óxido de deuterio) δ 26,98, 30,26, 44,28, 53,01, 53,92, 63,91, 68,80, 69,20, 69,76, 95,21, 116,65, 129,49, 133,15, 171,60, 176,13.

El rendimiento productivo de la formación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, era de un porcentaje del 39,62 %. El rendimiento productivo de la formación, se refiere al número de moles de los conjugados formados, expresado como un porcentaje de número de moles máximo, teórico, los cuales podrían producirse mediante la cantidad de los materiales de partida (en base a la estequiometría de la reacción).

Ejemplo 2 (Comparativo): Preparación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina a partir de glucosa y carnosina en un tampón, a diferentes valores pH

Se procedió calentar una mezcla de carnosina (226 mg, 1 mmol, 1 eq.) y de glucosa (360 mg, 2 mmol, 1 eq.) en 20 mL de tampón Na₂HPO₄ (0,5 mol/L, pH 3,0 / 5,0 / 7,0), en un recipiente cerrado, a una temperatura de 80 °C, durante un transcurso de tiempo de 3 h. Se procedió, a continuación, a evaporar el precipitado resultante, bajo la acción de una presión reducida, y éste se secó mediante congelación (se liofilizó). Los alícuotos, de la materia en polvo liofilizada (secada mediante congelación), se disolvieron en agua, mediante ultrasonificación (mediante ultrasonidos), durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, y éstos se filtraron (0,45 µ). A continuación, se procedió a fraccionar la solución, mediante una cromatografía líquida, de interacción hidrofílica, semi-preparativa

(HILIC-HPLC), mediante la utilización de una columna de 300 x 21,5 mm i.d. (diámetro interior), 10 µm, del tipo "TSKgel Amide-80 column" (de procedencia de la firma Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania), equipada con una columna de protección de 75 x 21,5 i.d. (diámetro interior), 10 µm, (de procedencia de la firma Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania). Mediante un control de seguimiento del efluente con un detector ELSD (Detector de Dispersión de la luz por Evaporación – [ELSD de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Evaporative Light Scattering Detector] y procediendo a ajustar el caudal de flujo a 8 mL/minuto, se utilizó un gradiente consistente en una ácido fórmico acuoso (1 % en agua, disolvente A), y acetonitrilo (disolvente B). A partir de una mezcla de un porcentaje del 75 % de B y de un porcentaje del 25 % de A, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, el gradiente se redujo, sucesivamente, a un porcentaje del 0 % de B y un porcentaje del 80 % de A, en un transcurso de tiempo adicional de 10 minutos. Después de mantener estas condiciones, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, el gradiente se incrementó un porcentaje del 75 % de B y del 25 % de A, en un transcurso de tiempo de 8 minutos. La purificación, condujo a 6 fracciones, tal y como se muestra en la Figura 1.

La molécula correspondiente a la fracción F5, se identificó como siendo carnosina, mientras que la molécula F6, se identificó como siendo 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina (en base a los datos de LC-MS y de NMR).

La cuantificación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se llevó a cabo mediante un análisis de dilución isotópica, estable, utilizando un HPLC-MS, equipado con una columna del tipo "TSKgel-Amide 80 column" (de 3 µm, 2 mm x 150 mm, de procedencia de la firma Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania) y, la columna de protección del tipo "TSKgel-Amide 80 (de 3 µm, 2 mm x 10 mm, de procedencia de la firma Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania). El eluyente A, era una mezcla de acetonitrilo con un porcentaje del 1 % de ácido fórmico y el eluyente B, era agua, con un porcentaje del 1,0 % de ácido fórmico. El volumen de inyección, era de 3 µL. El caudal de flujo, era de 0,2 mL/minuto. El gradiente de disolvente, se inició a un porcentaje del 95 % A, a partir de los 0 a 5 minutos y, a continuación, de un 95 – 5 % A, a partir de los 5 a 15 minutos, del 5 % de A, durante 10 minutos, de un 5 – 95 %, a partir de los 27 a 30 minutos, La Tabla 1, resume las condiciones de la MS.

Tabla 1. Transiciones de masa

Substancia	MW [Da]	Q1 → Q3 [m/z]	DP ³	CE ^b	CXP ^c
1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina	388	389 → 305	71	25	4
^a Potencial de desagrupamiento; ^b Energía de colisión; ^c Potencial de salida de la célula					

La influencia del valor pH, en el rendimiento productivo de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se muestra en la Figura 2. El rendimiento productivo más alto, era de un porcentaje del 1,6 %, obtenido a un valor pH de 9.

Ejemplo 3 (Comparativo): Preparación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a partir de glucosa y de carnosina, en un tampón, a diferentes temperaturas

Se procedió calentar una mezcla de carnosina (226 mg, 1 mmol, 1 eq.) y de glucosa (360 mg, 2 mmol, 1 eq.) en 20 mL de tampón de Na₂HPO₄ (0,5 mol/L, pH 3,0 / 5,0 / 7,0), en un recipiente cerrado, a una temperatura de 40 / 60 / 80 / 100 °C, durante un transcurso de tiempo de 3 h. Se procedió, a continuación, a analizar las mezclas resultantes, de la forma la cual se ha descrito en el Ejemplo 2.

La influencia de la temperatura de calentamiento en el rendimiento productivo de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se muestra en la figura 3. El rendimiento productivo más alto, era de un porcentaje del 1,2 %, obtenido a una temperatura de 80 °C.

Ejemplo 4 (Comparativo): Preparación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a partir de glucosa y de carnosina (β-alanil-L-histidina) en un tampón, a diferentes tiempos de calentamiento

Se procedió calentar una mezcla de carnosina (226 mg, 1 mmol, 1 eq.) y de glucosa (360 mg, 2 mmol, 1 eq.) en 20 mL de tampón de Na₂HPO₄ (0,5 mol/L, pH 3,0 / 5,0 / 7,0), en un recipiente cerrado, a una temperatura de 80 °C, durante un transcurso de tiempo de 0,3 a 3 h. Se procedió, a continuación, a analizar las mezclas resultantes, de la forma la cual se ha descrito en el Ejemplo 2.

La influencia del tiempo de calentamiento en el rendimiento productivo de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se muestra en la figura 4. El rendimiento productivo más alto, era de un porcentaje del 3,6 %, obtenido a después de un transcurso de tiempo de 1,5 horas.

Ejemplo 5: Preparación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, a partir de glucosa y de carnosina (β-alanil-L-histidina), en una mezcla eutéctica, líquida [Glucosa / Sacarosa], a diferentes tiempos de calentamiento

Preparación de la mezcla eutéctica, líquida, a partir de glucosa y sacarosa: se procedió a disolver 5,0 g de glucosa (28 mm) y 9,5 g de sacarosa (28 mm), en 30 mL de agua. Se procedió, a continuación, a concentrar la solución resultante, bajo la acción de presión reducida, a una temperatura de 50 °C, para proporcionar una mezcla eutéctica, líquida, consistente en glucosa y sacarosa, a un factor de relación molar de 50 / 50, con un porcentaje del 9,93 % de H₂O. Procediendo a olfatear la mezcla eutéctica, líquida, se confirmó el hecho de que no había acontecido ningún cambio, en el aroma, durante el proceso de formación de la mezcla eutéctica, líquida.

Se procedió a añadir 150 mg de carnosina (0,664 mmol) a 14,50 g de mezcla eutéctica, líquida, de glucosa / sacarosa (factor de relación molar 50 / 50, 9,93 % de H₂O) y, la mezcla resultante, se calentó, durante un transcurso de tiempo de 1,2 ó de 6 horas, a una temperatura de 60 °C. La cuantificación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se llevó a cabo de la forma la cual se describe en el Ejemplo 2.

La influencia del tiempo de calentamiento en el rendimiento productivo de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, se muestra en la figura 5. Se obtuvo un rendimiento productivo de un porcentaje del 71 %, después de un tiempo de calentamiento de 2 horas. Puede verse que, el hacer reaccionar la glucosa y la carnosina, en una mezcla eutéctica, líquida, tiene como resultado un rendimiento productivo más alto de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, que cuando la glucosa y la carnosina se hacen reaccionar en un disolvente de metanol / glicerol (Ejemplo 1). La reacción, en una mezcla eutéctica, líquida, tiene como resultado unos rendimientos productivos de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, de un orden de más de una magnitud mayor que cuando la glucosa y la carnosina, se hacen reaccionar en sistemas acuosos (Ejemplos 2, 3 y 4).

Ejemplo 6: Preparación de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, en una mezcla eutéctica, líquida [Glucosa / Carnosina]

Preparación de una mezcla eutéctica, líquida, a partir de glucosa y carnosina: Se procedió a disolver 0,3982 g de glucosa (2,2 mmol) y de 0,5000 g de carnosina (2,2 mmol), en 30 mL de agua. Se procedió, a continuación, a concentrar la solución resultante, bajo la acción de presión reducida, a una temperatura de 50 °C, para proporcionar una mezcla eutéctica, líquida, consistente en glucosa y carnosina, a un factor de relación molar de 50 / 50, con un porcentaje del 6,40 % de H₂O. Procediendo a olfatear la mezcla eutéctica, líquida, se confirmó el hecho de que no había acontecido ningún cambio, en el aroma, durante el proceso de formación de la mezcla eutéctica, líquida.

Se procedió a calentar 0,9 g de DES (sistema eutéctico intenso) de glucosa / carnosina (en un factor de relación de 50 / 50, 6,40 % de H₂O), durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 60 °C, para proporcionar la 1-Desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, con un rendimiento productivo de un 59,7 ± 2,3 %. (La cuantificación, se llevó a cabo de la forma la cual se ha descrito en el Ejemplo 2). Esto muestra el hecho de que, procediendo a hacer reaccionar la glucosa y la carnosina, como una mezcla eutéctica, líquida, tiene como resultado un rendimiento productivo más alto de la 1-Desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, que cuando se procede a hacer reaccionar la glucosa y la carnosina, en un disolvente de metanol / glicerol (Ejemplo 1). La reacción de la glucosa y la carnosina, como una mezcla eutéctica, líquida, tiene como resultado un rendimiento productivo de la 1-desoxi-D-fructosil-N-β-alanil-L-histidina, de un orden de más de una magnitud mayor que cuando la glucosa y la carnosina, se hacen reaccionar en sistemas acuosos (Ejemplos 2, 3 y 4).

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para producir un conjugado de azúcar-dipéptido, comprendiendo, el procedimiento, la formación de una mezcla eutéctica, líquida, de por lo menos dos compuestos, sólidos, a 25 °C, y agua, encontrándose presente, el agua, en una cantidad insuficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a 25 °C, individualmente, o en una cantidad tal, que todos los compuestos sólidos, a 25 °C, se saturen simultáneamente, a 25 °C; y calentar la mezcla eutéctica, líquida, a una temperatura mayor de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 10 minutos; en donde, la mezcla eutéctica, líquida, comprende un dipéptido y un azúcar reductor.
- 10 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, el azúcar reductor, se selecciona de entre el grupo consistente en xilosa, fructosa y glucosa.
- 3.- Un procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, el dipéptido, es un dipéptido de β -alanilo.
- 15 4.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, el dipéptido, se selecciona de entre el grupo consistente en carnosina, anserina y β -alanilglicina.
- 5.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, el conjugado de dipéptido-azúcar, es un ingrediente alimenticio.
- 20 6.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, la mezcla eutéctica, líquida, se forma procediendo, en primer lugar, a disolver los por lo menos dos compuestos, sólidos, a 25 °C, en una cantidad de agua, la cual sea suficiente como para disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a 25 °C, individualmente, y a continuación, concentrando la solución resultante, hasta que, el agua, se encuentre presente en una cantidad la cual sea insuficiente como para la disolver la totalidad de los compuestos, sólidos, a 25 °C, individualmente.
- 25 7.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, el dipéptido y el azúcar reductor, se encuentran presentes en un factor de relación molar, situado entre 1 : 0,02 y 1 : 50.
- 30 8.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, la mezcla eutéctica, líquida, consiste en glucosa, sacarosa, carnosina y agua.
- 9.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la mezcla eutéctica, líquida, consiste en glucosa, carnosina y agua.
- 35 10.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde, la mezcla eutéctica, líquida, comprende glucosa y, el factor de relación molar, de la glucosa con respecto al agua, en la mezcla eutéctica, líquida, se encuentra situado entre 1 : 9,5 y 1 : 2,5.
- 40 11.- Procedimiento para preparar un producto alimenticio, el cual comprende generar un conjugado de azúcar-dipéptido, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; proporcionando componentes alimenticios y combinando el conjugado de azúcar-dipéptido y componentes alimenticios, para formar un producto alimenticio.
- 45 12.- Un procedimiento, según la reivindicación 11, en donde, el producto alimenticio, es un condimento, un producto auxiliar para cocinar, una salsa, una sopa, o un producto alimenticio para animales domésticos.

Fig. 1

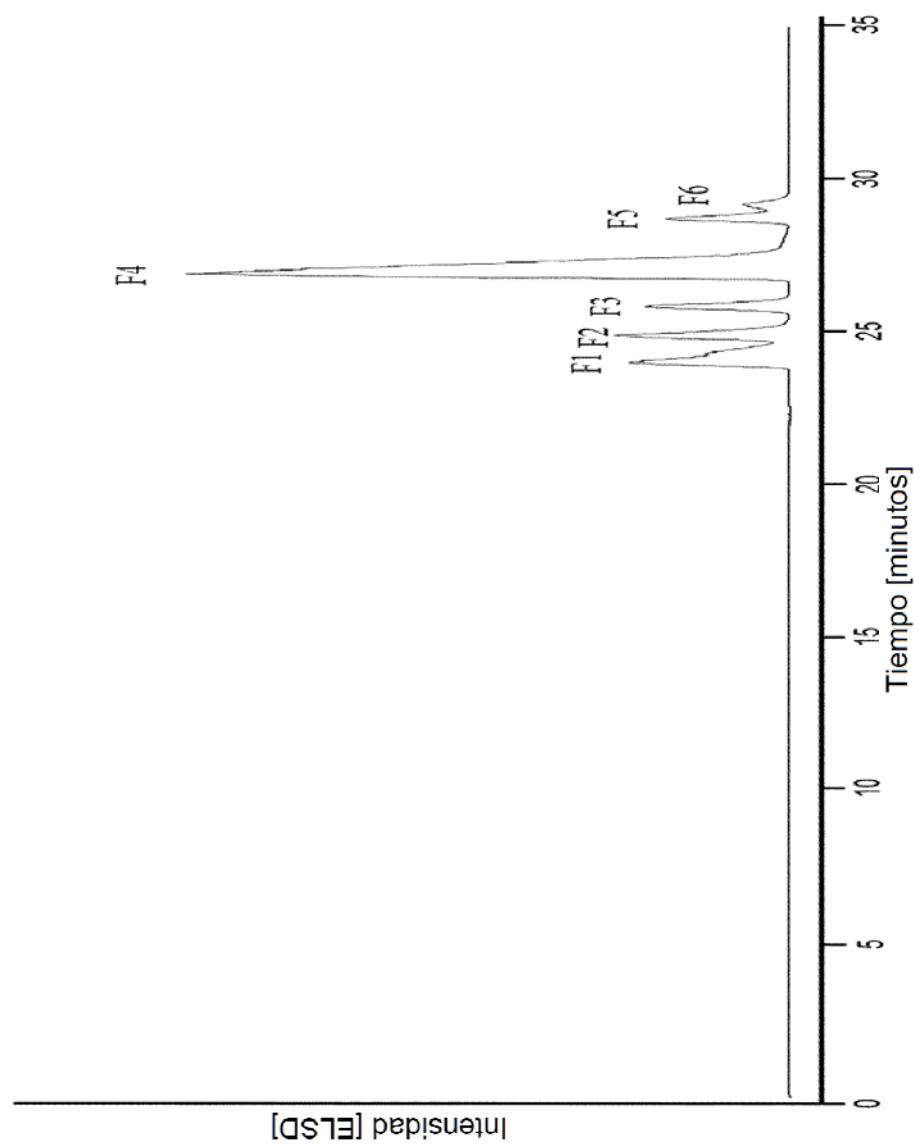


Fig. 2

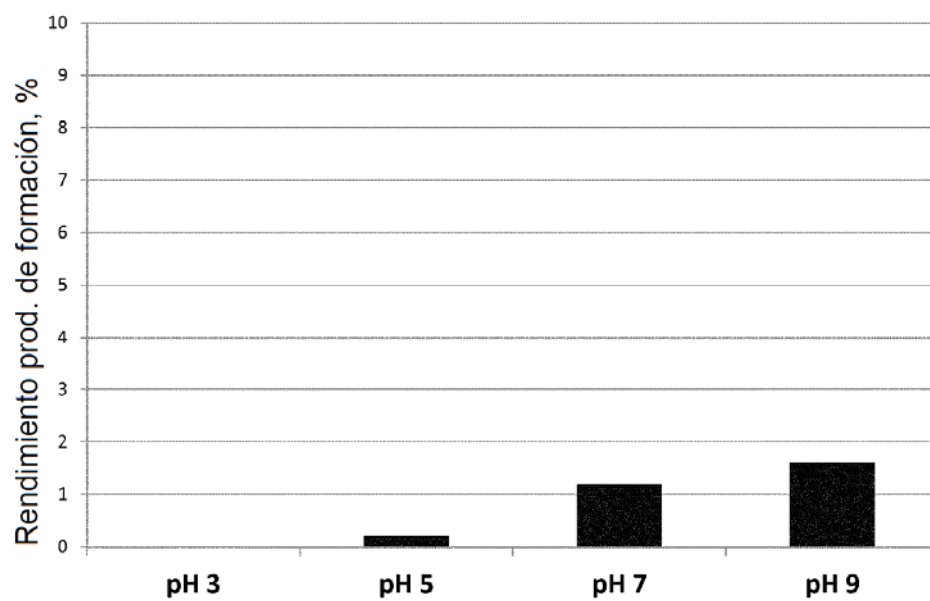


Fig. 3

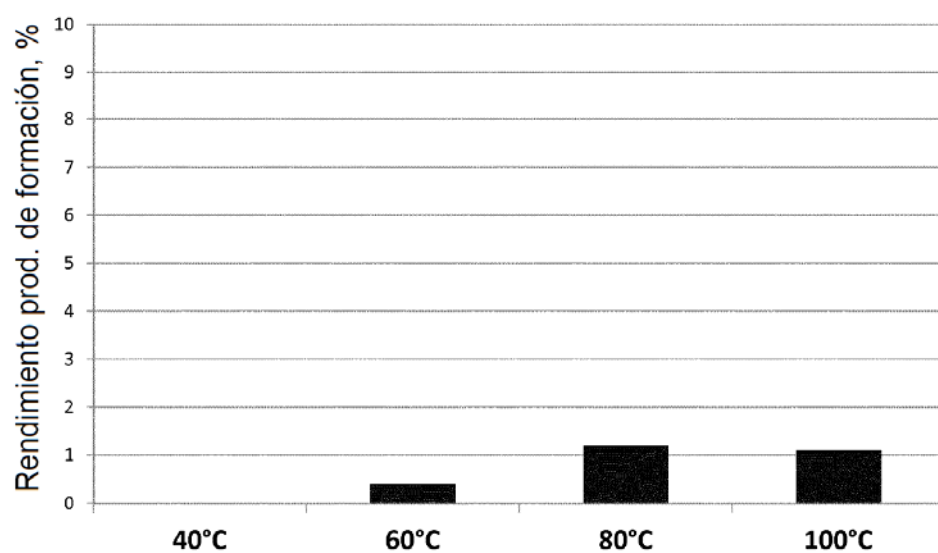


Fig. 4

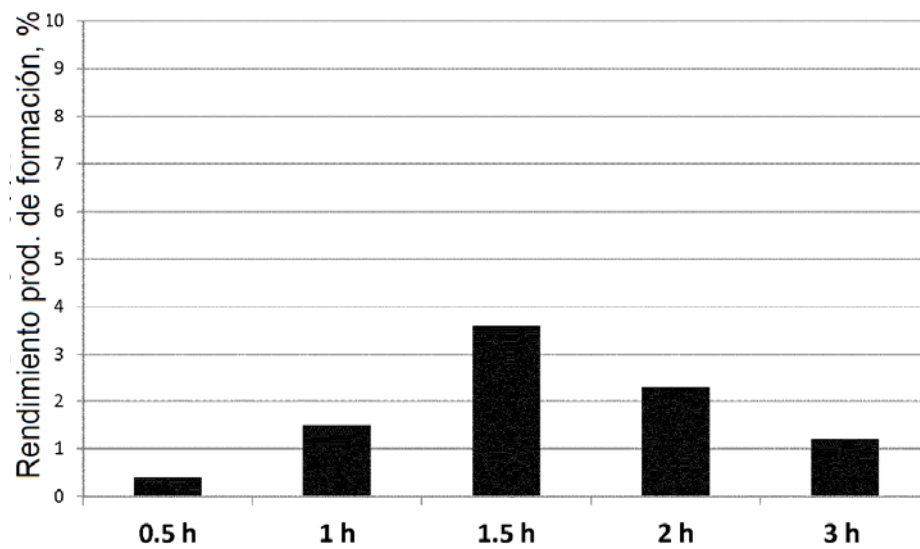


Fig. 5

