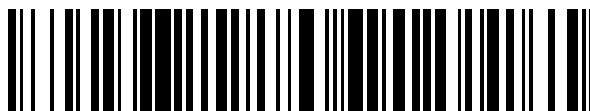


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 621**

51 Int. Cl.:

A23L 2/66 (2006.01) **A23K 20/158** (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 29/206 (2006.01)
A23L 5/44 (2006.01)
A23L 33/115 (2006.01)
A23L 33/155 (2006.01)
A23L 33/185 (2006.01)
A23K 20/174 (2006.01)
A23K 20/179 (2006.01)
A23K 20/147 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/EP2011/072690**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12084624**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11808841 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2654457**

54 Título: **Composiciones de ingredientes activos solubles en grasa que contienen complejos de proteína vegetal-polisacárido de soja**

30 Prioridad:

23.12.2010 CN 201010614218
22.07.2011 WO PCT/CN2011/001207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2019

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen , NL

72 Inventor/es:

DENG, WEI;
LEUENBERGER, BRUNO;
VIDONI, OLIVIA;
YAO, PING y
YIN, BAORU

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 711 621 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

Composiciones de ingredientes activos solubles en grasa que contienen complejos de proteína vegetal-polisacárido de soja.

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una o más proteínas vegetales, uno o más polisacáridos solubles de soja y uno o más ingredientes activos solubles en grasa. Estas composiciones se pueden usar para enriquecimiento, fortificación y/o coloración de bebidas alimentarias, pienso animal y/o productos cosméticos. La presente invención también se refiere a la preparación de dichas composiciones. La presente invención se refiere también a un procedimiento para la fabricación de una bebida mezclando las composiciones con ingredientes de bebidas.

10 Las composiciones para enriquecer, fortificar o colorear alimentos, bebidas, pienso animal o cosméticos que contienen ingredientes activos solubles en grasa, por ejemplo beta-caroteno, se conocen en la técnica. El beta-caroteno es un compuesto colorante preferible debido a su intenso y agradable color anaranjado para las aplicaciones anteriormente mencionadas. Puesto que los productos finales en los que se usan estos colorantes, nutrientes y/o aditivos son usualmente composiciones acuosas tales como bebidas, se deben añadir compuestos adicionales para evitar la separación de fases grasosas (oleosas) en el producto, que tornarían el correspondiente producto inaceptable.

15 Por lo tanto, los ingredientes activos solubles en grasa a menudo se combinan con compuestos auxiliares, tales como almidones o gelatina de pescado, con el fin de prevenir la separación de fases en la composición acuosa final. Esos compuestos auxiliares, no obstante, a menudo tienen una influencia negativa sobre las propiedades de color y nutricionales de los productos finales. Por lo tanto, se desea desarrollar nuevas composiciones de ingredientes activos solubles en grasa, que contengan compuestos auxiliares mejorados, que tengan muy buenas propiedades con respecto a gusto, capacidad de emulsión, estabilidad de la emulsión, capacidad de formación de película y/o color del producto final en el que se han de usar.

20 Se han usado proteínas como emulsionantes en productos alimentarios durante muchos años [E. Dickinson, D.J. McClements, Molecular basis of protein functionality, en: E. Dickinson, D.J. McClements (Eds.), Advances in Food Colloids, Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido, 1995, páginas 26-79]. No obstante, la capacidad de emulsión puede perderse en o cerca del punto isoeléctrico, es decir, a un pH específico de una proteína determinada en donde las cargas netas y la solubilidad de la proteína particular son mínimas. Asimismo, la estabilidad de la emulsión disminuye debido al blindaje de la repulsión electrostática de proteína en presencia de alta concentración de sales. La mayoría de las proteínas tienen un punto isoeléctrico debajo de pH 7. La mayoría de los alimentos y bebidas son ácidos; por lo tanto, una mala estabilidad de la emulsión en el punto isoeléctrico limita la aplicabilidad de las proteínas en las industrias de alimentos y bebidas.

25 La estabilidad de las emulsiones aceite en agua que contienen proteínas depende fuertemente de la densidad de carga y de la estructura del emulsionante adsorbido en la superficie de las gotitas de la emulsión. Las capas de adsorción de proteínas previenen la coalescencia gota-gota estabilizando las películas de la emulsión. No obstante, las emulsiones estabilizadas con proteínas son altamente sensibles al estrés ambiental, tal como pH y fuerza iónica [Rungnaphar Pongsawatmanit, Thepkunya Harnsilawat, David J. McClements, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 287, 59-67, 2006]. Cuando el pH acuoso se aproxima al punto isoeléctrico de una proteína y/o la concentración de sal es elevada, la repulsión electrostática de las capas de proteínas disminuye y, por ende, ocurre la precipitación de proteínas, la coalescencia de las gotitas de la emulsión y el cremado [Eric Dickinson Soft Matter, 2008, 4, 932-942].

Las proteínas como emulsionantes no funcionan eficazmente en valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico porque precipitan [N.G. Diftisa, C.G. Biliaderisb, V.D. Kiosseoglou, Food Hydrocolloids 19 (2005) 1025-1031].

35 La estabilidad de la emulsión se puede mejorar formando conjugados de proteína-polisacárido producidos a través de unión covalente [Eric Dickinson Soft Matter, 2008, 4, 932-942]. Los conjugados de proteína-polisacárido poseen mejores propiedades emulsionantes y estabilizantes estéricas, especialmente bajo condiciones en las que la proteína sola tiene poca solubilidad [Eric Dickinson Soft Matter, 2008, 4, 932-942].

40 También se han descrito mejores propiedades emulsionantes de la proteína de soja por conjugación con polisacárido [N. Diftis y V. Kiosseoglou, Food Chemistry, 81, 1, 2003; N. Diftis y V. Kiosseoglou, Food Hydrocolloids, 20, 787, 2006; N.G. Diftis, et al., Food Hydrocolloids, 19, 1025, 2005; N. Diftis y V. Kiosseoglou, Food Chemistry, 96, 228]. Las conjugaciones de proteína-polisacárido pueden mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas, especialmente a través de la reducción del tamaño de las gotitas de aceite y la estabilización de la emulsión. Estos conjugados se pueden producir por reacciones de tipo Maillard entre proteína y polisacárido o por otras reacciones. Xu y Yao, (Langmuir 2009, 25 (17), 9714-9720) también han descrito emulsiones aceite en agua preparadas a partir de conjugados de proteína de soja-dextrano. Los conjugados se adsorben en la interfaz junto

con constituyentes de proteína sin reaccionar, potenciando las fuerzas de estabilización estérica de las gotitas de aceite. Sin embargo, la reacción de tipo Maillard es un proceso que consume mucho tiempo que es poco susceptible a la reacción en escala industrial. Por consiguiente, el uso de dichos conjugados sigue siendo inadecuado en aplicaciones de alimentos y bebidas.

- 5 El documento EP2238843 describe composiciones que contienen una o más proteínas, uno o más polisacáridos y uno o más ingredientes activos solubles en grasa. Estas composiciones se pueden usar para enriquecimiento, fortificación y/o coloración de bebidas alimentarias, pienso animal y/o productos cosméticos.

10 Por lo tanto, aún existe la necesidad de composiciones que comprendan ingredientes activos solubles en grasa para enriquecimiento, fortificación y/o coloración de alimentos, bebidas, pienso animal, productos cosméticos o composiciones farmacéuticas que no presenten los problemas anteriormente mencionados.

15 Fue por lo tanto un objeto de la presente invención dar a conocer composiciones de ingredientes solubles en grasa que tengan las propiedades deseadas anteriormente indicadas, p. ej., muy buenas propiedades con respecto a claridad óptica y estabilidad de la emulsión, y/o una mejor intensidad del color y estabilidad del color (donde corresponda). Fue también un objetivo de la invención mejorar el procedimiento para la preparación de composiciones de ingredientes activos solubles en grasa.

Este objetivo ha sido resuelto con una composición que comprende:

- a) 0,1 a 70 % en peso en base a la composición de uno o más ingredientes activos solubles en grasa seleccionados del grupo que consiste en ingredientes sanitarios lipófilos; carotenoides y sus mezclas;
- 20 b) una o más proteínas vegetales seleccionadas del grupo que consiste en proteína de soja, proteína de altramuz, proteína de guisante y proteína de patata; y
- c) uno o más polisacáridos solubles de soja; en donde el ingrediente(s) sanitario lipófilo (uno o más compuestos) se selecciona del grupo que consiste en resveratrol; ligusticum; ubiquinonas y/o ubiquinoles (uno o más componentes), coenzima preferida Q 10, coenzima Q 9 y/o sus formas reducidas (los correspondientes ubiquinoles); genisteína y ácido alfa-lipoico, y
- 25 en donde la suma de la cantidad de proteína(s) y la cantidad de polisacárido(s) representa 10 a 85 % en peso en base a la composición en materia seca y, en donde la relación en peso de proteína(s) a polisacárido(s) se selecciona como 1 : b con la salvedad que b está comprendido entre 0,5 y 15.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "ingrediente activo soluble en grasa" se refiere a ingredientes sanitarios lipófilos, carotenoides y sus mezclas.

- 30 De acuerdo con la presente invención, los ingredientes sanitarios lipófilos preferidos son resveratrol; ligusticum; ubiquinonas y/o ubiquinoles (uno o más componentes) seleccionados de la coenzima Q 10 (también denominada "CoQ10"), coenzima Q 9 y/o sus formas reducidas (los correspondientes ubiquinoles); genisteína y/o ácido alfa-lipoico.

35 Los ingredientes activos especialmente preferidos de la invención son carotenoides, especialmente beta-caroteno, licopeno, luteína, bixina, astaxantina, apocarotenal, beta-apo-8'-carotenal, beta-apo-12'-carotenal, cantaxantina, criptoxantina, citranaxantina y zeaxantina. Se prefiere más especialmente beta-caroteno.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende entre 0,1 y 30 % en peso, más preferiblemente entre 0,2 y 20 % en peso, más preferiblemente entre 0,5 y 15 % en peso de uno o más ingredientes activos solubles en grasa, en base a la composición total.

- 40 De acuerdo con la presente invención, la proteína(s) vegetal deriva de soja, altramuz (p. ej., *L. albus*, *L. angustifolius* o sus variedades), guisante y/o patata. Las proteínas se pueden aislar de cualquier parte de la planta, incluidos frutos (como p. ej., frijoles de soja), semillas (incluidas semillas preparadas o procesadas) y similares; o de harina integral o productos desgrasados tales como almohadillas de cereales, copos, etc.

45 Para la composición de la presente invención, se prefieren especialmente proteína de soja y guisante, incluso más preferiblemente la proteína de soja es "proteína de soja soluble ácida" (Soyasour 4000K, con un contenido de proteína superior o igual a 60 % en peso). Más preferiblemente Soyasour 4000K, con un contenido de proteína superior o igual a 80 % en peso, humedad inferior o igual a 7,5 % en peso, grasa inferior o igual a 1,5 % en peso, pH 3,6 a 6,4) Puede provenir de Jilin Fuji Protein Co. Ltd. La fuente de proteína de guisante preferida es Cosucra SA (Warcoing, Bélgica)

La expresión "polisacárido soluble de soja", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a polisacárido soluble de soja con un contenido superior o igual a 60 % en peso de polisacáridos. El polisacárido soluble de soja más preferido es polisacárido soluble de soja con un contenido mayor o igual a 70 % en peso de polisacárido, menor o igual a 10 % en peso de proteína, menor o igual a 1 % en peso de grasa, menor o igual a 8 % en peso de humedad, menor o igual a 8 % en peso de cenizas, y un pH comprendido entre 3 y 6. Puede provenir de Fuji Co., Ltd.

Se prefiere elegir la relación en peso de proteína(s) a polisacárido(s) como 1: b con la salvedad de que b esté comprendido entre 1 y 7, más preferiblemente entre 3 y 7, lo más preferiblemente entre 4 y 5.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, los emulsionantes de polisacáridos solubles en proteína de soja se forman por calentamiento subsiguiente de la emulsión.

Por consiguiente, la invención también se refiere a un procedimiento para la elaboración de una composición emulsionante estable como se indicó anteriormente, que comprende las siguientes etapas (el procedimiento se puede llevar a cabo usando los ingredientes en las cantidades especificadas en este documento):

I) suspender la proteína en agua;

II) opcionalmente eliminar la proteína no disuelta de la suspensión de la etapa I);

III) mezclar uno o más polisacáridos solubles de soja en una relación en peso de proteína(s) a polisacárido(s) entre 1: 0,5 y 1: 15;

IV) ajustar el pH hasta un valor comprendido entre 3 y 5

V) añadir la fase orgánica, que comprende uno o más ingredientes activos solubles en grasa al complejo, en donde los ingredientes activos solubles en grasa se seleccionan del grupo que consiste en carotenoides, resveratrol; ligusticum; ubiquinonas y/o ubiquinoles (uno o más componentes), coenzima preferida Q 10, coenzima Q 9 y/o sus formas reducidas (los correspondientes ubiquinoles); genisteína y ácido alfa-lipoico,

VI) homogenizar la mezcla de la etapa V) con un procedimiento de emulsión convencional conocido por el experto en la técnica.

VII) calentar la emulsión a una temperatura comprendida entre 70 y 95°C, preferiblemente 80 y 90°C, durante por lo menos 45 minutos, preferiblemente, por lo menos 1 hora

VIII) opcionalmente secar la emulsión de la etapa VII).

De acuerdo con la presente invención, las proteínas preferidas son las proteínas vegetales anteriormente descritas.

La etapa de secado se puede llevar a cabo con cualquier proceso de secado convencional conocido por el experto en la técnica, prefiriéndose secado por pulverización y/o un procedimiento de atrapamiento de polvo en donde las gotitas de la suspensión pulverizada son atrapadas en un lecho de un adsorbente tal como silicato de calcio o almidón, o ácido silícico o carbonato de calcio y mezclas de estos, y posteriormente se secan.

La emulsión de la etapa VII) se puede usar tal como está o secarse para uso posterior. La homogeneización se puede llevar a cabo con técnicas de emulsión estándar como ultrasonificación u homogeneización a alta presión (800 a 1200 bar).

La ultrasonificación genera ondas alternantes de baja y alta presión en líquidos, conduciendo a la formación y el colapso violento de pequeñas burbujas de vacío. Este fenómeno, llamado cavitación, causa chorros de líquido de alta velocidad y fuertes fuerzas de corte hidrodinámicas, combinadas con compresión, aceleración, caída de presión e impacto, lo que causa la desintegración de partículas y la dispersión en el producto, además del mezclado de los reaccionantes (Encyclopedia of emulsion technology, 1983, Vol 1, P. Walstra, página 57, Ed P. Becher, ISBN: 0-8247-1876-3).

En el caso del procedimiento de homogeneización de alta presión, la mezcla que contiene ya las fases orgánicas y acuosas se pasa por un espacio en la válvula de homogeneización; esto crea condiciones de gran turbulencia y corte, combinadas con compresión, aceleración, caída de presión e impacto, causando la desintegración de partículas y dispersión por el producto. El tamaño de las partículas depende de la presión operativa utilizada durante el procedimiento y el tipo de espacio seleccionado. (Food and Bio Process Engineering, Dairy Technology, 2002, H.G. Kessler, Ed A. Kessler, ISBN 3-9802378-5-0).

La homogeneización más preferida para llevar a cabo la presente invención es homogeneización de alta presión de acuerdo con (Donsi et al. J. Agric. Food Chem., 2010, 58:10653-10660) en vista de la eficiencia y el alto rendimiento de esta tecnología para producir nanoemulsiones.

5 La presente invención también se refiere al uso de las composiciones anteriormente descritas para el enriquecimiento, la fortificación y/o la coloración de alimentos, bebidas, pienso animal, cosméticos o composiciones farmacéuticas.

10 Se describen bebidas en las que la composición de la presente invención se puede usar como colorante, o donde un ingrediente aditivo puede ser una bebida carbonatada, p. ej., aguas con gas saborizadas, gaseosas o bebidas minerales, además de bebidas no carbonatadas, p. ej., aguas saborizadas, jugos de frutas, ponches de frutas y formas concentradas de estas bebidas. Se pueden basar en jugos de frutas o verduras naturales o en sabores artificiales. También se describen bebidas alcohólicas y polvos para bebidas instantáneas. También se describen bebidas que contienen azúcar, bebidas dietéticas con edulcorantes no calóricos y artificiales.

15 A su vez, se describen productos lácteos obtenidos de fuentes naturales o de fuentes sintéticas, en donde la composición de la presente invención se puede usar como colorante o como ingrediente nutricional. Los ejemplos típicos de dichos productos son bebidas con leche, helado, queso, yogur y similares. Los productos en reemplazo de la leche tales como bebidas de leche de soja y productos de tofu también están comprendidos dentro de este intervalo de aplicación.

20 También se describen dulces, en donde la composición de la presente invención se puede usar como colorante o ingrediente aditivo, tal como golosinas, caramelos, gomas, postres, p. ej., helado, jaleas, budines, polvos para budines instantáneos y similares.

25 También se describen cereales, snacks, galletas, pastas, sopas y salsas, mayonesa, aderezos para ensalada y similares, en donde la composición de la presente invención se puede usar como colorante o ingrediente nutricional. Asimismo, también se describen preparaciones frutales utilizadas para lácteos y cereales. La concentración final de uno o más ingredientes activos solubles en grasa, carotenoides preferidos, especialmente beta-caroteno, que se añaden mediante las composiciones de la presente invención a los productos alimentarios, puede preferiblemente oscilar entre 0,1 y 50 ppm, particularmente entre 1 y 30 ppm, más preferiblemente entre 3 y 20 ppm, p. ej., aproximadamente 6 ppm, en base al peso total de la composición alimentaria y dependiendo del producto alimentario particular que se ha de colorear o fortificar, y del grado pretendido de coloración o fortificación.

30 Las composiciones alimentarias descritas preferiblemente se obtienen añadiendo a un producto alimentario el ingrediente activo soluble en grasa en la forma de una composición de la presente invención. Para coloración o fortificación de un alimento o producto farmacéutico, se puede usar una composición de la presente invención de acuerdo con métodos *per se* conocidos para la aplicación de formas de producto sólido dispersables en agua.

35 En general, la composición se puede añadir como una disolución madre acuosa, una mezcla de polvo seco con otros ingredientes alimentarios adecuados de acuerdo con la aplicación específica. El mezclado se puede efectuar, p. ej., empleando una mezcladora de polvo seco, una mezcladora de baja cizalladura, un homogeneizador de alta presión o una mezcladora de alta cizalladura, dependiendo de la formulación de la aplicación final. Como será obvio, dichos tecnicismos están dentro de la pericia del experto.

La invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación de una bebida que comprende las etapas de mezclar la composición de la invención con otros ingredientes usuales para bebidas.

40 Breve descripción de las figuras:

La Figura 1 muestra el resultado de DLS (dispersión dinámica de luz) en tiempo real de emulsiones digeridas durante 170 minutos.

La Figura 2 muestra (A) ζ -potencial de disolución de proteína de guisante y sobrenadante en función del pH. (B) ζ -potencial de disoluciones individuales de proteína de guisante y polisacárido de soja en función del pH.

45 La Figura 3 muestra los espectros visibles de emulsión de β -caroteno antes y después de la adición de FeCl_3 .

La Figura 4 muestra los espectros visibles de emulsión de β -caroteno antes y después de la adición de FeCl_3 . La emulsión se digirió por tripsina y pectinasa.

La presente invención se ilustra en más detalle mediante los siguientes ejemplos que no están destinados a ser limitativos.

50

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de una emulsión estable con proteína de soja/polisacárido soluble de soja

Materiales

5 La proteína de soja es de Jilin Fuji Protein Co. Ltd. (Soyasour 4000K, proteína de soja soluble ácida; ASSP) con contenido de proteína de 88 % (base seca). Posee un punto isoeléctrico de aproximadamente pH 4,7. Los polisacáridos solubles de soja (SSP) con 70 a 80 % en peso de polisacáridos provenían de Fuji Co., Ltd.

Preparación de la emulsión de proteína/polisacárido soluble de soja

10 La preparación de los complejos se lleva a cabo *in situ* en dos etapas: primero mezclando ambos productos (ASSP y SSP) antes de la homogeneización y luego calentando la emulsión hasta 80 °C para fijar la estructura creada. La proteína de soja soluble ácida (ASSP) y el polisacárido soluble de soja (SSP) se mezclan a pH 3,25 y se agitan de 3 a 4 horas. Se añade luego aceite de soja a la disolución de mezcla acuosa de ASSP-SSP. La disolución resultante se homogeneiza a temperatura ambiente con un homogeneizador (FJ200-S, Shanghai Specimen Model Co) a 10000 rpm durante 1 min. y se homogeneiza inmediatamente a 800 bar durante 2,5 min. (AH100D, ATS engineering Inc). Finalmente, la emulsión se calienta a 80 °C durante 1 hora.

15 **Medición del tamaño de partícula**

20 Se usaron muestras de emulsión recién diluidas con la misma concentración de pH y NaCl para cada medición de dispersión dinámica de luz (DLS). Las mediciones se llevaron a cabo en un aparato Malvern Autosizer 4700 (Malvern Instruments, Worcs, UK) equipado con un correlacionador de tiempo digital multi- τ (Malvern PCS7132) y un láser de estado sólido (Compass 315M-100, Coherent Inc.; potencia de salida \approx 100 mW, λ = 532 nm). Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y con un ángulo de dispersión fijo de 90°. Las funciones de la correlación del tiempo medidas se analizaron con un programa automático equipado con el correlacionador. El tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico promedio z , D_h) se obtuvo por análisis en modo automático. Se midieron dos lotes de muestras y se reportaron los datos promediados.

Ejemplo 2: Estabilidad de la emulsión con alta concentración de sal

25 La proteína de soja ASSP y el polisacárido soluble de soja SSP se mezclaron a pH 3,25. La condición de homogeneización es la siguiente: concentración de proteína 5 mg/ml, relación en peso de proteína a polisacáridos 1:5, 10 % fracción en volumen de aceite, 800 bar homogeneización durante 2,5 minutos, seguidos de un procedimiento de calentamiento o no. Después de conservar durante la noche a 4 °C, el pH de las emulsiones resultantes se ajustó a 5,0 o 6,0 y se añadió NaCl, luego las emulsiones se mantuvieron a 4 °C para investigar la estabilidad a largo plazo. La distribución del tamaño de las gotitas de las emulsiones se midió por dispersión dinámica de luz (DLS). Las muestras de DLS se prepararon diluyendo las emulsiones con disolución acuosa recién preparada que tenía el mismo valor de pH y la misma concentración de sal.

35 Después del procedimiento de calentamiento, las distribuciones del tamaño de gotita de las emulsiones no cambian significativamente en comparación con las emulsiones sin calentamiento. No obstante, sus estabilidades son diferentes, como se muestra en la Tabla 1 y en la Tabla 2. Las emulsiones calentadas exhiben una estabilidad a largo plazo en el medio con valor de pH 5,0 y 6,0 que contiene sal.

Tabla 1: Tamaño de partícula de emulsiones recién preparadas/emulsiones calentadas a pH 5 y pH 6 en diferentes concentraciones de cloruro de sodio. El experimento se repitió con dos lotes distintos rotulados (1) y (2) para evaluar la reproductibilidad de los datos.

Concentración de NaCl (M)		Tamaño de partícula, nm				
		0,02	0,05	0,1	0,15	0,20
Emulsion a pH 5	(1)	285	301	365	396	406
	(2)	284	309	378	403	412
Emulsión calentada a pH 5	(1)	255	268	292	293	306
	(2)	263	267	294	299	307
Emulsión a pH 6	(1)	343	363	435	460	486

	(2)	346	372	434	466	489
Emulsión calentada a pH 6	(1)	286	276	294	297	301
	(2)	287	279	298	304	299

5 Tabla 2: Tamaño de partícula de emulsiones/emulsiones calentadas a pH 5 y pH 6 en distintas concentraciones de cloruro de sodio después de 108 días de almacenamiento. El experimento se repitió con dos lotes diferentes rotulados (1) y (2) para evaluar la reproductibilidad de los datos. Las emulsiones no calentadas en medio de pH 5 y 6 que contenían NaCl 0,15 y NaCl 0,2 M presentaron cremado durante el almacenamiento. Las emulsiones calentadas exhibieron aspecto homogéneo después del almacenamiento.

		Tamaño de partícula, nm				
Concentración de NaCl (M)		0,02	0,05	0,1	0,15	0,20
Emulsión a pH 5	(1)	295	329	353	350	628
	(2)	301	333	359	387	625
Emulsión calentada a pH 5	(1)	289	291	309	311	322
	(2)	284	287	308	311	334
Emulsión a pH 6	(1)	383	372	513	702	805
	(2)	397	406	547	709	827
Emulsión calentada a pH 6	(1)	287	301	321	353	344
	(2)	285	304	328	351	350

Ejemplo 3: Estabilidad de la emulsión a pH distinto

10 Las emulsiones se prepararon a pH 3,25, con una concentración de proteína de 5 mg/ml y una relación en peso de proteína a polisacáridos 1:5, 10 % fracción de volumen oleoso, 800 bar homogeneización durante 2,5 minutos, calentando a 80 °C durante 1 h o sin calentar. Luego el pH de las emulsiones se ajustó hasta distintos valores, y las emulsiones se conservaron a 4 °C para investigar la estabilidad. Para las emulsiones que se sometieron al
15 procedimiento de calentamiento, las emulsiones son homogéneas en el intervalo de pH de 2-8 después de 140 y 145 días de almacenamiento. No obstante, se observó cremado para las emulsiones no calentadas en medio de pH 7 y 8 después de 20 días de almacenamiento; posteriormente también se observó cremado en las emulsiones no calentadas en medio de pH 2 y pH 6. La Tabla 3 demuestra que los tamaños aumentan a pH 2 y también aumentan de pH 5 a 8; las emulsiones no calentadas aumentan mucho más que las emulsiones calentadas antes y después del almacenamiento. El resultado que se exhibe en la Tabla 3 confirma además que el procedimiento de
20 calentamiento es necesario para aumentar la estabilidad de las emulsiones preparadas por homogeneización a alta presión.

Tabla 3: Tamaño de partícula de emulsiones en distintos pH de emulsiones recién preparadas y de emulsiones almacenadas durante 140 a 145 días. El experimento se repitió con dos lotes diferentes rotulados (1) y (2) para evaluar la reproductibilidad de los datos.

		Tamaño de partícula, nm							
pH		3,25	2	3	4	5	6	7	8
Emulsión fresca	(1)	238	400	239	239	263	327	457	507
	(2)	227	434	230	224	283	338	428	481
Emulsión después de 145 días de almacenamiento	(1)	254	634	262	271	289	425	571	654

		Tamaño de partícula, nm							
pH		3,25	2	3	4	5	6	7	8
Emulsión después de 140 días de almacenamiento	(2)	256	753	248	230	272	412	583	643
Emulsión calentada fresca	(1)	245	263	245	239	256	280	314	321
	(2)	232	283	236	229	262	284	299	314
Emulsión calentada después de 145 días de almacenamiento	(1)	264	293	266	276	289	312	344	378
Emulsión calentada después de 140 días de almacenamiento	(2)	257	304	243	250	275	312	340	367

Ejemplo 4: Tamaño de partícula de emulsiones calentadas recién preparadas realizadas con proteína de soja sola o polisacáridos solubles de soja solos en diferentes pH.

5 La estabilidad de las emulsiones preparadas con proteínas de soja solubles ácidas (ASSP) individuales y polisacáridos solubles de soja (SSP) individuales también se investigaron (ver Tabla 4) en comparación con emulsiones del complejo ASSP/SSP. Las emulsiones se prepararon en la condición de pH 3,25, concentración de proteína 5 mg/ml o concentración de polisacárido 25 mg/ml, 10 % fracción en volumen oleoso, 800 bar homogeneización durante 2,5 minutos, calentando a 80 °C durante 1 h. Luego el pH de las emulsiones se ajustó hasta diferentes valores y las emulsiones se conservaron a 4 °C. Para emulsiones de ASSP frescas, se observó cremado en el intervalo de pH de 5-8. Después de 1 semana de almacenamiento, se observó cremado en todas las muestras, excepto en la emulsión de ASSP a pH 3,25. Este resultado respalda la conclusión de que las emulsiones del complejo ASSP/ SSP son superiores a las emulsiones de ASSP y SSP individuales.

Tabla 4: Tamaño de partícula de emulsiones de SSP o ASSP recién preparadas en distintos pH. El experimento se repitió con dos lotes diferentes rotulados (1) y (2) para evaluar la reproducibilidad de los datos.

		Tamaño de partícula, nm						
pH		3,25	3	4	5	6	7	8
Emulsión de SSP calentada	(1)	519	630	1024	1088	997	980	834
	(2)	544	609	863	975	908	854	817
Emulsión de ASSP calentada	(1)	247	268	313	cremado			
	(2)	254	278	316	cremado			

Ejemplo 5: Influencia del pH del complejo proteína/polisacárido sobre la homogeneización

15 La homogeneización se llevó a cabo a distintos valores de pH para investigar la influencia de la formación del complejo sobre la estabilidad de las emulsiones. La condición de homogeneización es la siguiente: ajustar las disoluciones de ASSP y SSP hasta el pH deseado, mezclar las disoluciones de ASSP y SSP con el mismo pH, concentración de proteína 5 mg/ml, relación en peso de la proteína a polisacáridos 1:5, 10% fracción en volumen oleoso, 800 bar homogeneización durante 3-4 minutos. Los resultados que se muestran en las Tablas 5 y 6 indican que la homogeneización en el intervalo de pH de 3-4 puede producir emulsiones estables. En este intervalo de pH, ASSP y SSP forman complejos electrostáticos, indicando que la formación de complejo es esencial para producir las gotitas con la estructura de membrana del complejo ASSP/SSP en una interface aceite-agua, y un recubrimiento de SSP que estabiliza las gotitas en disolución acuosa.

Tabla 5: Resultado de DLS de emulsiones frescas homogeneizadas en distintos pH. El experimento se repitió con dos lotes diferentes rotulados (1) y (2) para evaluar la reproducibilidad de los datos.

		pH de homogenización								
		3	3,25	3,50	3,75	4	5	6	7	8
Tamaño de partícula, (nm)	(1)	224	232	227	236	242	393	-	-	-
	(2)	223	224	230	231	232	493	4532	4621	2132

Tabla 6: Resultado de DLS de las emulsiones que se muestran en la Tabla 5 después de 2 meses de almacenamiento. El experimento se repitió con dos lotes distintos rotulados (1) y (2) para evaluar la reproducibilidad de los datos.

		pH de homogenización								
		3	3,25	3,50	3,75	4	5	6	7	8
Tamaño de partícula, (nm)	(1)	220	229	223	235	211	Cremado	-	-	-
	(2)	225	228	227	219	220	Cremado			

5

Ejemplo 6: Digestión del SSP en la emulsión con enzima

La emulsión se preparó a pH 3,25, concentración de proteína 5 mg/ml, relación en peso de proteína a polisacáridos 1:5, 10 % fracción en volumen oleoso, 800 bar homogeneización durante 2,5 minutos y calentamiento a 80 °C durante 1 h como en el ejemplo 1. Luego, el polisacárido de soja en la emulsión se hidrolizó por pectinasa. Para monitorear el cambio de tamaño por medición de DLS en tiempo real, la hidrólisis se llevó a cabo a 25°C y pH 5,0 para reducir la tasa de hidrólisis. Durante la medición de DLS, se añadió una disolución de 3 µl de disolución al 0,5% de pectinasa en una cubeta de poliestireno que contenía emulsión diluida que se preparó diluyendo 5 µl de emulsión original con 3 ml de disolución acuosa a pH 5,0. Luego se midió el tamaño de las gotitas cada 10 min durante los primeros 80 min, y cada 15 min durante otros 90 min. Los datos que se muestran (Figura 1) revelan que el tamaño de la gotita disminuye de 262 nm a 219 nm y se estabiliza. A partir de la disminución del valor de D_h antes y después de la digestión, podemos estimar que la capa de polisacárido de las gotitas es de aproximadamente 22 nm.

10

15

Ejemplo 7: Solubilidad de proteína de guisante en disolución acuosa

Se disolvió proteína de guisante ((Pisane® F9) de CosucroSA Bélgica) en agua con una concentración aparente de 22 mg/ml. La disolución se ajustó hasta pH 1 a 10 con disolución de NaOH o HCl. Después de equilibrar durante la noche, las disoluciones se centrifugaron a 5000 rpm o 7800 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes se liofilizaron y luego los polvos se pesaron para estimar la solubilidad de la proteína de guisante a distinto pH. Los datos se muestran en la Tabla 7.

20

Tabla 7: Solubilidad de la proteína de guisante en el intervalo de pH de 1 a 10. La concentración original de proteína de guisante fue 22 mg/ml.

pH	Concentración de proteína de sobrenadante (mg/ml)	
	Centrifugación a 7800 rpm	Centrifugación a 5000 rpm
1	13,2	19,2
2	13,8	19,8
3	5,0	16,0
4	2,4	2,4
5	2,4	2,2
6	3,4	3,8
6.8	-	16,0±0,9 ^a

pH	Concentración de proteína de sobrenadante (mg/ml)	
	Centrifugación a 7800 rpm	Centrifugación a 5000 rpm
7	12,8	17,8
8	12,4	18,8
9	12,8	18,5
10	13,9	19,4

^a El pH original de la disolución acuosa de proteína es 6,8; la referencia representa un valor medio (n = 6).

La Tabla 7 muestra que las concentraciones de proteína son aproximadamente 2 mg/ml a pH 4 y 5, cerca del punto isoeléctrico de la proteína de guisante. A pH 1-3 y 7-10, después de la centrifugación a 5000 rpm, las concentraciones de proteína son aproximadamente 40% más altas que aquellas después de la centrifugación a 7800 rpm. Este resultado indica que la parte principal de la proteína consiste en agregados dispersables. La solubilidad de la proteína de guisante a pH 3,0 y 4,0 es mucho menor que la proteína de soja soluble ácida, que permanece en 20 mg/ml después de centrifugación a 10000 rpm a pH 3,0 y 4,0 para 23 mg/ml de disolución original.

Preparamos también una disolución de proteína de guisante de 50 mg/ml, luego cambiamos el pH a 3,0 y 3,25 para investigar la solubilidad. Los datos de la Tabla 8 revelan que a pH 3,25, después de la centrifugación a 5000 rpm durante 30 min, se eliminaron aproximadamente 67% de los agregados de proteína.

Tabla 8: Solubilidad de la proteína de guisante en disolución de pH 3,0 y 3,25. La concentración de proteína original fue 50 mg/ml. La disolución de proteína se ajustó hasta pH 3,0 o 3,25, luego se centrifugó durante 30 min.

pH	Concentración de proteína (mg/ml)	
	Centrifugación a 7800 rpm	Centrifugación a 5000 rpm
3,0	18,2	19,2
3,25	15,2	16,3

Ejemplo 8: ζ -potenciales de la disolución de proteína de guisante

Los ζ -potenciales de la disolución de proteína de guisante antes y después de la centrifugación a 5000 rpm no son significativamente diferentes (Figura 2A). La Figura 2B muestra los ζ -potenciales de las disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja. El ζ -potencial cero de la proteína de guisante es aproximadamente pH 4,8. La proteína de guisante y el polisacárido de soja portan cargas opuestas en el intervalo de pH de 3,0 a 4,8, en este intervalo de pH, la proteína de guisante y el polisacárido de soja pueden formar complejos electrostáticos.

Ejemplo 9: Emulsiones del complejo de proteína de guisante/polisacárido de soja preparadas a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación

La disolución madre del polisacárido de pH 3,25 se diluyó con la disolución acuosa del mismo pH seguida por 0,5 h de agitación. Luego, se añadió la disolución madre de proteína de guisante de pH 3,25 (sin centrifugación). La concentración de proteína final en la disolución mixta fue 5 mg/ml, la relación en peso (WR) de proteína a polisacárido fue 1:5. Después de agitar la disolución acuosa mixta durante 3,5 h, se añadió aceite de soja para alcanzar una fracción volumétrica de 10%. La mezcla se pre-emulsionó usando un homogeneizador (FJ200-S, Shanghai Specimen Model Co.) a 10000 rpm durante 1 minuto, y se emulsionó inmediatamente usando un homogeneizador de alta presión (AH100D, ATS Engineering Inc.) a 850 bar durante 4 min, seguido de tratamiento con calor a 80 °C durante 1 h. Después de almacenar durante toda la noche a 4 °C, las emulsiones resultantes se ajustaron a diferentes valores de pH y se añadió NaCl. Las emulsiones que contenían el valor de pH y la concentración de NaCl designados se almacenaron a 4 °C para investigar la estabilidad. El resultado de la dispersión dinámica de luz (DLS) de las emulsiones se muestra en la Tabla 9. Después de 26 días de almacenamiento, las emulsiones fueron homogéneas. Después de almacenar más, las emulsiones en el medio que contenía NaCl 0,2 M presentaron cremado. Las emulsiones en el medio de pH 5 y 6 sin sal presentaron una pequeña capa de suero en el fondo. La capa de suero es inferior a 10% en comparación con el volumen total de la emulsión después de 180 días de almacenamiento.

Tabla 9: Resultado de DLS de las emulsiones del complejo preparadas a pH 3,25 a partir de proteína de guisante sin centrifugación al comienzo del experimento y después de 26 días de almacenamiento. La emulsión se calentó a 80 °C durante 1 h. El experimento se repitió con dos lotes diferentes rotulados (1) y (2) para evaluar la reproducibilidad de los datos.

Muestra		Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH3,25 (pH emulsionante)	(1)	40	284	0,14
	(2)	36	280	0,21
pH5	(1)	37	319	0,25
	(2)	40	309	0,27
pH6	(1)	38	321	0,26
	(2)	43	306	0,23
pH5+ NaCl 0,2M	(1)	36	312	0,27
	(2)	37	325	0,29
pH6+ NaCl 0,2M	(1)	36	316	0,26
	(2)	32	322	0,27

5

Después de 26 días de almacenamiento:

Condición de almacenamiento		Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH3,25 (pH emulsionante)	(1)	55	275	0,13
	(2)	52	264	0,10
pH5	(1)	57	320	0,19
	(2)	55	315	0,22
pH6	(1)	55	353	0,20
	(2)	41	341	0,16
pH5+ NaCl 0,2M	(1)	33	379	0,22
	(2)	32	361	0,22
pH6+ NaCl 0,2M	(1)	39	414	0,28
	(2)	39	380	0,20

10 Cambiamos la temperatura de calentamiento a 90 °C durante 1 h con el fin de hacer que las películas interfaciales
aceite-agua fuesen más estables. La otra condición emulsionante es la misma que se describió anteriormente.
Después de emulsionar y calentar a pH 3,25, la emulsión se cambió a pH 4, 5, 6, y se añadió NaCl para investigar la
estabilidad. Después de 94 días de almacenamiento en el intervalo de pH de 3,25 a 6, las emulsiones tuvieron
aspecto homogéneo y los tamaños de las gotitas fueron inferiores a 350 nm (Tabla 10). Para las emulsiones
almacenadas en el medio de sal durante 94 días, apareció cremado. Este resultado demuestra que las emulsiones
son estables en el intervalo de pH de 3,25 a 6 que se puede usar en las bebidas sin sal. En el siguiente estudio, las
15 emulsiones se calentaron a 90 °C durante 1 h.

Además de emulsionar a pH 3,25, la emulsión también se llevó a cabo a pH 3,0, 3,5, 3,75 y 4,0. Las emulsiones
resultantes producidas en el intervalo de pH de 3,5 a 4,0 no son estables debido a la solubilidad inferior de la
proteína de guisante en este intervalo de pH. La emulsión producida a pH 3,0 no es tan estable como a pH 3,25.

Tabla 10: Resultado de DLS de las emulsiones del complejo preparadas a pH 3,25 a partir de proteína de guisante sin centrifugación. La emulsión se calentó a 90 °C durante 1 h. Se muestran resultados de material recién preparado y después de 94 días.

Muestra	Condición de almacenamiento	Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH 3,25 (pH emulsionante)	Recién preparada	58	265	0,15
	Después de 94 días	29	257	0,15
pH 4	Recién preparada	59	260	0,18
	Después de 94 días	25	241	0,16
pH 5	Recién preparada	53	273	0,16
	Después de 94 días	28	289	0,09
pH 6	Recién preparada	58	309	0,18
	Después de 94 días	28	335	0,10
pH 4 + NaCl 0,2M	Recién preparada	46	286	0,20
	Después de 94 días	Cremado		
pH 5 + NaCl 0,2M	Recién preparada	46	313	0,20
	Después de 94 días	Cremado		
pH 6 + NaCl 0,2M	Recién preparada	41	320	0,21
	Después de 94 días	Cremado		

5 **Ejemplo 10:** Emulsiones del complejo proteína de guisante/polisacárido de soja preparadas a partir de disolución de proteína de guisante centrifugada a pH 3,25

10 Con el fin de producir una emulsión estable en medio de sal, producimos emulsiones a partir de disolución de proteína que se había centrifugado a pH 3,25 para eliminar agregados no discernibles. La concentración de proteína final en disolución acuosa es aproximadamente 4 mg/ml, y del polisacárido es 25 mg/ml. La otra condición es la misma que anteriormente. El tamaño de las gotitas de las emulsiones resultantes se expone en la Tabla 11. Las emulsiones fueron homogéneas después de 87 días de almacenamiento a pH 5 y 6 con y sin NaCl 0,2 M; el tamaño de la gotita (D_h) no cambia significativamente después del almacenamiento en medio diferente.

Tabla 11: Resultados de DLS de las emulsiones del complejo preparadas a pH 3,25 a partir de dos muestras determinadas. Las muestras se midieron recién preparadas y después de 87 días de almacenamiento.

Muestra	Almacenamiento	Muestra 1 ^a			Muestra 2 ^b		
		Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH 3,25 (pH emulsionante)	Fresca	58±7	260±3	0,12±0,02	47±7	269±0	0,17±0,02
	87 días	35±3	287±1	0,18±0,02	33±2	294±1	0,19±0,01
pH 5	Fresca	46±12	258±1	0,16±0,06	54±8	266±5	0,17±0,01
	87 días	33±2	289±9	0,13±0,07	31±2	303±6	0,16±0,01
pH 6	Fresca	46±13	296±3	0,12±0,01	52±6	300±3	0,14±0,01
	87 días	29±1	290±2	0,22±0,02	31±3	324±9	0,18±0,01
pH5+ NaCl 0,2M	Fresca	38±2	276±0	0,16±0,03	34±0	276±4	0,16±0,02
	87 días	22±0	262±11	0,28±0,02	27±2	277±5	0,17±0,02

Muestra	Almacenamiento	Muestra 1 ^a			Muestra 2 ^b		
		Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH6+ NaCl 0,2M	Fresca	42±5	278±5	0,17±0,04	38±3	280±5	0,17±0,02
	87 días	21±1	271±16	0,25±0,05	28±0	311±3	0,21±0,01

^a La disolución madre de proteína con una concentración de 50 mg/ml se ajustó hasta pH 3,25, luego se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min.

^b La centrifugación se llevó a cabo a 7800 rpm en lugar de 5000 rpm.

5 **Ejemplo 11:** Emulsiones del complejo proteína de guisante/polisacárido de soja preparadas a partir de disolución de proteína de guisante centrifugada a pH 6,8.

Con el fin de aumentar la tasa de utilización de la proteína de guisante y de obtener además una emulsión estable en medio salino, cambiamos el pH de centrifugación. La disolución de proteína de guisante original tiene pH 6,8, y la disolución de polisacárido de soja original tiene pH 5,3. Centrifugamos la disolución de proteína a pH 6,8, en este pH, la tasa de utilización de la proteína es aproximadamente 73%. Luego mezclamos la disolución de proteína con disolución de polisacárido de soja que tenía pH 5,3 (sin ajustar el pH), o las mezclamos a pH 7,0 (ajustando el pH). La mezcla de proteína/polisacárido se ajustó adicionalmente hasta pH 3,75. La Tabla 12 no muestra precipitados a pH 3,75, lo que indica que el polisacárido puede proteger la proteína contra precipitación. La mezcla se mezcló a pH 7,0, luego se cambió hasta pH 3,75 con tamaño de partícula más pequeño y mayor intensidad, lo cual indica una mejor formación de complejo entre la proteína y el polisacárido. Al mezclar a pH 5,3, los agregados de proteína pueden inhibir la unión de la proteína con el polisacárido. Las mezclas de la Tabla 12 se usaron para producir emulsiones a pH 3,25; el tamaño de la gotita se muestra en la Tabla 13. A medida que se mezclaba la disolución, el complejo de proteína de guisante/polisacárido de soja a pH 7,0 produjo gotitas más pequeñas, adoptamos la siguiente condición para producir emulsiones en el siguiente estudio: se centrifugó disolución de proteína de guisante de pH 6,8 a 5000 rpm durante 30 min, el pH del sobrenadante resultante y el pH de la disolución de polisacárido de soja se ajustaron hasta pH 7,0, respectivamente, después se mezclaron las disoluciones de proteína y polisacárido a pH 7,0, luego se cambió la mezcla a pH emulsionante.

Tabla 12: Resultados de DLS de la disolución del complejo a pH 3,75. La disolución de proteína se centrifugó a pH 6,8. Las disoluciones de proteína y polisacárido se mezclaron a diferente pH.

Muestra	Concentración de proteína (mg/ml) ^a	Concentración de polisacárido (mg/ml) ^a	WR ^b	Intensidad	D _h (nm)	PDI
Mezcla – ajustada ^c	5	25	1:5	152±12	759±57	1,00
Mezcla – no ajustada ^d				139±16	1460±51	1,00

25 ^a La concentración de muestras de DLS. ^b La relación en peso de proteína a polisacárido.

^c Ambas disoluciones de proteína y polisacárido se ajustaron a pH 7,0 antes de mezclar.

^d El pH no ajustado antes de mezclar.

Tabla 13: Resultados de DLS de las emulsiones preparadas a pH 3,25 a partir de las mezclas que se muestran en la Tabla 12.

pH emulsionado	Muestra	Intensidad	D _h (nm)	PDI
3,25	Ajustada	29±3	301±9	0,20±0,02
	No ajustada	28±2	319±10	0,22±0,05

30 Investigamos también la disolución del complejo con diferentes relaciones en peso de proteína de guisante a polisacárido de soja (WR). Los datos de la Tabla 14 respaldan además que la formación de complejo puede destruir los agregados de proteína individual y polisacárido individual, formando partículas de complejo más pequeñas.

Tabla 14: Resultados de DLS de disoluciones de proteína, polisacárido y complejo de proteína/polisacárido a pH 3,75. Tanto las disoluciones de proteína como de polisacárido se ajustaron a pH 7,0 antes de mezclar; luego la mezcla se cambió a pH 3,75.

Muestra	Concentración de proteína (mg/ml)	Concentración de polisacárido (mg/ml)	Intensidad	D _n (nm)	PDI
proteína	5	0	126±3	1122±48	0,52±0,48
polisacárido	0	25	30±5	704±2	1,00
WR 2:1	5	2,5	145±12	178±2	0,60±0,01
WR 1:1	5	5	146±16	190±7	0,59±0,08
WR 1:2	5	10	136±21	334±59	0,81±0,08
WR 1:3	5	15	130±9	397±42	0,62±0,10
WR 1:4	5	20	127±8	590±129	0,92±0,04
WR 1:5	5	25	121±9	741±137	0,82±0,18
WR 1:6	5	30	134±17	928±110	0,92±0,08

- 5 **Ejemplo 12:** Emulsiones del complejo de proteína de guisante/polisacárido preparadas a partir de disolución de proteína de guisante centrifugada a pH 6,8. Las disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja se ajustaron hasta pH 7,0 antes de mezclar.

En el estudio que sigue, el procedimiento de producción de las emulsiones es el siguiente. Se centrifugó disolución acuosa de proteína de guisante (pH 6,8) a 5000 rpm durante 30 min. Las disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja se ajustaron hasta pH 7,0, respectivamente, luego se mezclaron y agitaron durante 2 h. La mezcla se ajustó adicionalmente hasta pH emulsionante. Después de agitar durante otras 4 h, se añadió aceite de soja hasta 10% fracción en volumen. La mezcla se pre-emulsionó usando un homogeneizador a 10000 rpm durante 1 minuto, y se emulsionó inmediatamente usando un homogeneizador de alta presión a 800 bar durante 3 min, seguido de tratamiento con calor a 90 °C durante 1 h. Después de almacenar durante la noche a 4 °C, las emulsiones resultantes se ajustaron a diferentes valores de pH y se añadió NaCl. Las emulsiones que contenían el valor de pH y la concentración de NaCl designados se almacenaron a 4 °C para investigar la estabilidad.

(1) Influencia del pH emulsionante

Las emulsiones del complejo se produjeron en el intervalo de pH de 2,5 a 7. Los resultados de DLS (Tabla 15) indican que las emulsiones producidas en el intervalo de pH de 3,5 a 4,25 son estables en medio de pH 5 y 6 con NaCl 0,2 M; las emulsiones fueron homogéneas después del almacenamiento. En el intervalo de pH de 3,5 a 4,25, la atracción electrostática es más fuerte entre la proteína y el polisacárido, como se muestra en la Figura 2, lo cual beneficia la formación de complejo. En el siguiente estudio, utilizamos pH 3,75 como pH emulsionante.

Tabla 15: Tamaños de gotitas de las emulsiones del complejo producidas a diferente pH. La concentración de proteína fue 5 mg/ml y la WR fue 1:5 en disolución acuosa. Las mediciones se efectuaron en material recién preparado, y dependiendo de los lotes, después de 29, 37 o 52 días (d) de almacenamiento.

pH emulsionante	Almacenamiento	Tal como se preparó	pH 5	pH 6	pH 5 + NaCl 0,2M	pH 6 + NaCl 0,2M
2,50	fresca	732±31	2372±192	2042±35	4686±373	3995±353
3,00	fresca	328±6	331±10	347±6	818±109	662±2
	37d	305	336	293	337	536
	52 d	301	288	375	534	463
3,25	fresca	299±13	298±13	324±10	465±54	442±49
	37d	265	279	306	337	395

pH emulsionante	Almacenamiento	Tal como se preparó	pH 5	pH 6	pH 5 + NaCl 0,2M	pH 6 + NaCl 0,2M
	52 d	289	312	363	369	452
3,50	fresca	302±18	299±4	321±5	383±3	375±3
	37d	264	308	300	330	389
	52 d	291	308	359	411	429
3,75	fresca	292±17	295±11	314±5	333±9	346±19
	37d	253	262	266	268	292
	52 d	286	310	367	370	399
4,00	fresca	291±15	309±7	328±15	360±25	348±9
	37d	245	270	284	270	318
	52 d	300	327	382	403	437
4,25	fresca	288±3	300±1	321±5	350±1	352±3
	37d (1)	268	281	313	345	422
	37 d (2)	266	288	337	347	387
4,50	fresca	306±8	326±9	354±8	473±20	448±18
	37d (1)	316	320	356	534	613
	37 d (2)	303	291	322	501	532
5,00	fresca	555±13	566±6	597±13	1156±15	950±0
	29 d (1)	595	523	558	Cremado	
	29 d (2)	621	600	501	Cremado	
6,00	fresca	Cremado	-			
7,00	fresca					

(2) Influencia de la relación en peso de proteína de guisante a polisacárido de soja (WR)

Fijación de la concentración de proteína a 5 mg/ml y cambio de la concentración de polisacárido de 2,5 a 30 mg/ml, es decir cambio de WR de 2:1 a 1:6. La Tabla 16 indica que cuando la WR está en el intervalo de 1:2 a 1:6, el tamaño de la gotita no es influenciado por el ambiente en forma significativa, lo que sugiere que las gotitas de aceite han sido cubiertas por suficiente polisacárido. Escogimos las WR 1:4 y 1:5 para más estudios.

5

Tabla 16: Resultado de DLS de las emulsiones del complejo producidas a pH 3,75 con diferente WR. La concentración de proteína fue 5 mg/ml.

Muestra	Tal como se preparó (pH 3,75)			Ajustada a pH 5		
	Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
WR2:1	16±2	567±9	0,54±0,01	22±2	624±49	0,38±0,23
WR1:1	34±8	367±27	0,23±0,01	38±2	350±10	0,15±0,10
WR1:2	53±4	292±11	0,12±0,01	48±1	279±3	0,14±0,01

ES 2 711 621 T3

WR1:3	48±8	284±12	0,13±0,03	48±2	282±5	0,14±0,02
WR1:4	48±4	280±13	0,12±0,01	50±4	284±2	0,15±0,07
WR1:5	52±8	288±12	0,15±0,01	52±4	296±4	0,15±0,03
WR1:6	57±3	281±11	0,14±0,05	52±3	298±6	0,14±0,03

Muestra	Ajustada a pH 6			Ajustada a pH 5 + NaCl 0,2M		
	Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
WR2:1	19±1	618±24	0,64±0,02	19±3	2816±344	1,00±0
WR1:1	36±1	342±14	0,20±0,08	26±2	1522±689	0,62±0,38
WR1:2	49±1	284±1	0,09±0,07	40±2	358±15	0,13±0,08
WR1:3	51±3	301±9	0,12±0,05	44±4	331±9	0,10±0,03
WR1:4	49±1	312±14	0,12±0,06	43±2	326±14	0,12±0,07
WR1:5	46±1	323±6	0,09±0,07	44±2	322±8	0,10±0,08
WR1:6	54±5	329±14	0,12±0,04	45±2	310±10	0,14±0,07

Muestra	Ajustada a pH 6 + NaCl 0,2M		
	Intensidad	D _h (nm)	PDI
WR2:1	14±1	1538±369	0,70±0,30
WR1:1	26±1	850±251	58±0,42
WR1:2	42±2	354±9	0,13±0,08
WR1:3	40±2	338±13	0,12±0,02
WR1:4	43±0	335±18	0,14±0,05
WR1:5	38±2	331±11	0,15±0,08
WR1:6	45±3	331±15	0,12±0,05

(3) Influencia de la homogeneización a alta presión (HPH)

- 5 Cambiamos la presión de homogeneización de 800 a 1200 bar. Los datos en la Tabla 17 demuestran que la presión no tiene influencia significativa sobre el tamaño de gotita y la estabilidad de las emulsiones. En el siguiente estudio, fijamos la condición de HPH a 800 bar durante 3 min.

Tabla 17: Resultado de DLS de las emulsiones del complejo producidas a pH 3,75 con distintas condiciones de HPH. La concentración de proteína fue 5 mg/ml.

Muestra	WR	pH3,75 (tal como se preparó)	Ajustada a pH 5				
			Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)
800-3	1:4	47±3	265±1	0,14±0,03	38±8	278±13	0,17±0,02
	1:5	45±2	281±3	0,17±0,03	30±8	295±3	0,16±0,03

1000-3	1:4	52±11	270±6	0,16±0,01	40±4	280±0	0,16±0,02
	1:5	51±1	275±4	0,12±0,04	34±2	287±1	0,15±0,05
1200-3	1:4	44±12	258±1	0,12±0,04	48±8	264±4	0,16±0,04
	1:5	56±2	266±3	0,13±0,03	38±10	275±0	0,16±0,02
Muestra	WR	Ajustada a pH 6	Ajustada a pH 5 + NaCl 0,2M				
		Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
800-3	1:4	42±8	283±5	0,14±0,05	40±6	311±14	0,20±0,02
	1:5	28±9	311±3	0,21±0,07	37±5	315±3	0,19±0,02
1000-3	1:4	36±5	299±2	0,18±0,05	38±2	306±1	0,16±0,02
	1:5	40±7	306±13	0,19±0,02	40±2	308±2	0,12±0,01
1200-3	1:4	48±8	272±5	0,12±0,03	37±5	302±7	0,18±0,01
	1:5	38±14	282±18	0,16±0,02	40±10	292±2	0,16±0,02
Muestra	WR	Ajustada a pH 6 + NaCl 0,2M					
		Intensidad	D _n (nm)	PDI			
800-3	1:4	44±6	314±13	0,18±0,02			
	1:5	38±8	332±10	0,22±0,03			
1000-3	1:4	40±4	312±2	0,19±0,04			
	1:5	34±2	321±2	0,18±0,01			
1200-3	1:4	42±4	298±10	0,14±0,02			
	1:5	42±1	305±0	0,18±0,03			

^a Las muestras preparadas bajo diferentes condiciones de HPH. Las cifras representan el valor de la intensidad de presión y la duración del proceso HPH. Por ejemplo, 800-3 indica que la muestra se homogeneizó a 800 bar durante 3 min.

(4) Influencia del tratamiento con calor

- 5 La emulsión producida a pH 3,75, 800 bar durante 3 min a partir de complejos con WR 1:4 con una concentración de proteína de 5 mg/ml se dividió en 2 partes. Una se calentó a 90°C por 1h, la otra no. Luego las emulsiones se cambiaron a pH 2 a 8 y se añadió NaCl 0,2 M. Los datos de la Tabla 18 indican que las emulsiones calentadas son estables contra cambios de pH y concentración salina. El calentamiento puede inducir la desnaturalización de la proteína y formar películas interfaciales aceite-agua irreversibles compuestas por proteína de guisante y polisacárido de soja. Durante el almacenamiento en diferentes medios, las emulsiones no calentadas presentaron cremado en todos los medios que contenían sal, y también cremado en medio de pH 7 y 8 sin sal. Por el contrario, las emulsiones calentadas son homogéneas en todos los medios con y sin sal. La Tabla 18 también muestra que las emulsiones no calentadas son estables en el intervalo de pH de 3 a 5, las emulsiones son homogéneas y los tamaños de las gotitas no cambian después del almacenamiento. Este resultado sugiere que la emulsión no calentada puede encapsular compuestos bioactivos lipófilos sensibles al calor y que la emulsión se puede usar en bebidas sin sal.
- 10
- 15

ES 2 711 621 T3

Tabla 18: Resultados de DLS de las emulsiones del complejo preparadas a pH 3,75, 800 bar durante 3 min a partir de complejos con WR 1:4 con una concentración de proteína de 5 mg/ml. El calentamiento tuvo lugar a 90 °C durante 1 h. Las mediciones se realizaron en material recién preparado después de 92 días de almacenamiento.

pH ajustado	Almacenamiento	Emulsiones no calentadas			Emulsiones calentadas		
		Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
pH2	fresca	30±3	390±12	0,30±0,04	30±4	312±12	0,22±0,02
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	41±1	362±3	0,26±0,01
pH3	fresca	38±2	271±4	0,11±0,03	37±5	282±6	0,17±0,02
	92 días	54±1	289±2	0,11±0	-	-	-
	99 días	-	-	-	49±1	280±4	0,15±0,01
pH4	fresca	38±4	270±8	0,17±0	38±3	274±4	0,18±0,06
	92 días	50±5	304±6	0,17±0,02	-	-	-
	99 días	-	-	-	49±1	279±1	0,17±0,01
pH5	fresca	38±4	280±3	0,16±0,01	36±1	280±8	0,23±0,01
	92 días	44±1	327±14	0,13±0,01	-	-	-
	99 días	-	-	-	50±1	301±2	0,20±0
pH6	fresca	28±3	364±8	0,27±0,10	37±1	320±25	0,26±0,08
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	45±1	323±1	0,15±0,07
pH7	fresca	24±1	495±41	0,26±0,03	34±2	316±14	0,17±0,01
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	50±3	351±2	0,21±0,02
pH8	fresca	22±6	514±26	0,47±0,07	38±1	326±10	0,17±0,02
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	37±3	573±8	0,24±0,05
pH2+NaCl 0,2 M	fresca	19±0	1036±152	1,00±0	24±2	342±3	0,24±0,02
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	38±1	400±421	0,18±0,02
pH3+NaCl 0,2 M	fresca	26±2	342±12	0,20±0,08	28±1	312±6	0,21±0
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	34±3	344±31	0,17±0,05
pH4+NaCl	fresca	30±1	297±1	0,20±0,04	30±0	293±1	0,15±0,01

		Emulsiones no calentadas			Emulsiones calentadas		
pH ajustado	Almacenamiento	Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
0,2 M	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	37±1	338±3	0,17±0,01
pH5+NaCl 0,2 M	fresca	21±2	479±28	0,41±0,07	26±0	316±6	0,20±0,05
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	35±2	355±1	0,13±0
pH6+NaCl 0,2 M	fresca	20±2	740±70	0,74±0,26	26±2	320±1	0,25±0,04
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	38±2	364±5	0,16±0,04
pH7+NaCl 0,2 M	fresca	20±0	692±24	0,62±0,04	28±2	323±8	0,20±0,07
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	34±0	343±11	0,17±0
pH8+NaCl 0,2 M	fresca	15±0	680±44	0,96±0,04	29±0	336±2	0,19±0,01
	92 días	Cremado			-	-	-
	99 días	-	-	-	Cremado		

Ejemplo 13: Emulsiones del complejo de proteína de guisante/polisacárido de soja preparadas a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación. Las disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja se ajustaron a pH 7,0 antes de mezclar.

- 5 1) emulsiones preparadas a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación.

Las disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja se ajustaron a pH 7,0, respectivamente, luego se mezclaron y agitaron durante 2 h. La concentración de proteína fue 5 mg/ml y la WR fue 1:4. La mezcla se ajustó además hasta pH emulsionante. Después de agitar durante otras 4 h, se añadió aceite de soja hasta 10% fracción en volumen. La mezcla se pre-emulsionó usando un homogeneizador a 10000 rpm durante 1 minuto, y se emulsionó inmediatamente usando un homogeneizador de alta presión a 800 bar durante 4 min, seguido de un tratamiento con calor a 90 °C durante 1 h. Después de almacenar durante toda la noche a 4 °C, las emulsiones resultantes se ajustaron hasta distintos valores de pH y se añadió NaCl. Las emulsiones que contenían el valor de pH y la concentración de NaCl designados se almacenaron a 4 °C para investigar la estabilidad (Tabla 19). Investigamos también la estabilidad de las emulsiones producidas a pH 3,5 y 3,75 en distintos medios (Tabla 20). Los datos de las Tablas 19 y 20 indican que las emulsiones preparadas a partir de disolución de proteína de guisante no centrifugada son estables contra cambios de pH y concentración salina.

Tabla 19: Tamaño de gotitas de las emulsiones del complejo preparadas a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación.

pH emulsionante	Tal como se preparó	pH 5	pH 6	pH 5 + NaCl 0,2M	pH 6 + NaCl 0,2M
3,0	261	300	309	381	349
3,25	265	301	306	349	345
3,5	263	294	305	320	305
3,75	236	319	327	328	323
4,0	245	316	320	345	329

Tabla 20: Resultados de DLS de las emulsiones del complejo preparadas a pH 3,5 a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación.

Emulsión calentada:						
Condición de almacenamiento	Emulsión calentada fresca			Después de 55 días de almacenamiento		
	Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
Tal como se preparó (pH 3,5)	32±2	267±6	0,16±0,01	52±2	278±3	0,11±0,01
pH2	28±2	326±7	0,17±0,03	41±1	370±6	0,22±0,02
pH 3	31±1	276±4	0,13±0,01	49±1	279±1	0,16±0,03
pH 4	33±2	250±15	0,16±0,03	48±2	282±1	0,14±0,01
pH 5	31±1	300±11	0,14±0,04	46±1	301±3	0,14±0,04
pH 6	31±1	306±3	0,18±0,02	48±6	319±4	0,20±0,01
pH 7	30±0	327±1	0,17±0,02	41±4	323±16	0,19±0,01
pH 8	27±5	311±7	0,20±0,01	45±4	341±6	0,21±0,01
pH 2+NaCl 0,2M	27±0	322±4	0,22±0,01	29±3	353±13	0,17±0,10
pH 3+NaCl 0,2M	29±1	291±0	0,16±0,02	36±1	321±13	0,15±0,01
pH 4+ NaCl 0,2M	30±3	280±6	0,20±0,03	38±10	298±13	0,11±0,02
pH 5+ NaCl 0,2M	27±2	300±2	0,16±0,01	37±11	336±16	0,15±0,04
pH 6+ NaCl 0,2M	29±1	300±1	0,18±0,01	34±7	367±12	0,21±0
pH 7+ NaCl 0,2M	29±1	309±8	0,20±0,01	31±3	438±11	0,23±0,04
pH 8+ NaCl 0,2M	28±0	307±3	0,17±0,02	36±6	457±18	0,26±0,04
Emulsión no calentada:						
Condición de almacenamiento	Emulsión no calentada fresca			Después de 55 días de almacenamiento		
	Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
Tal como se preparó (pH 3,5)	32±0	255±2	0,15±0,01	55±1	287±3	0,14±0,01
pH2	20±2	529±3	0,58±0,05		Cremado	
pH 3	30±2	263±4	0,16±0,04	55±1	289±1	0,13±0,01
pH 4	30±5	250±6	0,17±0,02	54±1	296±4	0,17±0,01
pH 5	27±3	303±6	0,12±0,05	50±0	341±4	0,21±0,02
pH 6	21±3	421±24	0,22±0,07			
pH 7	17±3	611±147	0,59±0,29		Cremado	
pH 8	15±2	668±229	0,75±0,25			
pH 2+0,2M NaCl	14±1	965±110	1,0±0			

ES 2 711 621 T3

pH 3+0,2M NaCl	22±4	411±54	0,23±0,05
pH 4+0,2M NaCl	26±2	304±6	0,23±0,01
pH 5+0,2M NaCl	14±3	604±171	0,71±0,29
pH 6+0,2M NaCl	14±3	969±400	0,79±0,21
pH 7+0,2M NaCl	Cremado		
pH 8+0,2M NaCl	Cremado		

2) Emulsión preparada con 20% y 30% fracción en volumen de aceite.

5 Una disolución de proteína de guisante sin centrifugación y disolución de polisacárido de soja se ajustaron a pH 7,0, respectivamente, luego se mezclaron y agitaron durante 2 h. La concentración de proteína fue 5 mg/ml y la WR fue 1:4. La mezcla se ajustó más hasta pH 3,5, y luego el aceite de soja se añadió a 20% y 30% fracción en volumen. La mezcla se emulsionó a 800 bar durante 4 min, seguida de tratamiento térmico a 90 °C durante 1 h. Los datos de la Tabla 21 indican que el tamaño de la gotita aumenta con el contenido de aceite, de modo tal que la estabilidad de las emulsiones disminuye con el incremento del contenido de aceite.

10 Tabla 21: Resultados de DLS de las emulsiones preparadas con 20% y 30% fracción en volumen de aceite antes y después de 55 días de almacenamiento. Las emulsiones se calentaron a 90 °C durante 1 h.

20% aceite:

Muestra	recién preparada				Después de 55 días de almacenamiento		
	Lote	Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
Tal como se preparó (pH 3,5)	(1)	60	387	0,24	46	424	0,28
"	(2)	61	401	0,24	45	387	0,14
pH 5	(1)	67	412	0,25	43	460	0,17
"	(2)	56	440	0,28	50	428	0,24
pH 6	(1)	66	427	0,28	35	486	0,23
"	(2)	59	446	0,33	52	432	0,22
pH 5 + NaCl 0,2 M	(1)	64	405	0,23	35	556	0,14
"	(2)	65	470	0,27	36	561	0,36
pH 6 + NaCl 0,2 M	(1)	61	462	0,26	32	545	0,19
"	(2)	54	488	0,28	30	528	0,28

30 % aceite

Muestra	recién preparada			Después de 3 días de almacenamiento		
	Intensidad	D _n (nm)	PDI	Intensidad	D _n (nm)	PDI
Tal como se preparó (pH 3,5)	57	576	0,28	Cremado		
pH 5	53	621	0,29			
pH 6	49	644	0,30			

Muestra	recién preparada			Después de 3 días de almacenamiento		
	Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH 5 + NaCl 0,2 M	50	678	0,37			
pH 6 + NaCl 0,2 M	42	699	0,41			

Ejemplo 14: Capacidad y estabilidad emulsionante de la proteína de guisante individual

Una disolución de proteína de guisante individual con una concentración de 5 mg/ml se ajustó a pH 3, 4, 5, 6 y 7, seguida de conversión a una emulsión. Las emulsiones producidas a pH 4, 5 y 6 presentaron cremado inmediatamente después de la conversión a emulsión. Para la emulsión producida a pH 3 y 7, el tamaño de las gotitas es 290 y 358 nm antes del calentamiento, 273 y 398 nm después del calentamiento, respectivamente. Las emulsiones calentadas y no calentadas producidas a pH 3 y 7 se modificaron a pH 2 y 8, y se añadió NaCl. El resultado de DLS demostró que los tamaños de las gotitas aumentan en forma aguda en muestras recién preparadas (no se muestran los datos); se observó cremado en todas las muestras al cabo de una semana, excepto para la emulsión producida a pH 3,0 sin cambio de pH y adición de sal.

El resultado anterior respalda la conclusión de que las emulsiones del complejo proteína de guisante/polisacárido de soja son superiores a las emulsiones de proteína de guisante individual y polisacárido de soja individual.

Ejemplo 15: Encapsulación de β -caroteno en las gotitas de la emulsión del complejo

Se añadió β -caroteno en aceite de soja con una concentración de 1 mg/ml. La fase oleosa se calentó a 70 °C durante 2 h bajo atmósfera de nitrógeno hasta disolver el β -caroteno. La emulsión se preparó a pH 3,75, 800 bar durante 4 min con 10% fracción en volumen de aceite, 5 mg/ml proteína de guisante y 20 mg/ml fase acuosa de polisacárido. Después del procedimiento de emulsión, se encapsuló el β -caroteno en las gotitas; el β -caroteno fue 0,1 mg/ml en la emulsión. La emulsión resultante se ajustó a diferentes pH para investigar la estabilidad. Si bien todas las emulsiones tienen aspecto homogéneo después de 11 días de almacenamiento en diferentes pH, el resultado de DLS que se muestra en la Tabla 22 indica que las emulsiones encapsuladas son estables en el intervalo de pH de 3, 4 y 5, en donde los tamaños de las gotitas no cambian significativamente.

Tabla 22 Resultado de DLS de la emulsión de β -caroteno encapsulada. La emulsión se produjo a pH 3,75, y la concentración de β -caroteno fue 0,1 mg/ml.

Muestra	Almacenamiento	Intensidad	D _h (nm)	PDI
pH 3,75 (pH emulsionante)	fresca	28±2	258±1	0,15±0,03
	86 días	58±1	301±4	0,12±0,01
pH 2	fresca	24±0	441±4	0,27±0,02
	86 días		Cremado	
pH 3	fresca	36±1	272±1	0,18±0,01
	86 días	56±1	296±2	0,14±0,02
pH 4	fresca	36±1	265±1	0,18±0,01
	86 días	61±3	310±5	0,16±0,0
pH 5	fresca	30±0	285±3	0,09±0,03
	86 días	56±4	334±4	0,23±0,06
pH 6	fresca	25±1	365±2	0,19±0,01
	86 días		Cremado	
pH 7	fresca	20±1	614±4	0,38±0,01

	86 días	Cremado		
pH 8	fresca	24±1	551±10	0,38±0,01
	86 días	Cremado		

Para demostrar más la estabilidad del β -caroteno encapsulado, los espectros visibles de las emulsiones de β -caroteno se midieron antes y después de la adición de FeCl_3 (ver Figura 3). Para este experimento, incubamos el material encapsulado con FeCl_3 . Se preparó una emulsión mezclando 5 μl de emulsión de beta-caroteno con 3 ml de agua, a la cual se le añadieron 20 μl de FeCl_3 en una concentración de 10 mg/ml. La concentración final de β -caroteno fue $1,67 \times 10^{-3}$ mg/ml. La disolución blanco para la medición contiene los mismos componentes con las mismas concentraciones pero sin β -caroteno. Este experimento demostró que la banda de absorción característica de la emulsión de β -caroteno no cambia después de la adición de FeCl_3 , lo que demuestra que el β -caroteno cargado no puede reaccionar con FeCl_3 , confirmando así que la emulsión puede proteger al β -caroteno de la oxidación durante el almacenamiento.

Asimismo, con el fin de medir la actividad de la emulsión de β -caroteno, se liberó β -caroteno por digestión de polisacárido de soja y proteína de guisante usando pectinasa y tpsina, respectivamente. El procedimiento es el siguiente: se añadió emulsión de β -caroteno de 5 μl a 2,6 ml de tampón Tris pH 8,2 (20 mM), y se añadieron 400 μl de disolución de tpsina preparada disolviendo tpsina en el tampón Tris con una concentración de tpsina de 2 mg/ml. La concentración de β -caroteno en la mezcla fue $1,67 \times 10^{-3}$ mg/ml. Después de la medición de los espectros visibles, se añadieron 20 μl de 10 mg/ml FeCl_3 a la mezcla. Estos resultados (Figura 4) demuestran que la banda de absorción característica de β -caroteno no cambia en presencia de FeCl_3 . Luego la mezcla se ajustó hasta pH 5,0, y se añadieron 40 μl de disolución de pectinasa y 20 μl de 10 mg/ml FeCl_3 a la mezcla. Los espectros visibles demostraron luego que la banda de absorción característica del β -caroteno desaparece, demostrando que el β -caroteno liberado puede reaccionar con FeCl_3 . Durante la medición de los espectros, la disolución blanco contiene los mismos componentes con las mismas concentraciones pero sin β -caroteno. Nuestro experimento control confirmó que en la emulsión de β -caroteno, la banda de absorción característica de β -caroteno no cambia en presencia de FeCl_3 cuando se añade tpsina o pectinasa solamente.

Ejemplo 16: Encapsulación de vitamina E en las gotitas de emulsión del complejo

En primer lugar, usamos vitamina E pura como fase oleosa para producir emulsiones. La emulsión se preparó a pH 3,25, 800 bar por 3 min con 10% fracción en volumen de aceite, 5 mg/ml proteína de guisante y 20 mg/ml de fase acuosa de polisacárido. La emulsión se calentó a 90 °C durante 1 h. El resultado de DLS que se muestra en la Tabla 23 indica que las emulsiones no son estables en medio salino.

Tabla 23: Resultado de DLS de las emulsiones preparadas a pH 3,25. Se usó vitamina E con una fracción en volumen de 10% como la fase oleosa.

Muestra	Almacenamiento	Intensidad	D_h (nm)	PDI
pH 3,25 (pH emulsionante)	fresca	67	317	0,16
	37 días	26	297	0,18
pH 5	fresca	55	296	0,13
	37 días	24	307	0,17
pH 6	fresca	44	357	0,10
	37 días	23	350	0,31
pH 5+NaCl 0,2M	fresca	33	1827	1,0
	37 días	Cremado		
pH 6+NaCl 2M	fresca	29	1060	1,0
	37 días	Cremado		

Considerando la viscosidad de la vitamina E, se modificó la fase oleosa a una mezcla 40% vitamina E y 60% aceite de soja. La otra condición es la misma que anteriormente. La emulsión se produjo a pH 3,75. Los datos de la Tabla

24 demuestran que los tamaños de las gotitas no son sensibles a los cambios de pH y de concentración de sal, lo que implica que las emulsiones serán estables en este medio.

Tabla 24: Resultado DLS de las emulsiones preparadas a pH 3,75 con una fracción en volumen de aceite de 10%. La fase oleosa estuvo compuesta por 40% vitamina E y 60% aceite de soja.

Condición de almacenamiento	Emulsión recién calentada			Después de 55 días de almacenamiento		
	Intensidad	D _h (nm)	PDI	Intensidad	D _h (nm)	PDI
Tal como se preparó (pH 3,75)	30±0	284±1	0,13±0	65±5	298±10	0,14±0,01
pH 2	28±3	350±35	0,25±0,02	38±7	344±3	0,22±0,01
pH 3	30±1	284±5	0,17±0,02	64±7	297±5	0,14±0,02
pH 4	31±2	279±2	0,20±0,03	64±5	300±5	0,16±0,02
pH 5	32±1	316±16	0,20±0,01	57±8	293±9	0,16±0,02
pH 6	29±0	330±17	0,23±0,06	60±10	378±31	0,28±0,07
pH 7	29±1	342±5	0,26±0,01	62±6	342±13	0,21±0,03
pH 8	31±1	344±20	0,21±0,02	59±9	380±2	0,23±0,02
pH 2+NaCl 0,2M	26±2	364±13	0,34±0,06	50±0	415±12	0,23±0,02
pH 3+NaCl 0,2M	27±2	329±7	0,23±0,02	51±7	398±41	0,25±0,05
pH 4+NaCl 0,2M	27±2	292±10	0,21±0,03	60±2	363±13	0,20±0,01
pH 5+ NaCl 0,2M	28±2	323±2	0,19±0,02	58±1	400±33	0,24±0,01
pH 6+ NaCl 0,2M	27±3	324±1	0,26±0,02	53±1	363±5	0,20±0,07
pH 7+ NaCl 0,2M	32±2	317±2	0,25±0,03			
pH 8+ NaCl 0,2M	32±3	322±3	0,23±0,01			Cremado

5

Ejemplo 17: Influencia de la relación en peso de proteína de soja a polisacárido de soja (WR) sobre la estabilidad de las emulsiones de proteína de soja/polisacárido de soja.

La Tabla 25 muestra emulsiones de proteína de soja/polisacárido de soja preparadas a partir de diferentes relaciones en peso de proteína de soja a polisacárido (WR). Los datos de la Tabla 24 revelan que los complejos de las emulsiones preparadas a partir de WR 1:2 a 1:6 son estables contra cambios de pH y concentración de sal, así como también en el almacenamiento a largo plazo.

10

Tabla 25: Influencia de la relación en peso de proteína de soja a polisacárido (WR) sobre los tamaños de las gotitas de las emulsiones en distintos medios. Las emulsiones se produjeron a pH 3,25. La concentración de proteína fue 5 mg/ml en disolución acuosa, y la fracción en volumen de aceite fue 10%.

Muestra		D _h (nm)				
		pH 3.25 (pH emulsionante)	pH 5	pH 6	pH 5 + NaCl 0.2 M	pH 6 + NaCl 0.2 M
Recién preparada	WR 2:1	367 ± 15	379 ± 32	415 ± 38	2445 ± 345	2265 ± 489
	WR 1:1	302 ± 3	343 ± 28	348 ± 28	1184 ± 219	1168 ± 285

	WR 1:2	265 ± 18	271 ± 6	292 ± 4	346 ± 81	391 ± 1
	WR 1:3	255 ± 12	275 ± 8	289 ± 1	320 ± 50	326 ± 40
	WR 1:4	263 ± 15	289 ± 6	302 ± 4	315 ± 21	325 ± 30
	WR 1:5	273 ± 11	298 ± 1	312 ± 4	317 ± 11	322 ± 1
	WR 1:6	272 ± 2	326 ± 12	342 ± 14	327 ± 11	342 ± 8
	WR 1:7	297 ± 2	342 ± 2	381 ± 2	450 ± 1	498 ± 3
Después de 45 días de almacenamiento	WR 2:1	390 ± 11	Cremado			
	WR 1:1	305 ± 16				
	WR 1:2	277 ± 18	307 ± 6	294 ± 19	419 ± 165	409 ± 144
	WR 1:3	265 ± 10	296 ± 6	303 ± 28	369 ± 109	336 ± 64
	WR 1:4	274 ± 15	300 ± 5	307 ± 28	346 ± 61	351 ± 64
	WR 1:5	275 ± 0	308 ± 6	320 ± 18	339 ± 37	353 ± 37
	WR 1:6	280 ± 4	337 ± 12	345 ± 16	351 ± 26	365 ± 25
	WR 1:7	304 ± 4	Cremado			

Ejemplo 18: Influencia de la relación en peso de proteína de guisante a polisacárido de soja (WR) sobre la estabilidad de las emulsiones de proteína de guisante/polisacárido de soja. Se usó disolución de proteína de guisante sin centrifugación.

- 5 Disoluciones de proteína de guisante y polisacárido de soja se ajustaron hasta pH 7,0, respectivamente, luego se mezclaron y agitaron durante 2 h. La concentración de proteína fue 5 mg/ml y se modificó la WR de 1:1 a 1:6. La mezcla se emulsionó a pH 3,5 con 10% fracción oleosa a 800 bar durante 4 min y luego con tratamiento de calor a 90 °C durante 1 h. Los datos de la Tabla 26 confirman que los valores de WR están en el intervalo de 1:2-1:6.

- 10 Tabla 26. Influencia de la relación en peso de la proteína de soja a polisacárido de soja (WR) sobre el tamaño de la gotita de las emulsiones del complejo de proteína de guisante/polisacárido de soja preparadas a partir de disolución de proteína de guisante sin centrifugación.

Recién preparada:

WR	Condición de almacenamiento				
	Tal como se preparó	pH 5	pH 6	pH 5+NaCl 0,2M	pH 6+NaCl 0,2M
1:1	258	276	280	638	400
1:2	276	303	316	315	314

ES 2 711 621 T3

WR	Condición de almacenamiento				
	Tal como se preparó	pH 5	pH 6	pH 5+NaCl 0,2M	pH 6+NaCl 0,2M
1:3	268	297	310	292	297
1:4	274	314	315	291	288
1:5	271	322	315	284	292
1:6	286	326	327	299	305
Después de 63 días de almacenamiento:					
1:1	244	242	238	Cremado	
1:2	268	246	288	328	336
1:3	275	274	284	313	317
1:4	281	286	302	324	352
1:5	288	294	301	314	394
1:6	297	305	308	344	393

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
- a) 0,1 a 70 % en peso en base a la composición de uno o más ingredientes activos solubles en grasa seleccionados del grupo que consiste en ingredientes sanitarios lipófilos; carotenoides y mezclas de estos;
- 5 b) una o más proteínas vegetales seleccionadas del grupo que consiste en proteína de soja, proteína de altramuz, proteína de guisante y proteína de patata; y
- c) uno o más polisacáridos solubles de soja;
- en donde el ingrediente sanitario lipófilo (uno o más compuestos) se selecciona del grupo que consiste en resveratrol; ligusticum; ubiquinonas y/o ubiquinoles (uno o más componentes), coenzima preferida Q 10, coenzima Q 9 y/o sus formas reducidas (los correspondientes ubiquinoles); genisteína y ácido alfa-lipoico, y en donde la suma de la cantidad de proteína(s) y la cantidad de polisacárido(s) representa 10 a 85 % en peso en base a la composición en materia seca y en donde la relación en peso de proteína(s) a polisacárido(s) se selecciona como 1 : b con la salvedad que b esté comprendido entre 0,5 y 15.
- 10
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque los carotenoides se seleccionan entre beta-caroteno, licopeno, luteína, bixina, astaxantina, apocarotenal, beta-apo-8'-carotenal, beta-apo-12'-carotenal, cantaxantina, criptoxantina, citranaxantina y/o zeaxantina.
- 15
3. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque las proteínas vegetales consisten en proteína de soja o guisante.
4. Procedimiento para la fabricación de una emulsión estable que comprende las siguientes etapas:
- 20 I) suspender la proteína en agua;
- II) opcionalmente eliminar la proteína no disuelta de la suspensión de la etapa I);
- III) mezclar uno o más polisacáridos solubles de soja en una relación en peso de proteína(s) a polisacárido(s) entre 1: 0,5 y 1: 15;
- IV) ajustar el pH hasta un valor comprendido entre 3 y 5;
- 25 V) añadir al complejo la fase orgánica, que comprende uno o más ingredientes activos solubles en grasa, en donde los ingredientes activos solubles en grasa se seleccionan del grupo que consiste en carotenoides, resveratrol; ligusticum; ubiquinonas y/o ubiquinoles (uno o más compuestos), coenzima preferida Q 10, coenzima Q 9 y/o sus formas reducidas (los correspondientes ubiquinoles); genisteína y ácido alfa-lipoico;
- 30 VI) homogenizar la mezcla de la etapa V) con un procedimiento de emulsión convencional conocido por el experto en la técnica;
- VII) calentar la emulsión a una temperatura comprendida entre 70 y 95°C, preferiblemente entre 80 y 90°C durante por lo menos 45 minutos, preferiblemente por lo menos 1 hora;
- VIII) opcionalmente secar la emulsión de la etapa VII).
- 35
5. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para enriquecimiento, fortificación y/o coloración de alimentos, bebidas, pienso animal, cosméticos o composiciones farmacéuticas.
6. Procedimiento para la fabricación de una bebida que comprende la etapa de mezclar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con otros ingredientes de bebidas habituales.

Figura 1

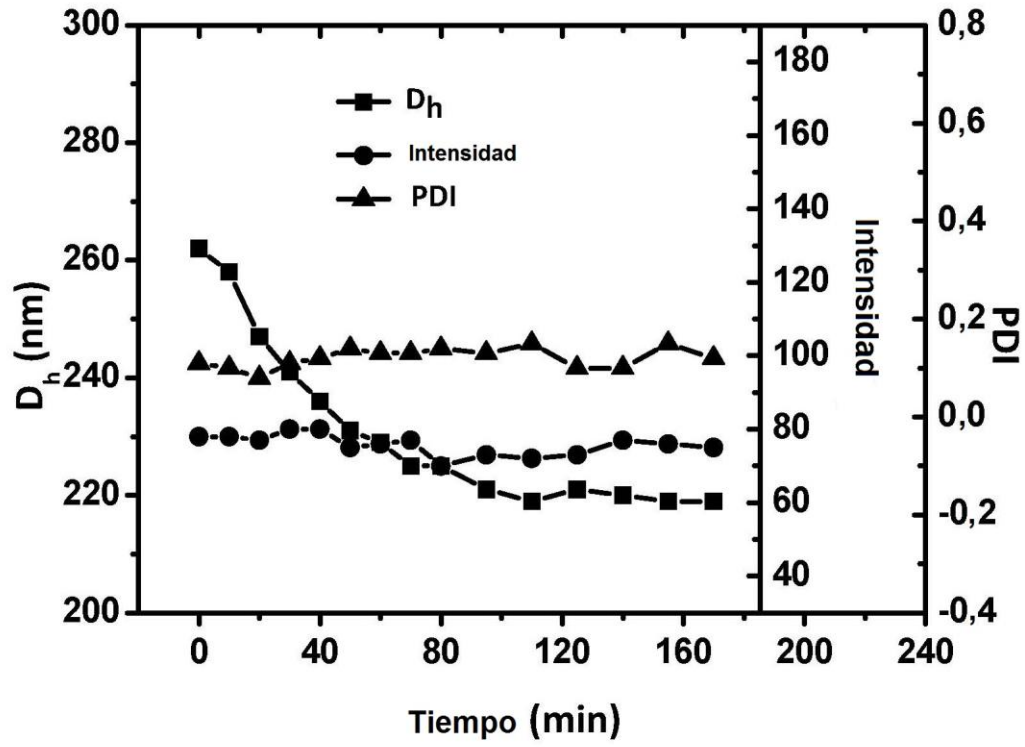
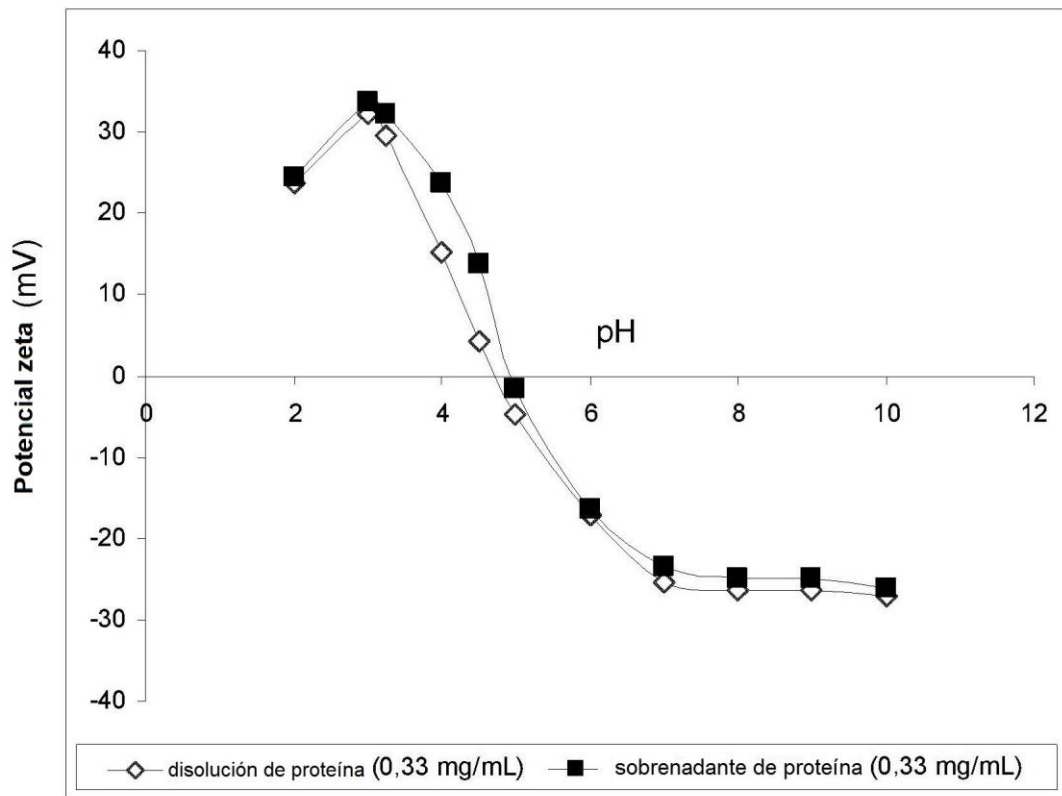


Figura 2

A



B

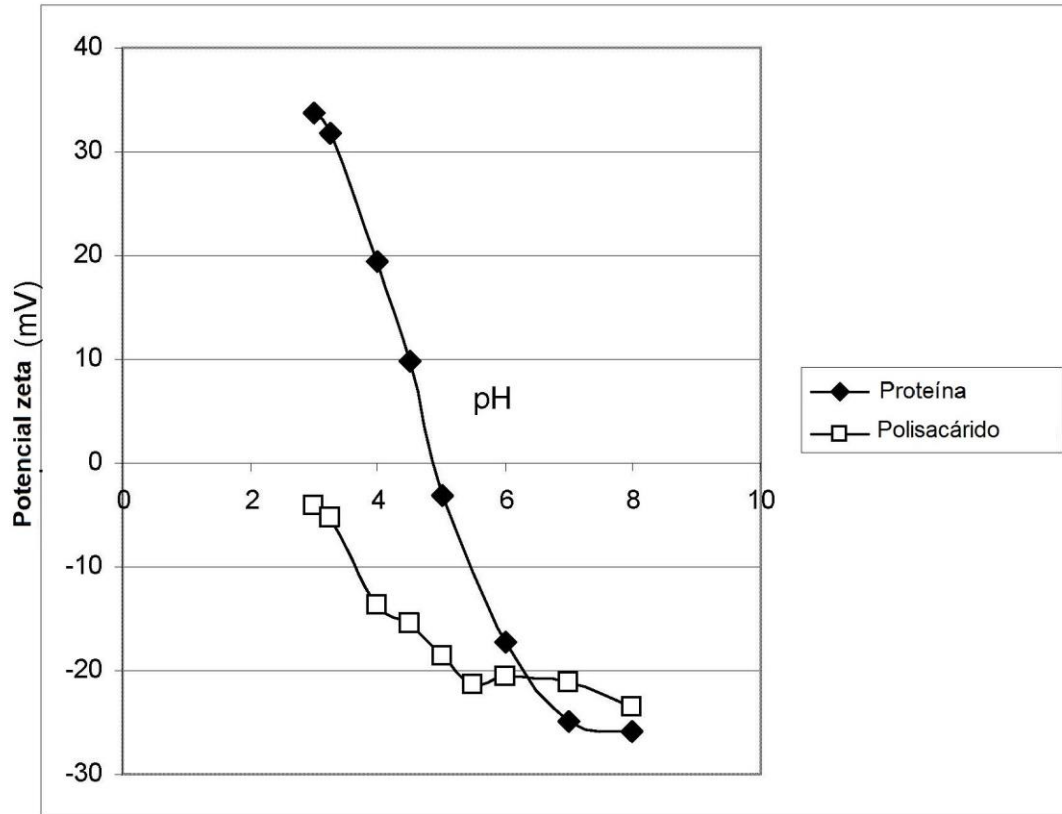


Figura 3

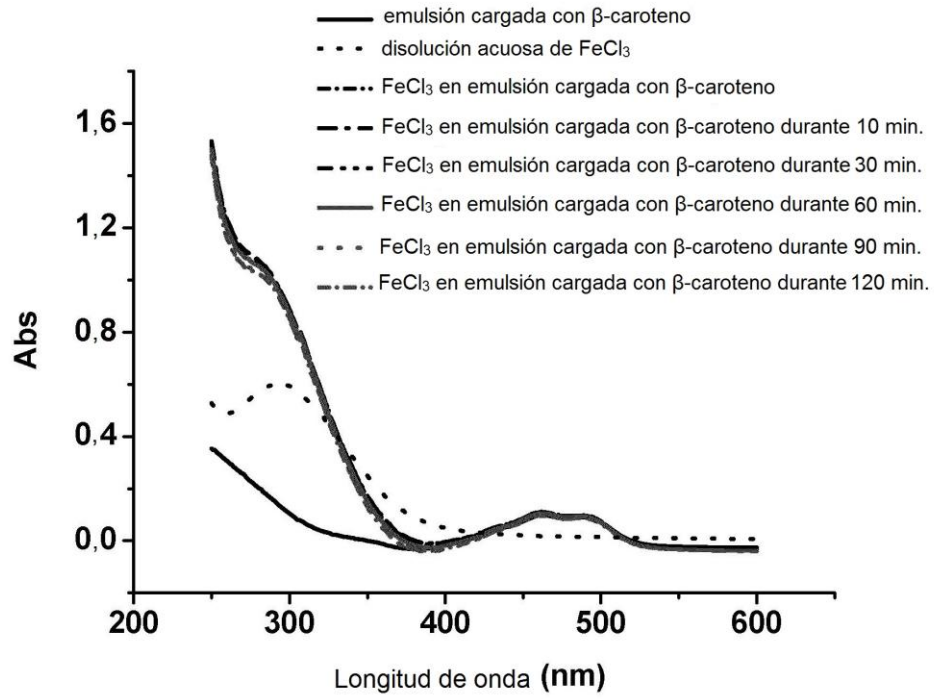


Figura 4

