

F. E. - 21 - 10 - 75



421496

Int. Cl.:	BOIF
Nº	421.496

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: UNILEVER N.V.

RESIDENCIA: Burg. s' JACOBPLEIN 1, Rotterdam, Holan-
da.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE
EMULSIONES.

Prioridad: Patente británica n.º 57,938/72 del 15.12.72

421496



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la pre-
paración de emulsiones mejoradas por conversión de los alde-
hidos que están presentes en estas emulsiones en sus corres-
pondientes alcoholes.

5 La invención es importante en particular en la conversión
de los aldehidos formados durante la auto-oxidación de las
grasas presentes en las emulsiones grasas acuosas.

10 La invención proporciona un procedimiento para la prepa-
ración de emulsiones por emulsificación de una fase grasosa
adecuada con una fase acuosa adecuada, conteniendo dicha fase
acuosa lactobacilos que han sido cultivados en un medio nutri-
tivo conteniendo sal común.

15 La emulsión grasa acuosa de la invención comprende prefe-
riblemente proporciones sustanciales de triglicéridos de áci-
dos grasos insaturados.

20 El término "grasa" se utiliza en esta memoria para
incluir los triglicéridos de ácidos grasos que son sólidos a
20°C y son comúnmente descritos como "grasas" así como los
triglicéridos que son líquidos a esa temperatura y son común-
mente descritos como "aceites". El término "aceite líquido",
que también se utiliza en esta memoria, se refiere a los tri-
glicéridos que son líquidos a 5°C. Una "fase grasosa" es una
grasa o mezcla de grasas que puede incluir aceites líquidos
y que es adecuada como única grasa en la emulsión de la in-
25 vención. Una "grasa margarina" es una grasa o mezcla de gra-
sas que puede contener aceites líquidos que es adecuada como
única grasa en la margarina. El término "emulsión" incluye
tanto las emulsiones de "grasa en agua" como "agua en grasa",
30 a no ser que el tipo de emulsión se establezca específicamente;

421496



1 las frases "grasa en agua" y "agua en grasa" se utilizan para
las emulsiones que contienen grasas o aceites líquidos o mez-
clas de grasas y aceites líquidos. Salvo indicación en con-
trario, el término "emulsión" incluye las emulsiones de "gra-
5 sa en agua" y "agua en grasa" que contienen cantidades ade-
cuadas de emulgentes solubles en la grasa, v.g. glicéridos
parciales de ácidos grasos, como monoglicéridos, fosfátidos
y fracciones de los mismos, etc. y/o emulgentes solubles en
agua, v.g. glicéridos parciales, fosfátidos, yema de huevo,
10 etc.

La proporción de fase grasa en la emulsión del invento
puede variar entre 3 y 85 %, siendo el resto de la emulsión
una fase acuosa, ajustada al valor del pH requerido. La fa-
se acuosa puede estar constituida por agua a la que, aparte
15 de los emulgentes solubles en agua adecuados, pueden agregar-
se diversos ingredientes mínimos como sal, ácido, proteínas,
aromas, etc.

En esta memoria, todos los porcentajes, proporciones y
partes se dan en peso, la cantidad de grasa en la emulsión
20 se basa sobre el peso de la emulsión y la cantidad de ácidos
grasos en la grasa se basa en la cantidad total de ácidos gra-
sos en dicha grasa, salvo indicación en contrario.

La capacidad de almacenamiento de una emulsión viene in-
fluida por diversos factores de los que la formación de alde-
25 hidos por auto-oxidación de los radicales ácidos grasos insa-
turados es el más dominante. Se han detectado varios aromas
secundarios en las emulsiones como mantequilla y margarina,
que se forman como resultado de la auto-oxidación de radi-
cales ácidos grasos insaturados, especialmente poli-insatu-
30



421496

1 rados. En "Netherlands Milk and Dairy Journal", Volumen 24,
I, págs. 61-63 (1970), se describen varios alcanales, alque-
nales, alcadienales y alcatrienales que aparecen en la mante-
ca de pescado almacenada en frío. En la obra "Symposium on
5 Foods: Lipids and their Oxidation", The Avi-Publishing Com-
pany Inc., Westport, Connecticut, 1962, págs. 216-229, G.
Hoffmann describe los aromas secundarios de aldehidos satura-
dos e insaturados que se forman por auto-oxidación en los
aceites vegetales, especialmente en el aceite de soja. De
10 acuerdo con Hoffmann, se aislan del aceite de soja por lo me-
nos 27 aldehidos volátiles.

Aunque mediante modernas técnicas de refinado e hidrogena-
ción puede eliminarse o evitarse en las grasas a utilizar en
la preparación de emulsiones por lo menos la mayor parte de
15 los aromas secundarios, incluidos sus precursores, la forma-
ción de aromas secundarios como resultado de la auto-oxida-
ción de las emulsiones procesadas bajo las condiciones de al-
macenamiento normales no ha podido ser evitada eficazmente
hasta ahora, incluso aunque se utilizaran los mejores anti-
20 oxidantes disponibles.

Preferiblemente se preparan emulsiones que contienen en
su fase grasa altas proporciones de glicéridos de ácidos gra-
sos poli-insaturados, v.g. aceites líquidos que contienen por
lo menos un 40 % de ácidos grasos poli-insaturados, especial-
25 mente aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cártamo
y aceite de maíz. En especial se preparan emulsiones que con-
tienen como mínimo 50 % y preferiblemente de 60 a 90 % de
triglicéridos que contienen por lo menos 40 % de ácidos gra-
sos poli-insaturados, calculado sobre la cantidad total de
30 grasa en la emulsión. Es una gran ventaja de la invención



421496

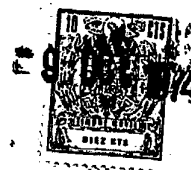
1 que pueden incorporarse a las emulsiones de la misma grandes
cantidades de estos aceites líquidos, que son ampliamente con-
siderados como dietéticamente beneficiosos, sin afectar ad-
versamente a las propiedades de almacenamiento de las emul-
5 siones.

La invención puede proporcionar emulsiones de agua en gra-
sa y de grasa en agua.

10 La invención es especialmente importante en el caso de
emulsiones que, debido al carácter de su preparación, a las
condiciones de transporte y al almacenamiento, deben tener
una duración en almacenamiento relativamente prolongada, por
ejemplo las margarinas. En esta memoria, entendemos por "mar-
garina" las emulsiones de "agua en grasa" que contienen una
15 fase acuosa a un pH de 4,5-7 aproximadamente y 75-85 % de
grasa. El término "margarina" en el sentido utilizado en esta
memoria incluye las emulsiones que son plásticas a la tempe-
ratura ambiente y las emulsiones que son líquidas o fluídas
a la temperatura ambiente.

20 La emulsión grasa acuosa de la invención, incluida la mar-
garina, contiene preferiblemente lactosa y/o citrato y/o só-
lidos lácteos y/o leche descremada. Estos componentes están
presentes preferiblemente en la fase acuosa de la emulsión
que contiene la sal, preparada de acuerdo con la invención.

25 Las emulsiones pueden prepararse por un método conocido;
durante el procesado, deben evitarse en lo posible las con-
diciones que influyan perjudicialmente en la supervivencia
de proporciones sustanciales de lactobacilos. Preferiblemen-
te, durante la preparación de la emulsión grasa acuosa, no
deben ser sometidos a temperaturas superiores a 55°C durante
30 más de unos 2 minutos o superiores a 45°C durante más de



421496

1 unos 10 minutos. Especialmente cuando el pH de las emulsio-
nes debe ser inferior a 4,7 aproximadamente, debe evitarse
en lo posible el tratamiento de las emulsiones a temperatu-
ras relativamente altas, ya que el efecto combinado de bajo
5 pH y alta temperatura afectará adversamente a la superviven-
cia de las bacterias. Deben evitarse unas concentraciones de-
masiado altas de ácido benzoico.

En especial se preparan emulsiones conteniendo menos de 1,
preferiblemente menos de 0,5 y en especial menos de 0,1 mg de
10 oxígeno por litro, ya que se ha observado sorprendentemente
que el número de bacterias viables en estas emulsiones es
considerablemente mayor que en las emulsiones que contienen
más oxígeno. Puede conseguirse un bajo contenido en oxígeno
efectuando la transformación en condiciones prácticamente
15 exentas de oxígeno, v.g. barriendo la mezcla grasa y la fase
acuosa con nitrógeno y preparando la emulsión en un equipo
prácticamente hermético al aire.

Los lactobacilos han sido cultivados preferiblemente en
un medio nutritivo conteniendo sal y lactosa y/o citrato y/o
20 sólidos lácteos y/o leche descremada. Para el desarrollo ópti-
mo de las bacterias, algunas veces es beneficioso agregar a
la leche o a la leche descremada una proporción adicional de
citrato, v.g. su sal sódica o potásica.

Los lactobacilos más preferidos son los leuconostocos y
los estreptococos para los fines de esta invención ya que
son los que presentan la máxima actividad alcohol-deshidro-
genasa. Los cultivos iniciadores de ácido láctico adecuado
son, por ejemplo, los vendidos por las firmas danesas Visby,
25 bajo el nombre comercial de "Probat" y Hansen bajo el nom-
bre comercial de "Syrevaekker" y "Streptococcus diacetylactus"
30

421496



1 o el "Marlac Culture" vendido por el Marschall Dairy Laboratory Inc., E.E.U.U.

5 Se utilizan especialmente bacterias que han sido cultivadas varias veces, preferiblemente por lo menos tres veces, en especial de 5 a 20 veces, en un medio nutritivo conteniendo sal. El medio nutritivo conteniendo sal en el que se cultivan las bacterias debe contener una pequeña proporción de sal común, v.g. inferior al 10 %, preferiblemente de 0,1 a 7 % y en especial de 1 a 5 %. Se ha establecido que, aparte del sodio, es esencial la presencia de iones potasio en el medio nutritivo. Generalmente debe encontrarse potasio suficiente en las emulsiones de grasa a base de leche.

15 Las bacterias son cultivadas preferiblemente a temperaturas de 10-40°C y mejor de 15-25°C. Las emulsiones y en especial las margarinas de la invención son mucho más resistentes a la auto-oxidación de las grasas que los productos de la técnica anterior. Esta mayor resistencia es el resultado del número de bacterias viables por mililitro de fase acuosa, que en los productos de la invención es de 10⁵ como mínimo después de 12 días de almacenamiento.

20 Se ha contado el número de bacterias viables en muestras frescas de margarinas comerciales (1 a 6 días después de la producción); se obtuvieron los siguientes datos:

	<u>Marcas</u>	<u>Contenido de sal</u>	<u>Número de células viables por ml de fase acuosa</u>	
25	Bélgica	Planta	0,7	<10 ²
		Planta plus	0,3	<10 ²
		Solo	0,1	<10 ²
		Becel	0	210

30

421496



		Contenido de sal	Número de células viables por ml de fase acuosa
1	Francia	Astra 0,45	<10 ²
		Planta 0,45	<10 ²
5		Trio nº 1 0	<10 ²
		Trio nº 4 0	164
	Alemania	Becel 0,2	<10 ²
		Flora 0,2	<10 ²
		Rama 0,2	<10 ²
10	Holanda	Brío 0	<10 ²
		Blue Band 0,76	200
		Becel 0	<10 ²
	Reino Unido	Stork 2,0	<10 ²
	Austria	Rama 0	150
15		Thea 0,2	<10 ²
	Finlandia	Flora 1,72	230
		Milda 1,72	<10 ²
	Dinamarca	Otto Mønstedt -	<10 ²
	Suiza	Dorina 0,1	<10 ²
20		Planta 0,1	<10 ²
	Rusia	Liubiteljski -	212
		Rossiiski -	62

La invención será ilustrada ahora mediante los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

Una leche descremada pasterizada exenta de sal se inocula a 20°C con 1 % de iniciador de ácido láctico de la margarina, conteniendo leuconostocos y estreptococos (Experimento A). Después la leche descremada es bacteriológicamente agriada y a un pH de 4,5 se toma una muestra de 1 ml, que se

25

30

421496



1 lleva a otro lote de leche descremada pasteurizada a 20°C con-
teniendo 2 % de NaCl (Experimento B).

5 Posteriormente se toma una muestra de 1,0 ml de la leche
descremada agriada del Experimento B y se lleva de nuevo a
una leche descremada pasteurizada conteniendo 2 % de sal co-
mún a 20°C. Este procedimiento se repite tres veces (Experi-
mento C).

10 En la Tabla I se encuentra la reducción de pH por unidad
de tiempo de las leches agriadas de los Experimentos A, B y
C.

15 Comparando la leche descremada agriada del Experimento C
con la de los Experimentos A y B, puede deducirse que las
bacterias se vuelven mejor adaptadas a una solución de sal
común al 2 % si han sido cultivadas allí varias veces. La le-
che descremada agriada obtenida en los Experimentos A, B y C
fue analizada para determinar la actividad alcohol-dehidroge-
nasa. Esto se hizo agregando nonanal a las leches agriadas
hasta que la concentración de nonanal era de 20 ppm. Al cabo
20 de 20 minutos de incubación a 30°C, se aíslan el nonanal y
sus productos de conversión (nonanol y ácido nonanoico) por
cinco extracciones con éter en una proporción de éter/leche
de 1:1; la relación ponderal de nonanal/nonanol fue determi-
nada por análisis cromatográfico de gas-líquido. El número de
25 bacterias en la leche agriada fue determinada por recuento
de placas. A partir de los datos obtenidos, se calcula el
número de moléculas de nonanol formadas por segundo y por
célula. Los resultados se encuentran en la Tabla II, de la
que puede deducirse que las bacterias del Experimento C re-
ducen al nonanal siete veces más deprisa que las bacterias
30



421496

1 no adaptadas del Experimento A. Debido a la presencia de me-
nos aldehidos de auto-oxidación, las emulsiones grasas que
contienen la fase acuosa del Experimento C fueron considera-
blemente preferidas sobre emulsiones idénticas conteniendo la
5 fase acuosa preparada en el Experimento A y/o B después de 7
a 10 semanas de almacenamiento.

EJEMPLO 2

10 Se repite el Experimento C del Ejemplo 1 a excepción de
que la tercera inoculación tiene lugar en leche descremada
pasterizada conteniendo 4,0 % de NaCl. Una muestra de 1 ml
de la leche descremada agriada con un pH de 4,5, obtenida des-
pués de la tercera inoculación, se lleva a una leche descre-
mada pasterizada conteniendo 4,0 % de NaCl (Experimento D).

15 Se llevó a cabo un Experimento E comparativo análogamen-
te al Experimento A del Ejemplo 1, a excepción de que ahora
el iniciador se agregó a una leche descremada pasterizada
conteniendo 4,0 % de NaCl.

20 De la Tabla III se deduce que inoculando tres veces, se
desarrollan bacterias que son resistentes a una solución al
4,0 % de NaCl. Las bacterias del Experimento D son muy ade-
cuadas para la conversión de aldehidos en alcoholes en las
emulsiones grasas. Las margarinas preparadas a partir de una
fase acuosa conteniendo las bacterias adaptadas fueron con-
siderablemente preferidas a las margarinas idénticas a excep-
25 ción de que no contenían las bacterias adaptadas. Cuando las
bacterias del Experimento D fueron reinoculadas por diez ve-
ces, se consiguieron tiempos de agriado considerablemente re-
ducidos.

30



421496

EJEMPLO 3

1

Se repite el Experimento C del Ejemplo 1 a excepción de que los microorganismos fueron adaptados cinco veces en lugar de tres al medio conteniendo sal al 2 %. Ahora se alcanzó un valor del pH inferior a 5,0 ya al cabo de 4 horas. Las bacterias así obtenidas eran muy adecuadas para la conversión de aldehidos en alcoholes en las emulsiones.

5

La leche descremada agriada obtenida se utiliza para la preparación de una fase acuosa margarina constituida por:

10

- 50 ml de leche descremada agriada
- 37 ml de solución de NaCl al 25 %
- 103 ml de agua desmineralizada
- 0,2 g de ácido cítrico
- 28 ml de suero conteniendo 30 % de sólidos.

15

Con fines comparativos, se utiliza una fase acuosa margarina idéntica a excepción de que contiene la leche descremada agriada del Experimento A. La supervivencia de las bacterias de ácido láctico y la actividad residual alcohol-deshidrogenasa por almacenamiento a 15°C, se determinaron en la forma descrita en el Ejemplo 1.

20

Los resultados se encuentran en la Tabla IV, de donde se deduce que las bacterias no adaptadas mueren al cabo de varias horas mientras que las bacterias adaptadas sobreviven durante unas cuatro semanas.

25

EJEMPLO 4

Se prepara una margarina a partir de 78 partes de una mezcla de grasa margarina comercial con la siguiente composición de grasas: 87 partes de aceite de girasol conteniendo alrededor de 60 % en peso de ácido 9 cis-12 cis-octadecadienoico y 13 partes de una mezcla interesterificada de aceite de pal-

30

421496



1 ma y de semilla de palma totalmente hidrogenado y 22 partes
de la fase acuosa del Ejemplo 3. Con fines comparativos, se
prepara una margarina idéntica a excepción de que contiene la
fase acuosa comparativa del Ejemplo 3. Se preparan margarinas
5 del tipo de agua en aceite por un proceso similar al descrito
en Andersen & William, Pergamon Press, 2ª Edición. Todo el
tiempo se evitan las temperaturas superiores a 45°C. La su-
pervivencia de las bacterias de ácido láctico y la actividad
residual de alcohol-deshidrogenasa por almacenamiento de la
10 margarina a 15°C se determina como sigue: después de almace-
nar 100 g de margarina, se mezclan con 480 ml de agua conte-
niendo 4 % de NaCl y se calienta a 40°C durante media hora.
Posteriormente la mezcla se enfría a 5°C. De la fase acuosa
separada se toma una muestra de 1 ml para el recuento en
15 placa del número de células viables. Se centrifuga la fase
acuosa separada restante y las bacterias así separadas se
mezclan con 20 ml de una fase acuosa margarínica estéril re-
cién preparada. La fase acuosa así obtenida se trata y ana-
liza como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que
20 ahora se utilizan unos tiempos de incubación de 60 minutos.
Los resultados, que no solamente indican que la supervivencia
de las bacterias adaptadas ha aumentado considerablemente si-
no también que ha mejorado considerablemente su actividad
ADH por célula, están resumidos en la Tabla V.

25

EJEMPLO 5

30

Para ilustrar la influencia de la temperatura de creci-
miento de las bacterias por una parte y la temperatura de in-
cubación por otra parte, se midió la actividad alcohol-deshi-
drogenasa de la leche descremada del Experimento C, a diver-
sas temperaturas de crecimiento e incubación. Los resultados

421496



1 se encuentran en la Tabla VI.

Las leches descremadas agriadas ilustradas en la Tabla VI eran adecuadas para la preparación de emulsiones; se prefirieron las que presentaban máximos grados de conversión de aldehído en alcohol.

EJEMPLO 6

Se repite el Ejemplo 2 a excepción de que el producto resultante es inoculado de nuevo en leche descremada pasteurizada conteniendo 6,0 % de sal común. Al cabo de 24 horas se obtuvo la acidez requerida para una fase acuosa margarinaica.

TABLA I

Experimento		<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
		<u>pH</u>	<u>pH</u>	<u>pH</u>
Tiempo (horas) después de la fase retrasada	0	6,45	6,45	6,40
	1	6,15	6,40	6,10
	2	5,62	6,30	5,80
	3	5,12	6,15	5,65
	4	4,80	5,90	5,40
	5	4,65	5,65	5,15
	6	4,50	5,45	4,90

TABLA II

<u>Experimento</u>	<u>Número de bacterias viables por ml</u>	<u>Relación ponderal Cgal:Cgol al cabo de 20 minutos</u>	<u>Moléculas de Cgol formadas por célula por segundo</u>
A	22 x 10 ⁷	28,4 : 71,6	5,1 x 10 ⁴
B	22 x 10 ⁷	36,0 : 64,0	4,5 x 10 ⁴
C	40 x 10 ⁶	4,0 : 96,0	3,7 x 10 ⁵

421496

OCT. 1952



1

TABLA V

Ejem. n°	Tiempo de almacenamiento de la margarina (horas)	Número de bacterias viables por ml	Moléculas de Cgol formadas por célula y por segundo
5	comparativo	0	56 x 10 ⁶
		24	6 x 10 ⁶
		144	4 x 10 ⁴
		288	<10 ²
10	4	0	22 x 10 ⁶
		24	6 x 10 ⁶
		144	4 x 10 ⁶
		288	4 x 10 ⁵

TABLA VI

Ejemplo n°	Temperatura de crecimiento, °C	Temperatura de incubación, °C	Moléculas de Cgol formadas por célula y por segundo
20	5 a	15	6,1 x 10 ⁴
	5 b	20	5,8 x 10 ⁴
	5 c	20	15,1 x 10 ⁴
	5 d	20	27,9 x 10 ⁴
	5 e	20	35,0 x 10 ⁴
	5 f	30	1,4 x 10 ⁴
	5 g	30	2,1 x 10 ⁴
	5 h	30	4,2 x 10 ⁴
	5 i	30	9,3 x 10 ⁴

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de emulsiones por emulsificación de una fase grasosa con una fase acuosa, ca-

30



421496

1 ractizado porque la fase grasosa es emulsionada con una fase
acuosa que contiene lactobacilos que han sido cultivados en
un medio nutritivo conteniendo sal común.

5 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracte-
rizado porque la fase grasosa que contiene triglicéridos de
ácidos grasos poli-insaturados es emulsionada para producir
una emulsión del tipo de agua en aceite.

10 3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2,
caracterizado porque se utiliza una fase acuosa que contiene
lactobacilos que han sido cultivados durante tres veces como
mínimo en el medio nutritivo que contiene la sal.

15 4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 3,
caracterizado porque se utiliza un medio nutritivo que con-
tiene lactosa y/o citrato y de 0,1 a 7 % de sal común.

5. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE EMULSIONES.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente memoria descriptiva que consta de dieciseis páginas me-
canografiadas.

Madrid, 14 diciembre 1.973

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30