

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A 1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	442.918	
	24.11.75	

PATENTE DE INVENCION

③① PRIORIDADES:	③② FECHA	③③ PAIS
③① NUMERO		
50958	25.11.74	Gran Bretaña

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑥② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	BOLF	

⑤④ TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA EMULSION DE AGUA Y ACEITE QUE CONTIENE UN ESTABILIZANTE DE EMULSION.

⑦① SOLICITANTE (S)

UNILEVER, N.V.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Burg. s'Jacobplein 1, ROTTERDAM, Holanda.

⑦② INVENTOR (ES)

Antonius Franciscus Van Dam, holandés,

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 Esta invención se refiere a emulsiones que comprenden una fase oleosa y una fase acuosa y más especialmente a emulsiones de aceite en agua que contienen un estabilizante de la emulsión.

5 Se conoce el uso de, por ejemplo, la yema de huevo como agente emulsionante, por ejemplo para la preparación de mayonesa. Sin embargo, las emulsiones estabilizadas con yema de huevo, como la mayonesa, no pueden ser esterilizadas por la acción del calor debido a que se rompe la emulsión durante el calentamiento a las temperaturas de esterilización. Por
10 consiguiente, con frecuencia el pH de las emulsiones estabilizadas con yema de huevo tiene que ser inferior al dictado por los meros requisitos de sabor con objeto de obtener una estabilidad microbiológica satisfactoria en almacenamiento.

15 En la solicitud de patente holandesa 68/09971 se describe la preparación de emulsiones de aceite en agua estabilizadas. La estabilización de las emulsiones se consigue utilizando un monoacil-glicerofosfátido. El monoacil-glicerofosfátido puede ser sintetizado o preparado sometiendo el diacil-glicerofosfátido a la acción de la fosfolipasa A derivada de la pancreatina. Las emulsiones contienen preferiblemente una
20 pequeña cantidad de una proteína como la caseína o de una proteína derivada de la soja. Estas proteínas contienen fosfolipo-proteínas.

25 El uso de estas fosfolipo-proteínas no modificadas más una cantidad de fosfolípidos modificados que no están formando complejos con la proteína tiene el inconveniente de que no conduce a emulsiones térmicamente estables (compárese el Ejemplo 4 de esta memoria).
30

1 En la solicitud de patente japonesa 56.465-1962 se describe un procedimiento para la preparación de un alimento similar a la mantequilla utilizando yema de huevo o huevos completos que ha sido tratado con un extracto de Aspergillus
5 niger, Rhizopus chinensis o Aspergillus oryzae, hasta que desaparecen las propiedades de coagulación térmica de la proteína del huevo debido a la hidrólisis de las moléculas de proteína.

10 El extracto enzimático contiene, entre otros enzimas, lecitinasas que son las responsables de la descomposición de la lecitina a lisolecitina y para las que se ha indicado que producen un aroma característico. Los huevos o yemas de huevo modificados se mezclan con un aceite comestible y un emulgente como monomirísato de sorbitol para obtener el producto
15 similar a la mantequilla. Para la preparación de emulsiones estables, se utiliza una cantidad bastante considerable del emulgente. Los solicitantes utilizaron yemas de huevo o huevos completos modificados de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa antes citada
20 para la preparación de emulsiones de aceite en agua. Fallaron todos los intentos de preparación de emulsiones térmicamente estables. Por consiguiente, puede decirse que el extracto enzimático obtenido de acuerdo con la publicación japonesa solo es capaz de afectar al sabor de la composición pero es incapaz de estabilizar las emulsiones de aceite en agua.
25

30 Ahora se ha encontrado que pueden prepararse emulsiones de aceite y agua, especialmente emulsiones de aceite en agua, que presentan mayor estabilidad, especialmente mayor estabilidad térmica, que las emulsiones que contienen una fosfolipoproteína no modificada, cuando se incorpora una fosfolipo-

1 proteína que ha sido modificada por la acción de la fosfoli-
pasa A durante alguna fase de la preparación de la emulsión.

5 Las emulsiones preparadas de acuerdo con la invención
pueden utilizar la fase oleosa o la fase acuosa como fase
continua y en esta memoria son denominadas emulsiones de agua
en aceite y emulsiones de aceite en agua, respectivamente.
Se prefieren las emulsiones de aceite en agua. Este último
10 tipo de emulsión significa para los fines de esta invención
unas fases acuosas continuas que contienen cualquier canti-
dad de grasa y/o aceite en forma dispersa. Son ejemplos de
emulsiones comprendidas dentro de esta definición los pro-
ductos comestibles como las margarinas de fase invertida,
sopas o salsas, jugos de frutas naturales o artificiales,
mayonesa, aderezos, untos o productos no comestibles como
15 preparados de tocador como champús, aditivos para baño y
productos para el cuidado de la piel. Las emulsiones de acei-
te en agua preferidas son emulsiones que contienen entre 20
y 90 %, más preferiblemente entre 40 y 90 % y especialmente
entre 70 y 90 % de un aceite o un aceite conteniendo una gra-
20 sa. Por grasa entendemos un triglicérido que es duro a la
temperatura ambiente. (Todos los porcentajes dados en esta
memoria son porcentajes en peso salvo indicación en contra-
rio).

25 Como ejemplos de sustancias que contienen fosfolipo-
proteínas podemos citar la caseína, la leche descremada, el
suero de mantequilla, el suero común, la nata, la soja, la
levadura, la yema de huevo, los huevos completos, el suero
sanguíneo y las proteínas del trigo. Como fuente de fosfoli-
po-proteína se utiliza preferiblemente la yema de huevo.

30 La yema de huevo u otras fuentes de fosfolipo-proteína

1 pueden ser sometidas a la acción de la fosfolipasa A y después el producto modificado se incorpora a los productos de esta invención.

5 También es posible aislar la fosfolipo-proteína de su fuente, someter esta proteína a la acción de la fosfolipasa A y después incorporar la fosfolipo-proteína modificada a los productos de esta invención.

10 La expresión "modificada" aplicada a la fosfolipo-proteína en el sentido utilizado aquí denota cualquier grado de conversión realizado por la acción de la fosfolipasa A. La fosfolipasa A es un enzima que efectúa la escisión del enlace que une un radical ácido graso al radical glicerólico de la molécula de fosfolípido, sustituyendo con ello este radical de ácido graso por un grupo OH, lo que se denomina conversión. La fosfolipasa A también es activa cuando el fosfolípido está complejado con la proteína (y entonces llamado fosfolipo-proteína en esta memoria).

15 Las fosfolipasas distintas de la fosfolipasa A no producen las características deseadas. Una fuente adecuada de la fosfolipasa A es la pancreatina que preferiblemente ha sido tratada térmicamente, de preferencia en condiciones ácidas. El tratamiento térmico se realiza a una temperatura comprendida entre 60 y 90°C, durante 3 a 15 minutos y preferiblemente a un pH comprendido entre 4 y 6,5. La composición enzimática así obtenida está esencialmente exenta de actividad enzimática diferente de la resultante de la fosfolipasa A, que es notablemente estable bajo las condiciones del tratamiento anterior. Otra fuente adecuada de fosfolipasa A es la fosfolipasa A 10.000 de Nordmark Werke Hamburg que no
20
25
30 contiene amilasas, tiene una actividad lipásica de $0,8 \times 10^{-4}$

1 UI/mg y una actividad proteolítica equivalente a 2,3 % de tripsina pura.

5 Los fosfolípidos forman una clase de compuestos químicos que comprende como elementos principales la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina y además algo de esfingomielina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Todos estos compuestos pueden formar complejos con las proteínas.

10 El grado de conversión de la fosfolipo-proteína modificada es expresada en esta memoria como porcentaje de fosfatidilcolina más fosfatidiletanolamina convertido, calculado sobre la cantidad total de fosfatidilcolina más fosfatidiletanolamina presente antes de la conversión. Un método sencillo de obtención de las cifras requeridas para calcular este porcentaje es la cromatografía cuantitativa en capa fina.

15 El grado de conversión está determinado, entre otros factores, por la temperatura y el pH al cual tiene lugar la incubación y por el periodo de tiempo que dura la incubación de la fosfolipo-proteína con fosfolipasa A así como por la concentración del enzima y la presencia de agentes activantes como iones Ca^{2+} o agentes desactivantes como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y EDTA, durante esta incubación.

20 Se ha encontrado que incluso un grado muy bajo de conversión contribuye a la capacidad emulgente de la fosfolipo-proteína modificada así como a la estabilidad térmica de la emulsión que la contiene. Sin embargo, también se ha encontrado que la presencia de fosfolipo-proteína no modificada perjudica a los efectos beneficiosos de la composición modificada sin que, sin embargo, elimine estos totalmente. Por lo tanto, normalmente cabe esperar que sustituyendo en una emulsión todo el contenido de fosfolipo-proteína modificada,

25

30

1 con un grado de conversión del 40 % por ejemplo, por una cantidad equivalente de partes iguales de fosfolipo-proteína no modificada y fosfolipo-proteína modificada con un grado de conversión del 80 %, no se observará ninguna diferencia
5 en las propiedades de la emulsión. Sin embargo, se ha encontrado que esta última emulsión es apreciablemente menos estable al calor que la primera, aunque la última emulsión también es apreciablemente mejor en este aspecto que una emulsión estabilizada con una cantidad equivalente de la fosfolipo-proteína no modificada.
10

Se ha encontrado que el grado de conversión debe ser preferiblemente del 10 %. Las emulsiones especialmente preferidas de acuerdo con esta invención son emulsiones en las que el grado de conversión de las fosfolipo-proteínas modificadas que contiene está comprendido entre 40 % y 86 %, especialmente entre 50 % y 60 %. Por una parte, es fácilmente alcanzable un grado de conversión del 40 % y, por otra parte, garantiza una capacidad emulsionante y una estabilidad térmica muy satisfactoria de la emulsión. Los grados de conversión superiores al 60 %, aunque excelentes, son algo menos fáciles de conseguir.
15
20

El uso de fosfolipo-proteína modificada produce resultados que también son sorprendentemente distintos de los obtenidos siguiendo el procedimiento descrito en la técnica anterior (compárese con la solicitud de patente holandesa 68/09971) donde se utiliza una fosfolipo-proteína no modificada más una cierta cantidad de fosfolípidos modificados que no están formando complejo con las proteínas. Incluso cuando se agregan cantidades de fosfolípidos convertidos correspondientes a la adición de grandes cantidades de fosfolipo-proteína
25
30

1 modificada con un grado muy alto de conversión, los resulta-
dos son todavía muy decepcionantes ya que las emulsiones pre-
paradas se rompen al calentar. Las emulsiones preferidas de
5 acuerdo con la invención son por lo tanto emulsiones en las
que prácticamente todo el contenido de fosfolípidos está pre-
sente en forma de fosfolipo-proteína que ha sido sometida a
la acción de la fosfolipasa A.

10 La modificación puede realizarse bajo diferentes condi-
ciones (temperatura, tiempo de incubación, concentración de
enzima, etc.), que pueden ser fácilmente determinadas por el
experto en esta técnica. Es adecuada una proporción compren-
dida entre 0,002 y 0,2 mg de fosfolipasa A por gramo de fos-
folipo-proteína. Estos límites son los adecuados para una com-
15 posición de fosfolipasa A con una actividad específica de
70 U/mg de proteína aproximadamente. Una unidad U significa
que se libera un microequivalente de ácido graso por minuto.

20 La modificación con estas fosfolipasas A deja intacto
al complejo de fosfolípido-proteína. Mediante el aislamiento
cuidadoso por centrifugación de las fracciones lipo-proteicas
de la yema de huevo modificada y no modificada se observa que
la porción fosfolípida de la yema de huevo modificada está
constituída por liso-compuestos; en otras palabras, la modifi-
cación tiene lugar in situ sin romper el enlace proteína-
25 lípido.

30 La cantidad de fosfolipo-proteína modificada que debe
estar presente en la emulsión puede variar dentro de límites
muy amplios. Esta cantidad depende, entre otros factores, de
la composición de la emulsión, de la presencia de otros agen-
tes emulsionantes, del grado de conversión de la fosfolipo-
proteína modificada y de las propiedades deseadas en la emul-

1 sión estabilizada. La cantidad real a utilizar puede ser fácilmente determinada por los expertos en la técnica de estabilización de emulsiones.

5 Pueden aplicarse proporciones considerablemente inferiores (algunas veces) a un quinceavo de las normalmente aplicadas cuando se utiliza un material no modificado, obteniéndose una eficiencia emulsionante comparable cuando se utiliza la fosfolipo-proteína modificada. Además, en este último caso, con frecuencia las emulsiones obtenidas son altamente termo-estables.

10 Como regla general, se prefiere que las emulsiones de la invención contengan entre 0,05 y 5 %, preferiblemente entre 0,5 y 4 % y todavía mejor entre 2 y 4 % en peso de fosfolipo-proteína modificada, calculado sobre la proporción de aceite (o aceite conteniendo grasa) de la emulsión.

15 Una de las ventajas especiales de las emulsiones de esta invención es que estas emulsiones presentan mayor estabilidad térmica. Aplicando a una emulsión dada una cierta cantidad mínima de una fosfolipo-proteína modificada con un grado dado de conversión, es posible obtener emulsiones que pueden resistir a la esterilización, por ejemplo a 100°C durante 20 30 minutos, sin perder su estabilidad. Esta cantidad específica puede ser fácilmente determinada por simple experimentación. En una realización especialmente preferida del invento, se preparan emulsiones que han sido esterilizadas. Hasta ahora, en muchos casos ha sido necesario mantener las emulsiones, por ejemplo la mayonesa, a un pH relativamente bajo con objeto de conseguir una estabilidad microbiológica satisfactoria. Las emulsiones de acuerdo con la invención pueden presentar fácilmente un pH comprendido entre 4 y 6, haciéndolas 25 30

1 microbiológicamente estables por estabilización.

Además, cuando la fosfolipo-proteína modificada estabi-
lizada se utiliza como agente estabilizante de la emulsión
comunica a esta última así estabilizada otras ventajas aso-
5 ciadas con la estabilidad térmica. Por ejemplo, es posible
introducir la emulsión caliente en los envases, eliminando
así la necesidad de adoptar medidas especiales cuando estos
productos se introducen en envases a la temperatura ambiente
y se desea mantener al mismo tiempo la esterilidad.

10 La acción estabilizante obtenida como resultado del uso
del complejo de fosfolipo-proteína modificada no se limita al
aumento de la estabilidad térmica de las emulsiones de aceite
y agua. En la preparación de mayonesas o aderezos, el uso de
un complejo de fosfolipo-proteína modificada hace posible
15 partir de un aceite no invernado e incluso de un aceite que
contenga una grasa dura (véase el Ejemplo 8) consiguiendo to-
davía composiciones estables en el refrigerador.

Se han preparado emulsiones de aceite en agua que con-
tenían 0,2-8 % de yema de huevo modificada (grado de conver-
20 sión: 10-90 %), 0,5-98 % de agua, 0,15-1,4 % de ácido acéti-
co y 0,8-83 % de un aceite glicérido (aceite de maíz).

El aceite utilizado puede contener incluso cierta cantidad
de una fracción de aceite de palma fraccionado en seco (frac-
ción de oleína, p.f. 30°C). Se han obtenido emulsiones esta-
25 bles que contienen 0,2-8 % de yema de huevo modificada (gra-
do de conversión: 10-90 %), 0,5-98,3 % de agua, 0,15-1,4 %
de ácido acético, 0,8-60 % de una fracción de aceite de pal-
ma fraccionado en seco y 0-23 % de aceite opcionalmente in-
vernado (maíz). El almacenamiento de las emulsiones durante
30 varias semanas a una temperatura comprendida entre 2 y 5°C

1 seguido de almacenamiento a 37°C no produce exudación del
aceite.

5 Además se ha encontrado que el uso del complejo de fos-
folipo-proteína modificada proporciona la posibilidad de au-
mentar el contenido en alcohol de las emulsiones. Esto tiene
la ventaja de que se intensifica el sabor de ciertos compo-
nentes como las especias.

10 Los límites preferidos de las concentraciones de los in-
gredientes de estas emulsiones de aceite en agua son: 1-6 %
de etanol, 0,15-1,4 % de ácido acético, 0,2-8 % de yema de
huevo modificada (grado de conversión: 10-90 %), 0,8-83 % de
aceite y 5-15 % de agua. Estas emulsiones presentan una esta-
bilidad y un sabor razonables.

15 Un aspecto de esta invención es una emulsión de aceite
en agua que contiene yema de huevo modificada que está esen-
cialmente exenta de colesterol.

20 Los límites preferidos para los ingredientes de estas
emulsiones están comprendidos entre los siguientes: 0,2-8 %
de yema de huevo modificada (grado de conversión: 10-90 %, que
contiene 0,02-0,18 % de colesterol), 0,5-98,8 % de agua,
0,15-1,4 % de ácido acético y 0,8-83 % de aceite. Se ha en-
contrado que estas emulsiones son muy estables a la tempera-
tura ambiente y durante el calentamiento a 100°C durante 30 mi-
nutos. Unas emulsiones comparables preparadas con yema de hue-
vo no modificada de la que se ha extraído el colesterol se
descomponen durante la adición del aceite.

25 La invención es ilustrada mediante los siguientes ejem-
plos:

EJEMPLO 1

En este ejemplo, se trata una yema de huevo preservada (92 % de yema de huevo, 7 % de cloruro sódico y 1 % de sorbato potásico) con diferentes enzimas para demostrar que el componente activo es la fosfolipasa A. La yema de huevo tratada con enzima se utiliza para preparar en un Ultra-Turrax una emulsión de aceite en agua de la siguiente composición:

yema de huevo (de la que el 38,5 % son fosfolipo-proteínas)	7,5 g
agua	5 ml
ácido acético al 10 %	5 ml
aceite de soja	80 g

La emulsión así obtenida se calienta a 100°C durante 30 minutos.

La pancreatina [4 x NF (National Formula) XIIⁱⁱ], la pepsina (3,5 m Anson U/mg), la papaína (3,5 m Anson U/mg), la tripsina (20.000 E/g), la ficina (3,9 m Anson U/mg) y la pronasa E (70.000 PUK/gⁱⁱⁱ) se obtienen de la firma Merck, Darmstadt, Alemania.

i) definida como sustancia que contiene enzimas, principalmente amilasa, tripsina y lipasa, que convierte no menos de cien veces su propio peso de almidón de patata NF (utilizado como patrón de referencia) en hidratos de carbono solubles y no menos de cien veces su propio peso de caseína en proteasas.

ii) 1 PUK = la cantidad de enzima que bajo las condiciones del ensayo efectúa una ϵ_{660} de 1,0 (Booklet Biochemica de E. Merck, Darmstadt, Alemania (1971)).

El término "fosfolipasa A" en la siguiente tabla indica

1. la solución obtenida calentando una dispersión de pancreatina al 5,2 % a 70°C durante 6 minutos y a un pH de 4. La dispersión caliente se enfría rápidamente a 0°C y se centrifuga a 3000 x g. La solución amarilla transparente (52 mg de enzima/ml) se utiliza tal como se obtiene.

5 La fosfolipasa C y la fosfolipasa D se obtienen de la firma Sigma International Ltd., St. Louis, Mo., Estados Unidos.

Los resultados se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

10

15

20

25

30

Especie de enzima y cofactor.	Concentración de enzima por 60 g de yema de huevo (mg)	Incubación			Estabilidad de la emulsión aceite en agua después de calentar 10 min. a 100°C	Grado de conversión (%)
		Tiempo (horas)	pH	Temperatura, °C		
Papaína con cisteína (5 x 10 ⁻³ M)	100	16	7,0	37	rota al cabo de algunos minutos	
Ficina con cisteína (5 x 10 ⁻³ M)	100	16	7,0	37	id	
Pronasa con cisteína (5 x 10 ⁻³ M)	100	16	7,0	37	id.	
Pepsina	100	16	2,0	37	id.	
Tripsina	40	16	6,5	37	id.	
Tripsina con desoxicolato	140	16	6,5	37	id.	
Pancreatina pretratada	1000	16	6,5	37	estable	>50
Fosfolipasa A	80	16	6,5	37	estable	>50
Fosfolipasa C	80	16	6,5	37	rota	
Fosfolipasa D	80	16	6,5	37	rota	

1 Esta tabla demuestra que solo son térmicamente estables las emulsiones estabilizadas con yema de huevo que ha sido tratada con fosfolipasa A.

EJEMPLO 2

5 Se utiliza la solución de fosfolipasa A del Ejemplo 1 para incubar la yema de huevo como se ha descrito en el Ejemplo 1 bajo condiciones variables indicadas en la Tabla II. El grado de conversión, antes definido, de la yema de huevo obtenida después de cada incubación se encuentra en la tabla. También se encuentra el efecto del uso de yema de huevo de diferentes grados de conversión sobre la estabilidad térmica de una emulsión como la descrita en el Ejemplo 1.

TABLA II

Temp. (°C)	Incubación		Concentración de enzima por 15 g de yema de huevo (mg)	Estabilidad de la emulsión de aceite en agua al 80 % después de calentar (30 min. a 100°C)	Grado de conversión (%)
	Tiempo (horas)	pH			
48	5	6,5	0,0	rota	0
"	"	"	2,0	algo estable	10
"	"	"	4,0	id.	18
20	"	"	6,0	cierta exudación de aceite	26
"	"	"	8,0	id.	33
"	"	"	10,0	estable con ligera exudación de aceite	39
"	"	"	12,0	id.	44
"	"	"	14,0	id.	49
25	"	"	16,0	estable	54
"	"	"	18,0	estable	58
"	"	"	20,0	estable	62
"	"	"	40,0	estable	65
48	16	6,5	20,0	estable	86

30 Esta tabla demuestra que las emulsiones estabilizadas con yema de huevo modificada de grados de conversión hasta de

1 solamente el 10 % resultan mejoradas en lo que se refiere a
su estabilidad térmica. La yema de huevo modificada con gra-
dos de conversión entre 50 y 86 % es muy eficaz para comuni-
5 car estabilidad contra los tratamientos térmicos severos a
las emulsiones preparadas con ella.

EJEMPLO 3

10 Se preparan diversas emulsiones como se ha descrito en
el Ejemplo 1 a excepción de que se modifica la proporción de
yema de huevo y de que se utilizan dos clases diferentes de
yema de huevo, a saber: yema de huevo no modificada y yema
de huevo modificada hasta un grado de conversión del 50 %.
15 Las emulsiones preparadas fueron evaluadas teniendo en cuenta
su estabilidad antes (a la temperatura ambiente) y después
de la esterilización durante 30 minutos a 100°C. Los resulta-
dos se encuentran en la Tabla III.

TABLA III

Muestra de yema de huevo	Porcentaje de yema de huevo en la emulsión	Propiedades a	
		Temperatura ambiente	Después de 30 minutos a 100°C
No modificada	1	malas, exudación de aceite	rota
	2,5	malas, exudación de aceite	rota
	5,0	suficientes	rota
	7,5	buenas	rota
25 Modificada	0,5	buenas	buenas
	1	buenas	buenas
	2,5	buenas	buenas
	5,0	buenas	buenas
	7,5	buenas	buenas

30 Esta tabla indica que la modificación no solamente aumenta la estabilidad térmica de la emulsión preparada con la

1 yema sino que también mejora las propiedades emulsionantes
de la yema de huevo.

EJEMPLO 4

5 Este ejemplo ilustra los resultados obtenidos cuando,
en lugar del complejo de fosfolipo-proteína modificada de
acuerdo con esta invención, se utiliza una mezcla de fosfo-
lípidos modificados y yema de huevo no modificada. Se prepara
10 emulsiones como la descrita en el Ejemplo 1 en las que
la yema de huevo no está modificada pero a las que se agre-
gan cantidades crecientes (0,25-1,25 g/7,5 g de yema de hue-
vo) de fosfolípidos modificados con un grado de conversión
del 50 %. Después de calentar a 100°C durante 30 minutos, la
emulsión preparada con la concentración más baja de fosfo-
lípidos modificados está totalmente rota; las otras presentan
15 claramente exudación de aceite. Además, es claramente observa-
ble un sabor amargo. La emulsión preparada con 1,25 g de fos-
folípidos modificados contiene tres veces la cantidad de
fosfolípidos convertidos que podría haber estado presente co-
mo máximo si en lugar de la yema de huevo no modificada se
20 hubiera utilizado la misma cantidad de yema de huevo modifi-
cada con un grado de conversión del 100 %. No obstante, el
resultado es mucho menos satisfactorio.

EJEMPLO 5

25 Se aísla de la soja una fracción de fosfolipo-proteína.
Se prueba una solución que contiene 30 % de fosfolipo-proteí-
na para preparar una emulsión de aceite en agua al 80 % como
se ha descrito en el Ejemplo 1 pero omitiendo la yema de hue-
vo, aplicando varias cantidades de la solución de fosfolipo-
proteína y completando el resto con agua. Todos los esfuer-
30 zos fallaron.

1 La fosfolipo-proteína se modificó hasta un grado de con-
versión del 80 % y se aplicó un 16 % (sobre el contenido de
aceite) de la solución al 30 %, obteniéndose una emulsión
perfectamente estable a la temperatura ambiente y que podía
5 ser calentada durante 30 minutos, a 100°C, sin perder su
estabilidad.

EJEMPLO 6

10 Se preparan dos emulsiones de aceite en agua al 80 %
como se ha descrito en el Ejemplo 1, una con la yema de hue-
vo en forma no modificada y la otra con la yema de huevo en
forma modificada con un grado de conversión del 80 %.

15 Ambas emulsiones se diluyen con agua formando así dos
series de emulsiones con unos contenidos de aceite de 48 %, 24 %, 12 %, 4 % y 0,8 % respectivamente. Estas emulsiones di-
luídas se calientan posteriormente a 100°C durante 30 a 90
minutos.

20 La serie de emulsiones derivadas de la emulsión prepara-
da con yema de huevo no modificada presenta intensa exuda-
ción de aceite; la serie de emulsiones derivadas de la emul-
sión preparada con yema de huevo modificada, sin embargo,
no presenta ningún tipo de exudación de aceite.

EJEMPLO 7

Preparación de una mayonesa utilizando un aceite no invernado

25 En este experimento se trata un huevo completo fresco
y sazonado con sal (90,6 % de huevo completo fresco, 8,7 %
de cloruro sódico y 0,7 % de ácido sórbico) con fosfolipa-
sa A durante 3 horas a 55°C. La concentración de enzima es
alrededor de 0,003 % calculada sobre el huevo completo. El
huevo completo modificado se utiliza para preparar una mayo-
30 nesa de la siguiente composición, mediante un molino coloi-

1 dal:

	huevo completo fresco y sazonado	15,45 g
	agua	3,8 g
	vinagre	5,3 g
5	aceite de maíz no invernado	75,0 g
	especias	0,045 g
	agente espesador	0,40 g

El aceite de maíz no está invernado y presenta turbidez después de ser almacenado durante 5 horas a 0°C.

10

Se prepara una muestra patrón de mayonesa como se ha descrito a excepción de que se utiliza huevo completo sazonado no modificado en lugar del huevo completo sazonado modificado. Ambas muestras se almacenan durante 5 semanas a 2° y 5°C, respectivamente. Después de almacenadas a 2° y 5°C, las muestras se almacenan durante 24 horas a 20°C seguido de almacenamiento a 37°C durante 2 horas. Se examinan las muestras para determinar la exudación de aceite y el aumento del diámetro medio de los glóbulos de grasa microscópicamente.

15

20

Por examen microscópico se observa que la mayonesa preparada con el huevo completo no modificado presenta un gran aumento del diámetro medio (desde 5 micras antes del almacenamiento hasta unas 15-25 micras después del almacenamiento) de los glóbulos de grasa después de almacenar a 2 y 5°C, 20°C y 37°C, mientras que el diámetro medio de los glóbulos de grasa de la mayonesa preparada con huevo completo modificado es casi el mismo antes y después del almacenamiento. Los resultados detallados se encuentran en la Tabla IV. No puede observarse visualmente exudación de aceite en ninguna de las muestras.

25

30

TABLA IV

Diámetro medio y extremos de los glóbulos de grasa en la mayonesa preparada con huevo completo modificado y no modificado antes y después del almacenamiento

	<u>Condiciones de almacenamiento</u>	<u>Huevo completo no modificado</u>	<u>Huevo completo modificado</u>
5	antes del almacenamiento	3-5 micras	3-5 micras
	5 semanas a 2°C + 24 horas a 20°C	15 micras	3-4 (máximo 12-15 micras)
10	5 semanas a 2°C + 24 horas a 20°C + 2 horas a 37°C	20-25 micras (máx. 40 micras)	4-7 (máximo 23 micras)
	5 semanas a 5°C + 24 horas a 20°C	18 micras (máximo 30 micras)	3 micras (máximo 13 micras)
15	5 semanas a 5°C + 24 horas a 20°C + 2 horas a 37°C	8-20 (máximo 50 micras)	7 micras (máximo 15 micras)

EJEMPLO 8

Preparación de una mayonesa conteniendo grasa dura

En este experimento, un huevo completo fresco sazonado (90,6 % de huevo fresco, 8,7 % de cloruro sódico y 0,7 % de ácido sórbico) se trata con fosfolipasa A durante 3 horas a 55°C. La concentración de enzima es alrededor de 0,004 %, calculada sobre el huevo completo. El huevo completo tratado con enzima se utiliza para preparar en un aparato Ultra-Turrax una emulsión de aceite en agua de la siguiente composición:

20	huevo completo fresco y sazonado	15,45 g
	agua	3,8 g
	vinagre	5,3 g
25	mezclas en diferentes proporciones de aceite de maíz y aceite de palma fraccionado en seco	75,0 g
30		

1 En la preparación de las muestras, la fracción cruda y
refinada de aceite de palma fraccionado en seco se calienta
a 60°C y se mezcla en diferentes proporciones con aceite de
maíz; la mezcla caliente de fracción de aceite de palma y
5 aceite de maíz se agita con una Ultra-Turrax en una fase
acuosa que contiene huevo completo modificado o no modifica-
do, ácido acético y sal. Las muestras se mantienen durante
tres semanas a 5°C. Después del almacenamiento, las muestras
se calientan a 20°C durante 24 horas seguido de calentamien-
to a 37°C durante 2 horas y se examina la exudación de acei-
te.

10 La Tabla V indica que las muestras preparadas con hue-
vo completo modificado son estables en el frigorífico inclu-
so cuando se sustituye alrededor del 40 % del aceite de maíz
por aceite de palma fraccionado en seco, crudo o refinado.
15 Por el contrario, todas las muestras preparadas con huevo
completo no modificado no son estables en el frigorífico.
Incluso la muestra preparada con 100 % de aceite de maíz no
es estable en el frigorífico, debido probablemente a la ele-
vada temperatura de preparación de la muestra. Se supone que
20 una sustitución del 40 % es próxima al límite máximo admisi-
ble. Probablemente con una fracción de aceite de palma con
una curva de dilatación menos pendiente pueda conseguirse un
mayor porcentaje de sustitución.

25 Se ha encontrado que utilizando huevo completo modifica-
do, puede prepararse una mayonesa estable en el frigorífico
en la que el 40 % del aceite de maíz es sustituido por aceite
de palma fraccionado en seco.

30

TABLA V

Estabilidad en frío de la mayonesa preparada con huevo completo modificado y no modificado y con diferentes proporciones de aceite de palma fraccionado en seco y aceite de maíz

Fracción de aceite de palma fraccionado en seco %	Huevo completo		Huevo completo modificado	
	Fracción cruda de aceite de palma fraccionado en seco	Fracción refinada de aceite de palma fraccionado en seco	Fracción cruda de aceite de palma fraccionado en seco	Fracción refinada de aceite de palma fraccionado en seco
0	estabilidad estable a 20°C	estabilidad estable a 37°C	estabilidad estable a 20°C	estabilidad estable a 37°C
10	separación ligera de aceite	separación ligera de aceite	estable	estable
20	mucho aceite	mucho aceite	estable	estable
23	rota	mucho aceite	id.	id.
27	rota	rota	id.	id.
30	rota	rota	id.	id.
33	no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.
36	no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.
39	rota	rota	estable	estable

1

5

10

15

20

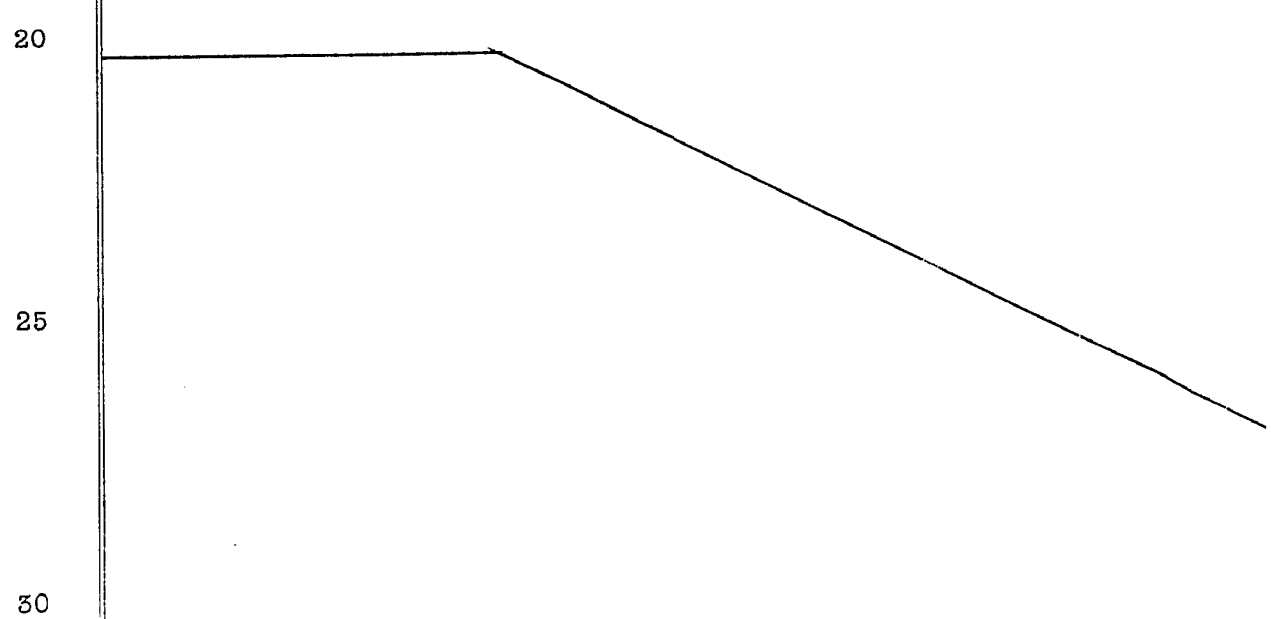
25

30

TABLA V

Estabilidad en frío de la mayonesa preparada con huevo completo modificado
proporciones de aceite de palma fraccionado en seco

Fracción de aceite de palma fraccionado en seco %	Huevo completo				Fracción de aceite de palma fraccionado en seco %
	Fracción cruda de aceite de palma fraccionado en seco		Fracción refinada de aceite de palma fraccionado en seco		
	estabilidad a 20°C	estabilidad a 37°C	estabilidad a 20°C	estabilidad a 37°C	
0	separación ligera de aceite	mucho aceite	separación ligera de aceite	mucho aceite	estabilidad a 20°C
10	rota	rota	mucho aceite	rota	
20	rota	rota	rota	rota	
23	rota	rota	rota	rota	
27	no llevada a cabo	no llevada a cabo	no llevada a cabo	no llevada a cabo	
30	no llevada a cabo	rota	no llevada a cabo	no llevada a cabo	
33	rota	no llevada a cabo	rota	no llevada a cabo	
36	rota	no llevada a cabo	no llevada a cabo	no llevada a cabo	
39	rota	rota	rota	rota	



30

TABLA V

ada con huevo completo modificado y no modificado y con diferentes
e de palma fraccionado en seco y aceite de maíz

Completo		Huevo completo modificado			
Fracción refinada de aceite de palma fraccionado en seco		Fracción cruda de aceite de palma fraccionado en seco		Fracción refinada de aceite de palma fraccionado en seco	
estabilidad a 20°C	estabilidad a 37°C	estabilidad a 20°C	estabilidad a 37°C	estabilidad a 20°C	estabilidad a 37°C
estable	estable	estable	estable	estable	estable
rotó	rotó	id.	id.	id.	id.
rotó	rotó	id.	id.	id.	id.
rotó	rotó	id.	id.	id.	id.
no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.	id.	id.
no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.	id.	id.
no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.	id.	id.
no llevada a cabo	no llevada a cabo	id.	id.	id.	id.
rotó	rotó	estable	estable	estable	estable

EJEMPLO 9

Preparación de emulsiones con mayor concentración de alcohol

1
5
10
15
20
25

Se preparan varias emulsiones como la descrita en el Ejemplo 1 a excepción de que se sustituyen 5 ml de agua por 5 ml de etanol al 96 %, se utilizan dos clases diferentes de yema de huevo, es decir, yema de huevo no modificada y yema de huevo modificada hasta un grado de conversión del 50 % o más y se añaden especias diferentes. Las emulsiones preparadas se examinan para observar su estabilidad antes y después de almacenamiento durante 48 horas a 5°C, seguido de 24 horas a la temperatura ambiente y para determinar el sabor de las emulsiones preparadas. Se ha encontrado que utilizando yema de huevo no modificada como emulgente no puede prepararse ninguna emulsión estable de aceite en agua al 80 %. Durante la adición del aceite de soja a la fase acuosa que contiene alcohol, la emulsión se rompe después de añadir algunos mililitros de aceite. Con la yema de huevo modificada como emulgente, puede prepararse una emulsión de aceite en agua al 80 % que es estable antes y después del almacenamiento de 48 horas a 5°C seguido de almacenamiento de 24 horas a la temperatura ambiente. El sabor de la mayonesa que contiene alcohol se considera bueno en comparación con el de una muestra que no contiene alcohol. Se observa un sabor a especias algo más intenso y más dulce.

EJEMPLO 10

Preparación de emulsiones empleando yema de huevo modificada de la que se ha separado prácticamente todo el colesterol.

30

Se separa el 95-99 % del colesterol de una yema de huevo modificada sazonada y secada por atomización y de una yema de huevo no modificada, por extracción con diclorometano.

1 Para separar el diclorometano, el polvo se seca a vacío a
una temperatura de unos 45°C durante 2 horas aproximadamen
te. Con estos polvos secos se preparan dos emulsiones de
5 aceite en agua al 80 % en la forma descrita en el Ejemplo
1, una con la yema de huevo en forma no modificada y la o-
tra con la yema de huevo modificada con un grado de conver
sión del 50 % o más. La emulsión preparada con la yema de
huevo no modificada extraída se rompe durante la adición de
10 aceite; la otra emulsión con la yema de huevo modificada
extraída es estable a la temperatura ambiente y durante la
calefacción a 100°C durante 10 minutos.

En resumen la patente de invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la preparación de una
emulsión de agua y aceite que contiene un estabilizante de
emulsión, caracterizado porque comprende el tratar una fos-
folipo-proteína con fosfolipasa A para obtener un grado de
conversión de por lo menos 10 % y agregar como mínimo 0,05 %
20 basado en la cantidad de aceite, de la fosfolipo-proteína
tratada en la formulación.

25 2. Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque la fosfolipo-proteína se trata con una
fosfolipasa A derivada de la pancreatina que ha sido sometida
a tratamiento térmico, durante un periodo suficiente como
para inactivar toda actividad enzimática que no sea la resul
tante de la fosfolipasa A.

30 3. Un procedimiento según la reivindicación 2,
caracterizado porque el tratamiento térmico se lleva a cabo

1 bajo condiciones ácidas.

4. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 60 y 90° durante 3 a 15 minutos.

5. Un procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el tratamiento térmico se lleva a cabo a un pH de 4 a 6,5.

10 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea de 0,002 a 0,2 mg. de fosfolipasa A de actividad específica 70 mg de proteína por gramo de fosfolipo-proteína.

15 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agua constituye la fase continua de la emulsión.

8. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fosfolipo-proteína es huevo completo.

9. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fosfolipo-proteína es yema de huevo.

20 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la fosfolipo-proteína es yema de huevo sustancialmente libre de colesterol.

25 11. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque sustancialmente toda la fosfolipo-proteína se somete al tratamiento con fosfolipasa A.

30 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se emplea de 0,05 a 5% de fosfolipo-proteína modificada, calculada sobre el contenido en aceite de la emulsión.

1

13. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el grado de conversión de la fosfolipoproteína es de 40 a 60 %.

5

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la emulsión contiene:

0,2 a 8% de yema de huevo modificada (grado de conversión 10 - 90%)

0,5 a 98,3% de agua

10

0,15 a 1,4% de ácido acético

0,8 a 83% de aceite.

15. Un procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque parte del aceite se sustituye por grasa.

15

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque la emulsión contiene de 0,8 a 60% de una fracción de aceite de palma fraccionado en saco (fracción de oleína).

20

17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la emulsión contiene:

1 a 6% de etanol.

0,15 a 1,4% de ácido acético.

0,2 - 8% de yema de huevo modificada (grado de conversión de 10 a 90%).

25

5 a 15% de agua.

0,8 a 83% de aceite.

18. Un procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la emulsión contiene:

30

0,2 a 8% de yema de huevo modificada que contie

1

ne de 0,02 a 0,18% de colesterol (grado de conversión 10 a 90%)

0,5 a 98,3% de agua

0,15 a 1,4% de ácido acético.

5

0,8 a 83% de aceite.

19. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA EMULSION DE AGUA Y ACEITE QUE CONTIENE UN ESTABILIZANTE DE EMULSION.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintiseis páginas mecanografiadas.

Madrid, 24 de Noviembre de 1975

BERNARDO UNGRIA

P.D.

15

20

25

30