



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 100**

51 Int. Cl.:
A23P 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798066 .9**

96 Fecha de presentación : **23.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1699304**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Barrera comestible.**

30 Prioridad: **23.12.2003 EP 03079171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Unilever N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Bevers, Loes Elizabeth;**
Bouwens, Elisabeth, Cornelia, Maria;
Ravestein, Peter y
Van der Hijden, Hendrikus Theodorus
Wilhelmus M.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 313 100 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

Barrera comestible.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una barrera. Más particularmente, la invención se refiere a una barrera comestible de humedad o sabor adecuada para usar en productos alimenticios, que comprende un biopolímero reticulado y un material lipídico.

10 **Antecedentes de la invención**

La migración de la humedad y el sabor en productos alimenticios plantea un serio problema porque afecta de forma negativa al aspecto, gusto, frescura, caducidad y satisfacción del consumidor. Con el fin de evitar tal migración, se han propuesto materiales de barrera comestibles. La tecnología de barreras comestibles frente a la humedad disponible actualmente no es adecuada para detener de forma eficaz la migración de la humedad en productos alimenticios compuestos durante la vida de almacenamiento. Las barreras frente a la humedad basadas en material lipídico carecen de resistencia física y de flexibilidad y no pueden resistir temperaturas elevadas durante el procesamiento. Las películas comestibles a base de hidrocoloides potencialmente poseen una mejor resistencia a la tensión, pero no son muy eficaces debido a su naturaleza hidrofílica. Tras el secado, las películas hidrocoloides tienden a convertirse en bastante frágiles y, por tanto, pierden sus propiedades físicas superiores. Las combinaciones de películas hidrocoloidales y lipídicas se han aplicado en capas alternantes (laminado) para aprovechar ambos sistemas, pero requieren un procesamiento complejo y caro.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad de barreras comestibles alternativas o mejoradas adecuadas para usar en productos alimenticios.

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar una barrera comestible adecuada para usar en productos alimenticios, que no tanga uno o más de los inconvenientes mencionados en lo que antecede.

Ahora, sorprendentemente se ha descubierto que el objeto anterior de la invención se puede conseguir mediante la barrera comestible de la invención, que es adecuada para usar en productos alimenticios, y comprende un biopolímero reticulado y un material lipídico, en la que dicha barrera comestible tiene un espesor de aproximadamente 2 a 1.500 micrómetros. Preferentemente, el biopolímero es una pectina, chitosano o almidón reticulado.

Además, se descubrió que la estabilidad a la temperatura de la barrera era excelente, son estables de -20°C a 150°C, estables a la congelación-descongelación y estables a la cocción y al freído.

El documento WO02/071870 (Unilever) describe un producto espumado en el que se incorpora homogéneamente pectina reticulada, como en los productos alimenticios tales como una crema o un helado.

El documento anterior WO04/000041 (Unilever) no pre-publicado describe un procedimiento de preparación de emulsiones de aceite en agua estables, en las que un compuesto feruolado se oxida, al menos parcialmente, durante o después de la formación de la emulsión de aceite en agua.

Los documentos US-A-4.661.359 y EP-A-0328317 describen barreras comestibles adecuadas para usar en productos alimenticios.

50 **Definición de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una barrera comestible adecuada para usar en productos alimenticios, que comprende un biopolímero reticulado y un material lipídico, en la que dicha barrera comestible tiene un espesor de aproximadamente 2 a 1.500 micrómetros y el material lipídico es un aceite, grasa o cera comestible.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un producto alimenticio compuesto que comprende partes que tiene diferentes actividades de agua (aa), separadas por el material de barrera de acuerdo con la invención.

60 **Descripción detallada de la invención**

La barrera comestible de acuerdo con la presente invención comprende un biopolímero reticulado y un material lipídico, en la que dicha barrera comestible tiene un espesor de aproximadamente 2 a 1.500 micrómetros. La barrera forma una película que se puede usar para prevenir la migración de humedad o sabor de una parte de un producto alimenticio a otra parte. Se ha descubierto que las películas que comprenden tales biopolímeros reticulados tienen una resistencia física elevada. Si los biopolímeros son hidrocoloides, sorprendentemente las películas poseen buenas propiedades de adherencia a una amplia gama de matrices alimentarias. Las películas de hidrocoloide forman eficaces barreras frente a aromas. Las películas barrera con un elevado contenido en lípidos son muy eficaces en la inhibición

ES 2 313 100 T3

de la migración de la humedad. La capacidad de unión a lípidos de la película puede potenciarse más mediante modificación hidrofóbica, es decir mediante fijación de los grupos hidrófobos a los polímeros reticulados.

Se ha encontrado especialmente atractivo aplicar tecnología de reticulación enzimática para detener la migración de agua y/o sabor de los ingredientes. En esta técnica, la pectina ferulilada o los biopolímeros feruolados o los biopolímeros fijados a vanillina tales como chitosano-vanillina están reticulados covalentemente.

Se ha descubierto que es posible potenciar la resistencia física de la película de barrera comestible a través de reticulación de los polímeros hidrocoloides y explotar esta mayor resistencia en combinación con una elevada capacidad de unión de la película debido a fuertes interacciones entre la red hidrocoloide y los lípidos. Además, las propiedades químicas de los hidrocoloides permiten una fuerte adherencia a una amplia gama de superficies de ingredientes.

Se sabe que ciertos biopolímeros que contienen grupos de ácido ferúlico fijados a su estructura son se pueden gelificar mediante oxidación. Un ejemplo de estos polímeros es la pectina de un número limitado de fuentes vegetales. La gelificación se puede conseguir mediante la adición de una cantidad adecuada de una enzima del tipo oxidasa, por ejemplo lacasa o peroxidasa. Los ingredientes de la aplicación pueden contener estas enzimas, lo que permite que el proceso se produzca sin la adición de enzimas exógenas. Las barreras a la humedad pueden desempeñar un importante papel para potenciar la calidad del producto durante el almacenamiento de productos alimenticios compuestos. La inestabilidad termodinámica de moléculas pequeñas en diferentes compartimentos del producto alimenticio compuesto dirige la migración hacia el interior de otros compartimentos. La migración resultante de humedad, sabor y color causa el deterioro de las propiedades sensoriales de las diferentes partes del producto alimenticio compuesto. La aplicación de la nueva tecnología de barrera en la superficie de los ingredientes inhibe la migración de agua, sabor y color, lo que tiene como resultado una consistencia mejor de los ingredientes y, por tanto, mejor calidad global del producto.

TABLA 1

	Propiedades de formación de película	Resistencia física	Capacidad de unión a lípidos	Propiedades de barrera de humedad	Propiedades de barrera de aroma
Hidrocoloides	++	-	-	-	+
Hidrocoloides reticulados	+++	+++	+	-	++
Lípidos entramados	++	++		+++	-
Lípidos unidos covalentemente	++	++	+++	+	-
Lípidos unidos covalentemente + lípidos entramados	++	++	+++	++++	-

La invención se refiere a la composición y la preparación de un material de barra de humedad comestible. Tal barrera consiste en una red de hidrocoloides al menos acoplados (covalentemente).

El acoplamiento covalente se puede conseguir por medio de agentes de reticulación como epíclorohidrina. Como alternativa, el acoplamiento covalente se puede conseguir mediante una reacción de oxidación de grupos polifenólicos (p. ej., residuos de ácido ferúlico), que conduce a la formación de gel o una viscosidad al menos incrementada de la fase acuosa. La capacidad de formación de gel de, por ejemplo, las pectinas se describe en, por ejemplo, el documento WO-A-98/22513 y el documento WO-A-00/40098 y el documento WO-A-96/03440.

Se sabe que los grupos de ácido ferúlico (grupos 4-hidroxi-3-metoxi-cinnamilo) son capaces de reticularse en presencia de ciertos oxidantes (p. ej., Oosterveld y col., oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp, Carbohydrate Research 328; 199-207, 2000). La parte de 4-hidroxil-3-metoxi-benceno es la fracción funcional

ES 2 313 100 T3

del ácido ferúlico que está implicada en la reacción de reticulación oxidativa. Y, por tanto, con este tipo de grupo (ortometoxi)fenólico se pueden establecer reticulaciones entre moléculas. En el proceso de oxidación se forma un nuevo enlace covalente entre dos grupos individuales ferúlico u otros fenólicos.

5 El término oxidante se usa para indicar un agente de oxidación, que puede ser un agente de oxidación químico o una enzima. Una enzima puede usarse sola o combinada con un co-oxidante tal como peróxido de hidrógeno.

10 El compuesto que comprende grupos feruolados (u orto-metoxi-fenólico similar) es, preferentemente, un polímero, más preferentemente un polisacárido. Entre los ejemplos de polímeros adecuados se incluyen pectina, chitosano, arabinano, galactano, derivados de celulosa, galactomananos tales como goma guar, goma garrofín, almidones u otros polímeros, que comprenden grupos hidroxilo que pueden esterificarse hasta un grupo de ácido ferúlico. Como alternativa, el grupo orto-metoxi-fenólico se puede acoplar covalentemente a la estructura de hidrato de carbono. Los polímeros que comprenden grupos de ácido ferúlico pueden ser polímeros naturales o polímeros sintetizados. Ejemplos de polímeros naturales con grupos de ácido ferúlico son pectina de caña de azúcar y arabinosilanos aislados de cereales. Los procedimientos sintéticos para preparar polímeros con grupos de ácido ferúlico normalmente incluyen esterificación de ácido ferúlico hasta un grupo hidroxilo libre situado sobre la estructura del polímero o sobre un sustituyente de azúcar.

20 Como alternativa, en la cadena polimérica se puede introducir un grupo fenólico a través de un enlace imina entre un grupo amina en el polímero u una función aldehído en el compuesto fenólico, como en, por ejemplo, chitosano y vanilina.

25 En una forma de realización altamente preferida, el compuesto feruolado es una pectina, todavía más preferida pectina de caña de azúcar. Las unidades estructurantes principales de pectina son regiones homogalacturónicas lisas y regiones ramificadas en las que se localizan la mayoría de los azúcares neutros. La arabinosa es el azúcar neutro predominante. Galactosa está presente en ramnogalacturonano. El 50-55% de los grupos de ácido ferúlico está unido a unidades de arabinosa y aproximadamente el 45-50% de los grupos de ácido ferúlico está unido a residuos de galactosa.

30 Preferentemente, el 15-80% de todos los grupos de ácido ferúlico están oxidados en la emulsión final, tras la oxidación.

35 Se prefiere que la mayoría de los grupos de ácido ferúlico no estén oxidados antes de la oxidación durante la formación de gel. Incluso más preferido, antes de la formación de gel, como mucho el 10% de todos los grupos de ácido ferúlico están oxidados.

En otra forma de realización preferida, el polímero es chitosano con fracciones de vanilina covalentemente acopladas. El acoplamiento de vanilina a la estructura de chitosano se puede conseguir a través de una base de Schiff.

40 En otra forma de realización, el polímero es almidón reticulado. También es posible usar una proteína reticulada o una combinación reticulada de una o más proteínas y uno o más hidratos de carbono.

45 La barrera comestible de acuerdo con la invención incluye un material lipídico y la oxidación de los polímeros feruolados conduce a la formación de una red, de modo que la fase de lípidos dispersos está atrapada en forma de una emulsión de a/a-capa. La composición lipídica depende del tipo de producto y sus condiciones de procesamiento. El material lipídico puede ser cualquier grasa o cera oleosa comestible y, preferentemente, se selecciona del grupo compuesto por aceite de girasol, aceite de coco, grasa de mantequilla, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de cacahuete o aceites extraídos de material de plantas o flores, tales como aceite de rosas y combinaciones de los mismos. También quedan abarcadas en la invención aceites y ceras fraccionados.

50 La oxidación se puede conseguir mediante la acción de un potente oxidante químico tal como peryodato potásico, permanganato potásico o ferrocianuro potásico.

55 Como alternativa, la oxidación se puede conseguir mediante el uso de una enzima oxidante tal como peroxidasa, una oxidasa de polifenol, por ejemplo oxidasa catecol, tirosinasa o una lacasa. Las peroxidases se pueden dividir en las que se originan en plantas, tales como peroxidasa de tomate, hongos o bacterias, y las que proceden de una fuente mamífero. Las lacasas se pueden obtener de diversas fuentes microbianas, fundamentalmente bacterias y hongos (incluidos hongos filamentosos y levaduras), y ejemplos adecuados de lacasas incluyen las que se pueden obtener de cepas de *Aspergillus*, *Neurospora* (p. ej., *N. crassa*), *Prodoxopora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes* (algunas de cuyas especies/cepas se conocen por varios nombres y/o anteriormente se han clasificado de forma diferente); *Polyborus*, *Rhizoctonia*, *Coprinus*, *Psatyrella*, *Myceliophthora*, *Schytalidium*, *Phlebia* o *Coriolus*.

65 Las enzimas preferidas se seleccionan del grupo compuesto por peroxidasa de tomate, peroxidasa de rábano, peroxidasa de soja y lacasas que muestran un potencial redox de, preferentemente, más de 450 mV, tal y como se describe en E. Solomon y col., *Chem Rev*, 1996, pág. 2563-2605.

En caso de que se aplique un sistema oxidante enzimático, la enzima de añade, preferentemente, en forma de una solución o una dispersión en sistema de tampón acuoso. Las enzimas indicadas antes son enzimas adecuadas. Algunas

ES 2 313 100 T3

enzimas, como las peroxidases, requieren la presencia de un cooxidante, tal como peróxido de hidrógeno, para su actividad.

Preferentemente, el cooxidante se añade por separado de la enzima que requiere su presencia.

La cantidad de enzima añadida se expresa en términos de unidades de actividad. Preferentemente, la enzima está presente en exceso. La cantidad de enzima añadida es preferentemente tal que se produce una rápida reticulación. Para una peroxidasa, la cantidad de enzima añadida es, preferentemente, de 10 a 100.000 unidades de actividad ABTS por ml de líquido. En algunos ingredientes alimentarios como, por ejemplo, frutas y verduras, la enzima está presente endógenamente y necesita menor adición externa, o ninguna.

Preferentemente, la oxidación se lleva a cabo a una temperatura de -20°C a 80°C, preferentemente de 4°C a 70°C. Se apreciará que la mejor temperatura depende del sistema de oxidación que se ha escogido.

De acuerdo con otra forma de realización, el agente oxidante se añade a la fase acuosa que ya comprende compuesto feruoilado, mientras la enzima está presente endógenamente.

La cantidad de compuesto feruoilado es, preferentemente, de 0,5 a 2%p (g de ácido ferúlico por 100 g de pectina). La cantidad de compuesto feruoilado como solución madre que se usa para una barrera es, preferentemente, de 6 a 10%p (g de compuesto feruoilado por 100 ml de disolvente). La solución se puede rociar o aplicar como tal en la superficie del ingrediente/producto. Como alternativa, el compuesto feruoilado se aplica primero y en segundo lugar se añade una capa de enzima/agente oxidante. Preferentemente, la capa se seca en un horno o grill después de aplicar la solución (barrera) y antes de usar los ingredientes para el producto final. Asimismo, la barrera se puede aplicar en forma de polvo seco, que es una mezcla de compuesto feruoilado y agente(s) oxidante(s).

Se puede añadir peróxido de hidrógeno en solución o se puede generar *in situ* mediante la adición de glucosa/glucosa oxidasa.

Los productos alimenticios en los que se puede usar adecuadamente la barrera se seleccionan, preferentemente, del grupo compuesto por ingredientes filtrados (humedad o sabor o aceite) tales como vegetales (tomate, ensalada), fruta, pan, pescado y carne. El formato del ingrediente puede variar desde el formato nativo a pulpa, gel seco etc.

La barrera además puede comprender ingredientes opcionales, tales como proteínas, sales, sabor, antimicrobianos, componentes, colorantes, emulsionantes, agentes acidificantes, (co)oxidantes tales como peróxido de hidrógeno y similares.

Con el fin de conseguir propiedades eficaces de barrera de humedad, la barrera contiene un material lipídico, tales como lípidos entramados en la matriz. La hidrofobicidad de la barrera puede también incrementarse fijando moléculas de lípido a la estructura polimérica. La fijación de fracciones lipídicas puede conseguirse mediante unión covalente de fracciones de glicerol que contienen una o dos cadenas de ácidos grasos y un ácido ferúlico, esterificado a uno de los grupos de glicerol hidroxilo a la estructura polimérica. Como alternativa se puede fijar gopipol a la estructura de polímero mediante acoplamiento oxidativo. Los ácidos grasos se pueden unir directamente a la estructura de polímero mediante esterificación (p. ej., almidón esterificado).

Como alternativa, la fracción hidrofóbica puede acoplarse covalentemente a la estructura polisacárida mediante cualquier reacción de acoplamiento covalente conocida en la técnica (p. ej., acoplamiento con base de Schiff).

Se puede conseguir un contenido lipídico superior en la película mediante la incorporación de material lipídico en el polímero hidrofóticamente modificado, tal y como se ha descrito en lo que antecede.

La invención se ilustrará además en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Películas de barrera de humedad

Materiales

Se obtuvo pectina de caña de azúcar de CP KELco, GMBH, lote de pectina genu β . El chitosano y el caseinato de sodio se obtuvieron de van Revén BV. La Peroxidasa de soja y la vanillina se obtuvieron de Quest. La peroxidasa es un trigo Biobake sin GM de grado alimentario de Quest, Países Bajos. El cofactor peróxido de hidrógeno usado es solución al 30% de Merck, Alemania. Para algunos ejemplos se usaron glucosa oxidasa, sin GM de grado alimentario de Amano en combinación con glucosa y trigo biobake. Lipasa Novozym 435 y pectinex ultra SP-L se obtuvieron de Novozymes. Cera de abeja, cera carnauba y etilferulato se obtuvieron de Sigma Aldrich Chemicals. Las grasas sólidas MGLA41, aceite de coco, copos PO58 y RPLE70 se obtuvieron de W. T. Hogervorst, SCC, URDV. Todos los demás compuestos químicos usados se obtuvieron de Merck.

ES 2 313 100 T3

Componentes de la película: Chitosano modificado con vanillina (Chitosan-V)

Síntesis A

5 La vanillina se disolvió en etanol al 97% y a esta solución se añadió polvo de chitosano. La suspensión resultante se incubó durante 1 hora hasta 7 días a 65°C, 200 rpm. La proporción chitosano:vanillina (p/p) varió en un intervalo entre 2:1 hasta 500:1 y se ajustó la cantidad de etanol usado para mantener una suspensión en movimiento. Tras la incubación, la suspensión se filtró y el filtrado se lavó con etanol para eliminar la vanillina libre. Por último, el filtrado se secó al aire.

10

Síntesis B

15 El chitosano (0,8 g) se disolvió en 90 ml de ácido acético al 2% metanol (1:2, v/v). Se añadió una solución de 2,75 g de vanillina en 10 ml de metanol y la mezcla se incubó durante 24 horas hasta 7 días a temperatura ambiente para obtener un hidrogel amarillo. El gel se secó y se lavó con agua y metanol varias veces para eliminar la vanillina libre.

Análisis: el grado de sustitución de vanillina se calculó mediante la masa molecular promedio de un monómero-chitosano basado en una determinación N total. Se usaron las fórmulas siguientes:

20

$$N(\text{g/g}) = M_N / M_{\text{polímero}}$$

N (g/g) se determina experimentalmente y M_N es conocido → calcular $M_{\text{polímero}}$

25

$$M_{\text{polímero}} = (v \cdot M_{\text{monómero de chitosano}} + M_{\text{vanillina}}) / v$$

$M_{\text{vanillina}}$ y $M_{\text{monómero de chitosano}}$ sin modificar son conocidos → calcular v (grado de vanillización)

30

$$v = M_{\text{vanillina}} / (M_{\text{polímero}} - M_{\text{monómero de chitosano}})$$

35 Además de un análisis del elemento, el chitosano modificado también se analizó sin éxito mediante MALDI-TOF MS. Las moléculas de chitosano eran demasiado grandes y los pesos moleculares fueron demasiado pesados para obtener resultados fiables.

Caseinato de sodio modificado con vanillina (Na-cas-V)

40 A una solución de 7 g de vanillina en 4 litros de agua desmineralizada se añadieron 200 de caseinato de sodio, el pH se ajustó a 7,5. La solución se enfrió hasta -80°C y se liofilizó durante aproximadamente 10 días a 100 mbar. Se obtuvo un polvo amarillo y, posteriormente, se disolvió en 2 l de agua desmineralizada. A continuación a la solución se añadieron 2 l de etanol para precipitar la proteína y separarla de la vanillina libre. La suspensión resultante se centrifugó durante 20 minutos a 4.500 rpm. Si el sobrenadante seguía turbio tras la centrifugación, el pH se disminuyó más hasta pH 4 y se repitió la centrifugación. Tras la centrifugación, el sedimento (proteína modificada) se enfrió hasta -80°C y se liofilizó durante otros 2 días para obtener producto seco.

45

Triglicéridos feruolados (GF)

50

55 *Síntesis:* 40 g de aceite de semilla de girasol y 3,5 g de etilferulato se secaron durante aproximadamente 16 horas en sílice azul. Tras esta etapa de secado, el etilferulato se disolvió en el aceite de semilla de girasol seca y 3,5 g de lipasa (Novozyme 435) se suspendieron en esta solución. La mezcla se selló e incubó a 65°C, a 200 rpm durante 7 días. Posteriormente la mezcla se separó en una columna de gel de sílice 60 extra pura (Merck) con un eluyente de polaridad creciente. Las primeras fracciones se eluyeron con éter de petróleo: éter dietílico (v/v) a 4:1 seguido por proporciones de 7:3, 3:2 y, por último, sólo se usó éter dietílico. En total se recogieron 12 fracciones, cada una de aproximadamente 200 ml y el eluyente se evaporó para obtener fracciones concentradas para el análisis.

60

Análisis:

65 *TLC:* 10 μL de cada fracción se analizaron en TLC. Las muestras se pipetearon en una placa de cristal de sílice y se eluyeron con tolueno:éter dietílico (v/v) 4:1. La placa de sílice se secó al aire y los componentes que contienen grupos ferúlicos se identificaron mediante fluorescencia UV.

HPLC: Las fracciones se analizaron en una columna HPLC C18 con un flujo isocrático de 40/60 (v/v) de acetona (que contiene 1% de ácido acético glacial)/acetonitrilo. Las muestras se prepararon mediante disolución de 10 μL de cada fracción en 1 ml de acetona y se eliminaron todas las partículas sólidas mediante filtración sobre una columna de

ES 2 313 100 T3

gel de sílice 60 extrapura. Como control, se registraron los espectros HPLC de ácido ferúlico, etilferulato, ácido oleico y glicerol. La presencia de residuos de ferúlico se monitorizaron mediante detección UV a 325 nm y la presencia de componentes lipídicos se monitorizó a 360 nm. Una referencia (detección de componentes) se monitorizó a 450 nm. Se combinaron todas las fracciones que contenían los glicéridos feruolados.

5

LC-MS-MS: Todas las mediciones se llevaron a cabo en el Quattro-II usando HPLC-MS y MS-MS en modo de electropulverización positiva. Para soportar la ionización se añadió acetato de amonio después de la columna. Más detalles se proporcionan en el Apéndice I.

10

Ensayo de actividad (ensayo ABTS)

A 880 μ l de tampón fosfato 25 mM, pH 6,0, añadir 100 μ l de ABTS 20 mM (ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) solución madre preparada en el tampón indicado). Incubar durante 5' a 30°C. Añadir 10 μ l de peróxido de hidrógeno 100 mM. Iniciar la reacción mediante la adición de 10 μ l de enzima (diluida de tal modo que se pueda medir una curva lineal). Medir la formación de radical ABTS a 414 nm usando un espectrofotómetro. La actividad específica se define como: μ mol de ABTS oxidada por minuto por mg de proteína a pH 6,0

Polímero modificado con glicéridos feruolados

Síntesis

La cantidad de glicéridos feruolados que se usó para la reacción de acoplamiento al polímero se puede variar en diferentes proporciones molares. Las fórmulas siguientes se usaron para calcular estas proporciones molares:

25

$$\text{Chitosano-V (g)/M}_{\text{polímero}} = \text{C Chitosano-V (mol)}$$

30

$$\text{Chitosano-V (mol)/v} = \text{vanillina unida (mol)}$$

$$\text{Proporción FG:vanillina * vanillina unida (mol) = FG (mol)}$$

La cantidad deseada de GF se disolvió en etanol y lentamente se añadió a la solución polimérica agitada. Posteriormente se añadió la enzima, también durante la mezcla y, por último, peróxido para iniciar la reacción de reticulación. Las cantidades de enzima y peroxidasa dependen de la naturaleza y la concentración del polímero y se describen con más detalle en el párrafo 3.2. Cuando el polímero modificado se usó como emulsionante, el porcentaje final de pectina debía ser menor de 1% y el chitosano-V debía ser inferior al 0,25% para prevenir la glicificación de la solución.

40

Análisis

Se usó el análisis TLC para monitorizar la reacción de acoplamiento. Antes y después de la adición del peróxido, se analizaron 15 μ l de la muestra en una placa de sílice. Los puntos se eluyeron con tolueno:éter dietílico (v/v) 4:1 y la desaparición de los puntos de GF libre se usó como indicador del éxito de la reacción de acoplamiento.

45

Se usó un análisis de ácidos grasos para examinar el producto de acoplamiento del polímero y los triglicéridos modificados. Tras la reacción de acoplamiento, 0,75 ml del producto de reacción se separaron de todo GF libre restante en la TLC con eluyente tolueno:éter dietílico (v/v) 4:1. El punto menor que contiene el polímero modificado se extrajo de la sílice en un tampón de ácido acético a pH 5,5 y se añadieron 0,01 g de lipasa (Novozyme 435). Tras la incubación durante 2 horas a 65°C, a 900 rpm, se centrifugó la muestra. El sobrenadante se concentró mediante evaporación y se realizó un análisis de ácidos grasos libres NEFA-C, método de ACS-ACOD (Wako).

50

55

Prueba funcional

Las propiedades emulsionantes del polímero modificado se usaron como una prueba funcional para comprobar si el GF se había acoplado con éxito a la estructura de polímero. Para este análisis se disolvieron 10 μ l de GF en 1 ml de EtOH y se añadieron a una solución de 3 ml de chitosano-V para obtener, por último, una solución de 0,125% de chitosano-V, 25% de EtOH, 0,0625% de ácido acético. Durante el mezclado, se añadieron 2,5 10 μ l de POX y, por último, 10 μ l de peróxido para iniciar la reacción de reticulación. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y, después, a 2 ml de aceite de semilla de girasol que contiene 1% de b-caroteno se añadió 1 ml de la solución. La mezcla se agitó en vortex durante 1 minuto a velocidad máxima y la estabilización de la emulsión resultante se monitorizó durante 48 horas. Las emulsiones se analizaron a varios intervalos con microscopía óptica (MO).

60

65

ES 2 313 100 T3

Películas

Síntesis de película

5 Todas las películas se basaron en un gel reticulado que se vertió en una placa de vidrio revestida de teflón, molde de aluminio de 5*5 cm y 0,3-2,5 mm de espesor, o una copa de pesada de plástico. Estos geles vertidos se secaron en un incubador a 50°C, un horno de aire o a temperatura ambiente. La síntesis en gel de tres tipos de películas (modificación reticulada, hidrofóbica enredada e hidrofóbica covalente) se describirían en los siguientes tres párrafos.

10

Películas reticuladas

15 Se formaron soluciones de pectina mediante la disolución de pectina en agua (máx, 9% p/p) y ajustando el pH durante la agitación con NaOH 1M hasta un pH de 5,5. El chitosano-V se disolvió en ácido acético al 1% (máx 2% p/p) y el pH también se ajustó con NaOH hasta un pH 5-5,5. A la solución polimérica se añadió una cantidad de peroxidasa de soja (enzima) durante la agitación y, por último, la peroxidasa se añadió al inicio de la reacción de reticulación.

Geles entramados hidrofóbicos

25 Los geles entramados hidrofóbicos se sintetizaron mediante la adición del componente hidrofóbico a la solución de polímero y homogeneizar la mezcla durante 1 minuto para obtener una emulsión homogénea. Si se usó una grasa o cera sólida, la mezcla se calentó en un baño de agua antes de homogeneizar, para fundir el componente sólido. Las soluciones que contienen proteína, esteroides, etanol, glicerol (1% de volumen del gel) o emulsionantes (tween 80, span 80, lecitina 1% de volumen en gel) también se añadieron a la solución/emulsión polimérica durante la homogeneización.

30 En la tabla 2.1 se muestra una revisión de los componentes hidrofóbicos usados. Cuando se mezclaron todos los componentes, se añadió la enzima y, por último, el peróxido para iniciar la reacción de reticulación. Películas de proteínas desnaturalizadas se obtuvieron mediante calentamiento del gel que contenía la proteína a 95°C durante 30 minutos para desnaturalizar las proteínas presentes. Algunas películas contenían polímero de chitosano-V digerido. Para este propósito, el polímero se incubó con pectinex, una enzima pectinasa, durante 2 horas a 37°C.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 100 T3

TABLA 2.1

Revisión de varios componentes hidrofóbicos en películas hidrofóbicas en forma de red

Polímero	Aceite líquido	Grasa sólida (ácido graso)	Cera	Solución de proteínas	Esterol
Chitosano-V 10:5 0,5-2%	Aceite de semilla de girasol Aceite de oliva	MGLA4I Aceite de coco P058 Copos RPLE70 Aceite oleico Ácido láurico	Cera de abeja Cera de carnauba	Caseinato de Na-(V) proteína de huevo	γ -orinazol β -sitosterol
Chitosano-V 10:1 0,5-2%	Aceite de semilla de girasol	Ácido oleico	Cera de abeja	-	γ -orinazol β -sitosterol
Pectina 2-4%	Aceite de semilla de girasol Aceite de oliva	Aceite de coco P058 Copos RPLE70 Aceite oleico	Cera de abeja Cera de carnauba	Caseinato de Na-(V) proteína de huevo	γ -orinazol β -sitosterol
Chitosano-V 10:5 Pectinex digerido	Aceite de semilla de girasol	Aceite de coco P058 Copos RPLE70	Cera de abeja	Caseinato de Na	-

ES 2 313 100 T3

Geles acoplados covalentemente

Se sintetizaron geles poliméricos modificados covalentemente de acuerdo con los mismos protocolos como películas hidrofóbicas en red, sólo la solución/mezcla añadida al polímero durante la homogeneización contenía un componente con un grupo fenólico que podía ser reconocido por la peroxidasa de soja. En la tabla 2.2. se enumeran tres componentes que se usaron en películas modificadas covalentemente y varias combinaciones.

TABLA 2.2

Revisión de componentes hidrofóbicos acoplados covalentemente en películas

Compuesto	Disolvente	En combinación con
Caseinato de Na-V	H ₂ O (pH 7,5)	Lípidos, grasas, glicéridos feruoilados
γ-orinazol	Etanol	Lípidos
glicéridos feruoilados	Etanol	Lípidos, grasas, cera, caseinato de NA (V)

Caracterización de la película

Tras la síntesis de la película, todas las películas lisas e intactas se analizaron mediante un ensayo de permeabilidad a vapor de agua. Las películas que dieron buenos resultados se analizaron después para determinar su solubilidad y el porcentaje de hinchamiento y, por último, algunas películas se analizaron con microscopía óptica. Los protocolos para estos ensayos se describen en la parte siguiente.

Ensayo de permeabilidad a vapor de agua (PVA)

La permeabilidad a vapor de agua se determinó mediante análisis gravimétrico. Las copas con un diámetro de 2 cm² se llenaron con 10 ml de agua desmineralizada y se sellaron con un pedazo de película. Las películas se sellaron completamente a la copa con parafilm o cera y se pesaron para determinar el peso inicial. Las copas se colocaron en un desecador lleno con sílice azul seca para crear un gradiente de humedad relativa de 0% en el desecador hasta 100% dentro de las copas. Durante 4-12 días se determinó la pérdida de peso de las copas selladas y se representó frente al tiempo. Las pendientes de estas curvas de pérdida de peso (g/día) se compararon con la pendiente de la copa no sellada y este número se consideró la permeabilidad relativa a vapor de agua. Los experimentos mostraron que esta pendiente no cambiaba significativamente entre los días 2 a 5. Tras 5 días, la sílice comenzó a saturarse y se sustituyó por sílice seca.

Espesor

El espesor de la película se midió con una medición de espesor digital (Mitutoyo) a los 0,01 mm más cercaos en las 10 posiciones aleatorias. se usó una media de los 10 valores para calcular el espesor de la película.

Hinchamiento de la película y prueba de solubilidad

Se cortó un pedazo de película de 1 cm x 1 cm de tamaño y se secó en un horno a 90°C durante 3 horas y se pesó para obtener el peso seco inicial. El pedazo de película se colocó en un tubo de análisis Falcon que contenía 10 ml de agua desmineralizada. El tubo se incubó a 37°C, a 100 rpm durante 24 horas. Tras la incubación, el contenido del tubo de ensayo se filtró y se determinó el peso total del filtro previamente pesado y la película, Con el fin de obtener el porcentaje de hinchamiento total de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Hz} = [(\text{peso de la película mojada} + \text{filtro} - \text{peso del filtro húmedo}) / \text{peso inicial de la película}] \cdot 100\% - 100\%$$

Posteriormente, el filtro y la película húmedos se secaron en una estufa de aire a 90°C durante 3 horas y se pesaron de nuevo. La solubilidad total de la película se determinó de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Sol}\% = 100\% - [(\text{peso seco de la película} + \text{filtro} - \text{peso seco del filtro}) / \text{peso inicial de la película}] \cdot 100\%$$

ES 2 313 100 T3

Microscopia

Las emulsiones y las películas se examinaron con microscopia óptica. Las muestras de película se prepararon cortando un pedazo de película de 2,5 mm x 2,5 mm de tamaño y colocándolo en un portaobjetos de vidrio, cuyo cubre de vidrio se selló con esmalte de uñas incoloro. Para las muestras de la emulsión, se pipetearon 0,1 ml de la emulsión estable en el portaobjetos de vidrio y se selló con un cubre de vidrio. Ambas muestras se examinaron con aumentos de 10x, 20x y 40x.

10 Películas

Síntesis de las películas

Las películas se sintetizaron tal y como se ha descrito antes con diversos componentes en diferentes combinaciones e intervalos de concentración.

En la tabla 3.1 se mencionan las concentraciones aplicadas de enzima y peróxido que se usaron para las diversas soluciones poliméricas. Para la reticulación de chitosano se usaron mayores concentraciones de peróxido porque se podían formar más enlaces covalentes entre las cadenas laterales de vanillina (mecanismo de reacción 1.2.1). Por el contrario las concentraciones de la enzima fueron menores en comparación con la reticulación de la pectina, debido a un índice mayor de formación de gel de chitosano. Además de las cantidades, parecía que el orden de la adición de los componentes era muy importante. En varios experimentos se había indicado que era crucial añadir la enzima antes del peróxido durante la reticulación de chitosano. Si se añadía el peróxido antes que la enzima, no se producía la gelificación del polímero. En la tabla 3.2 se proporciona una revisión de los intervalos de concentración de varios componentes de la película que se encontró que tenían como resultado películas estables.

TABLA 3.1

Revisión de soluciones poliméricas y concentraciones de enzima y peróxido en geles

Solución polimérica	Concentración de gel estable y película seca	Solución de enzima al 10% ($\mu\text{l/ml}$ de gel)	H ₂ O ₂ 1M ($\mu\text{l/ml}$ de gel)
Chitosano-V (10:5)*	0,5%-2%	0,1	5-20
Chitosano-V (10:1)	0,5%-2%	0,1	5-20
Chitosano-V (10:0,2)	0,5%-2%	0,1	5-20
Pectina	2%-4%	1	0,5-8

* proporción p/p de chitosano:vanillina durante la síntesis de chitosano-V

ES 2 313 100 T3

TABLA 3.2

Revisión de los intervalos de concentraciones de varios componentes para obtener películas estables

Polímero	% Aceite líquido Volumen del gel	% Ácido graso Volumen del gel	Grasa sólida % peso seco película	Cera % peso seco película	Solución de proteínas % peso seco película	Etanol % volumen del gel
Chitosano-V 10:5 0,5-2%	0-30%	0-30%	0-80%	0-80%	0-80%	0-67%
Chitosano-V 10:1 0,5-2%	0-5%	0-5%	0-80%			0-67%
Pectina 2-4%	0-5%	0-5%	0-80%	0-80%	0-80%	0-67%
Chitosano-V 10:5 Pectinex digerido	0-5%	0-5%	0-80%	0-80%		0-67%

Varias películas sintetizadas se dividieron en películas que contienen componentes y películas enredadas que se modificaron covalentemente.

Aditivos

Para que la película fuera más flexible se añadieron 400 μ l u 800 μ l de glicerol antes de homogeneizar. Para estimular la formación de la emulsión se añadieron emulsionantes a la mezcla de reacción antes de homogeneizar. Como emulsionantes se usaron varias cantidades de mono/diglicéridos y lecitina. Para disminuir la permeabilidad a vapor de agua de las películas, a la solución de chitosano-vanillina se añadieron compuestos hidrófobos adicionales antes de homogeneizar. Por ejemplo, se formaron películas que contenían β -sitosterol y γ -orinazol. El último compuesto es una mezcla de esteroles esterificados en ácido ferúlico. Estos compuestos también podían ser reticulados por la enzima hasta formar la red de chitosano e incrementar la hidrofobicidad y complejidad de la red, lo que disminuye la permeabilidad al vapor de agua. Además, el ácido ferúlico transesterificado en triglicérido (glicéridos mono o diferúlicos) también puede reticularse covalentemente hasta convertirse en la red polimérica para incrementar la hidrofobicidad y la permeabilidad al vapor de agua.

Propiedades de la película

En la introducción se describieron tres modos de obtener una película para barrera de agua usando tecnología de reticulación. Para describir los resultados de las propiedades de barrera de agua de varias películas sintetizadas se usará el mismo formato. Se añadieron componentes hidrófobos y, por último, los componentes hidrófobos se unieron covalentemente a la estructura de polímero para incrementar la hidrofobicidad.

ES 2 313 100 T3

Entramado hidrofóbico

Se sintetizaron diversas películas con componentes hidrófobos entramados, como aceite, grasas y ceras, y se analizaron en un ensayo de permeabilidad de agua y prueba de solubilidad. Además del espesor de la película, la concentración del componente hidrófobo también fue crucial para las propiedades de permeabilidad de agua de las películas analizadas.

Cuando la concentración del componente hidrófobo entramado aumentó, las propiedades de barrera de agua aumentaron significativamente,

En la tabla 4 se presenta una revisión de algunos ensayos de permeabilidad de vapor de agua en los que se analizaron películas de pectina y chitosano con o sin componentes hidrófobos entramados. En la tabla se muestra la gran diferencia entre las películas poliméricas normales y las películas que contienen aceite entramado. Con las películas de pectina que contienen ácido oleico, que tienen un espesor de aproximadamente 1 mm, se alcanzó un valor de permeabilidad al vapor de agua de caso cero. La misma tendencia se observó para las películas que contienen cera y/o grasa sólida entramada. También está claro que las películas que contienen cera/grasa y aceite obtuvieron propiedades de barrera muy similares.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 100 T3

TABLA 4

Revisión del análisis de la PVA

- NB: - Los porcentajes con volumen de gel v/v
 - Las proporciones son de película en peso seco p/p
 - Las películas están basadas en 20 ml de gel polimérico al 2%
 - A menos que se mencione una adición diferente, GF: 0,5 ml

Composición de la película	Espesor	Permeabilidad relativa de vapor de agua
Pectina	0,060	1,0000
Chitosano-vanillina	0.060	1,0000
Pectina, SO 10%	0,915	0,1154
Pectina, SO 20%	1,313	0,0385
Pectina, SO 10%	0,419	0,2642
Pectina, SO 10%	0,915	0,2264
Pectina, SO 7,5%	0,434	0,2639
Pectina, SO 2,5%	0,437	0,2500
Chit-V SO 10%	0,612	0,2639
Chit-V	0,696	0,1944
Chit-V SO 30%	0,324	0,2778
Chit-V SO 20% + 0,12 emulsionante	0,313	0,2786
Pectina, SO 1 % + orinazol 16:1	0,207	0,2556
Chit-V SO 20% + 20% EtOH	0,337	0,2556
Chit-V SO 20% + beta-sitosterol 16:1 peso seco	0,337	0,2778
Chit-V SO 20% + beta-sitosterol 16:1 peso seco	0,444	0,2778
Pectina + cera carnauba peso seco 1:2	0,437	0,2444
Chit-V SO 1% + cera de abeja peso seco 2:1	0,311	0,2360
Chit-V SO 1% + 20% EtOH	0,177	0,2809
Chit-V SO 1% + orinazol 16:1 peso seco	0,178	0,2697
Chit-V SO 1% + orinazol 10,6:1 peso seco	0,202	0,2584
Chit-V SO 1% + 2,5 ml 3% Cas-Na-V	0,215	0,2809

ES 2 313 100 T3

	Chit-V SO 1% + 1 ml 3% Cas-Na-V	0,19	0,2921
5	Chit-V SO 1% + 5 ml 3% Cas-Na-V	0,232	0,2809
10	Chit-V SO 1% + 2,5 ml 3% Cas-Na-V	0,282	0,2921
15	Pectina + 9% SO + 1 ml 3% Cas-Na-V + 20% EtOH	0,207	0,2035
20	Pectina + 10% OO + 20% EtOH	0,15	0,2124
25	Pectina + 10% SO + 20% EtOH	0,217	0,1947
	Pectina + 10% SO	0,205	0,1858
	Chit-V + 10% SO	0,424	0,2475
	Chit-V + 20% SO + GF	0,464	0,2574
30	Chit-V + 0,4 g coco (EtOH) + 10% SO	0,236	0,2482
35	Chit-V + 0,4 g CA + 2,5 ml EtOH + 10% SO	0,321	0,2774
40	Chit-V + 0,4 g PO50 + EtOH + 10% SO	0,297	0,2628
	Chit-V + 0,4 g CA + TWEEN	0,177	0,2828
45	Chit-V + 2,5 g CA + GF	0,4	0,2727
	Pectina + 10% ácido oleico	1,457	0,0149
50	Pectina + 7,5% ácido oleico	0,948	0,0373
55	Chit-V + 1,25 g CA + 1,25 PO58+ GF (1 ml)	0,36	0,2462
	Chit-V + 2,5 g CA + GF (1 ml)	0,528	0,2462
60	Chit-V + 2,5 g coco + GF (1,5 ml)	0,416	0,1791

65

ES 2 313 100 T3

Resultados de los análisis de solubilidad

Se observó una gran diferencia entre las películas de quitosano y de pectina. Las películas de pectina mostraron una solubilidad elevada en comparación con las películas de quitosano. Cuando se añadieron componentes hidrófobos se observó una disminución de la solubilidad de la película. Este efecto fue el mismo para ambas películas poliméricas, sólo las películas de quitosano alcanzaron valores de solubilidad significativamente menores. La adición de proteínas tuvo el efecto opuesto; en general, la solubilidad se incrementó cuando aumentó la concentración de proteína.

10 Ejemplo 2

Queso- Extracto de levadura

Se desarrolló una nueva pasta sabrosa compuesta por queso y extracto de levadura o hidrolizado de proteína vegetal, con un aspecto original de dos colores. Sin embargo, con el tiempo, la migración del color causó serios problemas de aspecto. Se produjo migración de agua desde el queso que contiene cantidad elevada de agua ($aa = \pm 0,8$) hacia el extracto de levadura que contiene una cantidad baja de agua ($aa = 0,2-0,4$). Además de la migración de agua, también el color marrón oscuro del extracto de levadura migra hacia la fase de queso, lo que conduce a una gran capa de transición de color marrón entre los dos componentes. Para prevenir la migración del colorante y el agua se usó una capa comestible. Las películas de quitosano que contienen hasta un 50% de lípidos parecieron tener mucho éxito. Según estos resultados, se puede concluir que el quitosano con un contenido elevado de lípidos puede prevenir la migración de agua entre dos componentes con diferentes actividades de agua.

25 *Procedimiento para la preparación de películas de quitosano-vanillina*

Película de quitosano-vanillina que contiene 20% (v/v) de aceite de semilla de girasol:

A 20 ml de solución al 2% de quitosano-vanillina se añadieron 5 ml de aceite de semilla de girasol en 1% de ácido acético, que se ajustó a un pH de 4,5 con NaOH. La solución se emulsionó con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (9.500 min^{-1}) durante 5 minutos y durante el mezclado se añaden $2 \mu\text{l}$ de enzima (peroxidasa de soja). Una vez que la enzima se distribuyó homogéneamente se añadieron $20 \mu\text{l}$ de H_2O_2 1M. La solución se vertió inmediatamente en una placa de vidrio revestida con teflón. La película se secó a 50°C y se despegó de la placa de vidrio.

35 El contenido en lípidos puede variar de 0% hasta un 50%.

En lugar de aceite de semilla de girasol, las películas también se sintetizaron de modo que contuvieran varias cantidades de aceite de oliva y ácido oleico.

40 Ejemplo 3

Salchichas de salami

45 Debido a sus propiedades de adherencia, no es posible formar una capa homogénea que cubra toda la superficie de la salchicha con pectina no reticulada. No obstante, el uso de pectina reticulada tuvo como resultado una película con sorprendentemente buenas propiedades de adherencia a la superficie, probablemente debido a la interacción covalente entre las moléculas de pectina y los grupos de tirosina de las proteínas localizadas en la superficie de las salchichas.

50 La capa de pectina se aplicó sobre la salchicha mediante inmersión en una solución de pectina al 4% que contiene enzima (1 ml/100 ml) y 25% de etanol. El etanol disminuirá el tiempo de secado y al mismo tiempo incrementará la viscosidad de la solución, lo que estimula la adherencia del gel sobre la salchicha. Posteriormente, la salchicha bañada se roció con una solución que contiene peróxido 1 mM y 2% de pectina (concentración máxima para un dispositivo de rociado) y se secó en un horno de aire caliente durante 4 horas a 40°C . El aspecto de la salchicha recubierta con pectina es el mismo que el de la no recubierta.

55 Se analizó la liberación de lípidos/agua de las salchichas recubiertas y no recubiertas a temperatura ambiente y después de una incubación de 10 minutos a 100°C . Las salchichas no recubiertas perdieron aceite, que fue visible sobre pañuelo de papel de soporte, mientras que la salchicha recubierta no perdió nada de aceite en las mismas condiciones.

Ejemplo 4

Recubrimiento comestible de galletas

65 Las galletas se recubrieron con películas de pectina reticulada y películas de quitosano reticulado que contienen ácido láurico. Las muestras se colocaron en un desecador a TA que contiene una solución saturada de NaCl (HR 80%). El incremento del peso debido a la adsorción de agua se midió como una función del tiempo. Los resultados

ES 2 313 100 T3

se muestran en la figura 1. Durante los primeros 6 días, el incremento del peso de la galleta recubierta con quitosano (cuadrados) fue significativamente menor que el incremento del peso de la galleta recubierta con pectina (triángulos).

5 Ejemplo 5

Películas de quitosano acoplado con vanillina mezclado con lípido

10 Se preparó una solución de quitosano-vanillina (Chit-V) tal y como se ha descrito en lo que antecede (síntesis B). La concentración de Chit-V en la solución de Chit-V producida fue 3%. La síntesis de tri y diacilglicéridos feruolados (GF) se ha descrito con anterioridad.

Síntesis de película

15 Se preparó una emulsión homogénea mediante mezclado de la solución de Chit-V con aceite de girasol y/o cera (se usó Cotebar A de Lodens Croklaan) y, en algunos casos, con tri y diacilglicéridos feruolados (GF) o Hymono 8903 (monoglicéridos altamente saturados de Quest). El mezclado se realizó a velocidad elevada usando un homogeneizador Ultra-Turrax durante 1-5 minutos.

20 Si se usaron ceras, se fundieron antes y los demás componentes y el equipo usado se calentaron en un horno antes de que pudieran ponerse en contacto con la cera fundida. a continuación, se añade la enzima (peroxidasa de soja, Biobake de Quest) y, tras la distribución homogénea, se inicia la reacción de reticulación con la adición de solución madre de peróxido de hidrógeno 1M. Para una película de 6 g se usaron 15 μ l (~2,5 mM). Para ver si la cantidad de peróxido de hidrógeno en la película es lo bastante elevada para la gelificación, se usó un papel indicador. La cantidad de enzima y H₂O₂ varió con la cantidad de material de partida. Capas finas de la película en película gelbond® (de FMC Bioproduct, EE.UU.), que es un poliéster recubierto con agarosa, que se secaron en aire o en horno durante varias horas entre 65°C y 100°C (las condiciones se muestran en la Tabla 5). Después de secar, se midió el espesor de las películas y se midió la permeabilidad al vapor de agua.

30 Los resultados de la permeabilidad (P) y la permeabilidad relativa de vapor de agua (PVA) de diferentes películas de quitosano-vanillina/lípido se proporcionan en la tabla 5. Las diferentes composiciones de las películas se expresan en %p/p de las películas húmedas (composición antes de secar).

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 100 T3

TABLA 5

Nº de película /condiciones de secado	% 3% de chitosano	%, SF	% Cotejar A	% GF	% Hymono	d [mm]	P [e-11 g/(s*m*Pa)]	PVA Rel. [%]
1.	59,2	19,7	19,7	1,3	0	0,25	6,64	5,19
2	59,2	19,7	19,7	1,3	0	0,62	7,61	4,80
3./4h 100 ° C	59,2	19,7	19,7	1,3	0	0,36	3,49	1,55
4./4h 100 ° C	59,2	19,7	19,7	1,3	0	0,09	2,00	3,55
5./4h 100 ° C	59,2	19,7	19,7	1,3	0	0,55	7,29	2,11
6.	42,3	35,5	1,1	21,1	0	0,43	8,72	5,01
7./4h 100 ° C	59,2	39,5	1,3	0	0	0,54	7,83	3,58
8./24h 65 ° C	60	20	20	0	0	0,37	9,13	4,2
9./	59,7	19,9	19,9	0	0,5	0,50	7,65	2,01
10.	59,7	19,9	19,9	0	0,5	0,06	6,08	nd
11	60	40	0	0	0	0,18	6,19	nd
12./25 %EtOH	65	10	0	0	0	0,06	6,49	nd

nd es no determinado

Las medidas de la permeabilidad al vapor de agua muestran que las películas de chitosano-vanillina/lípido tenían valores P muy buenos, por tanto una permeabilidad muy baja.

ES 2 313 100 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Barrera comestible adecuada para usar en productos alimenticios, que comprende un biopolímero reticulado y un material lipídico, en la que dicha barrera comestible tiene un espesor de aproximadamente 2 a 1.500 micrómetros, de modo que el material lipídico es un aceite, grasa o cera comestible.
2. La barrera de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el biopolímero es un biopolímero a base de hidrocoloide.
- 10 3. La barrera de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el biopolímero a base de hidrocoloide contiene grupos orto-metoxi-fenólicos.
4. La barrera de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el biopolímero a base de hidrocoloide contiene grupos de ácido ferúlico.
- 15 5. La barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el biopolímero es una pectina.
6. La barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que posee un espesor de aproximadamente 10 a 500 micrómetros.
- 20 7. La barrera de acuerdo con la reivindicación 6, que posee un espesor de aproximadamente 50 a 200 micrómetros.
8. La barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el biopolímero reticulado está modificado hidrofóbicamente.
- 25 9. La barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el compuesto es un polímero modificado que contiene ácido ferúlico y uno o dos cadenas de ácido graso acopladas a un polímero acoplado a vanillina, como, por ejemplo, chitosano.
- 30 10. La barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el biopolímero reticulado está reticulado a una proteína o una proteína acoplada a vanillina (p. ej., caseína-vanillina).
11. Producto alimenticio compuesto, que comprende partes que tienen diferentes actividades de agua (aa), separadas por la barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 35 12. Producto alimenticio que comprende una barrera comestible de acuerdo con reivindicaciones 1-10, que cubre un ingrediente alimentario seleccionado del grupo compuesto por verduras, fruta, pan y pescado.
- 40 13. Procedimiento para la preparación de un producto alimenticio, en el que partes que poseen diferentes actividades de agua (aa) están separadas por la barrera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la reticulación la lleva a cabo una enzima o sistema enzimático.
- 45 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que este sistema enzimático ya está presente *in situ*, por ejemplo peroxidasa de tomate en tomates.
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig.1.

Galleta recubierta HR 80%, TA

