

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 326 854**

21 Número de solicitud: 200701127

51 Int. Cl.:

A23B 4/12 (2006.01)

A22C 29/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **26.04.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
20.10.2009

71 Solicitante/s:

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Montero García, María del Pilar;
Martínez Álvarez, Óscar y
Gómez Guillén, María del Carmen**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento complementario en la inhibición del ennegrecimiento enzimático de decápodos marinos por inhibición de la actividad lacasa.**

57 Resumen:

Procedimiento complementario en la inhibición del ennegrecimiento enzimático de decápodos marinos por inhibición de la actividad lacasa.

Se trata de composiciones con acción frente al pardeamiento producido por la actividad lacasa. El ennegrecimiento enzimático de los alimentos, que principalmente ocurre en vegetales y crustáceos se debe a la acción de varios complejos enzimáticos. Existen diversos estudios - publicaciones y patentes - que tratan de los compuestos inhibidores sobre la PPO, pero no sobre la inhibición de las lacasas, en el ennegrecimiento de alimentos. Las lacasa han sido descritas en el reino vegetal, como por ejemplo en hongos, pero no en crustáceos/decápodos marinos. Entre los agente químicos de grado alimentario capaces de inhibir esta actividad lacasa se encuentran algunos p-difenoles, como por ejemplo el ácido p-hidroxicinámico, p-hydroxibenzoico, y la vainillina.

ES 2 326 854 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento complementario en la inhibición del ennegrecimiento enzimático de decápodos marinos por inhibición de la actividad lacasa.

Sector de la técnica

Inhibición de ennegrecimiento de alimentos producido por p-difenoloxidasas. Conservación de crustáceos marinos. Utilización de vainillina, ácido vainílico, ácido p-hidroxicinámico y p-hidroxibenzoico.

Estado de la técnica

El ennegrecimiento de los alimentos es una de las principales causas que produce su deterioro y más concretamente en bebidas, algunos vegetales como hongos, aguacate, ... y en los decápodos (langosta, cigala, gamba,). Su aparición implica la pérdida de la comercialización por el aspecto desagradable y el color marrón y negro que ocasionan.

En diversas patentes que tratan de métodos y formulación de aditivos para evitar el pardeamiento en alimentos y bebidas, se ha descrito que el pardeamiento enzimático se debe a la acción de una enzima denominada polifenoloxidasas (PPO) o tirosinasa, por el cual los fenoles se oxidan a quinonas, y éstas se polimerizan dando lugar a la formación de pigmentos de alto peso molecular con una coloración muy oscura en tonos marrones y posteriormente negros.

También es conocido que unos alimentos son más susceptible que otros -como por ejemplo gambas, setas, alcachofas y plátanos- y se debe a la mayor actividad de esta enzima (PPO).

El ennegrecimiento enzimático debido a la PPO ha sido objeto de numerosos estudios (Lambrecht HS. 1995. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. *Enzymatic Browning and its Prevention* 600:313-23., Sannomaru Y, Katayama O, Kashimura Y, Kaneko K. 1998. Effects of polyphenol content and polyphenoloxidase activity on browning reaction of apple fruits. *J Jpn Soc Food Sci Technol -Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 45:28-36.) y en crustáceos la atención ha sido posterior Alsina (1974) 3.982.030 US. Preservation of crustacea., McEvily, A.J., Iyengar, R., Gross, A. Composition and methods for inhibiting browning in foods. 1994 patente USDO05304), (Gomez-Guillen MC, Martinez-Alvarez B, Llamas A, Montero P. 2005. Melanosis inhibition and SO2 residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite-based treatments. *J Sci Food Agric* 85:1143-8., Montero P, Martinez-Alvarez O, Gomez-Guillen MC. 2004. Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *J Food Sci* 69:C643-7).

Un mejor entendimiento de las propiedades y mecanismos de la PPO son aun hoy en día necesarios en orden a ser capaz de controlar y en última instancia inhibir su acción.

Se han desarrollado diversos métodos que puedan inhibir su acción de manera individual o en combinación con aditivos inhibidores de dicha enzima.

El tratamiento térmico elevado es conocido que puede inactivar la actividad enzimática, pero no es adecuado para alimentos en crudo, ya que pierden esta característica, alterándose la textura, el color (Devece C, Rodriguez-Lopez JN, Fenoll LG, Tudela J, Catala JM, de los Reyes E, Garcia-Canovas F. 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: Comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J Agric Food Chem* 47:4506-11.).

La aplicación del ácido bórico fue de lo más efectivo durante muchos años, pero desde que se prohibió su uso por motivos de salud, han sido muchos los intentos por obtener un procedimiento y/o mezcla de compuestos efectivos para evitar el ennegrecimiento.

En cuanto a los aditivos químicos son muchos los que se han descrito, unos por disminuir la acidez del alimento ya que la enzima en algunas ocasiones es muy sensible al pH ácido, aunque en otros como en gamba debe de acidificarse hasta pH muy bajos -2 o 3- para inactivarla, por lo que también se perderían las características del producto crudo (Montero, P., Gómez-Guillén, MC., Zamorano, P. y Martínez-Alvarez, O. 2003).

Estudios de los agentes conservantes e inhibidores de la melanosis en crustáceos. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (Spain)).

Otro método que ha prevalecido en la industria alimentaria ha sido la adición de sales de sulfitos (Gomez-Guillen MC, Martinez-Alvarez B, Llamas A, Montero P. 2005. Melanosis inhibition and SO2 residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite-based treatments. *J Sci Food Agric* 85:1143-8., Lopez-Caballero ME, Martinez-Alvarez O, Gomez-Guillen MC, Montero P. 2006. Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *Eur Food Res Technol* 223:7-15.) y más modernamente de 4-hexylresorcinol (Guerrero-Beltran JA, Swanson BG, Barbosa-Canovas GV. 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT-Food Sci Technol* 38:625-30., Lambrecht HS. 1995. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. *Enzymatic Browning and its Prevention* 600:313-23., Montero P, Martinez-Alvarez O, Gomez-Guillen MC. 2004. Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting me-

lanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *J Food Sci* 69:C643-7). Solos o con la presencia de otros agentes que produzcan una acción sinérgica o sumatoria para evitar del ennegrecimiento. La presencia de ácidos de grado alimentario, tales como cítrico o ascórbico, es muy frecuente en la formulación del aditivo. Como se ha mencionado anteriormente pueden inhibir parcialmente la enzima o tan solo tener un efecto preservante del alimento, aunque en algunos casos como el del ácido cítrico además intensifica el color rosa en las gambas dándole un aspecto más fresco (Lambrecht HS. 1994. Erythorbates and everfresh(r) (4-hexylresorcinol) as sulfite substitutes for food preservation. *Abstr Pap Am Chem Soc* 208:167-AGFD, Montero P, Martínez-Alvarez O, Zamorano JP, Alique R, Gómez-Guillen MC. 2006. Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments. *Eur Food Res Technol* 223:16-21., Montero P, Martínez-Alvarez O, Gómez-Guillen MC. 2004. Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *J Food Sci* 69:C643-7.).

La presencia en la formulación del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y el Pirofosfato (PPI) ha sido considerada por su acción quelante y más recientemente por su acción inhibitoria de proteasas (Montero P, Martínez-Alvarez O, Zamorano JP, Alique R, Gómez-Guillen MC. 2006. Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments. *Eur Food Res Technol* 223:16-21., Montero P, Martínez-Alvarez O, Gómez-Guillen MC. 2004. Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *J Food Sci* 69:C643-7.) reduciendo así en el medio sustratos de la enzima PPO.

Tecnologías más modernas como la aplicación de altas presiones en algunas ocasiones ha sido de gran efectividad, por ejemplo en la pasta de aguacate, ya que en determinadas condiciones de presión, tiempo y temperatura moderada o baja, se alcanza a inactivar esta enzima. La pérdida de textura es importante, por eso aunque no siempre es útil para vegetales enteros, si se puede aplicar a bebidas -tipo zumo- o pastas como la ya comentada de aguacate (Lopez-Malo A, Palou E, Barbosa-Canovas GV, Welti-Chanes J, Swanson BG. 1998. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Res Int* 31:549-56., Montero P, Avalos A, Pérez-Mateos M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem* 75:317-24.). Sin embargo los estudios realizados en crustáceos, no han sido igual de aplicables, ya que de nuevo el mantener las características de crudo y del individuo entero no son fáciles de obtener (Lopez-Caballero ME, Pérez-Mateos M, Borderias JA, Montero P. 2000. Extensión of the shelf life of prawns (*Penaeus japonicus*) by vacuum packaging and high-pressure treatment. *J Food Prot* 63:1381-8. Montero P, Lopez-Caballero ME, Pérez-Mateos M. 2001. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *J Food Sci* 66:1201-6.).

Existe también una patente reciente (WO/2006/082267 Llamas Marcos, Argimiro; Llamas Galilea, Pedro; Vargas Jiménez, José Manuel; Navarro Roldan, Francisco y Córdoba García Francisco. Method of preserving crustacean against melanosis. Métodos de preservación de crustáceos frente a la melanosis) que describe la aplicación de determinadas bacterias ácido lácticas - principalmente los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* - como agentes inhibidores del ennegrecimiento en crustáceos.

Toda combinación de compuestos que permitan no usar alguno de ellos en exceso, evitando así reacciones adversas que puedan causar es bien aceptada. Así es conocido que el uso de sulfitos en alimentos tiene una cuota restringida debido a sus efectos adversos en la salud en ciertos individuos, tanto del que lo maneja al aplicarlo en el alimento como del que lo consume. Y en los últimos años la búsqueda de alternativas en las formulaciones ha sido y continúa siendo un reto.

Alimentos y bebidas susceptibles del ennegrecimiento enzimático debido a la acción de la actividad lacasa, pueden ser frescos o crudos, o también procesados de la siguiente manera: precortado, fileteado, descabezado, homogeneizado, según corresponda a los distintos alimentos. Igualmente pueden ser aquellos sometidos a algún otro tratamiento que no haya inhibido esta actividad, como por ejemplo con el uso de una temperatura moderada, o con altas presiones si el alimento es presurizado entero. Es objeto de esta patente la inactivación enzimática por medio bioquímico, es decir mediante un inhibidor que actúa compitiendo con el sustrato, de manera que no permita una reacción coloreada posterior, que constituiría el ennegrecimiento de estos alimentos. La acción conjunta de esta inhibición junto con la ya descrita en diversos medios de inhibición de la PPO para evitar la coloración que produce, constituye una aportación fundamental para evitar estas coloraciones negruzcas que constituyen una de las causas más importantes del deterioro y pérdida de los alimentos por parte de la industria y el consumidor.

Descripción de la invención

El objeto de esta invención es inhibir el ennegrecimiento enzimático de la actividad lacasa en alimentos y bebidas, -como complemento a la inhibición ya mencionada en otras patentes y publicaciones- de la actividad PPO. Se conoce que la lacasa existe en el reino vegetal y en algunos insectos. La actividad de esta enzima ha sido descrita en ciertos vegetales como por ejemplo los hongos, y algunos microorganismos, pero se desconocía hasta ahora su presencia en el crustáceos (decaópodos) marinos como por ejemplo en la familia Penaidae (gambas, langostinos), Aristeidae (gamba roja, carabnero) y Palinuridae (langostas, cigalas).

Al igual que la PPO, la lacasa (p-difenol:dioxígeno oxidoreductasa) presenta cobre en su centro activo, encontrándose entre las enzimas catalogadas como multicobre oxidasas. También se denominan proteínas multicobre azul, por

ES 2 326 854 A1

el color azul que presentan y que es debido al máximo de absorción del ión cobre tipo I. La secuencia y estructura intervienen en los sistemas redox relacionados con el ión cobre.

5 Tiene la capacidad de unir cobre en determinadas posiciones denominadas Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, clasificados así por sus propiedades espectroscópicas. Cuando los tipos 2 y 3 se unen se dice que se forma una agrupación trinuclear. La lacasa, es muy compleja, puede estar en forma polimérica y la actividad se encuentra en casi todas ellas, es decir en formas monoméricas, diméricas e incluso en trímeros. Las lacasas son activas frente a compuestos que tienen grupos fenólicos en posición para, aunque tienen otros sustratos inespecíficos. La lacasa más conocida es la de hongo, e incluso se ha utilizado para fines medioambientales y de bioremediación, se utiliza en la detoxificación de
10 efluentes, principalmente de la industria papelera, textil y petroquímica (Couto SR, Herrera JLT. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* 24:500-13.). Pero no hay estudios de lacasas, ni se había mencionado su existencia en gambas, langostinos, cigalas, carabineros, bogavantes y langostas.

15 De las distintas combinaciones de compuestos con actividad anti-ennegrecimiento en los alimentos, no se han considerado hasta ahora aquellos que inhiben la actividad lacasa, la cual contribuye al ennegrecimiento de ciertos alimentos y bebidas entre los que destacamos la denominada gamba blanca (*Parapenaeus longirostris*) típica de las costas españolas.

20 En los productos actuales para evitar el ennegrecimiento consideramos de importancia la incorporación de compuestos que tengan acción inhibitoria de la actividad lacasa, pues son característicos de ésta. Hay especies como la gamba blanca que son muy susceptibles al ennegrecimiento enzimático y a pesar de la adición de compuestos como los descritos en el estado del arte, el ennegrecimiento no se inhibe en su totalidad. Se atribuye a la actividad lacasa que en gamba blanca es más activa que en otros crustáceos, por lo que la inhibición en estos casos es de importancia para tener un efecto sumatorio.

25 La presente invención indica la complementariedad de alguno de estos compuestos inhibidores de lacasa, a las mezclas ya descritas y utilizadas habitualmente, entre las que destacan las basadas en derivados de sulfitos o del 4-hexilresorcinol, por su acción inhibitoria de PPO. La actividad PPO tiene como sustratos básicamente a monofenoles y o-difenoles, mientras que los sustratos que indicamos para la lacasa son compuestos fenólicos que no inducen una polimerización de compuestos que produzcan ennegrecimiento.
30

Entre los agentes químicos de grado alimentario capaces de inhibir esta actividad lacasa se encuentran algunos p-fenoles que actúan como sustratos competitivos a los naturales en el alimento, principalmente la vainillina, ácido vainílico, el ácido p-hidroxicinámico, y el p-hidroxibenzoico.

35 El método de aplicación puede ser espolvoreo, inmersión o pulverización. El procedimiento de espolvoreo ha sido un tratamiento tradicional muy usado, aunque hace que la mezcla de compuestos no se distribuya homogéneamente por el alimento. Si la formulación anti-ennegrecimiento contiene al menos uno de los compuestos citados en el párrafo anterior, es efectivo, aunque no consideramos que sea la mejor manera de aplicarlo dado que no se distribuye homogéneamente en el producto, hecho ya mencionado. La alternativa a este método ha sido la inmersión del alimento en una
40 solución conteniendo la mezcla anti-ennegrecimiento, pero este procedimiento aunque también es viable, puede producir una liberación de fluidos del alimento y por tanto desmerecer su calidad. El tiempo de este tratamiento puede ser entre 5 y 30 minutos, recomendando 15 min, el volumen de solución puede ser suficiente solo con que lo cubra, aunque se recomienda 2 partes de solución por una de alimento. De entre estos tratamientos se prefiere la pulverización, pues permite distribuir las mezclas homogéneamente sin tener que sumergir el alimento en solución. La pulverización debe realizarse de manera que se impregne toda la superficie del alimento.
45

Según el método de aplicación y comercialización puede ir ligado o no a excipientes/ u otros compuestos químicos. En primer lugar se deben considerar la adición de compuestos químicos, en especial la adición de sal común. Se
50 considerará además la adición de sales alternativas al uso del cloruro sódico, por ejemplo cloruro potásico, cálcico, magnésico, carbonatos, sulfatos, fosfatos, etc... (cualquier tipo de sal). También se puede considerar la opción de solubilizar los compuestos en una pequeña cantidad de disolvente orgánico (preferentemente etanol). La proporción de disolvente dependerá de la cantidad de compuesto añadido y de su solubilidad, siendo solo necesario para solubilizarlo. Posteriormente se diluirá en una solución acuosa, preferentemente agua. También se podrá añadir un coadyuvante como un tensioactivo que favorezca la dispersión del compuesto y su mayor contacto con el crustáceo, ingredientes
55 alimentarios como la lecitina u otros como el dimetilpolixiloxano y dióxido de silicio amorfo. El límite máximo de estos dos últimos es de 10 mg/kg. En este sentido se puede aplicar también un recubrimiento en forma de film o de cobertura sobre el crustáceo consistente en 0,5-1% de gelatina y 0,5-1% de alginato, 0,1-5% sorbitol como coadyuvantes del p-fenol elegido.

60 Las cantidades o dosis de los componentes químicos añadidos (0,1% a 5%) o la intensidad/duración de los tratamientos aplicados no serán limitantes. Se pueden aplicar cada uno de estos compuestos por separado, o dos, ó más de dos a través de distintas combinaciones.

65 El que intervengan todos o sólo alguno de los compuestos químicos variará en función de las condiciones y características del producto de partida. También dependerá de las características que se deseen obtener según sea el destino final del alimento.

ES 2 326 854 A1

Ejemplos del procedimiento y composición de los compuestos anti-ennegrecimiento

Ejemplo 1

5 *Inhibición por inmersión en vainillina*

Se diluye al 0.5% vainillina en agua. Posteriormente se añade cualquier formulación comercial anti-ennegrecimiento para inhibir la enzima polifenoloxidasa, como puede ser un 1% de solución basada en metabisulfito sódico y 1% ácido ascórbico. Y se diluye todo en agua. Se preparan dos partes de solución por 1 gramo de gambas. Se sumergen estas en la solución durante 15 minutos, a continuación se sacan de la solución y se dejan escurrir, conservándose de manera tradicional.

Ejemplo 2

15 *Inhibición por inmersión en ácido vainillico*

Se diluye al 0.5% ácido vainillico en agua. Posteriormente se añade cualquier formulación comercial anti-ennegrecimiento para inhibir la enzima polifenoloxidasa, como puede ser un 1% de solución basada en metabisulfito sódico y 1% ácido ascórbico. Y se diluye todo en agua. Se preparan dos partes de solución por 1 gramo de gambas. Se sumergen estas en la solución durante 15 minutos, a continuación se sacan de la solución y se dejan escurrir, conservándose de manera tradicional.

Ejemplo 3

25 *Inhibición por pulverización de ácido hidroxicinámico*

Se solubiliza en etanol 2% de ácido hidroxicinámico, agitándolo hasta que se disuelva. Se añade una concentración de 0,5% de 4-hexylresorcinol y 0.5% ácido cítrico. Se diluye y revuelve todo en agua suficiente para impregnar mediante pulverización todas las gambas, se pulverizan asegurando que se han impregnando en su totalidad y se dejan escurrir, conservándose de manera tradicional.

Ejemplo 4

Inhibición por recubrimiento con una solución filmogénica conteniendo 1% de vainillina

Se prepara una solución acuosa conteniendo 1% de gelatina y 1% de alginato, 1% sorbitol y 1% de vainillina. Se aplica dicha solución por encima de la superficie de las gambas de manera que se facilite el máximo contacto con el crustáceo. Se deja enfriar hasta que gelifique la mezcla, conservándose de manera tradicional.

40 Ejemplo 5

Inhibición por espolvoreo de vainillina

Se aplica sobre la superficie del crustáceo por espolvoreo una mezcla en seco compuesta por 1% de vainillina y 99% de NaCl, cuidando de esparcir el polvo por todo el cuerpo del crustáceo. Se conserva de la manera tradicional.

50

55

60

65

ES 2 326 854 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos **caracterizado** por comprender la aplicación de una composición inhibidora del enzima lacasa, complementaria a la inhibición del ennegrecimiento enzimático producido por polifenol oxidadasas, que contenga al menos un compuesto p-fenol de grado alimentario del grupo de la vainillina, ácido vainílico, p-hidroxicinámico, o p-hidroxibenzoico.
- 10 2. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según la reivindicación 1 **caracterizado** por utilizar en la composición un compuesto p-fenol de grado alimentario en una concentración comprendida entre el 0.1 y 5%.
- 15 3. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por aplicar conjuntamente en la composición un excipiente como por ejemplo cloruro sódico, cloruro potásico, cálcico, magnésico, carbonatos, sulfatos, fosfatos, en una concentración de hasta el 99% del producto en seco.
- 20 4. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** por incluir como coadyuvante en la composición un agente tensioactivo como lecitina, dimetilpolixiloxano o dióxido de silicio amorfo.
- 25 5. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** por disolver previamente en disolvente orgánico de grado alimentario como etanol o acetato de etilo los compuestos p-fenol de grado alimentario según las reivindicaciones 1 y 2.
- 30 6. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por aplicar la composición mediante espolvoreo.
- 35 7. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por aplicar la composición mediante inmersión durante un tiempo comprendido entre 1 y 120 minutos.
- 40 8. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por aplicar la composición mediante pulverización.
- 45 9. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por aplicar la composición mediante un recubrimiento a base de gelatina sola o en combinación con algún polisacárido.
- 50 10. Procedimiento para inhibir ennegrecimiento enzimático inducido por la actividad lacasa en crustáceos marinos según la reivindicación 9 **caracterizado** por aplicar la composición mediante un recubrimiento con una concentración de gelatina comprendida entre un 0,5 y 3%, 0,5 y 3% de alginato y 0,1-5% de sorbitol.

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 854

② Nº de solicitud: 200701127

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.04.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23B 4/12** (2006.01)
A22C 29/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MONTERO et al. Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (<i>Parapenaeus longirostris</i>). Journal of Food Science, 2004, vol. 69 (8), páginas 643-647.	1-10
X	WO 9222213 A1 (OPTA FOOD INGREDIENTS, INC) 23.12.1992, reivindicaciones; páginas 4-6,10.	1-10
X	MARSHALL et al. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO, 2000.[en línea]Recuperado de Internet. [Recuperado el 05.10.2009] <URL:http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html.	1-10
X	JANOVITZ-KLAPP, et al. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. J. Agri. Food Chem, 1990, vol 38, páginas 926-931.	1-10
X	KWAK E-U y LIM S-I. Inhibition of browning by antibrowning agents and phenolic acids or cinnamic acid in the glucose-lysine model. J. Sci. Food Agric., 2005, vol. 85, páginas 1337-1342.	1-10
X	CHEN Q-X. et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by p-alcoxybenzoic acids. Food Chemistry, 2005, vol. 91, páginas 269-274.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.08.2009

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23B, A22C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, FSTA, BIOSIS, HACAPLUS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.08.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-5, 9-10	SÍ
	Reivindicaciones 1-3, 6-8	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-10	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son los presentados el 25/09/2009 como resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Montero et al.	2004
D02	WO 92/22213	23-12-1992
D03	Marshall et al.	2000
D04	Janovitz-Klapp et al.	1990
D05	Kwak y Lim	2005
D06	Chen et al.	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La primera reivindicación de la solicitud se refiere a un procedimiento para inhibir el ennegrecimiento enzimático en crustáceos marinos, inducido por la actividad lacasa, que se caracteriza por comprender en la composición un compuesto p-fenol de grado alimentario del grupo de la vainillina, ácido vainillínico, p-hidroxicinámico o p-hidrobenczoico.

Antes de emitir una opinión sobre la novedad y actividad inventiva de la invención, se van a realizar algunas puntualizaciones sobre la interpretación de las reivindicaciones:

En primer lugar, el término "p-fenol" utilizado para definir los compuestos del procedimiento no es del todo correcto, ya que los compuestos utilizados no son químicamente fenoles, sino tres ácidos y un aldehído aromático que tienen un grupo hidroxilo en posición para, habría que buscar un término más adecuado que incluyese y definiese a los cuatro compuestos utilizados, como por ejemplo "compuestos derivados del fenol sustituidos en posición para".

En segundo lugar, tal y como está redactada la primera reivindicación, no queda claro el alcance de la invención, ya que la reivindicación se puede interpretar en un sentido amplio o restrictivo. En un sentido amplio incluiría en su definición la posibilidad de utilizar cualquier compuesto fenólico sustituido en posición para. A favor de esta interpretación amplia está la mención que se hace en la descripción (página 9, líneas 23-27) de que "entre los agentes químicos, se encuentran los p-fenoles, principalmente la vainillina...", dando a entender que se pueden utilizar otros muchos "p-fenoles". Sin embargo, en otros lugares de la descripción y en los ejemplos, únicamente se mencionan cuatro compuestos concretos, que son vainillina, ácido vainillínico, p-hidroxicinámico o p-hidroxibenzoico, lo que apoyaría una interpretación restrictiva de la reivindicación, es decir, sólo estos cuatro compuestos estarían dentro del alcance de la reivindicación. En principio, la búsqueda, el informe y la opinión escrita se han realizado tomando la reivindicación en su sentido más amplio e interpretando el término "p-fenol" como cualquier compuesto fenólico (es decir, un grupo aromático con un hidroxilo) con un sustituyente en posición para. Por último, según la reivindicación, la invención es un procedimiento para inhibir el ennegrecimiento producido por la lacasa, sin embargo, ni en la descripción ni en los ejemplos hay ninguna experiencia ni apoyo documental que demuestre tal inhibición. Es decir, no se ha comprobado ni que todos los crustáceos tengan lacasa, ni que una vez tratados con las composiciones de la invención, esta enzima se haya inhibido. Por ello, se ha interpretado la reivindicación como un procedimiento para tratar a los crustáceos marinos utilizando las composiciones de la reivindicación con objeto de inhibir el ennegrecimiento enzimático de los mismos, independientemente del mecanismo por el que se produzca éste.

Novedad (art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986)

En el documento D1 se utiliza el 4-hexilresorcinol en composiciones con objeto de inhibir la melanosis en el crustáceo marino *Parapenaeus longirostris*. Las cantidades aplicadas de este compuesto, que se puede considerar un derivado del fenol con un sustituyente en posición para, son de 0,0025% a 1% y el método de aplicación por inmersión, pulverización o espolvoreo.

Teniendo en cuenta este documento D1, las reivindicaciones 1-3 y 6-8, tal y como están redactadas, carecen de novedad.

Hoja adicional

También el documento D2 divulga métodos y composiciones para inhibir el pardeamiento en los alimentos, entre los que se incluyen los crustáceos marinos (resumen, página 10, último párrafo). Las composiciones comprenden al menos un derivado sustituido del resorcinol, especialmente los sustituidos en la posición 4 o para (ver fórmula II, página 6, reivindicaciones 1 a 13), en una proporción de 0.001 a 5% (página 10, primer párrafo), además de otros compuestos como sales, ácidos, etc. (página 4).

Por consiguiente, el documento D2 se considera que afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-3, 6-8 tal y como están redactadas.

Actividad inventiva (art. 8 de la Ley de Patentes 11/1986)

El documento D3, es una revisión de la FAO sobre el pardeamiento de los alimentos, el mecanismo por el que se produce y los posibles tratamientos para evitarlo.

En el apartado 3.2.1 e) y la figura 21 se pueden ver varios compuestos derivados del fenol y sustituidos en posición para que se han utilizado para evitar el pardeamiento por su actividad antioxidante.

En el apartado 3.2.5 e) menciona el uso de los ácidos carboxílicos aromáticos de la serie del ácido benzoico y del ácido cinámico como inhibidores de la polifenoloxidasas, ya sea inhibición competitiva o por formar un complejo con el cobre, en el lugar activo de la enzima.

Se considera el documento D3 como el documento más cercano del estado de la técnica ya que en este documento se citan compuestos de los nombrados de forma general en la reivindicación 1, es decir derivados fenólicos sustituidos en para y también algunos de los mencionados concretamente en la reivindicación de la solicitud, por el ejemplo el p-cumárico.

El problema que intenta solucionar la solicitud es encontrar un procedimiento alternativo a los ya existentes para inhibir la melanosis en los crustáceos. La solución que el solicitante propone es utilizar unas composiciones que incluyan los compuestos mencionados en la primera reivindicación.

Estos compuestos, según se puede ver en D1, ya se han mostrado útiles en el tratamiento de otro tipo de alimento con el mismo objetivo, es decir, inhibir el pardeamiento. Se considera que la utilización de estos compuestos en otro grupo de alimentos, los crustáceos marinos, no implica actividad inventiva, ya que, el mecanismo por el cual se produce en el ennegrecimiento en los alimentos, es semejante en todos ellos. Un experto en la materia, que buscara composiciones alternativas a las ya conocidas para evitar la melanosis de los crustáceos, utilizaría los que se han utilizado con éxito en otros alimentos, con una expectativa razonable de éxito.

El mismo razonamiento que el utilizado en el apartado anterior sirve para los documentos D4, D5 y D6.

En D4 se prueba a inhibir la polifenoloxidasas de la manzana mediante ácidos carboxílicos y sus derivados. Los ácidos con grupos OH en para (p-hidroxibenzoico, ácido vainillínico o p-cumárico) fueron mejores inhibidores que los meta.

En D5 se concluye que los ácidos fenólicos (entre los que se citan el ácido vainillínico y el hidroxibenzoico) son útiles en la inhibición del pardeamiento (ver conclusiones).

Finalmente, D6 estudia la inhibición de la tirosinasa de un hongo, mediante diferentes ácidos p-alcoixibenzoicos, entre los que figura el ácido p-hidroxibenzoico (ver discusión)

A la vista de todos estos documentos, cada uno de ellos por separado, se considera que la reivindicación independiente 1 no tiene actividad inventiva.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 10 no aportan ninguna característica que, en combinación con la 1, le otorguen actividad inventiva a la invención.

El único compuesto que no ha sido mencionado en el estado de la técnica como inhibidor de la melanosis es la vainillina. Con objeto de subsanar el problema de interpretación de las reivindicaciones, así como la falta de novedad y actividad inventiva, puede tratar de elaborar un nuevo juego de reivindicaciones, ciñéndose exclusivamente a ese compuesto.

También, sería conveniente eliminar las menciones a la actividad lacasa de la solicitud, ya que en ningún lugar de la descripción se demuestra que estas composiciones sean efectivas en la inhibición de la lacasa.