

368710

Int. C:



Int. Cl:

A 23 B 4/14

SECCION TECNICA

CLASIFICACION I. P. C.

CLASE C 12 A 23

SUBCLASE D B

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO DE PREVENCION DE LA MELANOSIS EN LOS MARISCOS Y OTRAS ESPECIES SIMILARES", a favor de Don Francisco GUTIERREZ MULLOR y Don José Maria VIGO GUTIERREZ, ambos de nacionalidad española y domiciliados en Madrid, respectivamente en "General Varela nº 3" y "Diego de León nº 3".

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento de prevención de la melanosis en los mariscos y otras especies similares.

- Es bién sabido que la melanosis consiste en una acumulación del pigmento melanina en determinadas partes del cuerpo y cabeza de los mariscos. Esta pigmentación no es debida a un proceso putrefactivo del animal, sino al trabajo metabólico de los melanoblastos o células situadas en la capa basal de la epidermis, que sintetizan la melanina a partir del aminoácido
5. tirosina.
- 10.



En líneas generales diremos que la tirosina oxidada pasa a dihidrofenilalanina (dopa), y a dopa-quinona, después de hacerlo por un leucocompuesto, el hallacromo, la 5-6-dihidroxiindol, y la indol-5-6-quinona, para terminar en el complejo melánico, o más comunmente llamado melanina, pero esta oxidación de la tirosina requiere la acción catalítica de un enzima llamado tirosinasa, que contiene cobre y que pertenece al grupo de oxidasas aeróbicas, o sea, aquellas que utilizan directamente el oxígeno y catalizan la oxidación de determinadas sustancias. La irradiación ultravioleta y el oxígeno ambiental sinergizan para favorecer este proceso de oxidación en los mariscos, al ser extraídos del mar.

Los estudios y experiencias hasta ahora realizadas se han limitado a encontrar una, o varias, sustancias reductoras para evitar la oxidación. Las limitaciones en el campo de la Bromatología han simplificado el número de reductores hasta casi los límites de los compuestos sulfúricos, u otros derivados del azufre.

Sin embargo, no se ha tratado de evitar la acción catalítica de la enzima tirosinasa, de una manera singular y efectiva.

Es, por ello, que el procedimiento motivo de la presente invención, va esencialmente dirigido a anular esta catalización de la enzima, sustrayéndole el cobre a la tirosinasa para, de este modo, romper el puente de unión con el sustrato, ya que en los casos en que la enzima es una proteína conjugada, el resto no aminoácido, o grupo prostético, es uno de los puntos por donde puede combinarse con el sustrato. Es, pues, un caso de "inhibición enzimática no competitiva", en la que el inhibidor no actúa sobre el centro activo, sino sobre el grupo prostético, descomponiendo el punto de unión de la enzima con el sustrato.



- Es también un inhibidor específico, porque inhibe una reacción o grupo de reacciones; y por definición, sabemos que la inhibición de los procesos enzimáticos es una disminución de la velocidad de la reacción, o su anulación total. Rota la catalización del proceso oxidativo de la tirosina, la reacción, o reacciones, no se producen, o, si se han iniciado, se reducen, no llegando a la franca formación de la melanina y, por ende, al obscurecimiento de las zonas afectadas por el pigmento melánico.
- 5.
10. Nuestro procedimiento consiste, esencialmente, en la presencia de una reductona antitirosinasa, capaz de ligarse al cobre de la tirosina y formar un compuesto reducido, de aquel, en fase inactiva.
15. La obtención de la reductona antitirosinasa se logra partiendo de la levadura de cerveza, procedente de cultivos frescos, lavados y prensados, de ciertas razas de *Sacharomycea cerevisiae*, (sacaromicaceos) y cuya síntesis es la siguiente:
20. Se trituran 500 partes de levadura exprimida con 25 partes de ácido clorhídrico concentrado y 250 partes de agua destilada.
25. Se calienta la mezcla durante varias horas, al baño de aceite, en un matraz provisto de refrigerante a reflujo manteniendo la temperatura entre 92°C y 103°C. Se deja enfriar a 50°C. aproximadamente. Se añade solución al 10% de carbonato sódico ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) hasta que cesa la efervescencia. La mezcla resultante deberá ser ligeramente alcalina. Se añaden 200 partes de agua agitando durante varios minutos y se deja en reposo 24 horas. Transcurrido este tiempo se decanta el líquido claro con posterior filtración a vacío, pasándolo luego a evaporación a presión reducida hasta consistencia de miel. Se agrega entonces
30. $\frac{1}{4}$ de su peso de levadura seca y se evapora a sequedad al va-



cío. Se obtiene un polvo amarillo-grisáceo, inodoro y de ligero sabor salino. A continuación se empieza a diluir en agua destilada un 5% del polvo anteriormente obtenido, agitando lentamente y a temperatura de 18°C a 20°C.. De esta solución se toman
5. 200 mililitros y se mezclan con 150 mililitros de ácido sulfúrico al 2%, y 500 mililitros de Butanol. Se agita durante 10 minutos y se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos. Se extrae la función butanólica sobrenadante. Se repite la extracción (sin añadir de nuevo a. sulfúrico) y se mezclan los dos extractos.
10. Se añaden 500 mililitros de solución alcalina, preparada previamente, con 500 mililitros de sosa, 4N, y 25 gr. de carbonato sódico; se agita durante 5 minutos. Se formarán dos fases y un precipitado. Se recoge el precipitado, se filtra al vacío, se seca y se liofiliza. El polvo resultante, de color, amarillo-lechoso, deberá envasarse en frascos de vidrio topacio esterilizados.
15.

Este polvo, así obtenido, contiene del 85% al 90% de la reductona antitirosinasa, de la cual su grupo amínico reacciona con el cobre de la tirosinasa para formar el correspondiente complejo cuproamínico y dejando a la enzima inactiva para sus funciones catalíticas en la reacción oxidativa de la tirosina. De este modo la cadena de oxidaciones queda rota, evitando la formación del complejo melánico.
20.

La reductona antitirosinasa puede formar parte del compuesto
25. contra la melanosis, en una proporción de 5-20 p.p.m..

A la presencia activa de la reductona antitirosinasa es preciso agregar la pasiva de otras sustancias que crean un campo propicio para que la reducción a nivel celular, sea favorecida por el medio externo inhibiendo la presencia del oxígeno ambiental, como son los bisulfitos, metabisulfitos, ácido ascórbico,
30.



tartarico, cítrico y otros carboxílicos, así como compuestos sulfurosos, en general, que no liberen más del 60% de SO₂ libre.

- También la asociación de otras sustancias orgánicas, como aquellas antibióticas, sinergizantes en este medio, pueden ser asociadas para crear una profilaxis antibacteriana, con el fin de evitar procesos de descomposición amoniacal que interferirían la acción del agente antimelánico. Este grupo antibiótico puede ser simple, o formado por la asociación de varios antibióticos, tales como las tetracilinas, cloranfenicol, estreptomycinas, bacitracina, neomicina y otros, capaces de crear un halo de inhibición bacteriana en torno al marisco y sumar su acción preservadora a la puramente entimelánica de la antitirosinasa. También cabe asociar un colorante, con el doble fin diferenciador y desinfectante, del tipo del clorhidrato de tetrametilitionina y otros, que en solución acuosa son de gran actividad antiséptica y cromógena, en dosis infinitesimales. El grupo antibiótico no deberá sobrepasar la dosis de 5-7 p.p.m. y el colorante las de 0,2-1 p.p.m..

- El compuesto preventivo de la melanosis, anteriormente obtenido, puede ser aplicado al marisco y otras especies similares, de las formas siguientes:
- a) solución del compuesto en agua, dulce o de mar, e inmersión del marisco en la solución,
 - b) pulverización de la solución anterior,
 - c) distribución de la mezcla sólida por camadas de marisco, y
 - d) en el hielo de refrigeración, para lo cual se procede a la disolución del agua potable con el compuesto ya obtenido y que ha de ser sometida a la congelación en las fábricas de hielo. En este caso, a la solución debe incorporarse de 17-30 p.p.m. de un polímero gelificante(carboximetilcelulosa) y de 10-25 p.p.m. de



un catión alcalino-térreo (acetato cálcico), para lograr una mejor dispersión y evitar el desplazamiento de sales al eje de la barra de hielo. Este hielo triturado, se aplica al marisco de forma convencional.

5. Cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos, pueden servir para el tratamiento del marisco destinado a la congelación. En este caso el tratamiento del marisco, u otras especies similares, deberá hacerse tan pronto haya sido izado a bordo, procediendo después a su congelación por los procedimientos habituales.
- 10.

N O T A

Hecha la descripción del presente invento lo que se declara como nuevo y de propia invención comprende las reivindicaciones siguientes:

15. 1.- Procedimiento de prevención de la melanosis en los mariscos y otras especies similares, c a r a c t e r i z a d o por el hecho de que el agente antimelánico es una reductona antitirosinasa obtenida a partir de levadura procedente de cultivos frescos de ciertas razas de *Sacharomyces cerevisiae*, lavada y prensada, a la cual se añaden un 25% de ácido clorhídrico y un 50% de agua destilada, se calienta la mezcla durante varias horas, al
20. baño de aceite, en un matraz provisto de refrigerante a reflujo manteniendo la temperatura entre 92°C y 103°C, se enfria hasta los 50°C aproximadamente, se añade solución al 10% de carbonato sódico hasta que cesa la efervescencia y se añade un 50% de agua
25. agitando durante varios minutos, se reposa durante 24 horas a continuación de lo cual se decanta el líquido claro con posterior



- filtración a vacío, pasándolo luego a evaporación a presión reducida hasta consistencia de miel, se agrega entonces 1/4 de su peso de levadura seca y se evapora a sequedad al vacío, dejando un polvo amarillo-grisáceo que se diluye en agua destilada
5. agitando lentamente y a temperatura de 18°C a 20°C, cuya solución se mezcla con un 75% de ácido sulfúrico y con un 333% de Butanol, se agita durante 10 minutos y se centrifuga a 2.500 r.p.m durante 5 minutos y se extrae la función butanólica sobrenadante, se repite la extracción, sin añadir de nuevo ácido sulfúrico y
10. se mezclan los dos extractos, a cuya mezcla se añade la misma cantidad que se añadió de Butanol, pero de una solución alcalina preparada previamente con la misma cantidad de sosa y un 5%, de esta, de carbonato sódico, se agita durante 5 minutos formándose dos fases y un precipitado que se toma, se filtra al vacío,
15. se seca y se liofiliza quedando un producto que contiene del 85% al 90% de reductona antitirosinasa, producto activo contra la melanosis al cual es preciso añadir una presencia pasiva de sustancias que creen un campo propicio para que la reducción a nivel celular sea favorecida por el medio externo inhibiendo la presencia del oxígeno ambiental, tal como son los bisulfitos, metasulfitos, ácido ascórbico, tartárico, cítrico u otros carboxílicos, así como compuestos sulfurosos que no liberen más del 60% de SO₂ libre.

- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, c a r a c t e -
25. r i z a d o por el hecho de que para crear una profilaxis antibacteriana con el fin de evitar procesos de descomposición amoniacal que interferirían la acción del agente antimelánico se asocia al producto obtenido otras sustancias orgánicas antibióticas, sinergizantes en este medio, tales como antibioticos simple o formado por la asociación de varios, como la tetracilina,
- 30.



cloranfenicol, estreptomycin, bacitracina, neomicina y otros capaces de crear un halo de inhibición bacteriana en torno del marisco y crear y sumar su acción preservadora a la puramente antimelanósica de la antitirosinasa e incluso asociar un colorante, con el doble fin diferenciador y desinfectante, del tipo del clorhidrato de tetrametilitionina que en solución acuosa es de gran actividad antiséptica y cromógena.

5. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que para su utilización cabe la disolución en el agua potable destinada a la congelación en las fábricas de hielo, de la asociación antimelanósica, antibacteriana, antiséptica y cromógena, con una previa incorporación de un polímero gelificante, tal como el carboximetilcelulosa, y de un catión alcalino-terreo, tal como el acetato cálcico, al objeto de lograr una mejor dispersión y evitar el desplazamiento de sales al eje de la barra de hielo que, una vez triturado, se aplica sobre el marisco de forma convencional.

10. 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que para su utilización cabe la solución previa de la asociación antimelanósica, antibacteriana, antiséptica y cromógena en agua, dulce o de mar, con inmersión del marisco en esta solución e incluso por pulverización de la misma sobre el marisco y, en algunos casos, por distribución de la mezcla sólida por camadas de marisco.

15. 5.- Procedimiento de prevención de la melanosis en los mariscos y otras especies similares.

Según se describe y reivindica en la presente Memoria que consta de nueve hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.



Madrid, a 23 de Junio de 1969

FRANCISCO GUTIERREZ MULLOR
José Maria VIGO GUTIERREZ.

P. a.

J A I M E I S E R N
P. P.
E L I M O N O I J O S E R O D R I G U E Z