



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 137 134**

② Número de solicitud: 009800615

⑤ Int. Cl.⁶: C07K 16/40

C12N 9/99

A23L 1/015

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **27.02.1998**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.1999**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.12.1999

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSITAT DE
LES ILLES BALEARS. OTRI
Campus Universitario
Ctra. de Valldemossa Km. 7,5
Edific. Mateu Orfila
Palma de Mallorca, Baleares, ES
Francisco Tejedor García S.A.**

⑦ Inventor/es: **Pons Biescas, Antonio;
Palou Oliver, Andrés y
Oliver Oliver, Jorge**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (E.C. 1.13.11.12) en alimentos o en sus ingredientes.**

⑤ Resumen:
Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (E.C. 1.13.11.12) en alimentos o en sus ingredientes.
La lipoxigenasa es responsable de la iniciación de procesos de peroxidación de lípidos. Los anticuerpos contra la lipoxigenasa permiten la inhibición de este enzima o su eliminación selectiva por técnicas separativas de aplicación en la industria alimentaria.
La utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa en la elaboración de sobrasada produce una inactivación del enzima perceptible incluso después del curado de este embutido, observándose efectos sinérgicos con otros antioxidantes.

ES 2 137 134 A1

DESCRIPCION

Título de la invención

Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (E.C. 1.13.11.12.) en alimentos o en sus ingredientes.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de los aditivos alimentarios que confieren propiedades funcionales a los alimentos y, en especial, se refiere a aditivos que producen la desactivación de enzimas responsables de la aparición de defectos en un alimento. Algunos procesos enzimáticos presentan un gran interés aplicado en la elaboración de alimentos, sin embargo, en otros casos son responsables parciales o totales de la aparición de características rechazables, como por ejemplo la iniciación de procesos de decoloración en alimentos en los que el color es una de sus características definitorias, o la aparición de sustancias de gusto desagradable. La idea de inhibir (desactivar) el enzima utilizando anticuerpos (proteínas) diseñados para su unión selectiva con el enzima y que a su vez produzcan su desactivación o faciliten su eliminación, puede ser aplicada en alimentos en cuyo proceso de elaboración no se consiga una desactivación térmica u de otro tipo de los enzimas, pudiendo llegar a ser una alternativa al uso de otros aditivos más inespecíficos y con un mayor grado de repercusión sobre la salud del consumidor. Entre los alimentos a los que se puede aplicar esta invención podemos citar los embutidos crudos curados y el vino, y son numerosos los enzimas que son responsables de defectos en un alimento (lipoxigenasa, polifenolasa, peroxidadas, etc.).

Estado de la técnica anterior a la invención

Existen diferentes defectos en alimentos ocasionados por la acción de enzimas que son parte constituyente de los ingredientes utilizados en su elaboración. Así por ejemplo, la xantina oxidasa de la leche es la responsable de la aparición de un cierto sabor a oxidado, que se evita mediante la desactivación térmica del enzima. En la elaboración de zumos también es necesaria la desactivación térmica de un enzima, la pectin-metil estearasa. Este enzima se encuentra de forma natural en la fruta de manera que en el proceso de la elaboración del zumo se pone en contacto con su substrato produciéndose la liberación de ácidos pectínicos libres, los cuales, en presencia de iones calcio, formarían agregados con tendencia a precipitar. Alternativamente a la inactivación térmica, que puede producir modificaciones no deseadas del aroma, se suele introducir poligalacturonidasas en el zumo, que también actúan sobre las pectinas desmetiladas, con lo que al hidrolizarse los ácidos pectínicos se evitaría su precipitación por calcio.

Muchos de los enzimas responsables del deterioro de alimentos pertenecen al grupo de las oxidorreductasas, aunque también podemos encontrar en otros grupos. Las oxidorreductasas son responsables de catalizar la oxidorreducción de multitud de substratos dando lugar a productos que tienen unas características modificadas respecto a su funcionalidad dentro de un alimento. En algunos casos, el cambio de característica es

beneficioso para el alimento, como es el caso de la acción de la lipoxigenasa en el proceso de blanqueado de la harina; sin embargo en otros, la reacción conduce a la pérdida de propiedades nutricionales u organolépticas que hacen descartar el uso comercial del alimento. Este sería el caso del pardeamiento (quiebra castaña) del vino, que obedece a la oxidación de compuestos fenólicos que en los vinos tintos puede provocar hasta la completa floculación del pigmento. Los procesos oxidativos que se producen son tanto de naturaleza química como enzimática (polifenoxidasas). Las fenoloxidasas catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos a o-difenoles y a estos a quinonas que son el punto de partida de una gran variedad de reacciones, algunas conducen a la formación de coloraciones pardas anómalas en frutas y productos derivados. Las medidas para evitar estas reacciones pasan por la inactivación de enzimas por calentamiento, la eliminación de oxígeno o la adición de reductores o antioxidantes. En el caso del vino el producto más indicado en la actualidad para evitar la quiebra castaña es el dióxido de azufre; los vinos pardeados pueden aclararse con carbón activo. Con este tratamiento se eliminan también defectos de sabor.

La oxidación de los lípidos es uno de los principales problemas que tiene la conservación y elaboración de alimentos grasos. En las condiciones en que habitualmente se almacenan los alimentos, los acil-lípidos insaturados no son estables y sufren procesos de peroxidación, que en reacciones posteriores se transforman en una gran variedad de compuestos. El proceso, que se conoce como peroxidación lipídica, se puede dividir en autooxidación y catálisis por lipoxigenasas. La diferencia consiste en que la reacción del oxígeno con el ácido graso para formar el hidroperóxido esté o no catalizada por un enzima. Durante el proceso de peroxidación lipídica se forman numerosas sustancias volátiles y no volátiles. Las sustancias volátiles tienen una actividad olfatoria extraordinariamente grande, los efectos de la peroxidación lipídica se manifiestan inclusive en aquellos alimentos que contienen acil-lípidos no saturados en pequeña concentración o en aquellos en los que sólo una pequeña parte de los acil-lípidos reacciona con el oxígeno. Las modificaciones producidas en el aroma de los alimentos son juzgadas con frecuencia por los consumidores negativamente, es decir, como rancias, a pescado, metálicas, herbáceas, a cartón, a viejo, etc. No debe olvidarse, sin embargo que los compuestos volátiles producidos por autooxidación en concentraciones inferiores a los umbrales de "off-flavor" contribuyen decisivamente al aroma de muchas frutas y legumbres y también matizan el aroma de los alimentos grasos.

Las lipoxigenasas, además de ser responsables de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, tienen la capacidad de catalizar la cooxidación de éstos con carotenoides como el β -caroteno, degradándose hasta productos incoloros. Los carotenoides contribuyen decididamente a proporcionar color a multitud de alimentos, entre ellos algunos embutidos crudos como la sobrasada o el chorizo. En estos casos la fuente principal de carotenoides la constituye el pimentón,

preparado de origen vegetal con un elevado grado de sequedad y que aún mantiene activos algunos enzimas como la lipoxigenasa. La mezcla de ingredientes como tocino, pimentón, carne magra de cerdo que se utiliza para la elaboración de los embutidos anteriormente citados pone en contacto el enzima (lipoxigenasa) con sus substratos (ácidos grasos insaturados, preferentemente linoleico y carotenoides como el β -caroteno) con lo que puede iniciarse el proceso de cooxidación que producirá una pérdida de color y de valor nutricional. Los carotenoides, además de proporcionar color a estos alimentos también tiene una importante función nutricional de provitamina A, habiéndose descrito que pueden desempeñar un papel importante en los sistemas de prevención de determinadas patologías como la arteriosclerosis.

El proceso de peroxidación de los ácidos grasos insaturados se encuentra mediado por la formación de radicales libres de estos ácidos grasos. La reacción de peroxidación sigue un esquema básico de una reacción en cadena en la que se pueden distinguir al menos cuatro fases. La fase de iniciación en la que un radical libre preexistente capta un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado produciéndose un radical libre de este ácido graso con el electrón centrado sobre un átomo de carbono. La fase de propagación en la que este radical libre reacciona con el oxígeno generando otro radical libre (radical hidropéroxido) en el que el electrón se encuentra centrado sobre el oxígeno. Este radical hidropéroxido puede captar un átomo de hidrógeno de otra molécula de ácido graso insaturado que a su vez puede de nuevo reaccionar con otra molécula de oxígeno, propagando de esta manera la reacción de peroxidación. En esta fase de propagación se genera el producto de la reacción de peroxidación, los hidropéroxidos de los ácidos grasos insaturados. Estos hidropéroxidos presentan a su vez una gran reactividad, de hecho pueden descomponerse en presencia de metales como el hierro y el cobre en su estado reducido, dando lugar a la denominada reacción de Fenton en la que se produce un radical hidroxilo extremadamente reactivo y el alcohol del ácido graso insaturado. Esta fase puede denominarse fase de reiniciación, puesto que en ella se vuelen a generar radicales libres muy reactivos, capaces de reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados. En la cuarta fase, la de terminación, los radicales libres que se han generado en las fases precedentes se desactivan por reacción entre ellos o con moléculas capaces de capturar estos radicales libres, transformándose a su vez en radicales libres poco reactivos. Estas sustancias tiene unas propiedades concretas que les permiten estabilizar el electrón radicalario y se conocen con el nombre genérico de antioxidantes por captura de radicales libres. Entre estas moléculas podemos encontrar la mayoría de antioxidantes primarios y secundarios autorizados como los galatos, ter-butyl-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-ter-butyl-p-cresol (BHT), tocoferoles (vitamina E), los compuestos de la serie ionox (derivados del BHT), los ácidos de la goma de guaiaca, los carotenoides (β -caroteno), los flavonoides, etc. Otros antioxidantes, también deno-

minados sinergistas, actúan quelando los metales de transición que pueden reiniciar la reacción de peroxidación, como los polifosfatos, EDTA, ácido tartárico, ácido cítrico, ésteres del ácido cítrico, ácido fítico, lecitina. Otros antioxidantes actúan inhibiendo la fase de iniciación de la peroxidación o bien consumiendo el oxígeno, el otro substrato de la reacción de peroxidación. Entre estos encontramos los sulfitos, el ácido ascórbico (vitamina C) y el palmitoilil-ascorbato, el ácido eritróico (D-isómero del ácido ascórbico). Algunos antioxidantes actúan por más de un mecanismo, como es el caso del ácido tiopropiónico que actúa como agente quelante y, al igual que el sulfito, descomponiendo hidropéroxidos de alquilo en compuestos más estables.

Las lipoxigenasas (linoleato:oxígeno oxidorreductasa, EC 1.13.11.12.) son una clase de dioxigenasas que contienen un átomo de hierro no hemínico y que catalizan la oxidación de los lípidos insaturados por el oxígeno molecular. Su existencia es conocida desde hace más de 60 años y, durante este periodo de tiempo, ha recibido diferentes nombres: caroteno oxidasa, oxidasa de grasas, lipoxidasa, y, de forma más consensuada en los últimos años: lipoxigenasa.

Antes de su descubrimiento como entidad enzimática, ya se utilizaba en la tecnología de alimentos para la decoloración de los carotenoides de la harina y para modificar las propiedades reológicas de la masa resultante [(1) Axelrod, 1974. ACS Adv. Chem. Ser. 136:324-348]. También se ha investigado su participación en la génesis de sabores y aromas en los alimentos, que pueden ser deseables o indeseables [(2) Siedow, 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 145-188.).

Se ha descrito su actividad en más de 60 especies de plantas superiores (1), en algas eucariotas [(3) Zimmerman y Vick, 1973. Lipids 8: 264-266), en levaduras y hongos [(4) Schecliter y Grossman, 1983. Int. J. Biochem., 15: 1295-1304], y en mamíferos [(5) Samuelsson, Dahlen, Lindgren, Rouzer y Serhan, 1987. Science, 237:1171-1176]. Esta gran diversidad de especies que presentan actividad lipoxigenasa también se refleja en una diversidad de estructuras que presentan esta actividad; a pesar de ello se han descrito reacciones inmunológicas cruzadas entre antisueros obtenidos con lipoxigenasa purificada de una fuente y la lipoxigenasa presente en otra especie, así por ejemplo se han obtenido reacciones cruzadas entre el anticuerpo contra la lipoxigenasa de soja y el enzima de patata y el de berenjena [(6) Trop, Grossman, Veg, 1974. Ann. Bot. 38: 783-794; (7) Vernooy-Gerritsen, Veldink, Vliegthart, 1982. Biochim. Biophys. Acta 708: 330-334]. Así mismo se han obtenido anticuerpos contra la lipoxigenasa de soja capaces de producir una inhibición de la actividad lipoxigenasa en distintos sistemas biológicos [véase (8) Pagés, Roselló, Gelpí, Gualde y Rigaud, 1986. Prostaglandins 32: 729-740].

Hasta el momento de esta invención no se han descrito procedimientos que produzcan la inhibición de la lipoxigenasa en alimentos basados en la utilización de anticuerpos específicos contra este enzima. La mayoría de aditivos utili-

zados actúan sobre la cadena de reacciones que se produce cuando se ha iniciado la peroxidación lipídica, aunque en algunos casos también actúan inhibiendo la fase de iniciación (incluso inhibiendo la actividad lipoxigenasa) o bien previniendo ésta al retirar posibles agentes prooxidantes. Se han patentado algunos extractos de vegetales tratados con fines a su comercialización como antioxidantes en la industria alimentaria. Por ejemplo se han utilizado extractos de cebada, en forma de polvo, soluciones acuosas o etanólicas [(9) H.W.-S. Chan, 1987, Academic Press Inc. London], sin embargo estudios realizados sobre su composición han revelado la existencia de hasta 24 antioxidantes fenólicos. El uso de aditivos alimentarios que impiden la peroxidación lipídica es en estos momentos una práctica generalizada en la industria de elaboración de sobrasada. Hemos comprobado que si no se utilizan estos aditivos, la sobrasada se blanquea en un periodo de tiempo relativamente corto. Además hemos comprobado la participación de la lipoxigenasa en el proceso de peroxidación de los ácidos grasos de la sobrasada. Estos antecedentes nos indujeron a pensar que la desactivación inmunológica de la lipoxigenasa puede producir una mejora substancial del mantenimiento del color y del valor nutricional de la sobrasada, disminuyendo la cantidad de aditivos sintéticos añadidos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (E.C. 1.13.11.12.) en alimentos o en sus ingredientes. La lipoxigenasa es responsable de iniciar procesos de oxidación de grasas dando lugar a decoloraciones y a la aparición de gustos desagradables. En especial se refiere a la desactivación de la lipoxigenasa en los alimentos que la contienen utilizando anticuerpos contra ella capaces de inactivarla o que faciliten su eliminación del alimento. La idea de poder inactivar o eliminar selectivamente la lipoxigenasa tiene gran interés en aquellos alimentos ricos en grasas insaturadas como el aceite de oliva o de semillas, embutidos como la sobrasada o en alimentos no grasos como el vino, en todos los cuales evitaría la aparición de determinadas características organolépticas no deseadas.

La obtención de anticuerpos policlonales contra la lipoxigenasa puede realizarse a partir de una fuente animal como el cerdo, el conejo o el pollo o bien pueden aplicarse las nuevas tecnologías que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales, después de fusionar los linfocitos obtenidos tras inmunizar alguno de éstos animales con líneas celulares inmortales compatibles con ellas. En cualquiera de los casos es conveniente comprobar que los anticuerpos obtenidos son aptos para la inactivación de la lipoxigenasa presente en el alimento. La inmunización de los animales puede realizarse utilizando la lipoxigenasa presente en el alimento una vez purificada o bien utilizando lipoxigenasa purificada de otro organismo. No siempre se obtiene un anticuerpo capaz de inhibir apreciablemente la actividad lipoxigenasa, aunque siempre se produce un cierto grado de interacción entre el enzima y el anticuerpo. Así por ejemplo, (véase más adelante) los anticuerpos contra la lipoxigenasa de soja obtenidos después

de inmunizar un cerdo adulto fueron capaces de unirse a la lipoxigenasa de pimentón y de sobrasada pero no la inactivaron; sin embargo los anticuerpos obtenidos contra la lipoxigenasa de soja tras inmunizar pollos o conejos fueron capaces de inhibir la actividad lipoxigenasa de pimentón y de sobrasada.

La obtención de los anticuerpos (policlonales o monoclonales) contra la lipoxigenasa del alimento en cuestión puede realizarse por cualquiera de los procedimientos de uso común que están descritos y se recomienda su purificación con objeto de eliminar posibles sustancias prooxidativas presentes en el preparado no purificado. Los anticuerpos, en forma de antisuero o plasma, o bien purificados finalmente podrán añadirse al alimento en solución o en polvos, una vez secados o liofilizados. Una vez obtenido el preparado de anticuerpos es necesaria su titulación mediante alguno de los procedimientos de uso común (ELISA, RIA), pero también la comprobación de que los anticuerpos conseguidos tienen la capacidad de inhibir la actividad lipoxigenasa del alimento. Ello se puede realizar a partir de un extracto acuoso del propio alimento, poniendo en contacto una cantidad fija de extracto del alimento con cantidades variables del preparado (purificado o no) con el anticuerpo a ensayar. Inmediatamente después de haber puesto en contacto el extracto del alimento con el preparado de anticuerpo, o bien transcurridas dos horas a temperatura ambiente, puede determinarse la actividad lipoxigenasa presente mediante alguno de los procedimientos de uso común que existen, como la variación de la absorbancia a 234 nm, indicativo de la formación de un dieno conjugado que sería debido a la reacción de peroxidación del ácido linoleico. Mediante este procedimiento podremos conocer la proporción de preparado de anticuerpo que debemos introducir en el alimento para provocar la desactivación deseada de la lipoxigenasa. Hemos comprobado, utilizando plasma obtenido de pollos inmunizados con lipoxigenasa de soja, que cuando la concentración de anticuerpo no es suficiente puede producirse una reactivación del enzima a las dos horas de iniciarse la incubación del extracto del alimento con el preparado de anticuerpo, sin embargo si la concentración es suficiente entonces la desactivación se mantiene en este tiempo.

El sistema que proponemos es capaz de inactivar la lipoxigenasa pero no tiene porque alterar la capacidad de los metales pesados o de la luz de producir reacciones de peroxidación de los ácidos grasos insaturados. La presencia activa de éstos en el alimento hará que sea necesario la utilización de sistemas adicionales que eviten la autooxidación lipídica, como la utilización de antioxidantes secundarios. La existencia en el alimento de otros sistemas de antioxidación puede influir en las cantidades a utilizar del preparado de anticuerpo y también de las de los otros antioxidantes. En este caso lo que se propone es la confección de un preparado con el antisuero y con antioxidantes secundarios que muestren la máxima capacidad antioxidante en el alimento. Los efectos sinérgicos que pueden dar lugar este tipo de combinaciones son muy potentes: En sobrasada hemos comprobado que con una proporción del 0.3% de plasma de

pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja o con 0.4 ppm de vitamina C añadida no se produce más variación en los niveles de actividad lipoxigenasa durante el secado que la que presenta la propia sobrasada sin ningún tipo de aditivo (un 25%), sin embargo si la sobrasada contiene un 0.3% de este preparado de anticuerpo y 0.4 ppm de vitamina C entonces se consigue un 30% adicional de desactivación de la lipoxigenasa. Estos efectos sinérgicos, junto con la posibilidad de que el propio alimento pueda presentar una cantidad de agente antioxidante hacen necesario el tener que afinar la cantidad relativa de cada uno de los antioxidantes a utilizar (incluido el preparado de anticuerpo) en base a los efectos obtenidos sobre la oxidación lipídica en el alimento en cuestión.

La adición del preparado con el anticuerpo debe realizarse en el momento en el que puedan ponerse en contacto el enzima con su sustrato, si bien también puede valorarse el momento adecuado en función de la cantidad y tipo de lipoxigenasa y de ácidos grasos insaturados del alimento. Generalmente los enzimas suelen estar compartimentados en la célula de forma que no se ponen en contacto mas que cuando se produce una disgregación del tejido y la ruptura celular; de la misma manera en este momento también es posible el contacto del anticuerpo con el enzima dado que no será necesario atravesar membranas puesto que la célula estará disgregada. Estos son generalmente los momentos más adecuados para introducir el preparado de antioxidantes con el anticuerpo en el alimento. En el caso de la sobrasada, el momento en el que se ha introducido el preparado de antioxidantes es cuando se mezcla el triturado de carne magra y tocino con el pimentón.

En otros casos los anticuerpos obtenidos no tienen una capacidad suficiente para desactivar la lipoxigenasa, sin embargo se produce la formación de un complejo enzima-anticuerpo que puede ser susceptible de poder ser eliminado del alimento de forma específica por inmunoprecipitación u otra técnica adaptable al proceso de elaboración del alimento. Hemos comprobado que mediante la inmunoprecipitación con proteína A de *Staphilococcus aureus* del complejo lipoxigenasa de pimentón con antisuero de cerdo inmunizado con lipoxigenasa de soja se consigue eliminar un 50% de la actividad lipoxigenasa del pimentón. Este procedimiento de eliminación de lipoxigenasa debe poder acoplarse al proceso de elaboración del alimento, y no siempre es posible. En el caso de la elaboración del vino sería posible una estrategia de este estilo puesto que ya se realiza una fase de clarificación del mosto con centrífugas o filtros lo que permitiría poder eliminar la lipoxigenasa una vez se hubiera unido al anticuerpo, éste a la proteína A que a su vez se encuentra unida a polivinil pirrolidona (PVP) para hacerla más insoluble.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

- A. Título del plasma obtenido después de inmunizar un conejo con lipoxigenasa de soja pura. Cada línea corresponde a una cantidad diferente de soja pura presente en el

pocillo de la placa de ELISA utilizada para el análisis. El método utilizado para la titulación ha sido descrito por (10) Pere Puigserver [Tesi doctoral, Universitat de les Illes Balears, 1992].

- B. Título del plasma obtenido después de inmunizar un pollo con lipoxigenasa de soja pura. El procedimiento de la titulación es el mismo que en el caso anterior.

Figura 2

- A: Título del suero obtenido después de inmunizar un cerdo con lipoxigenasa de soja pura. El método utilizado para la titulación ha sido descrito por Pere Puigserver (10).

- B: Título del suero obtenido de antes de inmunizar con lipoxigenasa de soja pura el cerdo que posteriormente se inmunizó y cuyo suero inmunizado se presenta en la gráfica A.

Figura 3

- A. Ejemplo 1 de la inhibición de la actividad lipoxigenasa presente en homogenado de pimentón y en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de este homogenado, por efecto de la adición creciente de un plasma de pollo inmunizado. La actividad lipoxigenasa se ha determinado siguiendo el procedimiento descrito por (11) Mínguez-Mosquera, Jarén-Galán, Garrido-Fernández [1993, *Phytochemistry* 32: 1103-1108]. El plasma inmunizado y el homogenado o el sobrenadante de centrifugación de este homogenado estuvieron en contacto durante 2 horas a temperatura ambiente antes de que se efectuara la determinación de la actividad enzimática.

- B. Ejemplo 2 de la inhibición de la actividad lipoxigenasa presente en homogenado de pimentón y en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de este homogenado, por efecto de la adición creciente de un plasma de pollo inmunizado. La actividad lipoxigenasa se ha determinado siguiendo el procedimiento descrito por Mínguez-Mosquera y colaboradores (11). El plasma inmunizado y el homogenado o el sobrenadante de centrifugación de este homogenado estuvieron en contacto durante 2 horas a temperatura ambiente antes de que se efectuara la determinación de la actividad enzimática.

- C. Ejemplo 3 de la inhibición de la actividad lipoxigenasa presente en homogenado de pimentón y en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de este homogenado, por efecto de la adición creciente de un plasma de pollo inmunizado. La actividad lipoxigenasa se ha determinado siguiendo el procedimiento descrito por Mínguez-Mosquera y colaboradores (11). El plasma inmunizado y el homogenado o el sobrenadante de centrifugación de este homogenado estuvieron

en contacto durante 2 horas a temperatura ambiente antes de que se efectuara la determinación de la actividad enzimática.

- D. Ejemplo 4 de la inhibición de la actividad lipoxigenasa presente en homogenado de pimentón y en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de este homogenado, por efecto de la adición creciente de un plasma de conejo inmunizado. La actividad lipoxigenasa se ha determinado siguiendo el procedimiento descrito por Mínguez-Mosquera y colaboradores (11). El plasma inmunizado y el homogenado o el sobrenadante de centrifugación de este homogenado estuvieron en contacto durante 2 horas a temperatura ambiente antes de que se efectuara la determinación de la actividad enzimática.

Figura 4

- A. Influencia del tiempo de incubación sobre la capacidad inhibitoria de la actividad lipoxigenasa del homogenado de pimentón por parte del plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja. Se han ensayado diferentes concentraciones de plasma de pollo inmunizado.
- B. Influencia del tiempo de incubación sobre la capacidad inhibitoria de la actividad lipoxigenasa del sobrenadante de centrifugación a 17.000 g del homogenado de pimentón por parte del plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja. Se han ensayado diferentes concentraciones de plasma de pollo inmunizado.

Figura 5

Actividad lipoxigenasa presente en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de homogenados de sobrasadas (recién embutidas y a los 15 días de curado) a las que se les ha adicionado plasma de pollo no inmunizado (1 % concentración final) o plasma de pollo inmunizado (1 % concentración final) con lipoxigenasa de soja.

Figura 6

Actividad lipoxigenasa presente en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g de homogenados de sobrasadas (recién embutidas y a los 15 y 30 días de curado) a las que se les ha adicionado dos cantidades diferentes (0.3 % y 1 % concentración final) de plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja.

Figura 7

Efecto sinérgico entre la adición de vitamina C (0.04 ppm a sobrasada) y plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja (0,3 % concentración final). Los resultados se expresan como porcentaje respecto de la actividad lipoxigenasa ($\mu\text{Kat/g}$ peso seco)

presente en las sobrasadas acabadas de embutir (día 0). Los resultados representan la media \pm error tipo de al menos cuatro determinaciones. Estadística (ANOVA): *: $p < 0.05$ día de curado vs día inmediatamente anterior; **: $p < 0.05$ día 30 vs día 0.

Se presentan diferencias significativas atribuidas al factor tiempo de curado, al factor tipo de sobrasada y también se presenta una interacción significativa de ambos factores.

Día 15 y 30: Las sobrasadas elaboradas con plasma inmunizado y vitamina C son diferentes del resto de sobrasadas que siguen sin presentar diferencias significativas entre ellas.

Figura 8

Precipitación de la actividad lipoxigenasa de homogenado de sobrasada y de pimentón (*Capsicum annum* L.) y de sus sobrenadantes de centrifugación a 17000 g con antisero de cerdo inmunizado con lipoxigenasa de soja.

Los valores representan la media \pm error tipo de cinco determinaciones por grupo. Están expresados como porcentaje de la actividad inicial antes de su precipitación por centrifugación a 1000 g en presencia de proteína A insoluble.

T: homogenado S: sobrenadante de centrifugación a 17.000 g Estadística: Δ : $p < 0.05$ sobrasada o pimentón vs enzima comercial; *: $p < 0.05$ homogenado vs sobrenadante de centrifugación.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance, el cual viene definido única y exclusivamente por la Nota Reivindicatoria adjunta. Así, por ejemplo donde se ha utilizado sobrasada, puede extenderse a cualquier otro alimento como el vino. Donde se ha utilizado lipoxigenasa, puede extenderse a cualquier otro enzima con el que pueda generarse un anticuerpo capaz de desactivarlo o de facilitar su eliminación de este alimento. Donde se ha utilizado pollo o conejo o cerdo como animales en los que generar los anticuerpos, puede extenderse a otros animales o a sistemas de cultivo celular que permitan la obtención de estos anticuerpos.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra que la adición de plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja produce una inhibición de la actividad lipoxigenasa de pimentón (*Capsicum annum*). Así mismo ejemplifica los efectos de diferentes variables, como la fuente animal de los anticuerpos y el tiempo de incubación de los mismos con el pimentón, sobre esta inactivación.

El plasma se obtuvo de pollos a los que se había inmunizado con lipoxigenasa de soja purificada a partir de una suspensión de este enzima adquirida a Sigma Chemical Co. La purificación se realizó por cromatografía en columna con

el sistema FPLC® (Fast Protein Liquid Chromatography, marca registrada por Pharmacia). Después de un primer paso de desalado, para eliminar el sulfato amónico de la preparación comercial de enzima, se efectuó una cromatografía de intercambio aniónico. La inmunización de los pollos se realizó siguiendo un protocolo de inmunización de uso común, consistente en una primera inmunización de los pollos con una cantidad de lipoxigenasa de soja repurificada junto a otra cantidad de adyuvante completo de Freund. Esta suspensión se inyectó de forma subcutánea en diferentes puntos del animal. Después de un periodo de tiempo que depende del tipo de animal que se inmunice, se efectuó una segunda inmunización con una cantidad de lipoxigenasa de soja repurificada junto con adyuvante incompleto de Freund. Al cabo de unos días el animal fue sacrificado y la sangre se recogió en vasos de precipitados previamente tratados con un anticoagulante. Para la obtención del plasma se centrifugó en unas condiciones que permiten su obtención sin que se produzca hemólisis. También se sacrificaron animales no inmunizados para la obtención de plasma sin anticuerpos contra la lipoxigenasa de soja, utilizando el mismo procedimiento que si se tratase de los animales inmunizados.

Antes de utilizar el plasma para la desactivación de la lipoxigenasa de pimentón se tituló para comprobar la presencia de los anticuerpos contra la lipoxigenasa. La titulación se efectuó siguiendo unas modificaciones del procedimiento descrito por Engvall y Perlmann (12) [1972, *J. Immunol.* 109: 129-135] y Morris y Head (13) [1983, *Biochem. J.* 213: 417-425]. En la figura 1 se presentan los resultados de la titulación de diferentes plasmas obtenidos de animales inmunizados con lipoxigenasa de soja. En ellos se puede comprobar que obtenemos anticuerpos contra la lipoxigenasa en todos los animales, tanto el conejo, el cerdo como el pollo. Así mismo hemos observado que cuando no hemos inmunizado el animal con la lipoxigenasa, no aparecen en el plasma o suero estos anticuerpos.

La adición del plasma de pollo inmunizado contra la lipoxigenasa al pimentón se realizó en húmedo para facilitar la difusión del anticuerpo hasta el enzima. Se realizó una homogeneización en frío (baño de agua-hielo) del pimentón utilizando un sistema de homogeneización de cuchillas (Omni-mixer de la marca Sorvall) y como medio de homogeneización se utilizó tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0. La concentración del pimentón en el homogenado puede ser variable. En este ejemplo hemos ensayado una concentración equivalente a 0.3g de materia seca de pimentón en 15 ml de tampón fosfato. El sistema de desactivación de la lipoxigenasa con el anticuerpo también es operativo al menos cuando la cantidad de agua presente en el homogenado es equivalente a la que se encuentra embebida en la sobrasada (26%-35% de agua). En el pimentón la lipoxigenasa se encuentra compartimentada, pudiendo diferenciarse al menos dos fracciones según precipite o no al centrifugar a 17.000 g el homogenado. Hemos desactivado la lipoxigenasa tanto del homogenado total como de la que permanece en el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g.

Para la desactivación de la lipoxigenasa de pimentón hemos mezclado diferentes cantidades de plasma inmunizado con una cantidad constante de homogenado (o sobrenadante de centrifugación a 17000 g), dejando un periodo de incubación a temperatura ambiente de dos horas. Al cabo de este tiempo hemos determinado la actividad lipoxigenasa presente en cada una de las mezclas realizadas y la hemos comparado con la actividad lipoxigenasa presente en el homogenado (o el sobrenadante de centrifugación a 17000 g) al que no se había añadido plasma inmunizado pero si un volumen equivalente del medio de homogeneización al objeto de evitar el factor de dilución. El procedimiento de determinación de la actividad lipoxigenasa que se ha seguido es una modificación del descrito por Mínguez-Mosquera y colaboradores (11), introduciéndose 3 ml de tampón fosfato sódico 200 mM pH 6.5 en una cubeta de cuarzo, a continuación se añade una alícuota de la muestra a ensayar, a continuación se añaden 20 μ l del sustrato del enzima (20 mg de ácido linoleico, 20 mg Tween-20 en 1 ml de agua) y se efectúa un seguimiento de la variación de absorbancia a 234 nm.

La figura 3a, 3B, y 3C, se muestran algunos resultados obtenidos utilizando plasmas de diferentes pollos inmunizados con lipoxigenasa de soja en diferentes momentos. A medida que aumenta la concentración de plasma inmunizado en el homogenado de pimentón (o en el sobrenadante de centrifugación de este homogenado) aumenta el porcentaje de inhibición de la actividad lipoxigenasa presente, presentándose un cierto grado de saturación de la inhibición cuando se aproxima al 80% de la actividad inicial, lo que tiene lugar cuando la concentración de plasma en el homogenado es de aproximadamente el 2%. Así mismo podemos observar que hay diferencias en función de que se trate del homogenado total o del sobrenadante de centrifugación de este homogenado, siendo la inhibición mayor en el primer caso. Con plasma de conejo inmunizado con lipoxigenasa de soja se presenta también una inhibición de la actividad lipoxigenasa de pimentón como puede apreciarse en la figura 3D, sin embargo el grado de inhibición es aparentemente menor, no apreciándose diferencias entre el homogenado total y el sobrenadante de centrifugación a 17.000 g.

El tiempo de incubación entre el plasma inmunizado y el pimentón puede influir en el grado de inactivación del enzima. En la figura 4 se puede observar que tanto el caso del homogenado de pimentón como el caso del sobrenadante de centrifugación de este homogenado, se consiguen mayores grados de inactivación inmediatamente después de poner en contacto la muestra con el plasma que al cabo de dos horas de incubación. Sin embargo, cuando la concentración de antisuero es suficientemente elevada, la incubación no afecta o incluso aumenta el grado de inactivación del enzima. La capacidad inactivadora del plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja es evidente para el caso del pimentón. Esta inactivación la hemos realizado en húmedo, sin embargo el grado de humedad puede llegar a ser del orden del 26-35%, similar al que se puede presentar en la sobrasada.

El pimentón es un producto que se comercializa seco por lo que antes de su comercialización será necesario secarlo o liofilizarlo, teniendo cuidado de no desnaturalizar el anticuerpo, que, como hemos observado en otros ejemplos que presentamos, tiene una gran resistencia a la desnaturalización dado que sigue activo durante todo el proceso de curado de la sobrasada.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra el procedimiento a seguir para conseguir inactivar la lipoxigenasa de la sobrasada, la importancia de la concentración de plasma en esta inactivación del enzima.

El plasma inmunizado y no inmunizado que se ha utilizado en este ejemplo se ha obtenido según el procedimiento de inmunización de pollos descrito en el ejemplo 1. La titulación de este plasma y su capacidad inactivadora de la lipoxigenasa de pimentón es similar a la que se presenta en el ejemplo 1. En el plasma no inmunizado no se detectaron anticuerpos contra la lipoxigenasa de soja.

El procedimiento de elaboración de sobrasada que se ha seguido es el indicado para que sea amparado en la denominación geográfica protegida de Sobrasada de Mallorca. En este caso el único aditivo antioxidante que se le ha introducido ha sido el plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa de soja, o bien, según el caso, una cantidad mínima de vitamina C (0.04 ppm) junto al plasma de pollo inmunizado. La introducción del plasma en la sobrasada puede realizarse en cualquier momento, siempre que después tenga lugar un proceso de homogeneización de la pasta de sobrasada. Es preferible la introducción del plasma en el momento en el que también se introduce el pimentón y el iniciador de la fermentación, es decir, inmediatamente después de haberse picado la carne magra y el tocino, en el momento del mezclado de los ingredientes. El proceso de secado de las sobrasadas es el mismo que se sigue cuando se utiliza otro procedimiento para evitar la oxidación.

La figura 5 ilustra el efecto de inactivación de la lipoxigenasa de sobrasada debido a la adición del plasma de pollo inmunizado. En este caso se ha utilizado como control, sobrasadas a las que se ha adicionado la misma cantidad de plasma de pollo, pero en este caso no estaba inmunizado. Cuando hemos adicionado plasma no inmunizado (1 % concentración final) se produce una disminución de la actividad lipoxigenasa de la sobrasada (medida en el sobrenadante de centrifugación a 17000 g, según el procedimiento descrito en el ejemplo 1) expresada en relación al su peso seco; sin embargo, cuando el pollo ha sido previamente inmunizado con lipoxigenasa su adición a la sobrasada produce una disminución significativamente mayor que el caso anterior. Esta disminución es atribuible exclusivamente a la inmunización del pollo y la hemos detectado a los 15 días de curado de la sobrasada, pero pudiera haberse producido con anterioridad. En este punto del proceso de curado ya se han producido los cambios definitorios del curado en relación con el valor del pH y de la actividad de agua.

La inactivación de la lipoxigenasa de sobrasada por el plasma de pollo inmunizado es depen-

diente de la cantidad de plasma añadido como puede observarse en la figura 6. Se obtiene una inactivación significativamente mayor cuando la concentración final del plasma en la sobrasada es del 1 % que cuando es del 0.3 %. Aparentemente la prolongación del tiempo de curado no aumenta significativamente en este ejemplo el grado de inactivación de la lipoxigenasa.

Los efectos de inactivación de la lipoxigenasa de sobrasada por el plasma inmunizado pueden potenciarse adicionando otros agentes antioxidantes como la vitamina C.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra los efectos sinérgicos que pueden establecerse entre el plasma de pollo inmunizado y otros antioxidantes como la vitamina C.

La vitamina C es hidrosoluble y puede adicionarse al alimento independientemente del plasma de pollo inmunizado o bien disolverlo primero en el plasma antes de que éste se mezcle con el alimento. En este ejemplo hemos introducido una cantidad de vitamina C en el plasma de pollo inmunizado con lipoxigenasa obtenido según el ejemplo 1 y después de haber confirmado la presencia del anticuerpo en concentraciones similares a las del ejemplo 1. La cantidad añadida puede optimizarse, siendo la ensayada la que una vez se ha adicionado el plasma a la sobrasada (concentración final del plasma 0.3 %) la concentración de vitamina C sea de 0.04 ppm.

La figura 7 muestra que mientras que la adición de plasma inmunizado o no inmunizado produce una disminución de la actividad lipoxigenasa de aproximadamente un 25 % al final del periodo de curado, de la misma manera que la adición de la vitamina C al plasma no inmunizado produce la misma disminución de la actividad, la adición de ésta al plasma inmunizado produce la disminución de aproximadamente el 55 % de la actividad lipoxigenasa de la sobrasada al final del curado. En otras palabras, mientras que la adición de vitamina C al plasma de pollo no inmunizado o la adición de solo plasma inmunizado producen el mismo efecto que la adición del plasma no inmunizado sobre la actividad lipoxigenasa de la sobrasada; la adición conjunta de vitamina C y plasma inmunizado duplica la inhibición observada de la actividad lipoxigenasa, poniéndose así de manifiesto los efectos sinérgicos que se pueden esperar de la formulación de mezclas de antioxidantes que contengan anticuerpos contra la lipoxigenasa sobre la actividad de este enzima.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra un procedimiento inmunológico alternativo o complementario a la inhibición de la actividad lipoxigenasa para eliminarla de un alimento. Se trata de un procedimiento que permite la eliminación por centrifugación de un enzima en un alimento, basado en las propiedades previamente descritas para la inmunoprecipitación de anticuerpos en muestras de mamífero (Harlow i Lane, 1988) a baja velocidad de centrifugación con proteína A de *Staphylococcus aureus* unida a polivinil-pirrolidina (PVP). Este es un procedimiento alternativo o complementario al descrito en el ejemplo 1, utilizando

en este caso suero de cerdo inmunizado con lipoxigenasa de soja, que hemos comprobado no inhibe la actividad lipoxigenasa del pimentón, pero la unión del anticuerpo a la lipoxigenasa permite la retirada del enzima al poder precipitar fácilmente el complejo enzima-anticuerpo-proteína A-PVP.

Se parte de un homogenado de pimentón (o del sobrenadante de su precipitación a 17000 g) obtenido como se describe en el ejemplo 1. La obtención del antisuero se realizó en cerdos inmunizados según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, aunque en este caso la sangre se recogió en frascos sin anticoagulante, dejando reposar durante una noche en nevera con objeto de facilitar la formación del suero. El suero se separó del resto de los componentes de la sangre mediante centrifugación a 2.000 g durante unos 15 minutos. El suero, así como el plasma inmunizados pueden guardarse durante bastante tiempo a -20°C.

Se ponen en contacto, durante 2 horas a temperatura ambiente, un homogenado de pimentón (o de su sobrenadante de centrifugación a 17000 g) con una cantidad de antisuero de cerdo inmunizado con lipoxigenasa de soja. Se añade

una cantidad de proteína A-PVP en exceso y se deja en agitación continua durante una noche a 4°C. El complejo lipoxigenasa-anticuerpo-proteínaA-PVP se precipitó por centrifugación rápida (pocos segundos) a 1000 g. El sobrenadante de esta centrifugación contiene una cantidad de lipoxigenasa significativamente inferior a la presente en el homogenado inicial de pimentón. El posterior secado o liofilización de este sobrenadante permitirá obtener un pimentón disminuido en lipoxigenasa.

La figura 8 muestra los efectos de la eliminación de la lipoxigenasa en homogenados de pimentón y en el sobrenadante de su centrifugación a 17000 g atribuibles al uso de antisuero de cerdo inmunizado con lipoxigenasa de soja. Así mismo se presentan estos efectos sobre la lipoxigenasa de sobrasada curada y de enzima de soja pura. Mediante el uso de este procedimiento conseguimos la inmunoprecipitación de el 50% de la lipoxigenasa pura y de la presente en el sobrenadante de centrifugación a 17000 g, aunque la lipoxigenasa total presente en sobrasada o en pimentón tan sólo la hemos eliminado en un 20-30%.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (EC. 1.13.11.12) en alimentos, ingredientes o aditivos, para producir una inhibición (de-sactivación) de dicho enzima o para facilitar la eliminación de dicho enzima del alimento, ingrediente o aditivo.

2. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación 1, en la que el alimento al que se aplica es un producto fabricado por la industria cárnica, vinícola, o láctea, y el ingrediente o aditivo al que se aplica es un producto fabricado por industrias productoras de ingredientes y/o aditivos alimentarios.

3. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación 1, en la que la eliminación del enzima se realiza por filtrado, precipitación, adsorción, centrifugación, cromatografía o electroforesis u otra técnica separativa de aplicación en la industria alimentaria.

4. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos son policlonales o monoclonales contra una o varias formas de lipoxigenasa (EC. 1.13.11.12) de origen animal, vegetal o microbiana y se producen después de la inmunización de algún tipo de animal o por técnicas de cultivos celulares.

5. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación 1, en la que se introduce dicho anticuerpo en el alimento, ingrediente o aditivo después de un proceso de purificación del anticuerpo o se introduce sin ser previamente purificado en forma de sangre, suero,

plasma o se introduce en forma de extractos de cultivos celulares que fabrican dichos anticuerpos o en forma de preparados a partir de estos materiales de partida.

6. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la elaboración de preparados de aditivos alimentarios, en la que dichos anticuerpos, con carácter antioxidante, pueden estar o no en presencia de antioxidantes con los que pueda o no tener un efecto sinérgico.

7. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación 6, en donde dicho antioxidante se selecciona entre ácido cítrico, agentes quelantes de metales, polifosfatos, lecitina, sulfitos, ácido ascórbico y sus derivados, tocoferoles u otros antioxidantes fenólicos.

8. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 6, en la que dicho anticuerpo se introduce en el alimento, como ingrediente o aditivo, en forma de muestras extraídas a partir de animales o partes de animales que previamente se han inmunizado convenientemente contra la lipoxigenasa.

9. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 6, en la que dicho anticuerpo se introduce en el alimento, como ingrediente o aditivo, en forma de extractos de cultivos de células o preparados obtenidos a partir de ellos, donde dichas células se han diseñado genéticamente para la síntesis de anticuerpos contra la lipoxigenasa.

10. Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa según la reivindicación, 1 ó 2, en la que dicho ingrediente o aditivo es pimentón.

FIGURA 1.A. TITULACIÓN PLASMA DE CONEJO

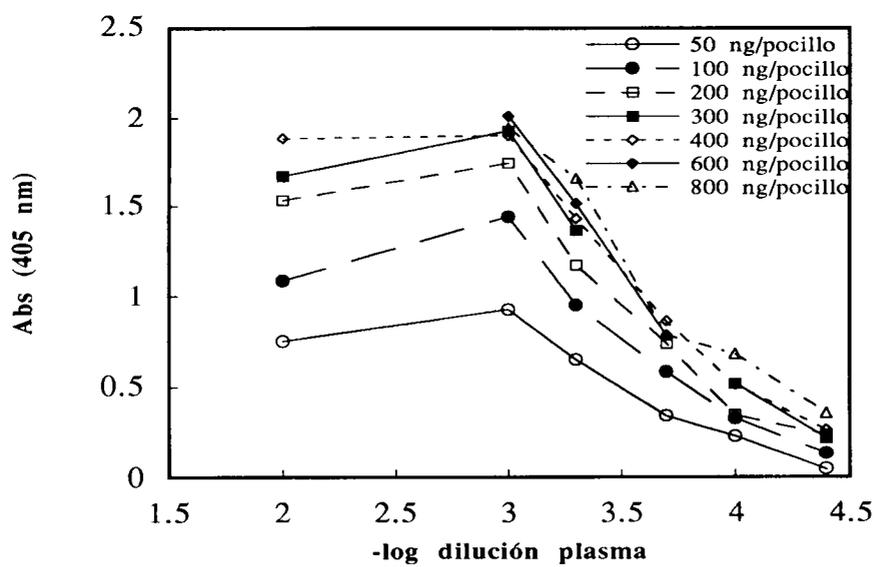


FIGURA 1.B. TITULACIÓN PLASMA DE POLLO

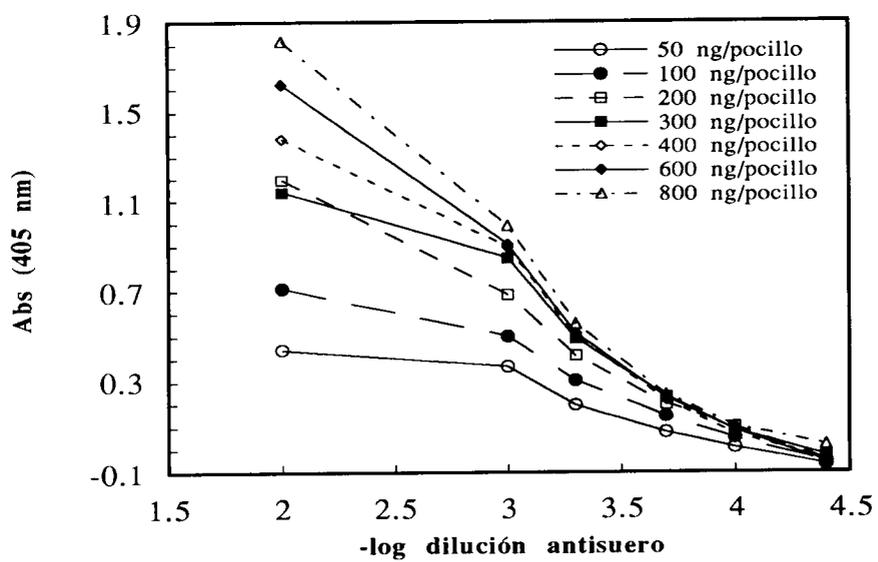


FIGURA 2.A. Titulación antisuero

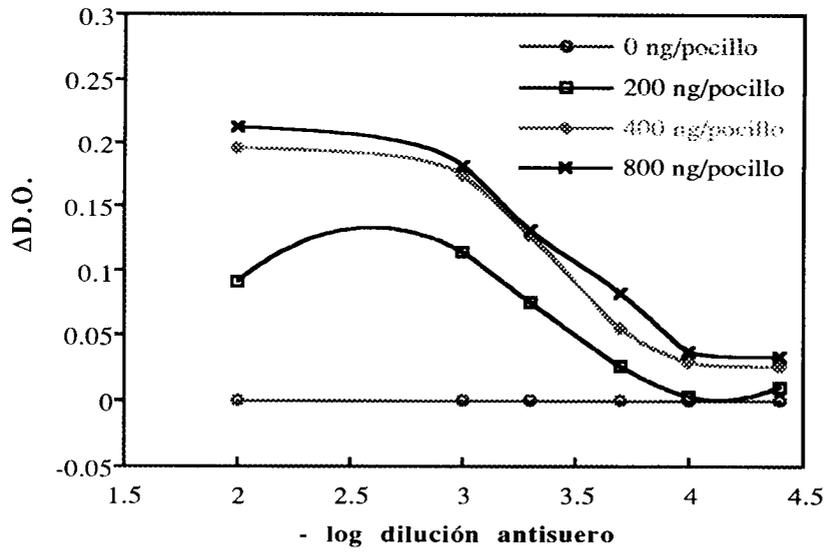
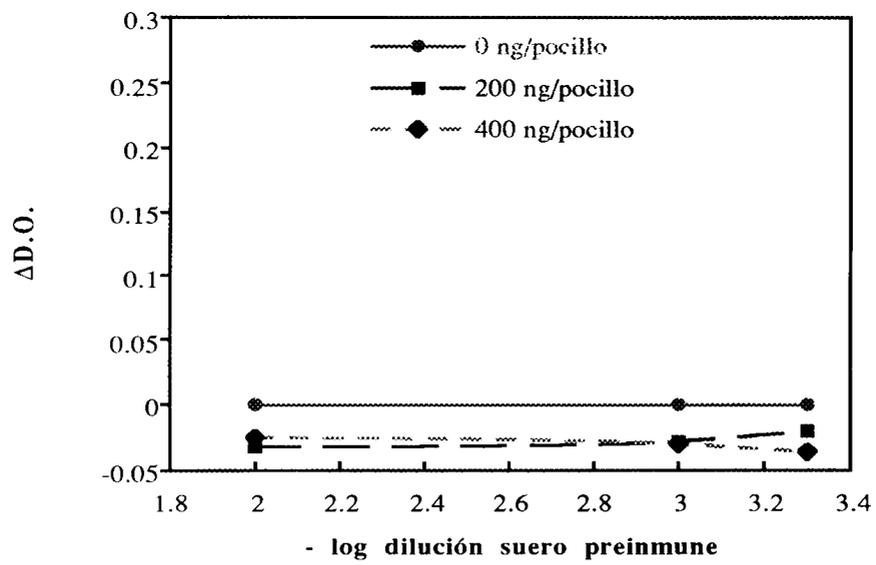


FIGURA 2.B. Titulación suero preimmune



**FIGURA 3.A.
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTISUERO
DE POLLO**

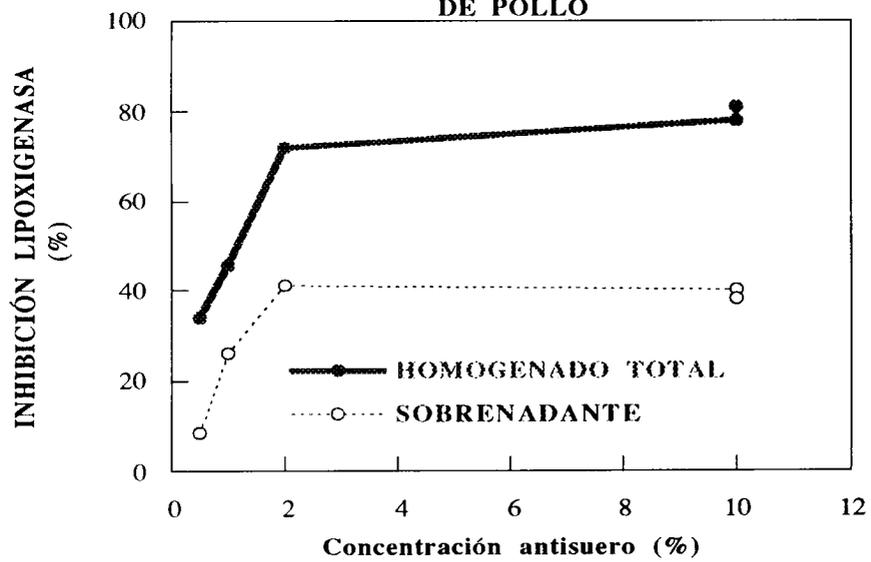


FIGURA 3.B.
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ANTISUERO
DE POLLO

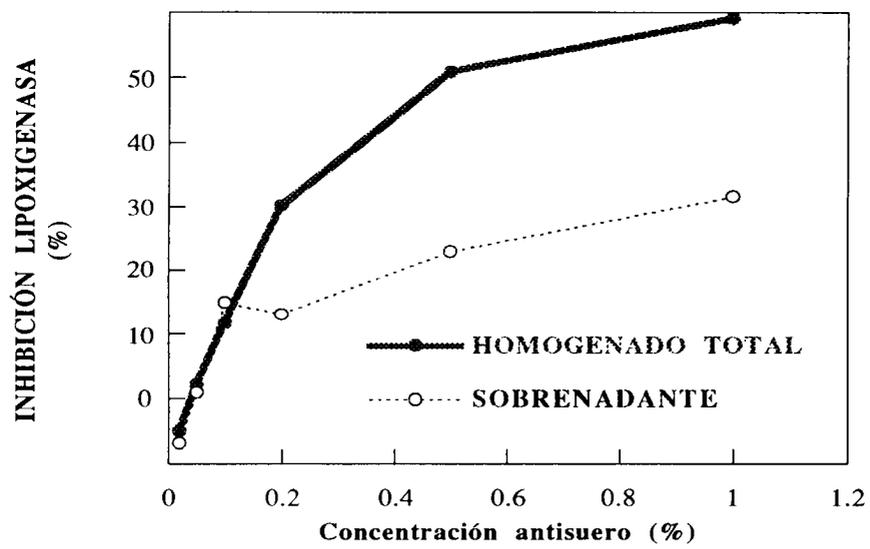


FIGURA 3.C.
EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTISUERO
DE POLLO

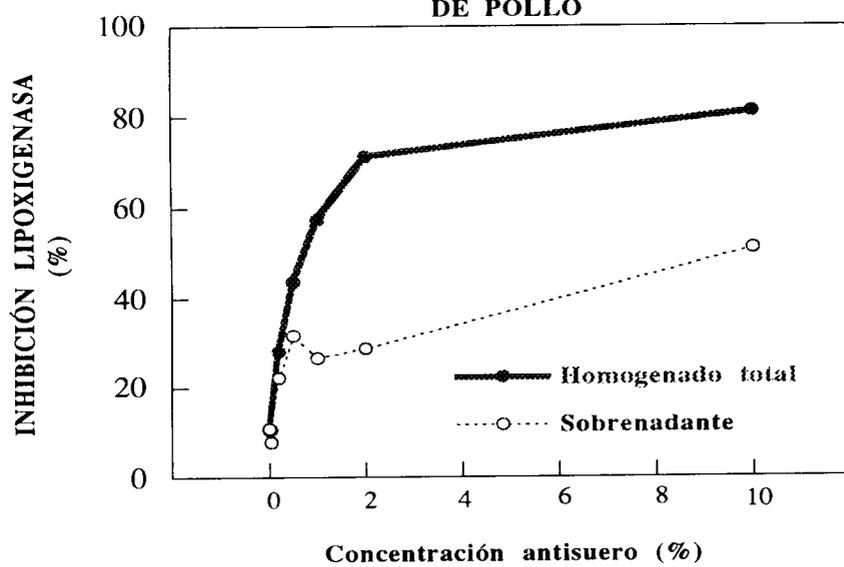
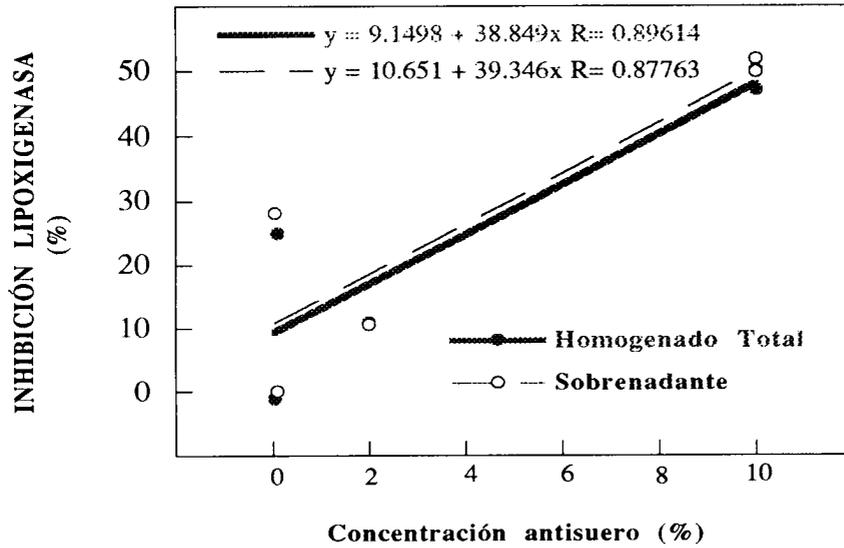


FIGURA 3.D.
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ANTISUERO
DE CONEJO



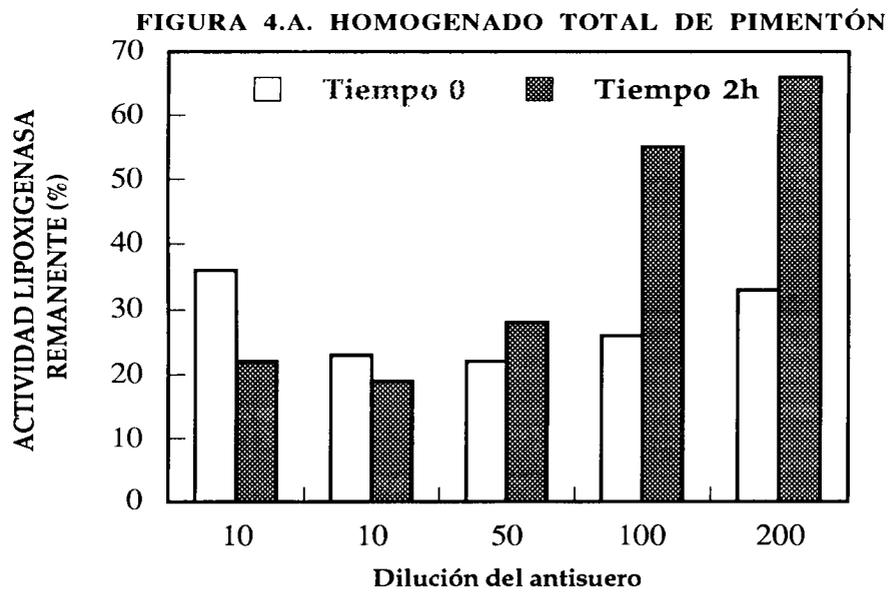


FIGURA 4.B. SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO DE PIMENTÓN

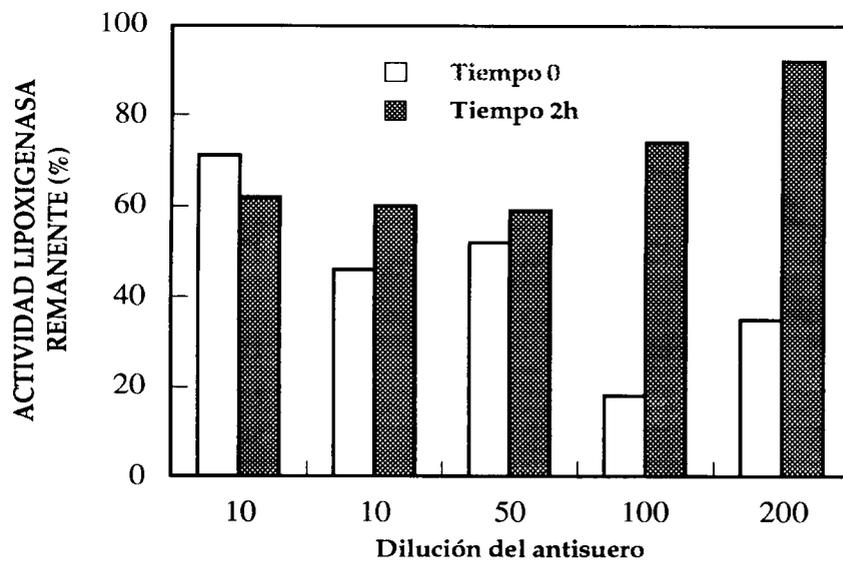


FIGURA 5.
SOBRASADAS ELABORADAS CON PLASMA
INMUNIZADO (1%)

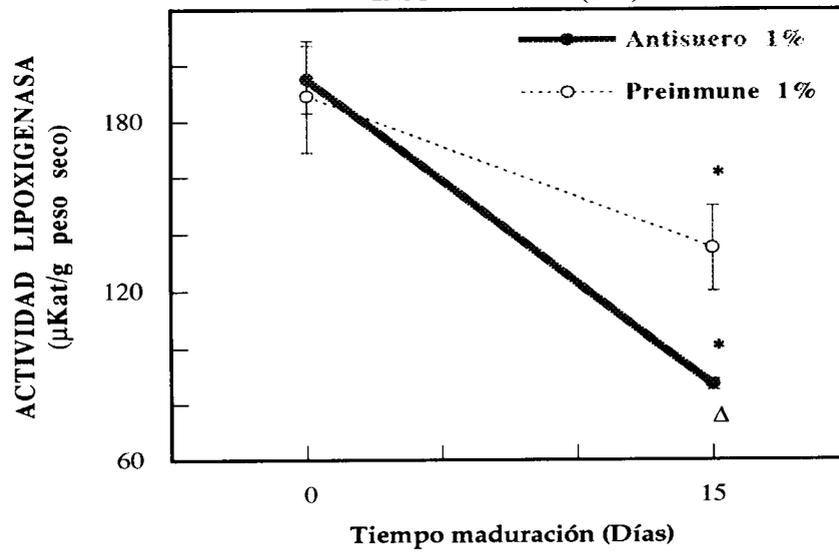


FIGURA 6.
SOBRASADAS ELABORADAS CON DOS CONCENTRACIONES
DE PLASMA INMUNIZADO (1% Y 0,3%)

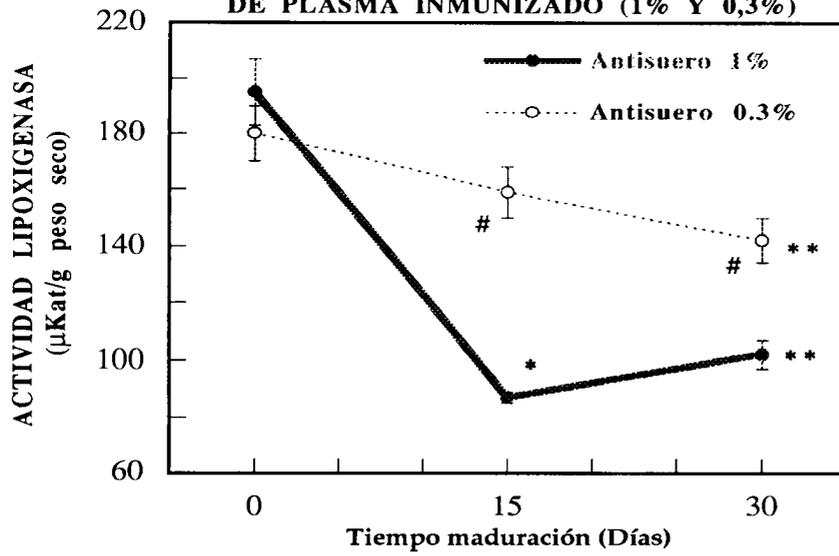
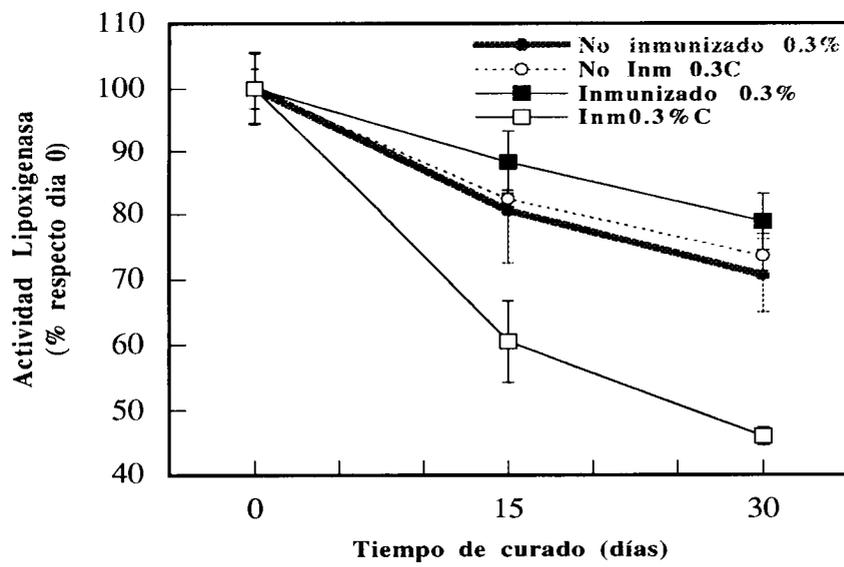
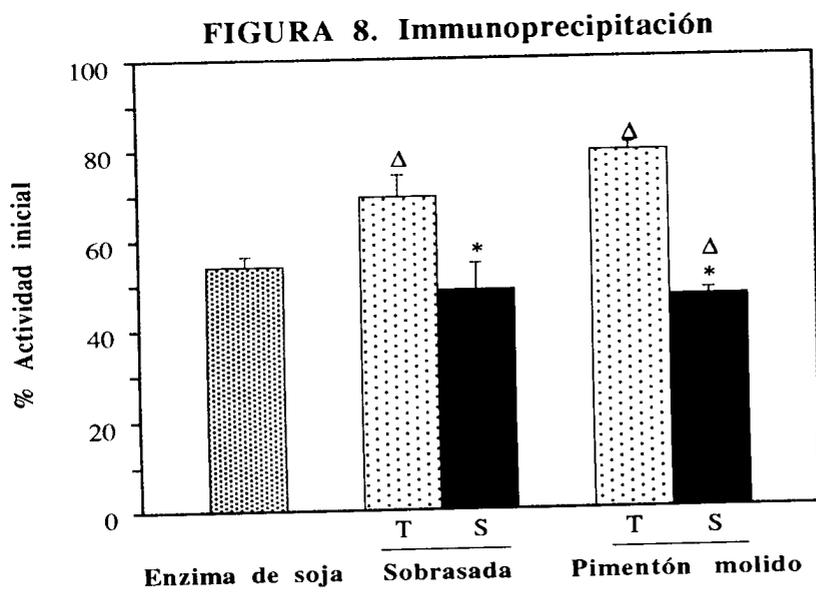


FIGURA 7. EFECTO SINERGICO LIPOXIGENASA-VITAMINA C







INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C07K 16/40, C12N 9/99, A23L 1/015

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MACCARRONE M. et al. "Inhibition of Lipoxygenase activity in lentil protoplasts by monoclonal antibodies introduced into the cells via electroporacion". 1992. EUR. J. BIOCHEM. Vol. 205 (3), páginas 995-1001.	1-10
Y	WHEELOCK M. et al. "Preparation and characterization of monoclonal antibodies against soybean seed lipoxygenase isoenzymes". 1991. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. Vol. 288 (2), páginas 578-583.	1-10
Y	JUNG-WON MOON et al. "The bleaching effect of potato lipoxygenase isoenzymes on beta-carotene". 1993. JOURNAL OF KOREAN SOCIETY OF FOOD AND NUTRITION. Vol. 22 (6), páginas 777-784, resumen.	1-9
Y	LUNING P. et al. "Characterization and occurrence of lipoxygenase in bell peppers at different ripening stages in relation to the formation of volatile flavor compounds". 1995. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. Vol. 43 (6), páginas 1493-1500.	9
A	OSZMIANSKI J. et al. "Inhibitory effect of phenolics on carotene bleaching in vegetables". 1990. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. Vol. 38 (3), páginas 688-690.	1-10
A	BIACS, P.A. et al. "Studies on the carotenoid pigments of paprika (Capsicum annum L. var. SZ-20). 1989. JOURNAL OF AGRICULTURE AND FOOD CHEMISTRY. Vol. 37 (2), páginas 350-353.	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 n.º:

Fecha de realización del informe

28.09.1999

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 137 134
- ⑫ N.º solicitud: 009800615
- ⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.02.1998
- ⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C07K 16/40, C12N 9/99, A23L 1/015

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. et al. "Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika". 1993. PHYTOCHEMISTRY. Vol. 32 (5), páginas 1103-1108.	1-10

Categoría de los documentos citados

- | | |
|--|---|
| <p>X: de particular relevancia</p> <p>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría</p> <p>A: refleja el estado de la técnica</p> | <p>O: referido a divulgación no escrita</p> <p>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud</p> <p>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p> |
|--|---|

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 28.09.1999	Examinador A. Collados Martín Posadillo	Página 2/2
---	---	----------------------