



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 257 964**

② Número de solicitud: 200500165

⑤ Int. Cl.:  
**A23B 4/22** (2006.01)  
**A22C 29/02** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.01.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2006**

Fecha de la concesión: **02.07.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2007**

⑰ Titular/es: **Universidad de Huelva  
Avda. de las Fuerzas Armadas, s/n  
Edificio Marie Curie, 1  
21071 Huelva, ES**

⑱ Inventor/es: **Llamas Marcos, Argimiro;  
Llamas Galilea, Pedro;  
Vargas Jiménez, José Manuel;  
Navarro Roldán, Francisco;  
Córdoba García, Francisco y  
Borrero Romero, Manuel Jesús**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método de preservación de crustáceos frente a la melanosis.**

㉑ Resumen:

Método de preservación de crustáceos frente a la melanosis.

Método de preservar un crustáceo frente a la melanosis, que consiste en poner en contacto los crustáceos con una solución que contiene una cantidad adecuada de bacterias ácido lácticas y su posterior almacenaje bajo condiciones adecuadas. Uso de bacterias ácido lácticas como agentes inhibidores de la melanosis en crustáceos y los crustáceos tratados con bacteria ácido lácticas para su uso alimenticio.

ES 2 257 964 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método de preservación de crustáceos frente a la melanosis.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de bacterias ácido lácticas como agentes inhibidores de la melanosis. Así como a un método de preservar un crustáceo frente a la melanosis por el empleo de dichas bacterias y los crustáceos tratados con éstas para su uso alimenticio.

10 **Estado de la técnica**

La melanosis o ennegrecimiento de los crustáceos, de las frutas y verduras y de los alimentos en general, es un proceso enzimático inherente a la fisiología de los productos del reino animal y vegetal, y como tal fenómeno se manifiesta negativamente, a partir del momento en que el animal muere o cuando la fruta o verdura se desprotege de su piel, se modifica su aspecto al cabo de pocos minutos, apareciendo una tonalidad marrón para las frutas y verduras y negra para el marisco (pardeamiento enzimático o melanosis). El hecho es que ha ocurrido un proceso de oxidación de los tejidos.

La melanosis en los crustáceos, se manifiesta mediante la aparición de manchas oscuras, ennegrecimiento en el cefalotórax y a lo largo de todo el cuerpo. Dicho ennegrecimiento ocurre principalmente como consecuencia de la oxidación catalítica, originada por la presencia del oxígeno del aire, con intervención de enzimas del tipo fenol-oxidasas (PPO), que acelera el proceso de oxidación de compuestos orgánicos tipo fenólico, como la tirosina, aminoácido esencial del que forma parte el elevado contenido proteínico del marisco, a o-quinonas las cuales polimerizan espontáneamente para formar un residuo oscuro, de alto peso molecular.

Varios métodos han sido desarrollados para prevenir el ennegrecimiento, incluyendo el calor para la inhibición de la PPO y varios tratamientos químicos tal como alterar el pH de los alimentos. La inactivación por calor no es un método apropiado para los alimentos frescos. Igualmente, bajando el pH por adición de un ácido, como el ácido cítrico, ácido fosfórico como ha sido descrito por Mc-Cord y Kilara en *J. Food Science*, 48: 1797-1483 (1983) puede conducir a los mismos efectos.

La actividad del enzima es elevada en distintas fases del crecimiento del tejido externo (esqueleto) de los crustáceos y en la fase *post modum*. La utilización de productos químicos como inhibidor de los procesos enzimáticos y no enzimáticos de oxidación es hasta ahora el método más extendido capaz de paliar el grave problema que tiene el sector marisquero a la hora de controlar el "enegrecimiento" de los crustáceos.

El ácido bórico fue ampliamente utilizado, aunque desde hace dos décadas se prohibió su uso por razones sanitarias. Desde su prohibición, como agente conservador de crustáceos frente a la melanosis y el deterioro del marisco, han sido muchos los esfuerzos encaminados a encontrar alternativas de compuestos químicos, no tóxicos, capaces de inhibir esta actividad enzimática.

El empleo de los sulfitos en el tratamiento de la melanosis fue descrito por Zawistowski *et al.*, en *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, (1987) 20(3): 162-165. Sin embargo su cantidad está limitada y regulada dependiendo de la naturaleza del alimento, dado que su ingestión, inhalación y el contacto con la piel, y en su manejo, presentan riesgos potenciales para la salud.

La forma usual de aplicación de los sulfitos es por espolvoreo, inmediatamente después de la captura de los crustáceos para retardar la aparición de la melanosis. La dosificación y homogeneidad del aditivo en las muestras es problemática siendo difícil conseguir de forma manual a bordo. Son muchos los ejemplos recogidos en la literatura científica de utilización de sulfitos como inhibidores de melanosis en crustáceos (Knowles, M.E. *Chem. Ind. (London)*, (1971), 910-911; McWeeny, D.J., *et al. J. Sci. Food Agric.*, (1974) 25, 735-746; Wedzicha, B.L. *et al. Food Chem.*, (1988) 27, 259-71) y así como de patentes que los utilizan (ES 2.112.798, US 5.882.688, FR 2.696.077, EP 141.875, GB 2.222.509, etc.). No obstante, ninguno de estos métodos ha resultado ser plenamente satisfactorios.

Labuza y cols. en *Cereal Foods World*, (1989) 34(4):353 describe el uso de proteasas especialmente ficina, en el control enzimático en el pardeamiento de ciertos alimentos. Este autor atribuye este efecto al ataque sobre la PPO de esta proteasa.

La patente americana US 4.981.708 describe la utilización de una proteasa libre como inhibidor del pardeamiento de alimentos. En éste método, alimentos que son susceptibles de pardeamiento, incluyendo por ejemplo, ciertos crustáceos, frutos, vegetales, y bebidas, incluido jugos de frutos y vinos, son tratados con extracto de una cantidad suficiente de proteasa-libre inhibiendo la reacción de pardeamiento. El extracto de la proteasa-libre que se extrae del latex (ficus) es tan efectiva como el bisulfito sódico.

Debido a que el fenómeno de la melanosis se manifiesta a las pocas horas cuando no se tratan los crustáceos con agentes antimelanósicos tradicionales, se ocasionan graves problemas de tipo económico al sector pesquero y a los comercializadores del marisco por la depreciación de su valor en el mercado.

## ES 2 257 964 B1

Es por tanto deseable contar con un tratamiento de la melanosis o pardeamiento de alimentos y en especial de crustáceos que minimice los problemas e inconvenientes de los productos anteriores.

### Descripción de la invención

Los inventores sorprendentemente han encontrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden ser empleadas como agentes inhibidores de la melanosis en crustáceos. Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere un método de preservación de crustáceos frente a la melanosis por su tratamiento con bacterias ácido lácticas.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, ésta se refiere al uso de bacterias ácido lácticas como agentes inhibidores de la melanosis en crustáceos.

De acuerdo con una realización preferida las bacterias ácido lácticas empleadas son de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Estas bacterias se han utilizado durante muchos años, en fermentaciones, en las que forman parte de cultivos mixtos naturales junto con otras bacterias, levaduras y mohos utilizadas para la producción de diversos alimentos humanos o animales tales como productos lácteos (quesos, mantequilla, yogurt, leches ácidas, etc.), vegetales fermentados (encurtidos, aceitunas, etc.), embutidos, panes ácidos, encurtidos y ensilados.

De acuerdo con una realización preferida, se emplean como starters microbianos *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Carnobacterium piscícola*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus acidilacti*.

#### *Bacterias ácido lácticas*

Las bacterias ácido lácticas son bacterias cocoides o bacilares inmóviles, de forma bacilar, o esférica, unidas. En preparaciones para el microscopio aparecen aisladas o formando cadenas de cocos o de bacilos. Los hábitat son muy variados; flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos ricos en azúcares, leche y derivados. Obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares y requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácido, bases nitrogenadas, algunas vitaminas), teniendo unas posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuyen a reducir el rendimiento de su crecimiento.

Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan.

Incapaces de respirar por que no pueden sintetizar compuestos porfirínicos, y, por tanto, formar una cadena de transporte de electrones. Carecen de ciclo de Krebs funcional y, son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo que es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos.

La catalasa (enzima que destruye el  $H_2O_2$ .) necesita un grupo porfirínico y, por tanto, este tipo de bacterias no tienen esta enzima, lo que permite la identificación del grupo. La tolerancia al oxígeno puede conseguirse por que acumulan gran cantidad de manganeso ( $Mn^{2+}$ ) que actúa como una superóxido dismutasa.

Todos estos organismos debido a la limitada capacidad biosintética, tienen requerimientos nutricionales altos, necesitando factores de crecimiento, vitaminas del grupo B, aminoácidos. Como consecuencia, las BAL se cultivan en medios que contienen peptona, extracto de levadura u otros hidrolizados de materiales vegetales o animales, con un glúcido fermentable que proporcione una fuente de energía.

El pequeño tamaño de las colonias es atribuible, en primer lugar, a los bajos rendimientos de crecimiento debido a su metabolismo fermentativo. Algunas especies pueden producir colonias grandes cuando se cultivan en medios que contienen sacarosa, como resultado de la síntesis masiva de polisacáridos extracelulares como los dextranos y levanos, correspondiendo gran parte del volumen de la colonia a estos azúcares. Otra característica fisiológica distintiva de estas bacterias, es su elevada tolerancia a los ácidos, consecuencia necesaria de su modo de metabolismo. Aunque las bacterias cocoides del ácido láctico pueden iniciar su crecimiento a pH neutros e incluso alcalinos, la mayoría de las formas bacilares no pueden crecer en medios con pH inicial menor a 6. El crecimiento de las BAL puede continuar hasta que el pH ha bajado a 4.5 o incluso menor. La capacidad de las BAL para producir y tolerar una concentración relativamente elevada de ácido láctico tiene un gran valor selectivo, ya que les permite eliminar la competencia de la mayoría de las otras bacterias, en ambientes ricos en nutrientes. Como resultado de su extrema especialización fisiológica, las BAL están confinadas a unos cuantos ambientes naturales característicos. Algunas viven en asociación con plantas y crecen a expensas de los nutrientes liberados tras la muerte y descomposición de los tejidos vegetales.

S. Orla Jensen, en "Le clasication des bacterias lactiques". Lait 4, pag 468-474, señaló que las BAL podían dividirse en dos subgrupos bioquímicos, que se distinguen por los productos formados a partir de la glucosa. Los homofermentadores convierten la glucosa casi cuantitativamente en ácido láctico, y los heterofermentadores la convierten en una mezcla equimolecular de ácido láctico, etanol, ácido acético y  $CO_2$ .

Los homofermentadores desamilan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof. Sin embargo los heterofermentadores no pueden utilizar esta ruta ya que carecen de la enzima fructosa difosfato aldolasa, por lo tanto estos organismos desamilan la glucosa por la vía de las pentosas fosfato.

## ES 2 257 964 B1

Es conocido, que los ácidos orgánicos inhiben las reacciones enzimáticas bajo ciertos rangos de pH. La polifenoloxidasas como cualquier otra enzima tienen unos valores de pH bajo los que actúa eficazmente, otros en los que cataliza con menos eficiencia y, finalmente, en ciertos rangos la reacción es prácticamente inexistente.

5 La tirosinasa (polifenoloxidasas) es conocida por ser una enzima clave en la síntesis de melanina en plantas, microorganismos y células mamarias, y por poseer cobre en su estructura. Muchos compuestos como el ácido kójico y la arbutina, son inhibidores de la tirosinasa.

Es conocido el papel de ciertos metabolitos producidos por las BAL, por ejemplo:

10 (i) ácido láctico: puede ser sintetizado como L(+), D(-), y bajo forma racémica. La forma D(-) no se metaboliza por los humanos, por lo que no es recomendado su ingesta, sobre todo en niños y en adolescentes. El ácido láctico, al igual que otros ácidos orgánicos, producen a nivel de la membrana citoplasmática de los microorganismos desajustes en el potencial de membrana e inhibe los procesos de transporte.

15 (ii) peróxido de hidrógeno: las BAL no poseen catalasas, por lo que no pueden desdoblarse el peróxido de hidrógeno, excretándolo al medio. Esta molécula es un fuerte oxidante, produciendo oxidaciones en los lípidos y proteínas de la membrana.

20 (iii) dióxido de carbono: es producido por las BAL heterofermentativas, creando un ambiente anaerobio en el medio, lo cual podría dañar a ciertas bacterias aerobias. También produce descenso del pH a ambos lados de la membrana citoplasmática.

25 (iv) diacetilo: es un producto del metabolismo del ácido cítrico, y es el responsable del sabor característico de algunos alimentos como mantequillas y otros productos lácteos fermentados siendo producido por ciertas bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Dicha producción es inhibida cuando existen hexosas metabolizables en el medio. Las bacterias Gram-, los hongos y las levaduras son más sensibles que las Gram+ al diacetilo. Al parecer su mecanismo de acción está basado en interferencias en la utilización del aminoácido arginina por parte de estos microorganismos.

30 (v) reuterina: es producida por *Lactobacillus reuteri* en un medio con una mezcla de glucosa y glicerol ó gliceraldehído. Tiene un espectro antimicrobiano general afectando a virus, hongos, protozoos y bacterias. Esta actividad se produce, al inhibir la ribonucleótido reductasa.

35 En *Enzyme and microbiological Technology*, 1999, pag 87-107, se indica que el medio empleado para el crecimiento de las BAL es determinante para la cantidad de ácido láctico que será producido.

40 Las BAL tienen la capacidad de soportar pH de 5 e inferiores, lo que les confiere una ventaja selectiva sobre otras bacterias. La temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 45°C. Muchas de ellas son consideradas beneficiosas para el consumo humano, pero otras pueden llegar a ser tóxicas como algunos streptococos. BAL tienen complejos requerimientos nutricionales, por su limitada capacidad de sintetizar vitaminas del grupo B, y aminoácidos.

45 Las BAL pueden usar los glúcidos fermentándolos hasta un solo producto final (homofermentadores) o varios productos finales (heterofermentadores). En los homofermentadores el producto principal y casi único, es el ácido láctico, mientras que los heterofermentadores sintetizan ácido láctico, etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y acetatos. La cantidad de etanol y acetato formado depende del potencial redox del medio. Todas las BAL pueden usar la vía de las pentosas fosfatos, es decir llevar a cabo una heterofermentación, excepto *lactobacilos* del tipo I como por ejemplo *Lactobacillus delbrueckii*. Una mezcla de ácidos se produce por homofermentadores como los *lactococos*, cuando disminuye la concentración de glucosa en el medio, y durante el crecimiento en otros azúcares como *Lactobacillus*

50 *lactis* en maltosa, lactosa y galactosa, o cuando aumenta el pH y disminuye la temperatura. Por ejemplo, *Lactobacillus amylophilus* crece a 15°C y 45°C, pero la mayor producción la lleva a 25 y 37°C. Para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* entre 37 y 44°C, lo cual es contradictorio, ya que estas bacterias crecen a 15°C y no a 45°C. *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* exhibieron las mayores productividades a 33-35°C y a 41-45°C.

60 Dada la competencia que las BAL pueden ejercer con bacterias del género *Pseudomonas*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Shewanella* etc. estas bacterias serían desplazadas del medio por las condiciones tan extremas en las que pueden vivir las bacterias lácticas.

65 Ciertas aminas se forman en el marisco después de su captura, aún conservando a bajas temperaturas, debido a que bacterias de los géneros anteriormente mencionados, producen la descarboxilación de aminoácidos libres. La formación de aminas como la histamina, putrescina y cadaverina, es paralela al crecimiento de estos microorganismos, produciendo malos olores, basificación del medio y produciendo en algunos consumidores reacciones alérgicas.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, ésta se refiere al uso de bacterias ácido lácticas en la eliminación de otras bacterias que producen la formación de ciertas aminas biogénicas, no deseables en crustáceos.

## ES 2 257 964 B1

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, ésta se refiere a los crustáceos tratados con starters microbianos consistentes en BAL.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el uso de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus acidilacti*, produce la inhibición de manera drástica de la aparición de la melanosis en los crustáceos, *post-mortem*, una vez tratados por inmersión.

Otros aspectos y ventajas del tratamiento por inmersión de los crustáceos con soluciones de bacterias ácido lácticas son:

- (i) distribución homogénea del agente antimelanósico en los crustáceos por inmersión en la solución que contiene las BAL.
- (ii) el método de la inmersión en la disolución establece el control de la concentración efectiva del agente antimelanósico beneficioso en la parte comestibles de los crustáceos.
- (iii) una vez que se instalan las bacterias ácido lácticas en los crustáceos, su acción sobre el enzima (PPO-Cu), sustrato proteínico, etc., perdura una vez que cesa el proceso de tratamiento por inmersión de los crustáceos.

Una vez que los crustáceos se sacan del contenedor que contiene la solución de bacterias ácido lácticas, las propiedades organolépticas (el aspecto, presencia, color, sabor) prácticamente no se alteran, lo que proporciona notables ventajas sobre los métodos tradicionales de espolvoreo de los sulfitos, (productos agresivos) los cuales permanecen en contacto con los crustáceos durante semanas, meses, provocando decoloración del esqueleto externo, sequedad, mal sabor etc.,

De acuerdo con una realización preferida, la concentración de bacterias ácido lácticas empleada está entre aproximadamente 80 UFC/ml y 140 UFC/ml. De modo más preferido, entre 100 UFC/ml y 110 UFC/ml, siendo aún más preferido entre 106 UFC/ml y 108 UFC/ml.

Los medios de cultivo adecuados para la realización del método de acuerdo con la presente invención, son aquellos medios selectivos de bacterias lácticas, en el cual las bacterias crecen satisfactoriamente. Entre los medios más adecuados se encuentran:

Medio Esencial Mínimo (MEM): Cloruro sódico (NaCl) (0.7%) y D(+) glucosa (2%), peptona (5%), sulfato de magnesio heptahidratado (0,005%). pH inicial entre 6-6.3.

Medio Pobre (MP): Cloruro sódico (NaCl) (0.7%) y D(+) glucosa (5%), pH inicial entre 6 y 6.5.

Medio MRS: caldo citrato diamónico comercia; extracto de carne en polvo, extracto de levadura, D(+) Glucosa, sulfato magnésico, sulfato de manganeso (II), peptona bacteriológica, fosfato dipotasio, acetato sódico, y tween 80. Este medio tiene un pH inicial de 6,2 aproximadamente.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se emplea como caldo de cultivo un medio seleccionado entre Medio Esencial Mínimo, Medio Pobre, MRS y el medio de cultivo sintetizado por ellas mismas, utilizando glucosa como solución nutritiva. En una realización más preferida el medio de cultivo es Medio Pobre.

De acuerdo con una realización preferida, el tiempo establecido de inmersión de los crustáceos en la solución de bacterias ácido lácticas es de entre 5 y 120 minutos. En una realización más preferida el tiempo de inmersión es de entre 10 y 60 minutos. Según una realización aún más preferida el tiempo de inmersión es de entre 15 y 45 minutos, siendo especialmente preferido un tiempo de inmersión de aproximadamente 30 minutos.

De acuerdo con una realización preferida, la temperatura a la que se lleva a cabo el tratamiento de los crustáceos está comprendida entre 0°C y 35°C. De acuerdo con una realización más preferida, la temperatura de tratamiento es de 3°C.

Una vez tratados los crustáceos en las condiciones fijadas, los crustáceos se refrigeran para posteriormente ser distribuidos para su consumo en fresco, o bien se congelan si su consumo se dilata en el tiempo. La suspensión microscópica de las bacterias ácido lácticas en el medio de cultivo es apta para repetir varios ciclos de tratamiento de los crustáceos por inmersión. Esta forma de proceder se puede extrapolar indefinidamente siempre que se mantenga prácticamente la concentración de las bacterias ácido lácticas para que no se resienta el proceso de melanización y la calidad de los crustáceos. La posibilidad de realización de estos ciclos de tratamiento por inmersión, hace que el proceso de utilización de la las bacterias ácido lácticas como inhibidor de melanosis sea tecnológicamente rentable.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Las descripciones en el resumen de esta solicitud se incorporan aquí como referencia. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

## Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Representación de la actividad enzimática de la enzima Polifenol Oxidasa de *Parapenaeus longirostris*, mediante diferentes curvas de absorbancia (A) y pH en función del tiempo (t).

Se observa en la gráfica que a medida que el pH del medio es más ácido la absorbancia es menor y por consiguiente se desarrolla menos color, que es el objetivo que se persigue con la producción de ácido láctico producido por las bacterias lácticas, en nuestro caso *Lactobacillus helveticus*.

Fig. 2. Se representa comparativamente el porcentaje de actividad de inhibición de la PPO del crustáceo *Parapenaeus longirostris*, a la que no se le efectúa ningún tratamiento (barra con rayas inclinadas), frente a muestras tratadas con las bacterias *Lactobacillus lactis* (I), *Carnobacterium piscicola* (II), *Lactobacillus plantarum* (III), *Lactobacillus helveticus* (IV) y *Pediococcus acidilactici* (V), en medios en medio pobre (barra con cuadrícula) y en medio esencial mínimo (barra con rayas horizontales).

Fig. 3. Representación gráfica de la medida de la absorbancia (A) frente al tiempo (t) de la velocidad de aparición de Dopacromo.

Los siguientes modos de realización se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Exposición detallada de modos de realización

### Ejemplo 1

#### *Estudio de la microflora autóctona del marisco*

Uno de los factores esenciales de actuación de las BAL es la competencia con otras bacterias que aceleran el proceso de melanosis. Para el estudio microbiológico se utiliza el sistema de tiras API, el cual es un sistema de identificación estandarizado, que utiliza distintos tests bioquímicos miniaturizados y una base de datos. Consta de diez microtubos que contienen sustratos deshidratados. Estos test se inoculan con una suspensión bacteriana, que reconstituye los medios. Durante la incubación, se producen cambios de color espontáneo o revelado por adición de reactivos.

Después de una incubación de 18-24 horas a 35-37°C, la lectura de reacciones se visualiza contrastando lista de perfiles, o con un software de identificación.

La extracción de la flora bacteriana del marisco se realizó, usando agua de peptona tamponada, esterilizada en autoclave 121°C durante 20 minutos, con un 0.01% de Tritón X-100 en un agitador magnético, a 37°C durante 12 horas. En ese tiempo las bacterias se despegan de su huésped, y pasan a la solución de agua peptonada. A continuación, se procedió al aislamiento de las cepas que habitan en el medio líquido, pasando a utilizar un medio sólido, general, no específico, donde cualquier bacteria, puede crecer. Este medio es el TSA (Tryptona Soja Agar). Se realizaron en placas de petri, siembras “por agotamiento”, con triplicado, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se pudo observar como han crecido en las placas decenas de colonias, en la mayoría de los casos entre 3 y 4 colonias distintas, por lo que cabe de esperar que en el marisco de forma natural en descomposición, estén instaladas predominantemente este mismo número de bacterias.

Los crustáceos, una vez capturados, y después de quince días de almacenamiento en frigorífico a la temperatura de 0-5°C no presenta melanosis y durante un tiempo indefinido (de 1 a 10 meses) a la temperatura de -18°C, cuando fueron tratados con starters microbianos como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus Lactis*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus acidilacti*.

### Ejemplo 2

#### *Inhibición de la melanosis en crustáceos*

Los estudios se basan todos ellos en el crustáceo *Parapenaeus longirostris*, conocido como “gamba blanca de Huelva”. Este artrópodo tiene cutícula y apariencia con tonalidades claras, por lo que los efectos de la melanosis será más acusada. Los ejemplares siempre fueron frescos y sin tratamiento químico, ni otro de cualquier naturaleza anterior a nuestros ensayos.

#### *Reconstitución de cepas bacterianas*

Se encargaron al Centro Español de Cultivos Tipo las bacterias *Lactobacillus helveticus*, CECT 4305 T. Estas cepas se presentan liofilizadas en pequeñas ampollas, a las que se le añadió 0,3 mililitros del medio MRS, y resuspendió con pipeta Pasteur, y se inocularon con 200 ml del mismo medio contenido en matraz aforado. Este caldo se incubó durante 24 horas a 37°C, y al cabo de este tiempo, se obtuvieron concentraciones de *Lactobacillus helveticus* de 100 a 1000 millones de células por mililitro en un medio que alcanza un pH entre 4,20 y 4,50.

## ES 2 257 964 B1

*Actividad enzimática de la enzima Polifenol Oxidasa de Parapenaeus longirostis, entre un intervalo de pH 3 y 9*

Se tomaron muestras de cefalotorax, lugar donde la enzima es más abundante, se pesó el extracto del tejido tomado y se procedió a su homogenización con nitrógeno líquido y con 3 mililitros de los distintos tampones utilizados. Se centrifugó a 13240 gs durante 30 minutos y se desechó el precipitado, separando la fase soluble donde se encuentra la enzima. A continuación se preparó una solución de tripsina al 5% en agua destilada, y una solución de DL- Dopa 25 mM en tampón fosfato pH 6,5.

Se midió la absorbancia producida en el espectrofotómetro a la longitud de onda ( $\lambda$  de 390 manómetros), cada 2 minutos, durante 20 minutos, de máxima actividad de la PPO. Los resultados se recogen en la Tabla 1.

TABLA 1

*Medición de la absorbancia en función del tiempo y del pH*

pH=4		pH= 5		pH=6	
Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia
0	0,000	0	0,005	0	0,007
2	0,000	2	0,015	2	0,022
4	0,000	4	0,023	4	0,038
6	0,000	6	0,031	6	0,057
8	0,000	8	0,039	8	0,073
pH=7		pH=8		pH=9	
Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia
0	0,021	0	0,022	0	0,051
2	0,044	2	0,042	2	0,091
4	0,066	4	0,061	4	0,145
6	0,086	6	0,084	6	0,206
8	0,108	8	0,106	8	0,269

Se observó que a partir de los 8 minutos la reacción enzimática dejaba de ser lineal. El estudio de esta zona, en la que la reacción de formación de producto con respecto al tiempo es lineal nos permite calcular la pendiente de la recta que representa la cinética de la reacción, y que nos sirve para cuantificar la actividad enzimática.

1. pH= 4. No existe reacción. La pendiente es igual a 0.

2. pH= 5.  $Y = 0.0042x + 0.058$ .

3. pH= 6.  $Y = 0.0084x + 0.011$ .

4. pH= 7.  $Y = 0.0108x + 0.0002$ .

5. pH= 8.  $Y = 0.0106x + 0.001$ .

6. pH= 9.  $Y = 0.0276x + 0.089$ .

Aplicando la ecuación de la Actividad Enzimática Específica:

$$\text{Act. Enz. Esp.} = \frac{\text{Abs.} \cdot \text{Vol. Tampón extracción (ml)}}{\text{Vol. muestra (ml)} \cdot (\text{min}) \cdot \text{peso fresco}} e^{-1} \cdot d^{-1}$$

$e$  = coeficiente de extinción molar  $3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d$  = camino óptico = 1 cm

## ES 2 257 964 B1

obtenemos los siguientes resultados:

Para pH 4, no existe actividad enzimática.

5 Para pH 5, tenemos una actividad enzimática específica de  $3,80 \times 10$  elevado a la menos 6 micromoles/min x gramo peso fresco.

Para pH 6,  $7,60 \times 10$  elevado a menos 6 micromoles/min x gramo peso fresco

10 Para pH 7,  $9,76 \times 10$  elevado a menos 6 micromoles/min x gramo peso fresco

Para pH 8,  $9,58 \times 10$  elevado a la menos 6 micromoles/min x gramo peso fresco.

15 Para pH=9,  $24,95 \times 10$  elevado a la menos 6 micromoles/min x gramo peso fresco.

Para el desarrollo de la actividad enzimática “*in situ*” se utilizaron los siguientes tampones:

Para pH de 4 y 5 usamos el sistema tamponado acético/acetato.

20 Para pH de 6 y 7 usamos el sistema tamponado fosfato potásico monobásico/fosfato potásico dibásico.

Para pH de 8 y 9 usamos el sistema tamponado con Tris.

25 Todos los medios se emplean a la concentración de 0,1 molar.

Si representamos los datos obtenidos veremos como existe una zona lineal en la que la variación de la absorbancia es prácticamente constante, es en esta zona donde calculamos la pendiente y con ella la actividad específica de la PPO, aplicando la ecuación de la Actividad Enzimática Específica.

30 La actividad de la fenoloxidas (PPO) se expresa como moles de DL-DOPA transformados por minuto y por mg a 475 nm, a diferentes pH y a temperatura ambiente en las condiciones descritas. La oxidación de la DOPA a DOPA-CROMO, catalizada por la PPO conlleva un apreciable cambio de color que es lo que medimos en el espectrofotómetro a 475 nm.

35 De una muestra de cabeza de gamba se obtuvo el extracto, el cual fue incubado con tripsina 1% durante 15 minutos en agitación y se midió a lo largo del tiempo la variación de absorbancia a 475 nm frente a DL-DOP.

40 Los valores presentados en la Tabla 2 son la media de 3 ensayos  $\pm$  la desviación estándar (SD), los cuales representamos gráficamente y obtenemos la actividad enzimática específica de la zona lineal de la Figura 3

TABLA 2

*Medición de la absorbancia en función del tiempo*

Tiempo (minutos)	Absorbancia	Tiempo (minutos)	Absorbancia
0	0,000 $\pm$ 0.000	12	0,522 $\pm$ 0.021
2	0,160 $\pm$ 0.053	14	0,538 $\pm$ 0.031
4	0,274 $\pm$ 0.044	16	0,576 $\pm$ 0.045
6	0,340 $\pm$ 0.036	18	0,611 $\pm$ 0.050
55 8	0,399 $\pm$ 0.022	20	0,633 $\pm$ 0.038
10	0,467 $\pm$ 0.024	22	0,655 $\pm$ 0.035

60 zona lineal en la que la variación de la absorbancia es prácticamente constante, es en esta zona donde calculamos la pendiente y con ella la actividad específica de la PPO, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pendiente de la recta} = 0.0339, R^2 = 0.994$$

65 
$$\text{Actividad específica} = 30,65 \times 10^{-6} \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$$



## ES 2 257 964 B1

### *Producción de bacterias lácticas y medios bacteriogénicos*

Se ensayaron medios de cultivo diferentes, selectivos de bacterias lácticas, en el cual las bacterias crecen satisfactoriamente tales como Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio MRS y Medio Pobre (MP).

5

Cuando se incubaron estos microorganismos a 37°C, en estos medios, al cabo de 24 horas se obtuvieron concentraciones entre 100 y 1.000 millones de bacterias por mililitro de medio, siendo el nuevo pH entre 3.5 y 4.0, de lo que se deduce que el metabolismo bacteriano ha sido el que ha generado esa bajada drástica de pH.

10

Tanto MEM como MRS, proporcionaron medios adecuados para el desarrollo del cultivo, sin embargo el medio MP es el que otorgó una mayor inhibición enzimática y ausencia de ennegrecimiento del marisco, y con propiedades organolépticas de los crustáceos excelentes.

### *Ejemplo de pruebas realizadas con medio MEM*

15

Se tomó una solución salina de cloruro sódico 0,7% y D(+) glucosa (2%), peptona (5%), sulfato de magnesio heptahidratado (0,005%), pH inicial 6.2. y se inoculó con bacterias ácido lácticas de *Lactobacillus helveticus* y se incubaron a 37°C, observándose un crecimiento lento de dichas bacterias. A las 76 horas la disolución presentó concentraciones deseadas para nuestro ensayo, concretamente de 10 a 100 millones de bacterias por mililitro de medio. El pH inicial del medio era de 5,82, mientras que a las 76 horas de incubación de las bacterias el pH es de 3.3, en todos los ensayos. El medio es inodoro e incoloro, no apreciándose mal sabor. El marisco se trató a temperaturas de refrigeración, concretamente a 3°C, a diferentes tiempos de residencia; 10, 20, 30, 60 y 120 minutos por inmersión en el medio bacteriogénico descrito. Una vez extraído los crustáceos de la disolución se procede a repetir ciclos de inmersión hasta cinco veces consecutivas. A continuación se procedió a estudiar la evolución de la melanosis, observando que a las 24 horas el marisco tratado permanece inalterado, a temperatura ambiente 18-20°C, mientras que en el marisco control (marisco sin ningún tratamiento) ya se observan principios de melanosis en cabeza e incluso en las patas. Después de 12 días de permanecer los crustáceos en el refrigerador a 3-5°C no se apreció aparición de melanosis. La Figura 3 representa el tanto por ciento de inhibición de las bacterias ensayadas en diferentes medios de cultivo como Medio Pobre (MP) y Medio Esencial Mínimo (MEM).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

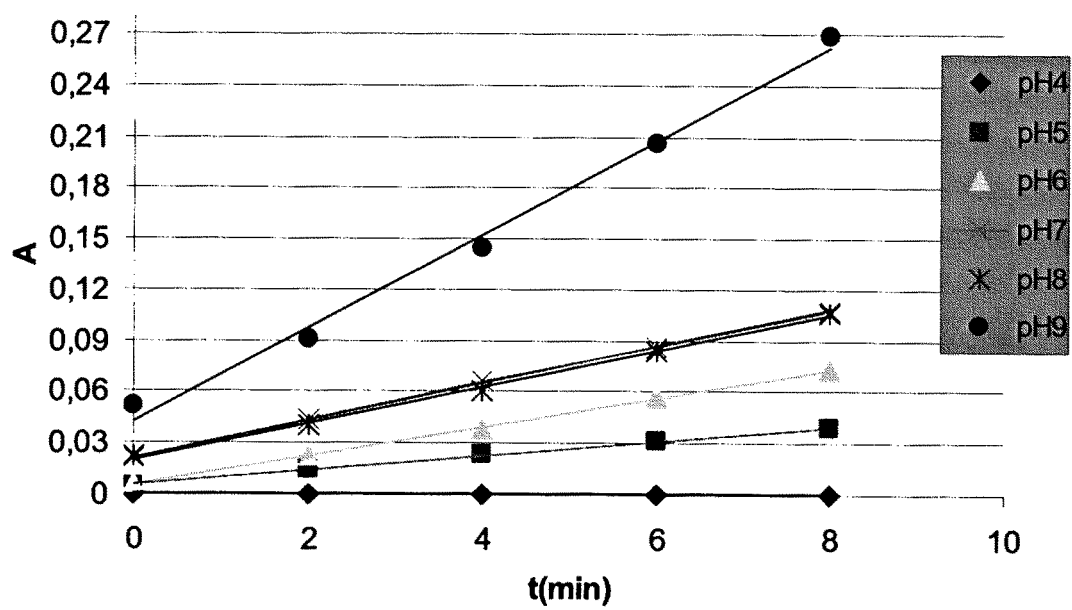
65

## ES 2 257 964 B1

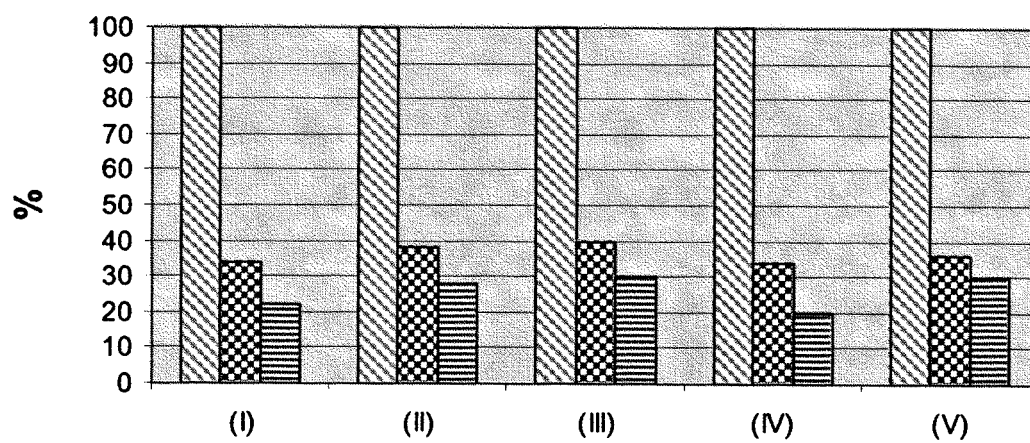
### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de preservar un crustáceo frente a la melanosis, **caracterizado** porque comprende los pasos de poner en contacto los crustáceos con una solución que contiene una cantidad adecuada de bacterias ácido lácticas y su posterior almacenaje bajo condiciones adecuadas.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado** porque las bacterias empleadas son de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.
- 15 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 2, **caracterizado** porque las bacterias son del tipo *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Carnobacterium piscícola*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus acidilacti*.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado** porque las bacterias se suspenden en un medio de cultivo adecuado.
- 25 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo se selecciona entre medio esencial mínimo (MEM), medio pobre (MP), medio MRS y el medio de cultivo sintetizado por ellas mismas, utilizando glucosa como solución nutritiva.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo es el medio pobre (MP).
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, **caracterizado** porque la concentración de bacterias ácido lácticas es de entre 80 UFC/ml y 140 UFC/ml.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, **caracterizado** porque la concentración de bacterias ácido lácticas es de entre 100 UFC/ml y 110 UFC/ml.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, **caracterizado** porque la concentración de bacterias ácido lácticas es de entre 106 UFC/ml y 108 UFC/ml.
- 50 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, **caracterizado** porque el tiempo de inmersión es de entre 5 y 120 minutos.
- 55 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, **caracterizado** porque el tiempo de inmersión es de entre 10 y 60 minutos.
- 60 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 11, **caracterizado** porque los crustáceos son tratados a la temperatura de entre 0°C y 35°C.
- 65 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 12, **caracterizado** porque los crustáceos son tratados a la temperatura de 3°C.
14. Uso de bacterias ácido lácticas (BAL) como agentes inhibidores de la melanosis de crustáceos.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación anterior **caracterizado** porque las bacterias empleadas son de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.
16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 14 a 15, **caracterizado** porque las bacterias son del tipo *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Carnobacterium piscícola*, *Lactobacillus plantarum*, y *Pediococcus acidilacti*.
17. Los crustáceos tratados con bacterias ácido lácticas como agentes inhibidores de melanosis para su uso alimenticio.

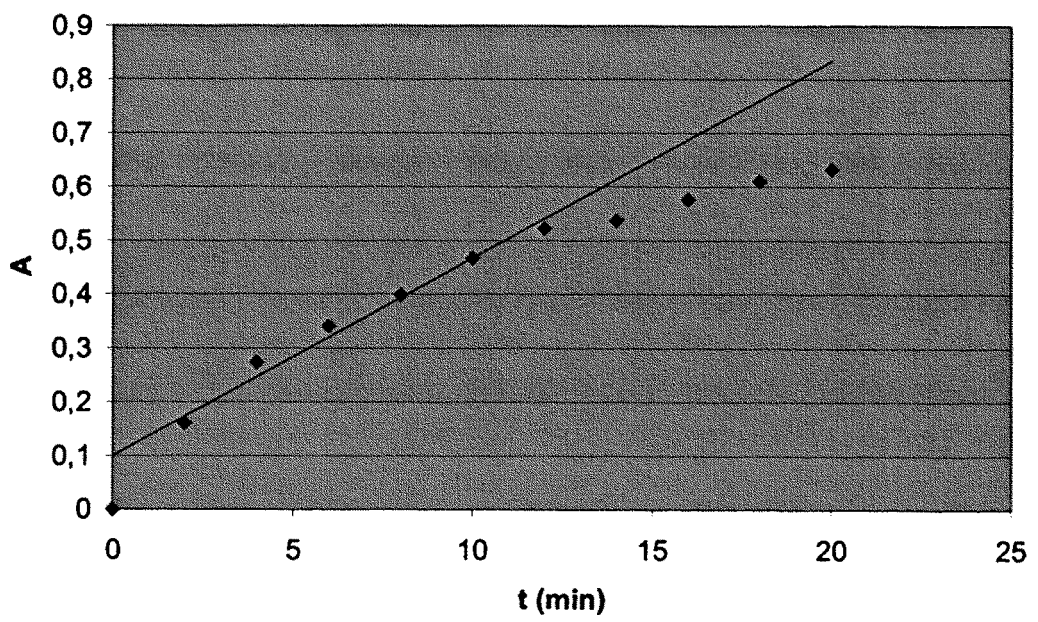
FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG 3**





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 257 964

② Nº de solicitud: 200500165

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23B 4/22** (2006.01)  
**A22C 29/02** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BENNER et al. Lactic acid/melanosis inhibitors to improve shelf life of brown shrimp ( <i>Penaeus aztecus</i> ). Journal of Food Science, 1994, Vol. 59 (2), páginas 242-250.	17
X	CHINIVASAGAM et al. Can spoilage bacteria cause blackspot (melanosis) in stored prawns?. Letters in Applied Microbiology, 1998, Vol. 27, páginas 5-8.	17
A	US 20040249129 A1 (DANIEL et al.) 09.12.2004, todo el documento.	
A	CA 2502565 A1 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD) 21.05.2004, todo el documento.	
A	ES 2065858 A1 (IRTA) 16.02.1995, todo el documento.	

#### 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  
05.06.2006

Examinador  
A. Polo Díez

Página  
1/1