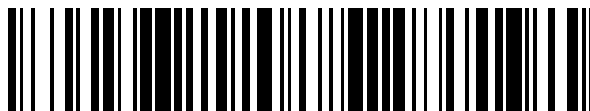


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 115**

21 Número de solicitud: 201330210

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.08.2014

Fecha de la concesión:

24.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ESTEVE GIL, Clara;
MARINA ALEGRE, María Luisa y
GARCÍA LÓPEZ, María Concepción**

74 Agente/Representante:

GUTIÉRREZ DE MESA, José Antonio

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante a partir de semillas de aceituna**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener péptidos con capacidad antioxidante mediante digestión enzimática de las proteínas aisladas a partir de la semilla de aceituna. El procedimiento consiste en extraer las proteínas de la semilla de la aceituna empleando un método desarrollado previamente, disolver el aislado de proteínas en un medio tamponado a pH ligeramente alcalino, digerir con la enzima alcalasa, centrifugar y recoger el sobrenadante que contiene los péptidos con capacidad antioxidante in vitro.

ES 2 487 115 B1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PEPTÍDICO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE SEMILLAS DE ACEITUNA

5 La presente invención se refiere a un procedimiento químico para obtener un extracto peptídico con capacidad antioxidante a partir de un asilado de proteínas de semilla de aceituna mediante el empleo de la enzima proteolítica alcalasa.

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 Esta invención permite obtener sustancias con elevado valor añadido a partir de la semilla contenida en el hueso de la aceituna que constituye un residuo generado en el procesamiento de la aceituna. El interés de la invención está en el tratamiento de residuos industriales mediante la obtención de compuestos de alto valor biológico y en la aplicación de los péptidos bioactivos obtenidos. El tratamiento de residuos industriales y la obtención
15 de compuestos de alto valor biológico es de interés para el sector químico y la industria manufacturera de aceituna de mesa y aceite de oliva mientras que, desde el punto de vista de la aplicación de los péptidos encontrados, esta invención iría dirigida al sector alimentario y farmacéutico.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En los procesos de producción de aceitunas de mesa y aceite de oliva se produce un gran volumen de residuos, lo que constituye un problema medioambiental y económico. Concretamente, el hueso de la aceituna forma parte de este material residual que, en
25 general, no se suele aprovechar. Sin embargo, la semilla contenida en el hueso de la aceituna presenta un alto contenido en proteínas, que llegan a representar el 20% del peso, y de donde podrían extraerse moléculas con alto valor añadido como son péptidos bioactivos [1, 2]. Un gran número de hidrolizados proteicos derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas de plantas y sus subproductos han demostrado tener capacidad
30 antioxidante [3]. El consumo de antioxidantes se ha relacionado inversamente con el envejecimiento, la muerte celular, la diabetes y el cáncer [4]. Además, los compuestos antioxidantes son también muy útiles en el control de la oxidación lipídica en productos alimentarios. La oxidación lipídica es un grave problema en la industria alimentaria dado que da lugar a la aparición de malos sabores y olores, colores oscuros y productos de reacción

potencialmente tóxicos. La demanda de antioxidantes naturales ha aumentado en los últimos años debido a que son más seguros que los antioxidantes sintéticos y a que el consumidor tiene una percepción negativa de estos últimos. El uso de estos antioxidantes naturales ha sido estudiado en buena medida para la prevención de la oxidación lipídica en alimentos [5, 6].

En esta patente se propone una alternativa para el aprovechamiento y revalorización de este material residual.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento químico propuesto permite la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante a partir de semilla de aceituna.

15 El procedimiento requiere la extracción previa de las proteínas a partir de la semilla de la aceituna, siguiendo un método previamente optimizado, y la hidrólisis enzimática de las proteínas extraídas. La extracción de las proteínas contenidas en el hueso de la aceituna se realiza utilizando un tampón Tris-HCl a pH 7,5 que contiene dodecilsulfato sódico y ditiotreitól y precipitando las proteínas solubilizadas con acetona. Las proteínas aisladas se disuelven en un medio alcalino y se lleva a cabo la hidrólisis utilizando la enzima alcalasa a una temperatura controlada y con agitación. Una vez finalizada la digestión, se inactiva la enzima y se separa por centrifugación el sobrenadante que contiene los péptidos con capacidad antioxidante.

25 A continuación, en la Tabla 1 se muestran los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante para el extracto peptídico obtenido mediante la digestión con alcalasa de las proteínas contenidas en la semilla de aceitunas de la variedad Arbequina.

30 **Tabla 1.** Capacidad antioxidante del extracto peptídico obtenido por la digestión de las proteínas de la semilla de la aceituna con la enzima alcalasa.

Muestra	Capacidad de captura de radicales DPPH (%)	Capacidad de captura de radicales ABTS (%)	Valor TEAC ^a	Capacidad de captura de radicales hidroxilo (%)	Inhibición de la oxidación de lípidos (%)
---------	--	--	-------------------------	---	---

Digerido			363 ±		
con	68.6 ± 5.6	72.0 ± 4.3	28	54.5 ± 3.3	91.2 ± 6.9
alcalasa					
Control	54.3 ± 4.5 ^b	40.4 ± 3.9 ^c		66.1 ± 6.7 ^b	89.1 ± 7.2 ^c

^a El valor TEAC (actividad antioxidante en equivalentes de Trolox) se expresa como micromoles de equivalentes de Trolox por gramos de muestra.

^b Usando GSH (1 mg/mL) como control positivo.

^c Usando Trolox (1 mM) como control positivo.

5

La comparación de los resultados con los obtenidos para un compuesto control con reconocida capacidad antioxidante demuestra que los hidrolizados obtenidos constituyen interesantes fuentes de péptidos con propiedades antioxidantes.

10

A través de este procedimiento se describe una alternativa de aprovechamiento de un material residual como son los huesos de aceituna y que hasta ahora no se realizaba. En comparación con otras formas de aprovechamiento de este residuo, el procedimiento que aquí se presenta permite la revalorización de esta fuente barata de proteínas.

15

Por último, el procedimiento objeto de la invención es sencillo, económico, rápido y seguro, ya que utiliza instrumentación básica y una enzima comercial de uso extendido en la industria alimentaria.

MODO DE REALIZACIÓN

20

Obtención del aislado de proteína de la semilla de aceituna

25

Para la obtención del aislado proteico de la semilla de la aceituna se emplea un método optimizado previamente [7]. Brevemente, el hueso de la aceituna se deja secar a temperatura ambiente y se extrae del mismo la semilla mediante fractura mediante procedimientos mecánicos. Una vez extraída la semilla de la aceituna esta se tritura en un molinillo. Las proteínas de la semilla se extraen empleando un medio de extracción formado por un tampón Tris-HCl 125 mM (pH 7,5) que contiene dodecilsulfato de sodio y ditiotreitól.

30

En estas condiciones las proteínas pasan a la disolución acuosa y el residuo sólido se elimina mediante centrifugación. Se recupera el sobrenadante y se le añade acetona

previamente enfriada para precipitar las proteínas. El aislado proteico se recoge por centrifugación de la muestra y se deja secar a temperatura ambiente.

Obtención del hidrolizado de proteínas de la semilla de aceituna

5

La hidrólisis del extracto proteico obtenido a partir de la semilla de aceituna se lleva a cabo empleando la enzima proteolítica alcalasa. Para ello, el aislado proteico de la semilla de aceituna se disuelve en una disolución reguladora adecuada, como puede ser un tampón fosfato a baja concentración, a un pH comprendido entre 7,0 y 9,0. Se recomienda una concentración de enzima de 0,01-0,5 U/g proteína. La reacción de hidrólisis se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 40-60 °C durante un tiempo suficientemente elevado como para que la digestión sea completa (superior a 1 h) y con agitación. Seguidamente, se realiza la inactivación de la enzima, que se sugiere que se lleve a cabo calentando las muestras a una temperatura superior a 100 °C. A continuación, se centrifugan las muestras para precipitar las posibles proteínas remanentes. La capacidad antioxidante del extracto peptídico obtenido se evalúa a continuación.

10

15

Evaluación de la capacidad antioxidante

20

La capacidad antioxidante del hidrolizado obtenido con la enzima alcalasa se evaluó empleando cuatro métodos *in vitro* distintos: ensayo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ensayo del radical hidroxilo y ensayo de autooxidación del ácido linoleico.

25

El *ensayo ABTS* se realiza de acuerdo a lo descrito por Wiriyanphan y col. [8] con algunas modificaciones. Se prepara una disolución stock de ABTS⁰⁺ mezclando, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h, una disolución de ABTS 7,4 mM con persulfato potásico 2,5 mM. El radical ABTS⁰⁺ formado se diluye con tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) hasta obtener una absorbancia de 0,7 ± 0,01 a 734 nm. A 1 µL de muestra se le añaden 100 µL de la disolución de ABTS⁰⁺ y la absorbancia se mide transcurridos 6 min. Se calcula la capacidad antioxidante de acuerdo a la siguiente ecuación:

30

$$\text{Capacidad de captura de radicales ABTS (\%)} = \left(\frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} \right) \times 100$$

donde $Abs_{muestra}$ es la absorbancia de 1 μ L de muestra con 100 μ L de disolución de $ABTS^{0+}$ y Abs_{blanco} es la absorbancia de 1 μ L del tampón empleado en la digestión del extracto proteico con 100 μ L de disolución de $ABTS^{0+}$.

- 5 La capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC) refleja la cantidad de Trolox (mM) que hace falta para producir la misma actividad que una concentración 1 mM del compuesto estudiado. El valor TEAC se determina comparando la pendiente obtenida al determinar la capacidad de captura de radicales ABTS de los hidrolizados a cinco concentraciones finales diferentes (3-35 μ g/mL) con el valor de la pendiente de una curva estándar preparada con Trolox (concentraciones finales de 0-15 μ M).

El ensayo *DPPH* se lleva a cabo de acuerdo a lo descrito en trabajos anteriores [9, 10]. Para llevar a cabo el ensayo, la muestra (50 μ L) se mezcla con 50 μ L de una disolución de DPPH 0,1 mM en 95% (v/v) de EtOH. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min y la absorbancia de la disolución resultante se determina a 515 nm. Como control positivo se utiliza GSH en concentraciones de 0 a 5 mg/mL. La capacidad antioxidante se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de captura de radicales DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{control_muestra}}{Abs_{blanco}} \right) \times 100$$

20 donde $Abs_{muestra}$ es el valor de la absorbancia de 50 μ L de muestra con 50 μ L de la disolución de DPPH; $Abs_{control_muestra}$ es el valor de la absorbancia de 50 μ L de muestra con 50 μ L de EtOH al 95% (v/v); y Abs_{blanco} es el valor de la absorbancia de 50 μ L del tampón empleado en la digestión de la muestra con 50 μ L de la disolución de DPPH.

25 El ensayo del radical hidroxilo se lleva a cabo de acuerdo a lo descrito por Ajibola y col. [11] con algunas modificaciones. Se prepararan disoluciones de 1,10-fenantrolina 3 mM en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), sulfato ferroso 3 mM y peróxido de hidrógeno al 0,01% (v/v). A 25 μ L de muestra se añaden 25 μ L de la disolución de 1,10-fenantrolina y 25 μ L de la disolución de sulfato ferroso. Para iniciar la reacción se añaden 25 μ L de peróxido de hidrógeno y se incuba durante 1 h a 37 °C. La absorbancia de la disolución resultante se mide a 536 nm. Como control positivo se utiliza GSH en concentraciones de 0 a 5 mg/mL. La capacidad antioxidante se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de captura de radicales hidroxilo (\%)} = \left(\frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \right) \times 100$$

5 donde $Abs_{muestra}$ es la absorbancia del digerido proteico; Abs_{blanco} es la absorbancia resultante de utilizar agua en lugar de la muestra; y $Abs_{control}$ es la absorbancia resultante de llevar a cabo la reacción poniendo agua en lugar de peróxido de hidrógeno.

10 El *ensayo de autooxidación del ácido linoleico* se realiza de acuerdo al método establecido por Chen y col. [9] con algunas modificaciones. Para ello, se mezclan 20 μL de muestra con 20 μL de una disolución de ácido linoleico disuelto en EtOH al 0,13% (v/v) y con 10 μL de agua. La muestra se mantiene a 40 °C en la oscuridad durante 144 h (6 días) y se evalúa el grado de peroxidación mediante el método del tiocianato férrico [11]. Para ello, se mezclan, a diferentes intervalos de tiempo durante la incubación, 2,5 μL de la mezcla incubada con 175 μL de EtOH al 75% (v/v), 2,5 μL de tiocianato amónico al 30% (m/v) y 2,5 μL de cloruro 15 ferroso 20 mM en HCl al 3,5% (v/v). Después de 3 min, se mide la absorbancia a 500 nm. Los blancos se obtienen con un volumen equivalente del tampón empleado en cada digestión enzimática. Como control positivo se emplea GSH en una concentración de 1 mg/mL. La inhibición de la oxidación del ácido linoleico se calcula utilizando la siguiente ecuación:

20

$$\text{Inhibición de la oxidación del ácido linoleico (\%)} = \frac{1 - (Abs_{muestra,144h} - Abs_{muestra,0h})}{(Abs_{blanco,144h} - Abs_{blanco,0h})} \times 100$$

25 donde $Abs_{muestra,144h}$ y $Abs_{muestra,0h}$ son las absorbancias de la muestra tras 144 h y 0 h, respectivamente; y la $Abs_{blanco,144h}$ and $Abs_{blanco,0h}$ son las absorbancias del blanco tras 144 h y 0 h, respectivamente.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

30 A los fabricantes de las industrias alimentaria y farmacéutica les interesa que existan procedimientos químicos rápidos, económicos y sencillos que permitan la obtención de hidrolizados proteicos con capacidad antioxidante que puedan añadir a sus productos comerciales. El novedoso empleo de la semilla de la aceituna como fuente de péptidos

bioactivos ofrece una fuente barata de compuestos de alto valor biológico resolviéndose a la vez un problema de aprovechamiento de los residuos producidos durante la fabricación de aceituna de mesa y aceite de oliva.

5

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R., Fernández-Bolaños, J.; *Bioresource Technology* **2008**, 99, 5261-5269.
- [2] Martín-García, A. I.; Moumen, A.; Ruíz, D. R. Y.; Alcaide, E. M. *Animal Feed Science and Technology* **2003**, 107, 61-74.
- 10 [3] Sarmadi, B. H.; Ismail, A.; *Peptides* **2010**, 31, 1949-56.
- [4] Harman, D.; *Annals of the New York Academy of Sciences* **2001**, 928, 1-21.
- 15 [5] Sakanaka, S.; Tachibana, Y.; Ishihara, N.; Juneja, L. R.; *Food Chemistry* **2004**, 86, 99-103.
- [6] Sakanaka, S.; Tachibana, Y.; Ishihara, N.; Juneja, L. R.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 464-468.
- 20 [7] Esteve, C.; Del Río, C.; Marina, M. L.; García, M. C.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 8176-8182.
- [8] Wiriyaphan, C.; Chitsomboon, B.; Yongsawadigul, J.; *Food Chemistry* **2012**, 132, 104-111.
- [9] Chen, H. M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Nokihara, K.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44, 2619-2623.
- 25 [10] Brandwilliams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *LWT-Food Science and Technology* **1995**, 28, 25-30.
- [11] Chen, H. M.; Muramoto, K.; Yamamuchi, F.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, 574-578.

30

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante a partir de semillas de aceituna **caracterizado** por las etapas de aislamiento de las proteínas de la semilla, digestión enzimática de las mismas y centrifugación.
- 10
2. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según las reivindicaciones 1, **caracterizado** porque las proteínas aisladas se disuelven en una disolución reguladora a pHs entre 7,0 y 9,0.
- 15
3. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según las reivindicaciones 1, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas se realiza utilizando la enzima proteolítica alcalasa.
- 20
4. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según las reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas requiere una concentración de enzima alcalasa comprendida entre 0,01 y 0,5 g enzima/g proteína.
- 25
5. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas tiene lugar a temperaturas comprendidas entre 40 y 60 °C.
- 30
6. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas se realiza en un tiempo suficiente que asegure el máximo grado de hidrólisis (tiempo de digestión superior a 1 h).
7. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque finalizada la digestión es necesario la inactivación de la enzima.

8. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antioxidante, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se centrifuga la muestra digerida para separar el sobrenadante que contiene péptidos con capacidad antioxidante.



- ②① N.º solicitud: 201330210
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P21/06** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ZHENBAO, Z. et al. "Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (<i>Prunus armeniaca</i> L.) kernel protein hydrolysate". EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY. Mayo 2010, Vol. 231, N° 1, páginas 13-19, todo el documento.	1-8
Y	UDENIGWE, C.C. et al. "Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of flaxseed protein-derived high Fisher ratio peptide mixture". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.04.2010. Vol. 58, n° 8, páginas 4762-4768, todo el documento.	1-8
Y	YUST, MdM. et al. "Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) protein hydrolysates. J. SCI. FOOD AGRIC. 01.07.2012. Vol. 92, N°. 9, páginas 1994-2001, todo el documento.	1-8
A	WANG, W. et al. "Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in <i>Olea europaea</i> ". 2001. INT. J. DEV. BIOL. Vol. 45, N° S1, páginas S63-S64, todo el documento.	1-8
A	ZEB, A. et al. "Olive (<i>Olea europaea</i> L.) seeds, from chemistry to health benefits. NUTS AND SEEDS IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION. 2011. Edited by: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. ISBN: 978-0-12-375688-6. 2011 Elsevier Inc. Páginas 847-853, todo el documento.	1-8

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
29.10.2013

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/5

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

C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-8	NO

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

Base de la Opinión.-

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

Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento de obtención de un extracto peptídico que tiene propiedades antioxidantes, a partir de semillas de aceituna. El contenido de las semillas de aceituna se somete a hidrólisis con la enzima Alcalasa y los péptidos originados, se recuperan en el sobrenadante después de someter la solución de hidrólisis a centrifugación. El extracto obtenido, presenta actividad antioxidante.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZHENBAO, Z. et al. "Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (<i>Prunus armeniaca</i> L.) kernel protein hydrolysate". EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY. Mayo 2010, Vol. 231, Nº 1, páginas 13-19.	
D02	UDENIGWE, C.C. et al. "Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of flaxseed protein-derived high Fisher ratio peptide mixture". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.04.2010. Vol. 58, nº 8, páginas 4762-4768.	
D03	YUST, MdM. et al. "Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) protein hydrolysates. J. SCI. FOOD AGRIC. 01.07.2012. Vol. 92, Nº. 9, páginas 1994-2001.	
D04	WANG, W. et al. "Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in <i>olea europaea</i> ". 2001. INT. J. DEV. BIOL. Vol. 45, Nº S1, páginas S63-S64.	
D05	ZEB, A. et al. "Olive (<i>Olea europaea</i> L.) seeds, from chemistry to health benefits. NUTS AND SEEDS IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION. 2011. Edited by: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. ISBN: 978-0-12-375688-6. 2011 Elsevier Inc. Páginas 847-853.	

El documento D01, describe la producción de extractos de péptidos de bajo peso molecular obtenidos por hidrólisis de las proteínas de semillas de albaricoques con seis proteasas diferentes. Los extractos peptídicos obtenidos presentan actividad antihipertensiva. La mayor actividad antihipertensiva se obtiene en los extractos obtenidos después de hidrólisis con las enzimas Alcalasa y Proleather.

El documento D02, describe la producción de extractos de péptidos de bajo peso molecular obtenidos por hidrólisis de las proteínas de semillas de lino. La hidrólisis se realiza con termolisina seguida de pronasa y se obtiene un extracto peptídico que tiene actividad antioxidante e inhibidora de ACE (angiotensin converting enzyme).

El documento D03, describe la producción de un extracto de péptidos, obtenidos por hidrólisis secuencial con alcalasa y flavourzyme de las proteínas de garbanzo. Se obtiene un extracto peptídico que tiene actividad antioxidante.

El documento D04, describe las proteínas de almacenamiento de las semillas de aceituna. Se identifican las dos proteínas mayoritarias presentes en las semillas denominadas Solea I y II, que presentan alta homología con las proteínas 11S.

El documento D05, describe los beneficios para la salud de los aceites contenidos en los frutos y semillas del olivo. No se hace mención a las propiedades beneficiosas para la salud de las proteínas contenidas en los frutos y semillas del olivo.

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

NOVEDAD

Reivindicaciones 1-8

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa péptidos con propiedades medicinales relacionados con las proteínas contenidas en las semillas de aceituna. El procedimiento de hidrólisis enzimática con Alcalasa de las proteínas de semillas de aceituna que da lugar a un extracto peptídico que presenta propiedades antioxidantes, es nuevo y por tanto las reivindicaciones 1-8 de la presente solicitud, cumplen los requisitos de novedad del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-8

La búsqueda de productos derivados de proteínas contenidas en los alimentos que presentan características farmacológicas y que mejoran el estado general de los consumidores (nutracéuticos), está ampliamente descrita en el estado de la técnica. Se han descrito péptidos activos obtenidos por hidrólisis tanto de proteínas animales (carne, pescado, proteínas de la leche) como vegetales (albaricoques, garbanzos, semillas de lino, guisantes), ver documentos D01-D03. Los extractos de los péptidos obtenidos por hidrólisis, presentan actividad que puede ser antioxidante, antihipertensiva, reductora de los niveles de colesterol, etc. mientras que las proteínas de las que derivan, no presentan dicha actividad. Es fundamental recurrir al procedimiento de hidrólisis para generar los péptidos activos.

Se ha observado analizando los documentos del estado de la técnica D01-D03, que los investigadores que buscan péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva, suelen utilizar como enzimas hidrolíticas Alcalasa y Termolisina. La Alcalasa es una proteasa de amplia especificidad por todos los enlaces peptídicos pero tiene preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos; la Termolisina hidroliza los enlaces de aminoácidos hidrofóbicos como F, Y, L, I y V. Aunque no se ha descrito en el estado de la técnica que las proteínas de las semillas de aceituna producen por hidrólisis, péptidos que pueden ser utilizados como nutracéuticos, el experto en la materia que desease identificarlos, intentaría en primer lugar aplicar al extracto de proteína total, los métodos de hidrólisis enzimática descritos en los documentos D01-D03 con una expectativa razonable de éxito; por ello se considera que dichas reivindicaciones 1-8, carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.