

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 092**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3472 (2006.01)

A23B 4/14 (2006.01)

C11B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/US2013/050598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13742114 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2877043**

54 Título: **Uso de antioxidantes novedosos para piensos y alimentos como conservantes basados en enzimas antioxidantes extraídos de la sangre de animales**

30 Prioridad:

16.07.2012 US 201261671817 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.05.2019

73 Titular/es:

**CLEMSON UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
391 College Avenue, Suite 401
Clemson, SC 29634, US**

72 Inventor/es:

**REUKOV, VLADIMIR y
VERTEGEL, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 713 092 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de antioxidantes novedosos para piensos y alimentos como conservantes basados en enzimas antioxidantes extraídos de la sangre de animales

Antecedentes de la invención

5 Los antioxidantes son componentes vitales de la industria alimentaria, que tiene una influencia principal sobre la salud y el bienestar globales. Los antioxidantes evitan la rancidez provocada por la oxidación de lípidos. Otras industrias también utilizan antioxidantes, incluyendo, pero sin limitarse a, las que producen colorantes, pinturas y otros materiales basados en aceite. La mayoría de los antioxidantes usados actualmente son sustancias químicas sintéticas, y existe una preocupación global entre las autoridades normativas y los clientes con respecto a la
10 seguridad de estos compuestos. Existe un cambio principal hasta antioxidantes de procedencia natural en respuesta a estas y otras cuestiones de salud relativas a los antioxidantes sintéticos. No obstante, los antioxidantes naturales actualmente disponibles en el mercado son mucho más caros y, con frecuencia, no tan eficaces como sus contrapartes sintéticas. De este modo, existe demanda de antioxidantes naturales capaces y no costosos.

15 Muchos productos alimentarios incluyendo alimentos para humanos, alimentos para mascotas y piensos para animales, contienen grasas y aceites procedentes de materiales clarificados. La clarificación es el procedimiento de conversión de los tejidos animales incomedibles tales como tendones, huesos y órganos en materiales estables con valor añadido. La mayoría del material procesado procede de mataderos pero también puede proceder de restaurantes, carnicerías o tiendas de ultramarinos. Las fuentes más comunes de material clarificado son cerdo, vacuno, pollo, pavo, oveja y pescado. La clarificación incluye un procedimiento de separación del material de partida en dos corrientes por separado de materiales clarificados - (1) materiales de alto contenido en grasa y (2) materiales de bajo contenido en grasa que contienen hueso, ceniza y proteínas. De este modo, se pueden obtener dos rendimientos por separado tras completar el procedimiento de clarificación - un producto de alto contenido en grasa y un producto de bajo contenido en grasa, tal como un alimento proteico. El material clarificado se puede usar en más de 3.000 aplicaciones industriales. Por ejemplo, el componente de alto contenido en grasa se puede
20 comercializar como manteca o sebo o se puede usar como fuente de biocombustible. Adicionalmente, el componente de alto contenido en grasa se puede usar en jabones, lubricantes, detergentes, productos cosméticos, otros productos de higiene personal o piensos mejorados para animales. Al mismo tiempo, el componente de bajo contenido en grasa, tal como alimento proteico, también se puede usar como pienso para animales. Existen más de 250 instalaciones de clarificación en Norte América que producen más de 20.000 millones de libras (9,1 millones de toneladas) de material clarificado al año. Aproximadamente un 50 % de la cantidad total del material clarificado constituye grasas y aceites.

25 Las grasas y aceites clarificados son componentes importantes en los piensos para animales. No obstante, las grasas y aceites clarificados se pueden degradar por medio de procesos de auto-oxidación de lípidos que pueden disminuir el valor nutritivo de los piensos para animales preparados con grasas y aceites clarificados. Además, la oxidación puede afectar al aroma, color, olor y textura de los piensos, lo cual puede afectar a la palatabilidad. Por ejemplo, determinados ácidos grasos tales como ácido linoleico y ácido linolénico contienen enlaces carbono-carbono insaturados que pueden ser inestables y muy susceptibles a la auto-oxidación de lípidos.

30 <Xueming Xu et al., "Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma", Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 89, No. 11, 30 Agosto 2007, p. 1897-1903 describen que la recuperación de la sangre porcina y la conversión en productos de alto valor resulta deseable desde un punto de vista ambiental y de rentabilidad. En su estudio, se investigaron las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de plasma porcino PPE y PPA preparados con pepsina y papaina.

35 En Liu Q. et al., "Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis", Food Chemistry, Elsevier Ltd., NL, Vol. 118, No. 2, 15 Enero 2010, páginas 403-410, se investigaron la actividad antioxidante y las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteína de plasma sanguíneo porcino preparados con alcalasa a un 6,2 %, 12,7 % y un 17,6 % de grado de hidrólisis. Encontraron que el péptido con la actividad antioxidante más intensa tuvo la secuencia de aminoácidos His-Asn-Gly-Asn. Además, estos resultados indican que los hidrolizados de proteína de plasma sanguíneo porcino se podían usar como antioxidante, pero que estos hidrolizados fueron de utilidad limitada como agentes emulsionantes y espumantes.

40 Jin-Zhi Wang et al., "Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin", Journal of Food Biochemistry, Vol. 32, 12 Mayo 2007, páginas 693-707 investigaron las propiedades antioxidantes de hidrolizados de albúmina de plasma porcino y globulina obtenidos por medio de hidrólisis con alcalasa. Se separaron los péptidos obtenidos en cinco grupos de acuerdo con su peso molecular por medio de ultrafiltración. Encontraron que las fracciones de péptido con menor peso molecular (< 3 kDa) tuvieron una potencia de reducción mayor en comparación con las fracciones de péptido que tenían un peso molecular mayor.>

45 Aunque se añadieron antioxidantes como conservantes alimentarios para evitar la degradación de las grasas y lípidos presentes en los componentes del pienso para animales procedentes de materiales clarificados, muchos de estos antioxidantes, tales como etoxiquina, tocoferoles mixtos (vitamina E), vitamina C e hidroxitolueno

butilado/hidroxianisol butilado, son costosos y se deben obtener a partir de una fuente externa a la industria de la clarificación. Además, la FDA y otras agencias normativas, así como los consumidores, han expresado su preocupación sobre la seguridad de los antioxidantes sintéticos tales como etoxiquina. Como tal, la industria de clarificación busca disoluciones naturales para ampliar el período de caducidad de sus productos de manera permitida al tiempo que se mantiene la frescura y calidad del producto. De este modo, lo que se demanda en la técnica es un potente antioxidante que se pueda usar como conservante alimentario procedente de la industria de clarificación, tal como subproductos de origen animal, de manera rentable y se pueda obtener de forma sencilla y eficaz. Más ampliamente, resulta necesario y existe demanda por parte del cliente de un antioxidante natural potente y no costoso que se pueda usar en diversos tipos de alimentos, incluyendo alimentos para humanos, alimentos para mascotas y piensos para animales. También se demanda un procedimiento de extracción de antioxidantes a partir de subproductos de origen animal sin el uso de disolventes orgánicos, que sea rentable y supere los problemas de seguridad.

Sumario de la invención

En términos generales, la presente divulgación va destinada al uso de una forma antioxidante de una fuente natural como conservante para alimentos o piensos.

La presente divulgación va destinada al uso de un antioxidante para conservación de un producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antioxidante se extrae a partir de la sangre de un animal. El antioxidante comprende superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Además, el antioxidante puede estar generalmente libre de hemoglobina. Se debería comprender que el antioxidante no tiene que purificarse por completo y puede contener otros componentes de la sangre y otros compuestos añadidos durante el procesado de la sangre para lograr una purificación parcial, tal como compuestos añadidos para retirar la hemoglobina o para aumentar la concentración de antioxidante.

La extracción del antioxidante de la sangre del animal puede incluir la obtención de una muestra de sangre del animal, en la que la sangre del animal contiene eritrocitos; someter a lisis los eritrocitos para formar una disolución que contiene el antioxidante; y tratar la disolución para retirar la hemoglobina de la disolución, tal como por medio de tratamiento de la disolución con al menos un compuesto o retirada de la hemoglobina por un medio físico, tal como ultrafiltración o electroforesis. En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto inorgánico. El compuesto inorgánico puede ser una sal metálica, tal como, por ejemplo una sal de cinc, u otro compuesto que contiene cinc. El compuesto inorgánico se puede añadir a una concentración que varía de un 0,1 % en peso/volumen hasta aproximadamente un 20 % en peso/volumen del volumen de la disolución. En algunas realizaciones, el antioxidante puede estar en forma de una disolución aplicada a una concentración que varía de aproximadamente 0,1 microlitros por gramo de producto alimentario a aproximadamente 100 microlitros por gramo de producto alimentario. El antioxidante puede estar en estado purificado, y el producto alimentario puede ser un alimento para mascotas, pienso para animales o un alimento para consumo humano.

Breve Descripción de las Figuras

Una divulgación completa y útil de la presente materia objetivo, incluyendo el modo mejor de la misma para el experto común en la técnica, se explica más particularmente en el resto de la memoria descriptiva, incluyendo la referencia a las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 ilustra un procedimiento de extracción de un antioxidante (es decir, superóxido dismutasa no purificada (SOD)) procedente de un subproducto animal (es decir, sangre) como se divulga en la presente memoria.

La Figura 2 muestra la actividad SOD de sangre de pollo no purificada de diversas muestras tras 20 semanas a 25 °C, en comparación con un control a 4 °C.

La Figura 3 muestra la actividad SOD de sangre de pollo no purificada de diversas muestras tras 40 semanas a 25 °C, en comparación con un control a 4 °C.

La Figura 4 es un gráfico que compara la actividad antioxidante de SOD no purificado extraído de subproductos de origen animal en comparación con la de los antioxidantes conservantes alimentarios usados actualmente por medio de un ensayo colorimétrico de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS).

La Figura 5 ilustra otro procedimiento de extracción de antioxidantes naturales no purificados ("proteína bruta" o CP) procedente de una fuente de animal (es decir, sangre).

La Figura 6 es un gráfico que compara la capacidad de los antioxidantes naturales en la proteína bruta de la presente divulgación con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario actualmente usados para evitar la oxidación en hamburguesas de pollo triturado. Se ha usado el ensayo de oxidación ferrosa - naranja de xilenol (FOS) para evaluar el grado de oxidación de las hamburguesas de pollo. La "proteína bruta" o CP en este caso y a continuación hace referencia a una mezcla no purificada de antioxidantes naturales, presente junto con otras biomoléculas y sustancias, obtenida por medio del procedimiento general ilustrado en la Figura 5.

La Figura 7 es un gráfico que compara la capacidad de los antioxidantes naturales en la "proteína bruta" de la presente divulgación con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario actualmente usados para evitar la oxidación de grasa de pollo usando un ensayo FOX.

La Figura 8 es un gráfico que compara la capacidad de los antioxidantes naturales en la proteína bruta de la

presente divulgación añadidos en diferente concentración con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario usado actualmente para evitar la oxidación en hamburguesas de pollo triturado usando ensayo FOX. Se encontró que un valor tan bajo como 17 microgramos de CP por gramo de alimento, o aproximadamente 17 litros de CP por tonelada de alimento era tan eficaz como 1000 ppm de PET-OX™ (basado en el contenido de

5 grasa), una concentración actualmente empleada en la industria. La Figura 9 es un gráfico que muestra la capacidad de los antioxidantes naturales en la "proteína bruta" de la presente divulgación para seguir siendo eficaz tras el envejecimiento acelerado a 50 °C durante 10 días en un modelo de carne de pollo triturada. Esto corresponde a aproximadamente 3 meses de período de caducidad a temperatura ambiente.

10 La Figura 10 es un gráfico que muestra la capacidad de los antioxidantes naturales en la "proteína bruta" de la presente divulgación para seguir siendo eficaz tras el envejecimiento acelerado a 50 °C en un modelo de grasa de pollo.

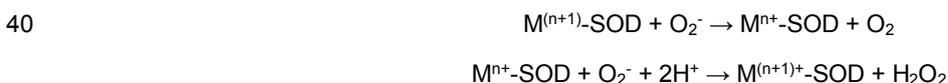
15 La Figura 11 es un gráfico que compara la actividad antioxidante de una disolución de proteína bruta, concentrado SOD, 1000 U/ml catalasa, PET-OX™ y agua (sin actividad antioxidante) cuando se aplica a hamburguesas de ternera usando un ensayo fluorométrico TBARS.

La Figura 12 es un gráfico que compara la actividad antioxidante de una disolución de proteína bruta, concentrado de SOD obtenido usando el procedimiento mostrado en la Figura 1, 1000 U/ml SOD, 1000 U/ml de catalasa, PET-OX™ y agua (sin antioxidante) cuando se aplica a grasa de pollo usando un ensayo de FOX.

20 **Descripción detallada de realizaciones preferidas**

En general, se divulga en la presente memoria un antioxidante que se usa como conservante alimentario. En particular, los antioxidantes procedente de eritrocitos (hematíes) de la sangre, como RBC son vehículos naturales de oxígeno y están equipados con un sistema antioxidante altamente eficaz que incluye un número de enzimas y compuestos antioxidantes. Estos antioxidantes incluyen glutatión, enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa y otras biomoléculas y compuestos, algunos de los cuales pueden resultar aún desconocidos. Estos antioxidantes se pueden aislar a partir de la sangre en forma purificada pero en muchas circunstancias se pueden usar en forma parcialmente purificada, en una mezcla con otros componentes de la sangre. En muchos casos, el uso de mezclas de antioxidante parcialmente purificada puede resultar beneficioso debido a los costes de producción más bajos. Una vez que se ha producido la extracción de los antioxidantes, tal como en forma de "proteína bruta" parcialmente purificada, los antioxidantes se añaden posteriormente al pienso para animales, pienso para mascotas, alimento para consumo humano, aceites o cualquier otro producto alimentario en el que la oxidación constituye un problema.

Uno de los antioxidantes objeto de extracción es la superóxido dismutasa (SOD) que puede proceder de la industria de clarificación, tal como procedente de subproductos de origen animal. Los antioxidantes no purificados se extraen de sangre de animal y se usan como conservante alimentario. SOD es una enzima que funciona como agente de neutralización de radicales libres. A nivel celular, SOD compite con las reacciones de oxidación perjudiciales, protegiendo a las células de este modo frente a la toxicidad por oxidación. SOD puede catalizar la dismutación de superóxido en agua oxigenada y oxígeno menos tóxicos. La dismutación catalizada por SOD de superóxido se puede escribir con las siguientes semi-reacciones:



en las que M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2). En la presente reacción, el estado de oxidación del catión metálico oscila entre n y n+1. La reacción de oxidación tiene lugar de forma rápida en la célula para proteger las dianas celulares sensibles y críticas, tales como lípidos en la membrana celular.

45 De manera beneficiosa, SOD se puede extraer de la sangre del animal a coste relativamente bajo. SOD se extrae y se almacena en forma de un concentrado de enzima no purificado de manera que mantiene al menos un 50 % o más de su actividad antioxidante inicial. Además, dicho concentrado de enzima no purificado también exhibe actividad catalasa - otra enzima eficaz frente a agua oxigenada, que puede actuar sinérgicamente con SOD, y reducir el peróxido, formado a partir del superóxido. Una revisión general del procedimiento de extracción no de acuerdo con la invención se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 1. En el procedimiento 100 de la Figura 1, en primer lugar, el tejido animal bruto se puede obtener a partir de cualquier fuente, tal como una planta de pollo/matadero. El tejido animal bruto es sangre, ya que la sangre se puede procesar de forma sencilla de acuerdo con un procedimiento de extracción. Se puede utilizar cualquier fuente de sangre incluyendo, sin limitación, vacuno, porcino, aves, oveja, pollo o cualquier otra fuente de origen animal.

55 La fuente de sangre se puede procesar para concentrar aquellos componentes de la sangre que contienen SOD. Por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que se utiliza sangre bruta, se puede procesar ésta para obtener un material que tenga una concentración elevada de hematíes. A modo de ejemplo, la sangre bruta se puede centrifugar, por ejemplo a una tasa de aproximadamente 250 g (fuerza centrífuga relativa) hasta aproximadamente 750 g, tal como una tasa de aproximadamente 500 g, con el fin de separar la sangre y obtener un producto que

tenga una concentración elevada de hematíes (RBC) en forma de gránulo. El sobrenadante (es decir, plasma y otros factores de coagulación) se pueden descartar o se pueden usar para otros fines. El gránulo que presenta elevado contenido de SOD se puede procesar de forma adicional para extraer el SOD. Por ejemplo, los hematíes se pueden lavar con Disolución Salina Tamponada de Fosfato 1x (PBS) para retirar cualquier plasma restante y/o factores de coagulación. A continuación, se puede someter el gránulo de RBC a lisis en una disolución de lisis, usando un volumen de disolución que sea el doble del volumen del gránulo de RBC. La disolución de lisis generalmente puede incluir cloruro de amonio 0,15 M (NH₄Cl), bicarbonato potásico 10 mM (KHCO₃), ácido etilendiaminotetracético 0,1 mM (EDTA) y éter fenil octílico de polioxietileno al 1 % (Triton X-100) en agua destilada. El tratamiento del gránulo RBC en la disolución de lisis, produce la lisis de los hematíes y libera la enzima SOD junto con otros componentes de las células. La lisis se puede llevar a cabo durante aproximadamente 20-30 minutos, tal como aproximadamente 25 minutos, bajo agitación intensa. La disolución de lisis puede incluir agua desionizada fría (4 °C) con o sin adición de tensioactivos tales como TritonX u otros tensioactivos apropiados.

La fracción de hemolisis que contiene SOD se puede separar a continuación de los otros componentes de la mezcla. Por ejemplo, se pueden desnaturalizar otras proteínas sometiendo la fracción de hemolisis a tratamiento de Tsuchihashi donde el sobrenadante de la fracción de hemolisis se mezcla con etanol (aproximadamente 0,25 volúmenes del sobrenadante) y cloroformo (aproximadamente 0,15 volúmenes del sobrenadante). Durante el tratamiento, la fracción de hemolisis se agita intensamente durante aproximadamente 25 minutos, dando como resultado una disolución rojo-ladrillo. Posteriormente, se puede centrifugar la disolución a una tasa de aproximadamente 3000 g a aproximadamente 5000 g, tal como una tasa de aproximadamente 4000 g, durante aproximadamente 10-20 minutos, tal como durante aproximadamente 15 minutos, con el fin de separar las proteínas desnaturalizadas y la hemoglobina de los otros contenidos de hematíes sometidos a lisis en la fase de cloroformo. También se puede recoger el sobrenadante relativamente transparente (fase de etanol). A continuación, se pueden añadir aproximadamente 300 gramos/litro de fosfato de potasio (K₂HPO₄) al sobrenadante para mover la enzima SOD de la fase orgánica hasta la fase acuosa, donde se puede reactivar en un entorno iónico. Esta disolución se puede centrifugar a una tasa de aproximadamente 4000 g a aproximadamente 6000 g, tal como una tasa de aproximadamente 5000 g, para precipitar las proteínas extrañas adicionales y retirar el cloroformo que queda. A continuación, se puede recoger el sobrenadante amarillo claro que contiene el SOD.

Posteriormente, se pueden añadir acetona (almacenada a -20 °C) u otro disolvente orgánico al sobrenadante a una relación en volumen de 2:1, y se puede centrifugar la disolución resultante a una tasa de aproximadamente 4000 g a aproximadamente 6000 g, tal como de aproximadamente 5000 g, durante aproximadamente 10-20 minutos, tal como aproximadamente 15 minutos, para garantizar la precipitación de la proteína deseada de interés. En este momento, el SOD puede precipitar fuera de la acetona u otra disolución de disolvente, dando como resultado un precipitado de color crema. La acetona se puede recuperar a continuación, dejando la enzima SOD, que no se purifica, lo que significa que no experimenta purificación por medio de cromatografía o filtración de gel tras la precipitación a partir de la disolución. Posteriormente, la enzima SOD no purificada se puede lavar dos veces en PBS Dulbecco 1x, se centrifuga a una tasa de aproximadamente 4000 g a aproximadamente 6000 g, tal como una tasa de aproximadamente 5000 g, y se almacena en una disolución que puede incluir un estabilizador y/o un crioprotector tal como, sin limitación, trehalosa, sacarosa, dextrosa, manitol, glicerol, etc., o el SOD se puede liofilizar para uso futuro. La actividad SOD se puede medir en Unidades/mililitro de volumen inicial de sangre (U/ml de volumen inicial de sangre) por medio de un ensayo de actividad de SOD WST (sal de tetrazolio soluble en agua, (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonfenil)-2H-tetrazolio, sal de monosodio)) y puede variar de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 U/ml de sangre inicial. Además, la actividad de catalasa se puede medir usando un ensayo de actividad de catalasa y puede ser de aproximadamente 125 U/ml.

Debería comprenderse que el procedimiento descrito anteriormente es una manera de extraer enzimas antioxidativas no purificadas a partir de sangre de animales, aunque es posible simplificar el procedimiento incluso más, tal como por medio de la eliminación de disolventes orgánicos del procedimiento. Por ejemplo, en algunos casos, se pueden procesar las aves de corral vivas en una planta de aves de corral/pavo enviando las aves de corral/pavo a través de la cámara en una atmósfera controlada de CO₂. Dicho tratamiento proteger la sangre de las aves de corral frente a la coagulación, lo cual permite la retirada del EDTA (agente anti-coagulación) del procedimiento descrito con anterioridad. Además, se puede usar agua destilada para producir la lisis de RBC en lugar de Triton X, y el cloroformo usado en el tratamiento de suchihashi T se puede sustituir por un disolvente alternativo.

La extracción de proteína bruta se puede simplificar para evitar el uso de dichos disolventes orgánicos tales como acetona y cloroformo, que pueden resultar tóxicos. Dicho procedimiento también puede proporcionar ahorro de costes y puede tener como resultado la extracción simultánea de diversas biomoléculas que están implicadas en los mecanismos antioxidantes, incluyendo, superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. La composición de proteína bruta que contiene estas biomoléculas se puede extraer en primer lugar mediante la obtención de una fuente de origen animal, como se muestra en el procedimiento 200 de la Figura 5. La sangre se puede adquirir, por ejemplo, en una planta de procesamiento de aves de corral o de carne o matadero, tras el suministro/transporte o en cualquier otro momento durante el cual se procesa la fuente de origen animal en la instalación de clarificación.

A continuación, como se muestra de forma adicional en el procedimiento 200 de la Figura 5, después de obtener la sangre, se puede procesar, tal como por medio de centrifugación, para separar los eritrocitos/hematíes de los otros componentes, tales como plasma y factores de coagulación. Tras la retirada del sobrenadante, se puede añadir agua desionizada a RBC para facilitar la lisis celular. Estas etapas de separación y lisis se pueden omitir, por ejemplo si se somete a lisis los eritrocitos por vía mecánica durante el procesado (por ejemplo, durante el transporte o el bombeo). En la alternativa o junto con la adición de agua desionizada, se puede utilizar agitación mecánica o tratamiento por ultrasonidos para provocar la lisis de RBC. Además, aunque se muestra la lisis celular en la Figura 5 que se lleva a cabo tras la separación de RBC a partir de la sangre del animal, debe comprenderse que la lisis también se puede llevar a cabo en la sangre sin la separación previa de RBC con respecto a los otros componentes. Independientemente de si la lisis se lleva a cabo en la sangre o RBC únicamente, una vez que se ha completado la lisis celular, se puede añadir un compuesto o mezcla de dos o más compuestos a RBC sometidos a lisis para precipitar la hemoglobina y facilitar su retirada de los RBC sometidos a lisis. El compuesto de precipitación de hemoglobina puede ser un compuesto inorgánico tal como cualquier sal metálica apropiada. En una realización, la sal metálica puede ser sal de cinc. La sal de cinc puede ser cloruro de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc, etc. En otras realizaciones, se puede utilizar un disolvente orgánico tal como etanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, terc-butanol o una combinación de los mismos, para separar la hemoglobina de los RBC sometidos a lisis. También se puede usar otro medio químico (cambio de pH, fuerza iónica, etc.) o físico (cambio de temperatura, separación por densidad, etc.) para precipitar la hemoglobina. Además, se comprende que se puede utilizar cualquier medio físico para retirar la hemoglobina, tal como filtración a través de una membrana de separación por tamaño o campos electromagnéticos, ultrafiltración o electroforesis. En cualquier caso, la disolución resultante de RBC sometidos a lisis contiene la proteína bruta que incluye biomoléculas que tienen actividad antioxidante, tal como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Si se desea, cuando el compuesto de precipitación de hemoglobina es un compuesto inorgánico tal como una sal metálica, dicho compuesto se puede retirar de la disolución y se puede recoger la proteína bruta en forma de polvo por medio de la adición de, por ejemplo, una disolución concentrada de sulfato de amonio o nitrato de amonio.

Por ejemplo, se puede centrifugar aproximadamente 1 litro de sangre de animal a aproximadamente 1000 g a aproximadamente 10.000 g durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos para obtener los RBC empaquetados, que podrían alterarse químicamente con posterioridad por medio de mezcla con una disolución de agente de lisis (por ejemplo, agua desionizada o tensioactivo) o podrían someterse a lisis mecánica por medio de agitación intensa o aplicación de presión. A continuación, el compuesto de precipitación de hemoglobina se puede añadir a la fracción de lisis celular. El compuesto de precipitación de hemoglobina puede ser un disolvente orgánico tal como etanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, (2-metil-1-propanol), terc-butanol (2-metil-2-propanol) u otros disolventes similares que conducen a la precipitación de hemoglobina, como se conoce por los expertos en la técnica. El disolvente se puede añadir a la sangre a una concentración que varía de aproximadamente un 1 % en peso/volumen a aproximadamente un 50 % en peso/volumen, basado en el volumen de la disolución de sobrenadante. Por ejemplo, el disolvente se puede añadir a una concentración que varía de aproximadamente 2,5 % en peso/volumen a aproximadamente un 25 % en peso/volumen, tal como de aproximadamente un 5 % en peso/volumen a aproximadamente un 20 % en peso/volumen, tal como de aproximadamente un 7,5 % en peso/volumen a aproximadamente un 15 % en peso/volumen, basado en el volumen de la disolución. En una realización, el disolvente orgánico puede ser 1-butanol, que se puede añadir a una concentración de aproximadamente un 7 % en peso/volumen. En otra realización, el disolvente orgánico puede ser terc-butanol, que se puede añadir a una concentración de aproximadamente un 9 % en peso/volumen. En otra realización, se pueden añadir dos compuestos, en los cuales el primer compuesto puede ser etanol y el segundo compuesto puede ser 1-butanol, 2-butanol o isobutanol (2-metil-1-propanol). En dicha realización, el primer compuesto se puede añadir a una concentración que varía de aproximadamente un 5 % en peso/volumen a aproximadamente un 50 % en peso/volumen, mientras que el segundo compuesto se puede añadir a una concentración que varía de aproximadamente un 0,5 % en peso/volumen a aproximadamente un 30 % en peso/volumen, basado en el volumen de la disolución.

En otra realización, el compuesto de precipitación de hemoglobina puede ser un compuesto inorgánico, tal como una sal de cinc u otra sal metálica apropiada. Cuando el compuesto de precipitación de hemoglobina es una sal de cinc u otro metal, se puede aplicar a una concentración de aproximadamente un 0,1 % en peso/volumen a aproximadamente un 20 % en peso/volumen, tal como de aproximadamente un 0,5 % en peso/volumen a aproximadamente un 15 % en peso/volumen, tal como de aproximadamente un 1 % en peso/volumen a aproximadamente un 10 % en peso/volumen, basado en el volumen del sobrenadante. Después de añadir el compuesto de precipitación de hemoglobina, se puede incubar la disolución resultante durante aproximadamente 15 minutos, con agitación ocasional. La hemoglobina puede precipitar y posteriormente se puede retirar por medio de decantación o centrifugación a aproximadamente 1000 g a aproximadamente 5000 g durante un período de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos. También debe comprenderse que se pueden ejecutar procedimientos análogos en un sistema de flujo pasante.

Tras la extracción de los antioxidantes de proteína bruta en una disolución o forma de polvo, se aplica la disolución o el polvo a un producto alimentario para mascotas, un producto de pienso para animales, o un producto alimentario para consumo humano con el fin de evitar la oxidación. Por ejemplo, cuando están en forma de disolución, los antioxidantes extraídos de la sangre se pueden aplicar al producto en una concentración de aproximadamente 0,1

microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto hasta aproximadamente 100 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto, tal como de aproximadamente 2,5 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto hasta aproximadamente 90 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto, tal como de aproximadamente 5 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto hasta aproximadamente 75 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto. En una realización, el producto se puede aplicar a una concentración de aproximadamente 6,25 microlitros de disolución de antioxidante por gramo hasta aproximadamente 50 microlitros de disolución de antioxidante por gramo de producto.

Además, debe comprenderse que la propia disolución de antioxidante de proteína bruta se puede concentrar tras la extracción a partir de la sangre. Por ejemplo, en algunos casos, la disolución de antioxidante puede ser una disolución concentrada de aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 10 veces, tal como de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 8 veces, tal como de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 6 veces. En una realización, por ejemplo, la disolución de antioxidante aplicada al producto puede ser una disolución concentrada 5 veces.

Los procedimientos de extracción de antioxidante y los antioxidantes no purificados resultantes que se usan (es decir, un antioxidante que no se ha purificado usando cromatografía o filtración de gel) como conservante para alimentos o piensos, como se divulga en la presente memoria, se puede comprender mejor con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo comparativo 1

Haciendo referencia a la Figura 2, se determinó la actividad en U/ml de SOD extraído por medio del procedimiento de la Figura 1, que se almacenó en diversas disoluciones durante 20 semanas a una temperatura de 25 °C, en comparación con una muestra de control almacenada a 4 °C, de la siguiente forma. Con el fin de determinar la actividad antioxidante de SOD no purificado en unidades por mililitro (U/ml), se puede usar un ensayo de SOD con sal de tetrazolio soluble en agua, WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal de monosodio). En este ensayo, WST-1 produce un colorante de formazano soluble en agua tras la reducción con el anión de superóxido. La tasa de reducción de WST-1 con O₂⁻ está linealmente relacionada con la actividad de xantina oxidasa (XO) y esta reducción está inhibida por SOD.

A modo de control, se determinó que la actividad de una muestra de SOD en disolución y mantenida a 4 °C fue de 100 U/ml. Al mismo tiempo, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de trehalosa al 1 % fue de aproximadamente 100 U/ml hasta aproximadamente 125 U/ml, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de trehalosa al 10 % fue de aproximadamente 125 U/ml a aproximadamente 150 U/ml, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de sacarosa al 10 % fue de aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 125 U/ml, y la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de sacarosa al 1 % fue de aproximadamente 0 U/ml a aproximadamente 10 U/ml. La actividad de una muestra de SOD almacenada en disolución sin aditivos fue de aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 125 U/ml.

Ejemplo comparativo 2

A continuación, como se muestra en la Figura 3, se determinó la actividad en U/ml de SOD almacenado en diversas disoluciones durante 40 semanas a una temperatura de 25 °C, en comparación con una muestra de control almacenada a 4 °C, de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1 anterior. A modo de control, se determinó que la actividad de una muestra de SOD en disolución y mantenida a 4 °C fue de 100 U/ml. Al mismo tiempo, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de trehalosa al 1 % fue de aproximadamente 90 U/ml hasta aproximadamente 105 U/ml, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de trehalosa al 10 % fue de aproximadamente 70 U/ml a aproximadamente 80 U/ml, la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de sacarosa al 10 % fue de aproximadamente 90 U/ml a aproximadamente 150 U/ml, y la actividad de una muestra de SOD almacenada en una disolución de sacarosa al 1 % fue de aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 150 U/ml. La actividad de una muestra de SOD almacenada en disolución sin aditivos fue de aproximadamente 100 125 U/ml. Los Ejemplos 1 y 2 muestran que los extractos de SOD obtenidos usando el procedimiento mostrado en la Figura 1 y almacenados sin ningún estabilizador permanecen estables y activos durante al menos 40 semanas si se almacenan a temperatura ambiente.

Ejemplo comparativo 3

Además, como se muestra en la Figura 4, se determinó la eficacia antioxidante de extractos SOD en un sistema alimentario modelo. En este ensayo particular, se ha usado un modelo de lípido-aceite de cártamo. Se determinaron los niveles de oxidación de las muestras de aceite de cártamo tratadas con SOD usando un ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA) y se compararon con los de las muestras de aceite de cártamo tratadas por medio de tres antioxidantes comercialmente disponibles actualmente usados en conservantes alimentarios - PET-OX™ (Pet), NATUROX™ (Na) y NATUROX PLUS™ (Na-TX). PET-OX™ es un antioxidante sintético actualmente usado en alimentación animal que contiene hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Generalmente, se usa en alimentación animal a una concentración de aproximadamente 150 partes por millón (ppm) a aproximadamente 500

ppm. Al mismo tiempo, NATUROX™ y NATUROX PLUS™ son antioxidantes naturales que contienen tocoferoles mixtos. Tras el tratamiento de las muestras de alimentación animal con diversas concentraciones de tres tipos de antioxidantes, se llevó a cabo el ensayo de ácido barbitúrico (TBA), y se midió el nivel de TBA presente como absorbancia a 532 nm que correspondía al nivel de oxidación de lípidos. Además, una muestra que tenía una absorbancia menor correspondió a una cantidad menor de oxidación de la muestra alimentaria.

En primer lugar, la muestra de control no se trató con un antioxidante y tuvo una absorbancia de 0,7 a aproximadamente 0,8. Una muestra tratada con 10 ppm de NATUROX™ y una muestra tratada con 10 ppm de NATUROX PLUS™ tuvieron ambas una absorbancia de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7. Al mismo tiempo, una muestra tratada con 10 ppm de PET-OX™ tuvo una absorbancia de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4. Aumentando la concentración de PET-OX™ hasta 100 ppm, se redujo la absorbancia hasta una nivel de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1, indicando un nivel menor de oxidación. Cuando se trató una muestra con 6,2 ppm de extracto de SOD, la muestra tuvo una absorbancia de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1. De este modo, una muestra tratada con únicamente 6,2 ppm de SOD exhibe una cantidad similar de oxidación que una muestra tratada con 100 ppm del antioxidante PET-OX™.

De este modo, aunque el antioxidante SOD de la presente divulgación no se purifique por medio de cromatografía o procedimientos de filtración de gel, el gráfico de la Figura 4 demuestra que el procedimiento descrito en la presente memoria da lugar todavía a un antioxidante potente que puede evitar la oxidación de, por ejemplo, grasas y aceites en alimentación para animales. No obstante, se comprende que el producto de SOD no purificado descrito en la presente memoria, así como el procedimiento de extracción del producto de SOD no purificado, también se puede usar en otros productos además de los alimentos o piensos para animales, tales como pinturas, masillas, plásticos o cualesquiera otros productos que presenten riesgo de oxidación.

Ejemplo 1

El Ejemplo 1 hace referencia a la Figura 6, que compara la capacidad de los antioxidantes naturales en la proteína bruta de la presente divulgación con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario actualmente usados para evitar la oxidación en hamburguesas de pollo triturado. Se obtuvo la proteína bruta por medio del procedimiento de la Figura 5, donde se usó cloruro de cinc para separar la hemoglobina de los RCB a partir de la disolución de proteína bruta, que contiene los antioxidantes. Posteriormente, se aplicó la proteína bruta a una primera muestra de carne de pollo a una concentración de 50 microlitros por gramo, una segunda muestra de carne de pollo a una concentración de 25 microlitros por gramo, una tercera muestra de carne de pollo a una concentración de 12,5 microlitros por gramo, y una cuarta muestra de carne de pollo a una concentración de 6,25 microlitros por gramo. La concentración de cinc en todas las muestras de proteína bruta fue de 250 ppm. Con fines de comparación, se aplicó etoxiquina a una quinta muestra de carne de pollo a una concentración de 150 partes por millón (ppm) basado en el peso total, se aplicó PET-OX™ a una sexta de carne de pollo a una concentración de 1000 ppm basado en contenido de grasa, y se aplicó agua a una séptima muestra de carne de pollo como control. Se sometieron estas siete muestras a oxidación a 50 °C durante 12 horas. Se dejó una octava muestra que no tenía tratamiento como control no oxidado y se almacenó en un frigorífico a 4 °C.

Trascurridas 12 horas, se llevó a cabo un ensayo ferroso de xilenol-oxidación (FOX) sobre las muestras para determinar la absorbancia (densidad óptica) de la disolución restante a 560 nanómetros, donde una lectura de absorbancia menor corresponde con un nivel menor de oxidación. Como se muestra, las disoluciones de proteína bruta de la presente invención tuvieron una absorbancia menor de aproximadamente 0,3, que fue similar a las lecturas de los antioxidantes actualmente disponibles (etoxiquina y PET-OX™), que no son seguros y son más costosos. La absorbancia de las cuatro muestras de proteína bruta fue también similar a la absorbancia de la muestra que no se sometió a oxidación, lo cual indica que las disoluciones de proteína bruta extraídas por medio del procedimiento de la presente divulgación y aplicadas a carne de pollo a concentraciones que varían de aproximadamente 6,25 microlitros por gramo a aproximadamente 50 microlitros por gramo resultan eficaces para evitar la oxidación de la carne de pollo.

Ejemplo 2

El Ejemplo 2 se resume por medio de la Figura 7, que es un gráfico que compara la capacidad de los antioxidantes naturales de la proteína bruta de la presente divulgación con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario actualmente usados para evitar la oxidación en grasa de pollo líquida. Se extrajo la proteína bruta de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 5, presentando la disolución resultante biomoléculas de antioxidante natural. La disolución de proteína bruta se mezcló con grasa de pollo líquida de forma que la proteína bruta estuviera presente en una primera muestra a una concentración de 250 microlitros por gramo de grasa, en una segunda muestra a una concentración de 100 microlitros por gramo de grasa, y en una tercera muestra a una concentración de 20 microlitros por gramo de grasa. Con fines de comparación, se aplicó PET-OX™ a una cuarta muestra de grasa de pollo a una concentración de 500 ppm. No se trató una quinta muestra de grasa de pollo con un antioxidante (por ejemplo, control oxidado). Se sometieron estas cinco muestras a oxidación a 50 °C durante 12 horas. Se dejó una sexta muestra que no tenía tratamiento como control no oxidado y se almacenó en un frigorífico a 4 °C.

Trascurridas 12 horas, se llevó a cabo un ensayo ferroso de xilenol-oxidación (FOX) sobre las muestras para determinar la absorbancia (densidad óptica) de la disolución restante a 560 nanómetros, donde una lectura de absorbancia menor corresponde con un nivel menor de oxidación. Como se muestra, las disoluciones de proteína bruta de la presente invención tuvieron una absorbancia menor de aproximadamente 0,125, que fue similar a las lecturas de PET-OX™, que no son seguros y son más costosos. La absorbancia de las tres muestras de proteína bruta fue también similar a la absorbancia de la muestra que no se sometió a oxidación y mucho menor que la muestra no tratada que se sometió a oxidación, lo cual indica que las disoluciones de proteína bruta extraídas por medio del procedimiento de la presente divulgación y aplicadas a carne de pollo a concentraciones que varían de aproximadamente 20 microlitros por gramo a aproximadamente 250 microlitros por gramo resultan eficaces para evitar la oxidación de la grasa de pollo líquida.

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 hace referencia a la Figura 8, que compara la capacidad de los antioxidantes naturales en la proteína bruta de la presente divulgación con la capacidad de los antioxidantes de conservante alimentario actualmente usados para evitar la oxidación en hamburguesas de pollo triturado. Se extrajo la proteína bruta de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 5, presentando la disolución resultante biomoléculas de antioxidante natural. La disolución de proteína bruta se mezcló con hamburguesas de pollo triturado de forma que la proteína bruta estuviera presente en una primera muestra a una concentración de 50 microlitros por gramo de carne triturada, en una segunda muestra a una concentración de 25 microlitros por gramo de hamburguesa de pollo triturado y en una tercera muestra a una concentración de 17 microlitros por gramo de hamburguesa de pollo triturado. Con fines de comparación, se aplicó PET-OX™ a una cuarta muestra de hamburguesa de pollo triturado a una concentración de 500 ppm. No se trató una quinta muestra de hamburguesa de pollo triturado con un antioxidante (por ejemplo, control oxidado). Se sometieron estas cinco muestras a oxidación a 50 °C durante 12 horas. Se dejó una sexta muestra que no tenía tratamiento como control no oxidado y se almacenó en un frigorífico a 4 °C.

Trascurridas 12 horas, se llevó a cabo un ensayo ferroso de xilenol-oxidación (FOX) sobre las muestras para determinar la absorbancia (densidad óptica) de la disolución restante a 560 nanómetros, donde una lectura de absorbancia menor corresponde con un nivel menor de oxidación. Como se muestra, las disoluciones de proteína bruta de la presente invención tuvieron una absorbancia menor de aproximadamente 0,2, que fue similar a las lecturas de PET-OX™, que no son seguros y son más costosos. La absorbancia de las tres muestras de proteína bruta fue también similar a la absorbancia de la muestra que no se sometió a oxidación y mucho menor que la muestra no tratada que se sometió a oxidación, lo cual indica que las disoluciones de proteína bruta extraídas por medio del procedimiento de la presente divulgación y aplicadas a hamburguesas de pollo triturado a concentraciones que varían de aproximadamente 17 microlitros por gramo a aproximadamente 50 microlitros por gramo resultan eficaces para evitar la oxidación de las hamburguesas de pollo triturado.

Ejemplo 4

El Ejemplo 4, que hace referencia a la Figura 9, muestra la capacidad de los antioxidantes naturales de la proteína bruta de la presente divulgación para seguir siendo eficaces tras el envejecimiento acelerado durante 10 días a 50 °C, que es equivalente a 3-4 meses a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, y más de 1 año a temperatura refrigerada de aproximadamente 4 °C. Se envejecieron las muestras de proteína bruta durante 4 días, 8 días y 10 días, y se incubó con carne de pollo triturado; se sometieron las muestras a oxidación a 50 °C durante 12 horas. Se evaluaron los niveles de oxidación usando un ensayo FOX; cada muestra tratada por medio de la proteína bruta tuvo una absorbancia de menos de 0,3 cuando se determinó a una longitud de onda de 560 nanómetros. Esto fue similar a la absorbancia de la muestra incubada con PET-OX™ (1000 ppm basado en el contenido de grasa), que no se sometió a envejecimiento acelerado que experimentaron las disoluciones de antioxidante de proteína bruta.

Los resultados del Ejemplo 4 muestra que la proteína bruta sometida a extracción por medio del procedimiento de la presente divulgación pueden tener un período de caducidad de al menos aproximadamente 3-4 meses a temperatura ambiente, lo cual resulta apreciable ya que muchas proteínas y enzimas son frágiles y tienen un período de caducidad limitado.

Ejemplo 5

El Ejemplo 5, que hace referencia a la Figura 10, demuestra la capacidad de los antioxidantes naturales de la proteína bruta de la presente divulgación para seguir siendo eficaces tras el envejecimiento acelerado a 50 °C durante hasta 10 días cuando se usa para tratar grasa de pollo. Igual que en el Ejemplo 4, la muestra tratada con PET-OX™ no se incubó a 50 °C. Al mismo tiempo, la disolución de proteína bruta de la presente divulgación se envejeció durante 1 día, 2 días, 3 días 4 días, 5 días y 10 días, después de lo cual se mezclaron 25 microlitros de la proteína bruta con 475 microlitros de la grasa de pollo. A continuación, se incubó la mezcla durante 12 horas a 50 °C, y se llevó a cabo el ensayo de FOX donde se determinó la absorbancia de cada una de las disoluciones a 560 nanómetros.

Como se muestra, incluso después de 10 días de envejecimiento acelerado, las disoluciones de proteína bruta de la presente divulgación exhibieron una absorbancia menor de 0,25, lo que demuestra que la proteína bruta fue capaz de evitar la oxidación de la grasa de pollo, y su eficiencia no se degradó durante el envejecimiento acelerado.

5 **Ejemplo 6**

El Ejemplo 6, que hace referencia a la Figura 11, compara la actividad antioxidante de una disolución de proteína bruta, concentrado SOD, 1000 U/ml de catalasa, PET-OXTM, y agua cuando se aplica a hamburguesas de ternera usando un ensayo de TBARS. Se obtuvo la proteína bruta usando el procedimiento de la Figura 5, en el que se obtuvo 1 milímetro entre 5 milímetros de sangre, donde la concentración de cinc fue de aproximadamente 4800 ppm. (No obstante, nótese que tras la adición de la disolución a la muestra de hamburguesa de ternera, se redujo el contenido final de cinc a aproximadamente 240 ppm). A continuación, se concentró la proteína bruta 5 veces usando filtración a través de una membrana con un valor límite de peso molecular de 3.000 Da para dar lugar a un concentrado de 5 veces. Se obtuvo el SOD usando el procedimiento de la Figura 1, donde se precipitó la hemoglobina por medio de una mezcla de etanol-cloroformo. Para el ensayo, se mezclaron 1,5 gramos de ternera triturada con 75 microlitros de antioxidantes y se incubó durante 12 horas a 37 °C, de forma que la concentración de antioxidantes por gramo de carne fuera de 50 microlitros por gramo. Tras tratar las hamburguesas de ternera con diversos antioxidantes, agua o control no incubado, se llevó a cabo el ensayo de TBA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1; no obstante, se midió el contenido de TBA usando fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 520 nm y una longitud de onda de emisión de 560 nm. El nivel de TBA presente en la muestra correspondió al nivel de oxidación presente en base a la lectura de fluorescencia. Además, una lectura de fluorescencia más baja correspondió a una cantidad menor de TBA en la muestra, lo cual correspondió a una cantidad menor de oxidación del pienso para animales.

Como se muestra, el concentrado de 5 veces de proteína bruta de la presente divulgación mostró la cantidad más baja de oxidación, seguido de 1000 ppm de PET-OXTM, a continuación el concentrado de SOD y a continuación 1000 U/ml de catalasa.

25 **Ejemplo 7**

El Ejemplo 7, que hace referencia a la Figura 12, compara la actividad de antioxidante de una disolución de proteína bruta obtenida usando el procedimiento de la Figura 5, concentrado de SOD obtenido usando el procedimiento de la Figura 1, 1000 U/ml de SOD, 1000 U/ml de catalasa, PETOXTM y agua cuando se aplica a grasa de pollo. Se usó agua como control negativo mientras que una muestra almacenada a 4 °C fue el control positivo. Se midieron los niveles de oxidación usando un ensayo FOX.

Como se muestra, la proteína bruta, el concentrado SOD, y PET-OXTM tuvieron absorbancias menores de 0,21 a 560 nanómetros y, de este modo, fueron eficaces en la prevención de la oxidación. La grasa de pollo tratada con agua únicamente exhibió el nivel de más alta de oxidación, mientras que 1000 U/ml de SOD bovino comercial y 1000 U/ml de catalasa evitaron la oxidación en menor medida que la proteína bruta, concentrado de SOD y PET-OXTM. La proteína bruta, concentrado SOD y PET-OXTM inhibieron aproximadamente un 85 % de la oxidación, mientras que 1000 U/ml de SOD disminuyó la oxidación en aproximadamente un 34 % y 1000 U/ml de catalasa disminuyó la oxidación en aproximadamente un 13 %.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un antioxidante para conservar un producto alimentario o de pienso, en el que el antioxidante se extrae de sangre de un animal, en el que el antioxidante procede de eritrocitos (hematíes) de la sangre del animal tras la retirada del plasma de la sangre del animal, en el que el antioxidante comprende superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa.
2. Uso del antioxidante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sangre de animal es sangre porcina, bovina o aviar.
3. Uso del antioxidante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antioxidante está generalmente libre de hemoglobina.
- 10 4. Uso del antioxidante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antioxidante está en forma de una disolución aplicada a una concentración que varía de 0,1 microlitros por gramo de producto alimentario a 100 microlitros por gramo de producto alimentario.

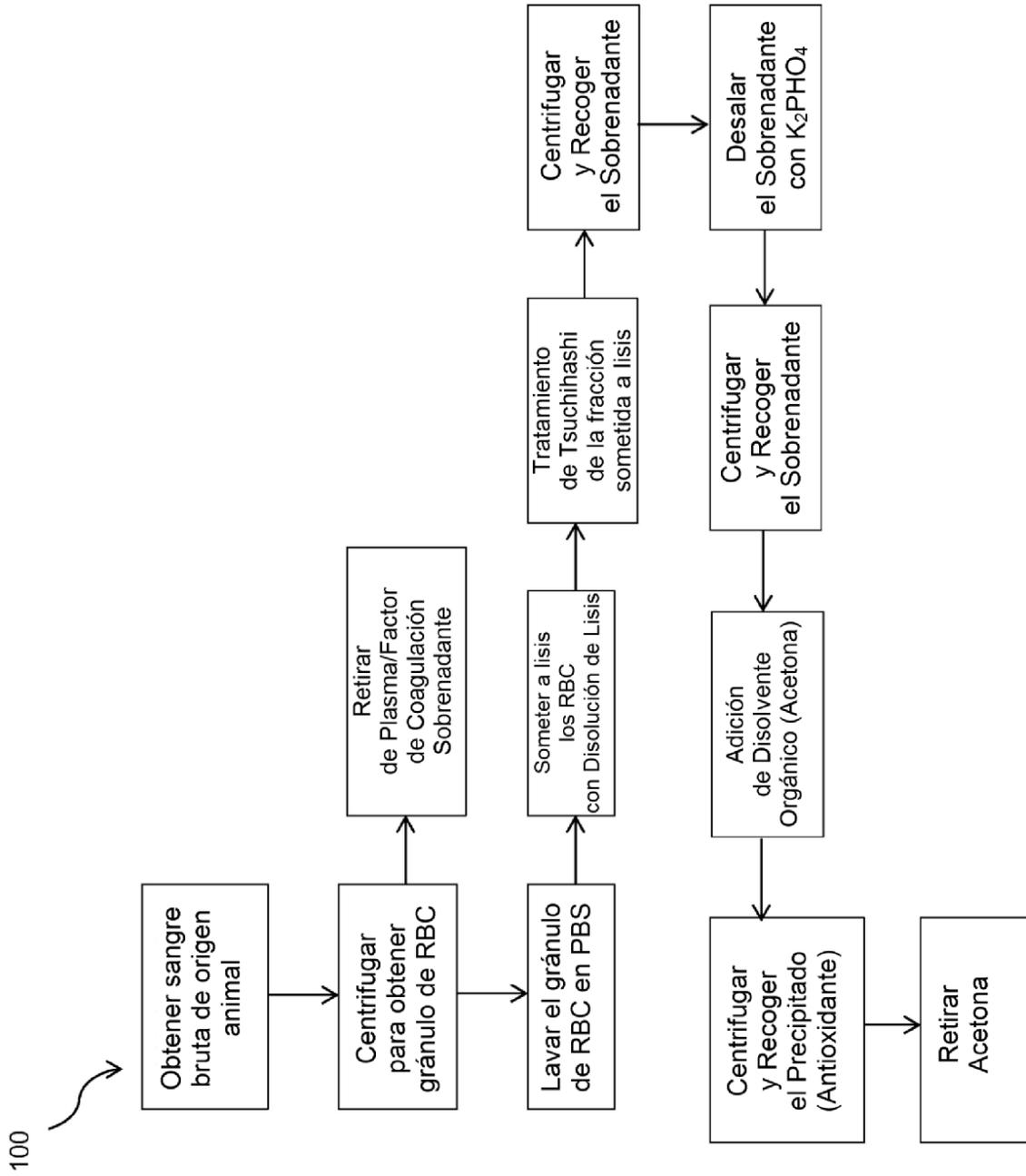


FIGURA 1

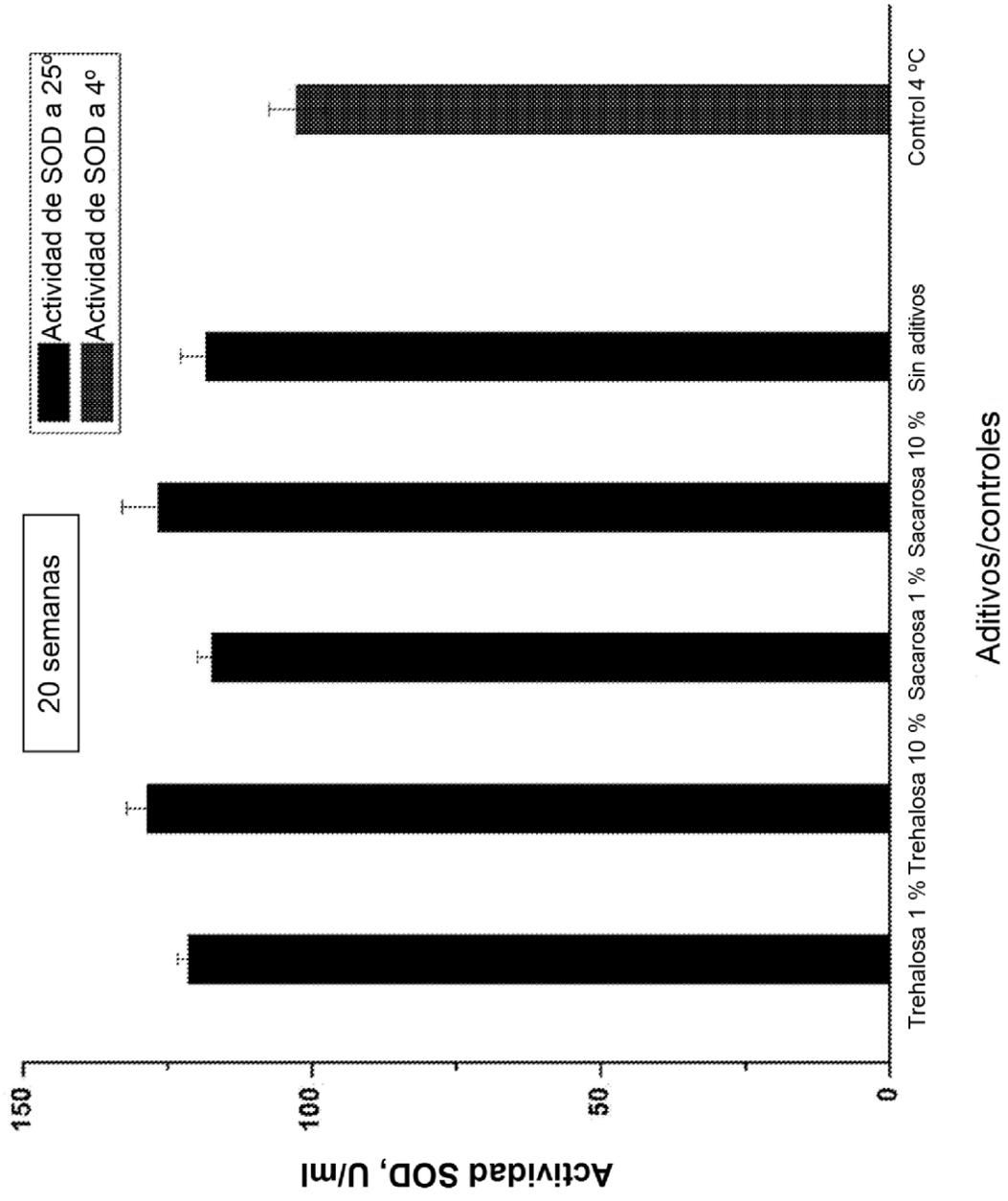
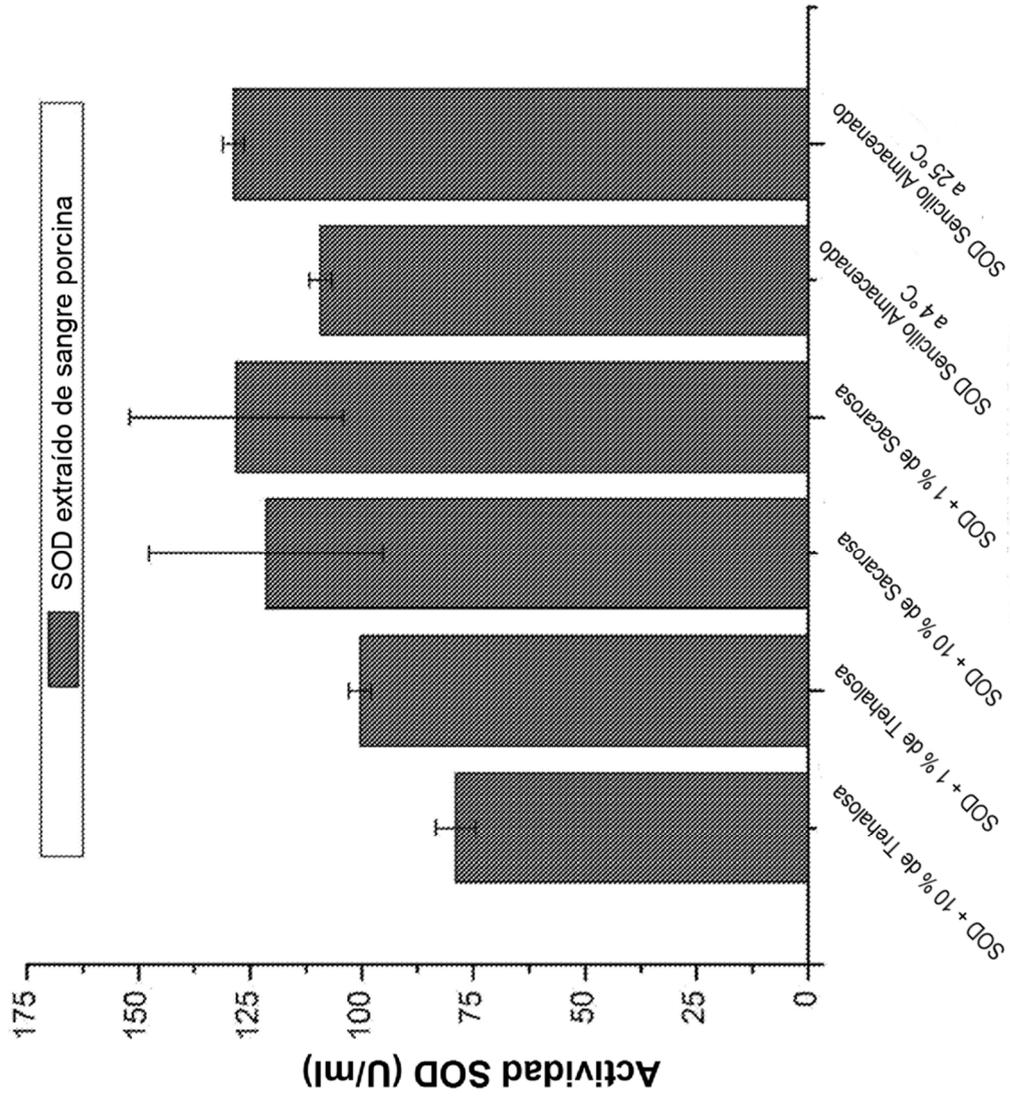


FIGURA 2



Todas las muestras se almacenaron en disolución a 25 °C

FIGURA 3

Ensayo de TBS – análisis para estimación de oxidación

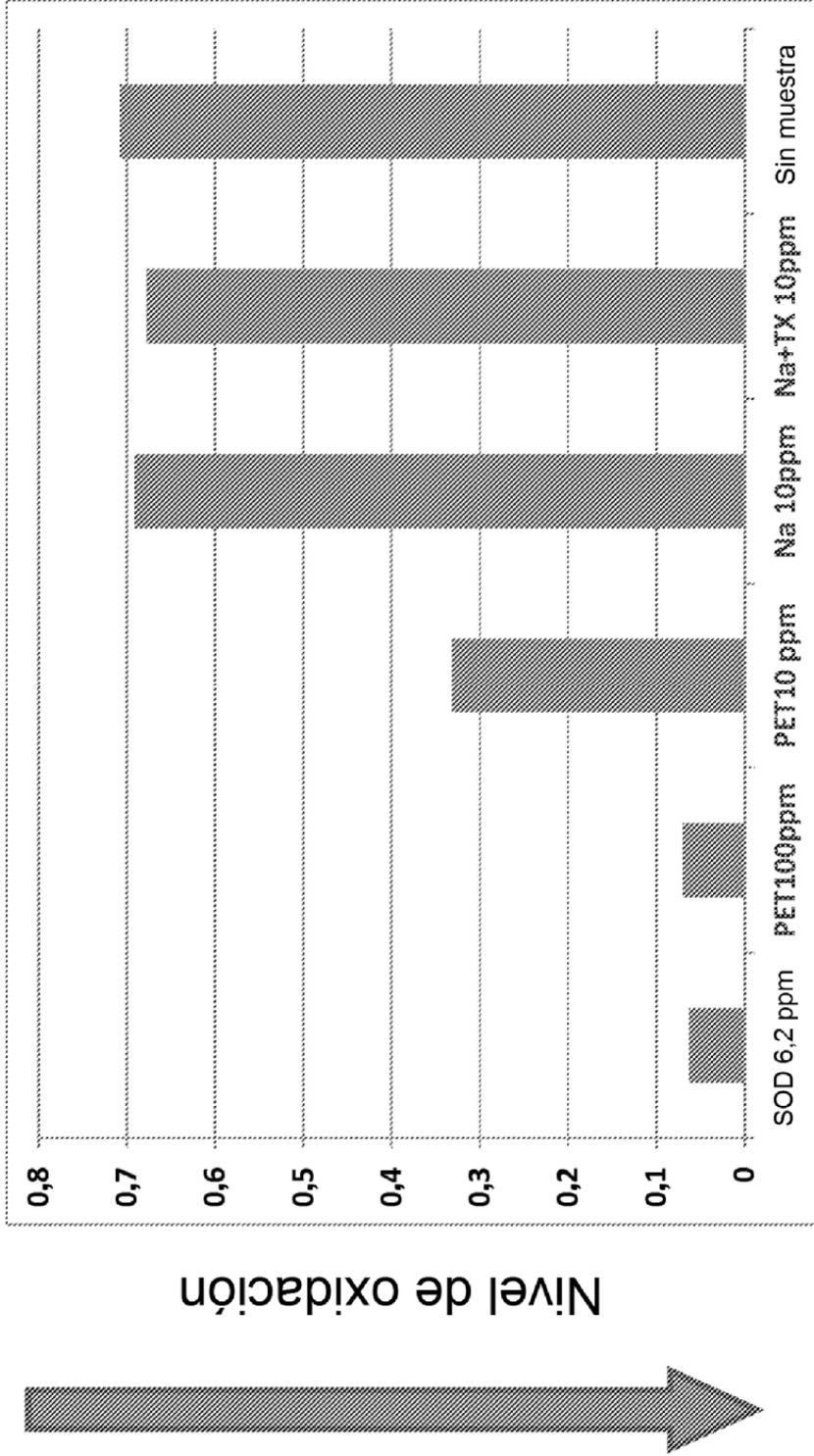


FIGURA 4

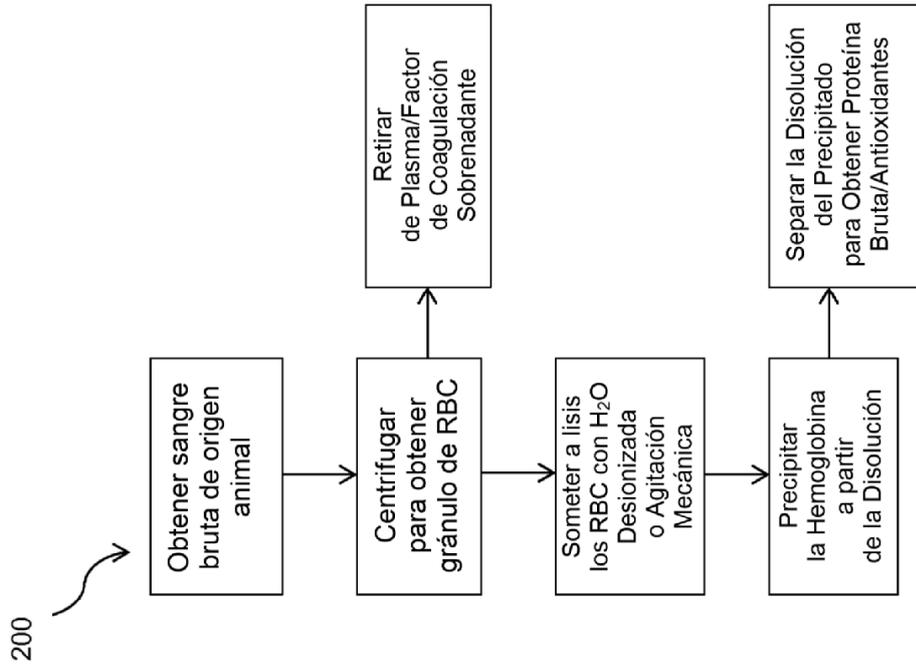


FIGURA 5

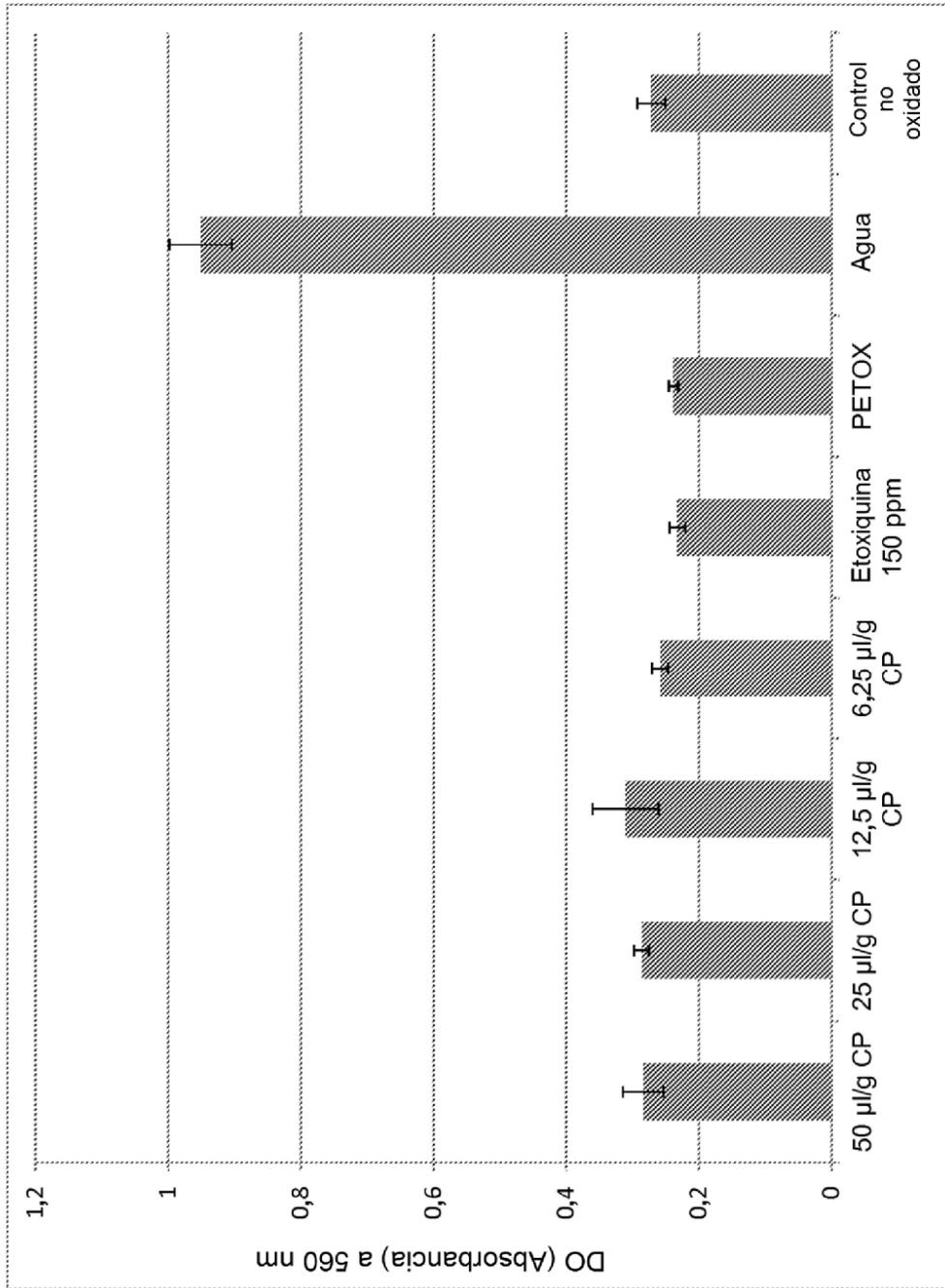


FIGURA 6

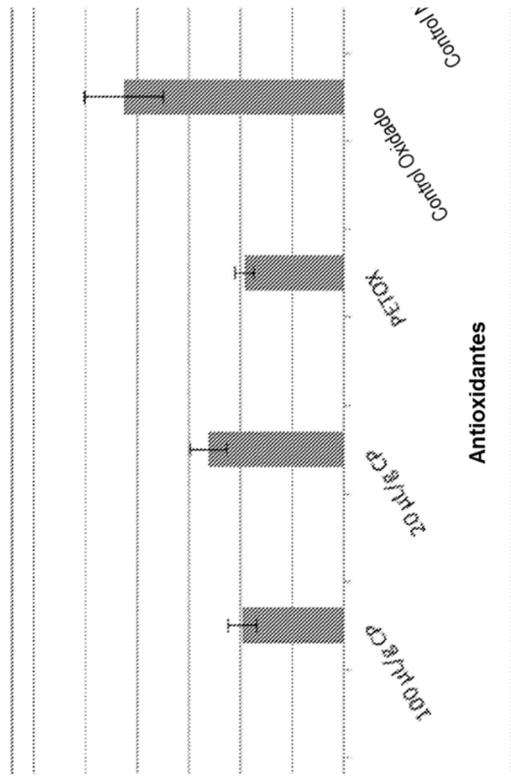


FIGURA 7

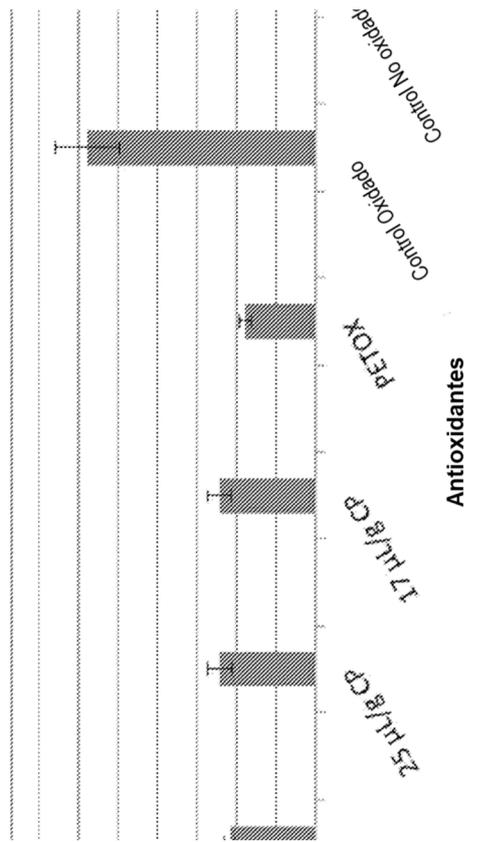


FIGURA 8

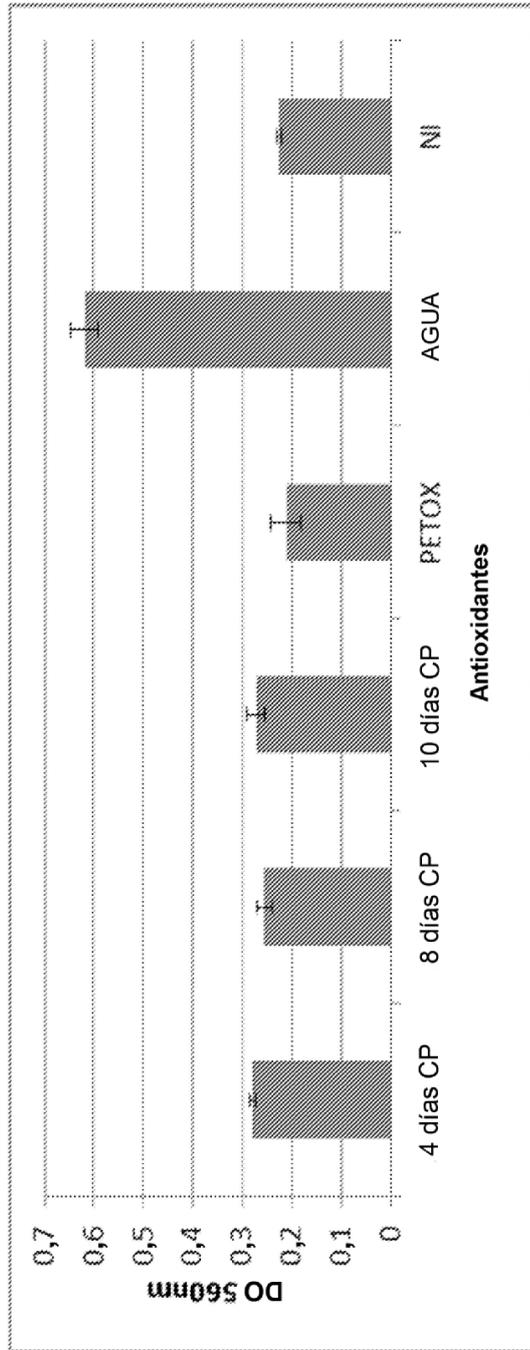


FIGURA 9

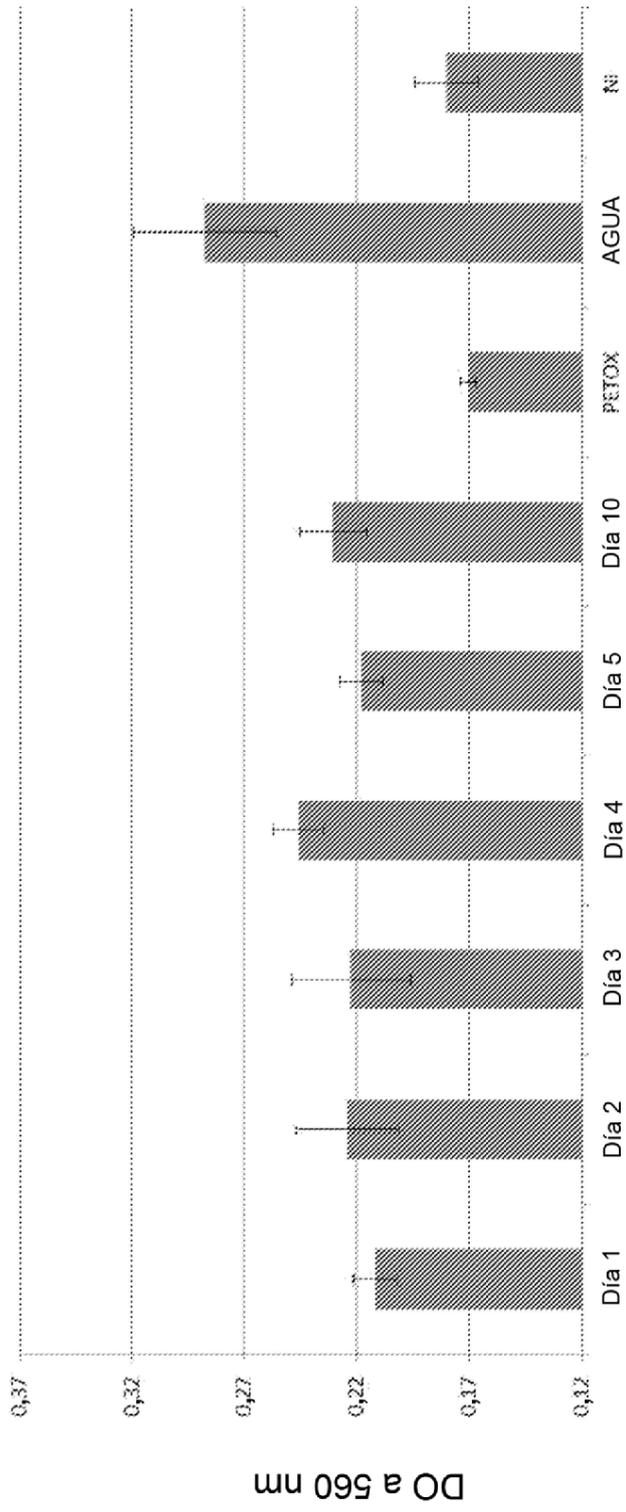


FIGURA 10

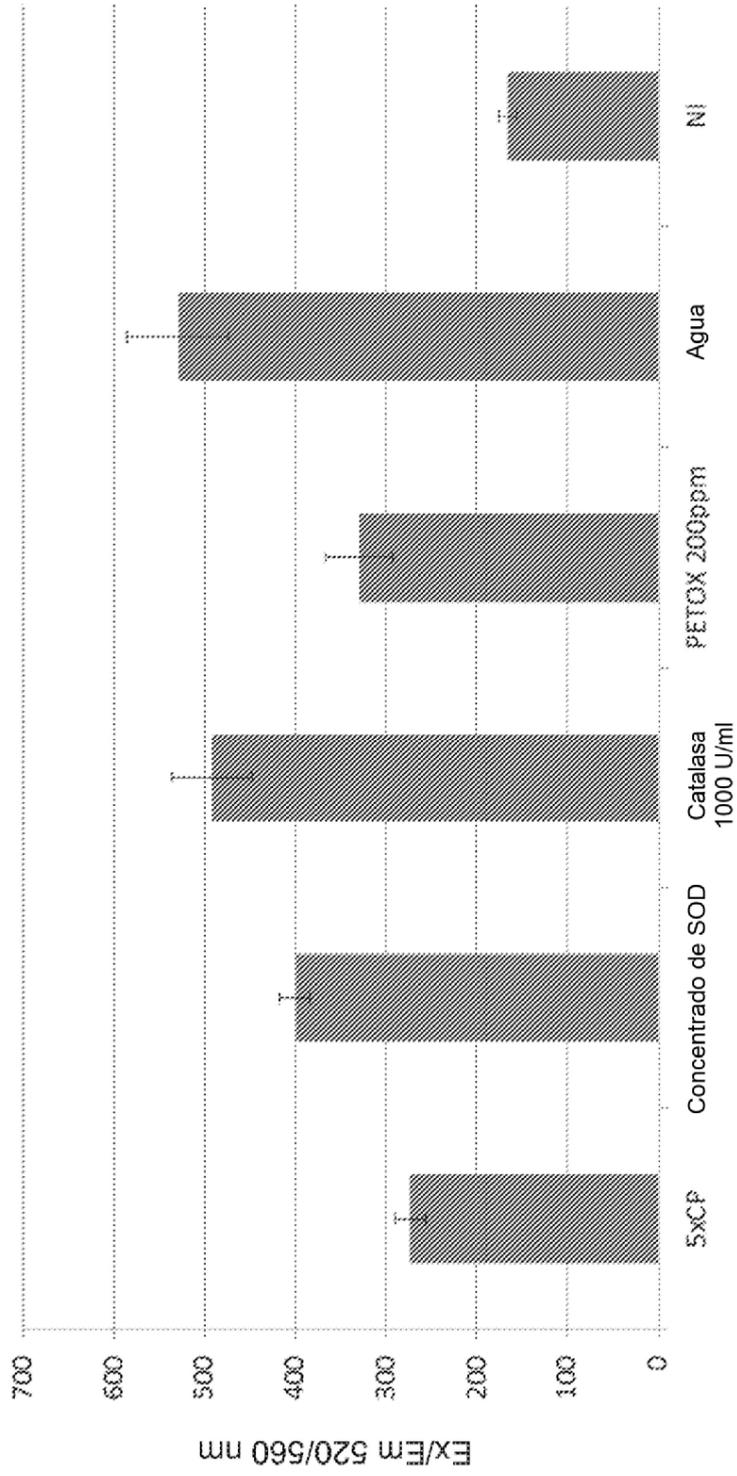


FIGURA 11

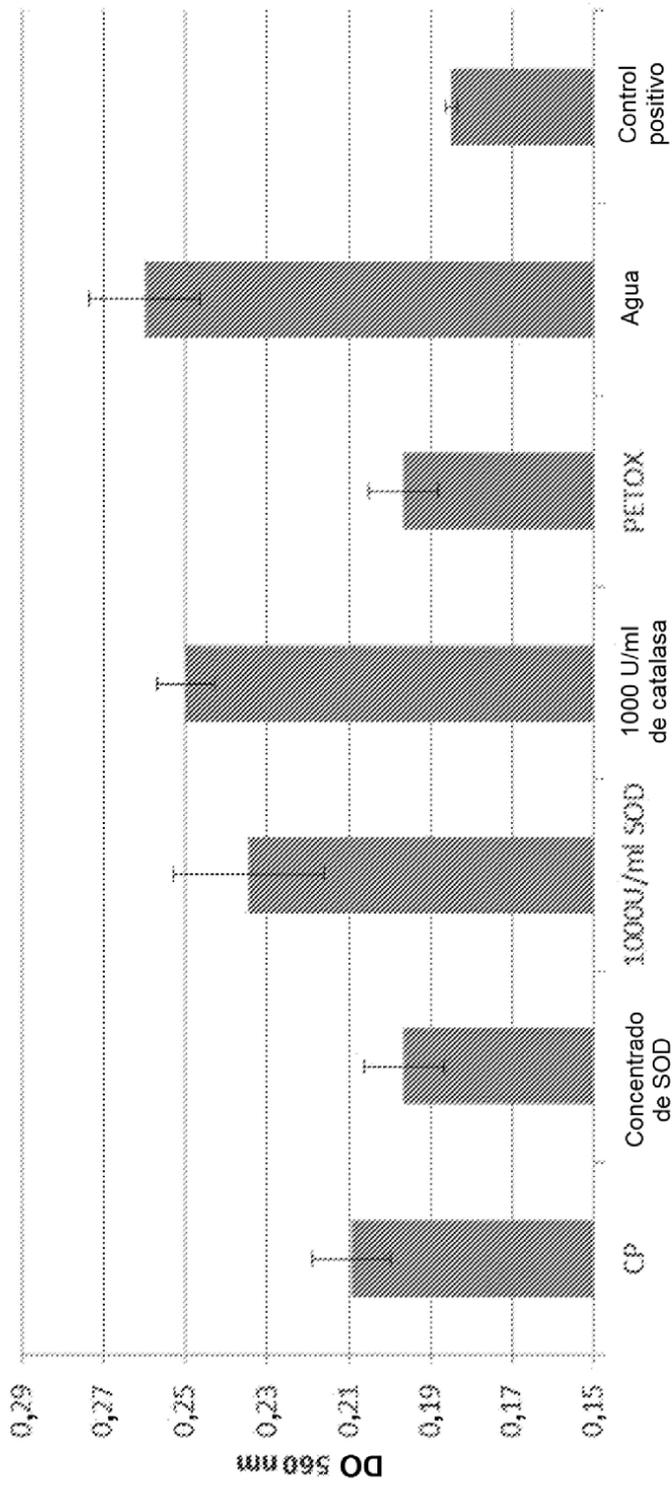


FIGURA 12