

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 618**

51 Int. Cl.:

A23L 17/30 (2006.01)

A23B 4/027 (2006.01)

A23B 4/023 (2006.01)

A23L 3/3508 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2019 PCT/DE2019/100993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20125848**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2019 E 19820663 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3897198**

54 Título: **Método para producir caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros de peces o crustáceos, y tales productos**

30 Prioridad:

17.12.2018 DE 102018132386

17.12.2018 EP 18212833

17.12.2018 US 201862780356 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2025

73 Titular/es:

**ALFRED-WEGENER-INSTITUT HELMHOLTZ-
ZENTRUM FÜR POLAR- UND
MEERESFORSCHUNG (100.00%)
Am Handelshafen 12
27570 Bremerhaven, DE**

72 Inventor/es:

KÖHLER-GÜNTHER, ANGELA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 018 618 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

Método para producir caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros de peces o crustáceos, y tales productos

Un método para producir caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos, y dichos productos.

La invención se refiere a un método para producir caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo, en donde los huevos vivos, maduros y ovulados están en un estado fértil pero no fecundado y tienen un contenido natural de potasio en el ovoplasma, mediante el tratamiento de los huevos vivos, maduros y ovulados en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento y posteriormente, en al menos una solución que contiene agua y al menos un componente catiónico disuelto en la misma que actúa para estabilizar la envoltura del huevo de los huevos vivos, maduros y ovulados, y a un caviar o un producto similar al caviar.

Los huevos preparados y no fecundados, especialmente de peces, se consideran un manjar y su consumo va en aumento. El término “hueva” se usa para describir (en términos sencillos) los huevos en cualquier fase de madurez, es decir, desde inmaduros hasta maduros, mientras que el grado de desarrollo de los huevos no está claramente definido. “Desove” se refiere a los huevos vivos y maduros que pone una hembra de pez, langosta u otro animal acuático en el agua para ser fecundados. Los huevos ovulados son huevos maduros, fértiles y vivos que se liberan de las cáscaras de los folículos de los ovarios y se liberan en la cavidad corporal. Desde allí, son desovados o extraídos por masaje abdominal. Según el Codex Alimentarius de la FAO, el caviar solo puede producirse a partir de las huevas de hembras de las diversas especies de esturión. Además de los esturiones salvajes, los esturiones criados en instalaciones acuícolas de agua dulce ahora también se utilizan para la producción de caviar. Los esturiones desovan solo en agua dulce, salvo algunas excepciones. Las especies de esturión más conocidas (*Acipenseridae*) incluyen *A. baerii*, *A. guldenstaedtii*, *Huso huso* (también conocido como esturión Beluga), *A. transmontanus*, *A. ruthenus* y su albino. Sin embargo, también cabe mencionar los híbridos entre *A. schrenckii* (hembra) y *A. dauricus* (macho) y el “pez espátula” americano (*Polydon spatula*), estrechamente relacionado con los esturiones. En el mercado se conocen diversos tipos de caviar, tales como el Sevruga, el Osietra y el Beluga. El caviar blanco (también conocido como “caviar dorado”) se obtiene del esturión albino. La especie *A. ruthenus* albino se utiliza ocasionalmente en instalaciones acuícolas para producir lo que se conoce como “caviar del Zar”. Sin embargo, este no es el auténtico “caviar del Zar”, que proviene del albino de *Huso huso* y es muy raro.

En la actualidad, se producen y comercializan productos similares al caviar de aproximadamente otras 38 especies de peces que no pertenecen a la especie del esturión; véase, por ejemplo, la publicación de P Bronzi y col.: “Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview” (Journal of Applied Ichthyology 2014, 30 SI, 6, 1536-1546). Estos incluyen el atún, el lumpo, el salmón, la trucha, el arenque, el bacalao, la carpa, el lavareto común y el capelán, cuyas huevas inmaduras se utilizan para elaborar productos similares al caviar (también conocidos como “sustitutos del caviar” o “caviar falso”). Las huevas de langosta, cangrejos de río grandes y otros crustáceos también se pueden procesar a productos similares al caviar. El método reivindicado en la invención y los productos que pueden producirse pertenecen a estos peces y crustáceos que se han mencionado (así como a otros que son adecuados pero que no se han mencionado). A menos que se mencione explícitamente el caviar de esturión, el caviar y los productos similares al caviar de peces distintos del esturión y de crustáceos, en particular langostas y cangrejos de río, se entienden y abarcan habitualmente en la siguiente discusión.

El caviar y los productos similares al caviar son alimentos valiosos. El caviar es rico en proteínas con un alto contenido de aminoácidos esenciales y grasas. El caviar contiene las vitaminas D, E, B₁₂ y niacina, los minerales sodio, potasio, magnesio y calcio, así como los oligoelementos fósforo, flúor, yodo y zinc. Además, tiene un alto contenido de colesterol “bueno” (HDL). El caviar y los productos similares al caviar se pueden utilizar como alimento y como sustancia en la industria cosmética o en otras industrias que trabajan con sustancias tan valiosas. El tamaño y la firmeza de los huevos dependen en gran medida de la especie de pez o crustáceo en cuestión, así como de la madurez y, por tanto, del momento de su recolección.

Actualmente hay en el mercado algunos productos de caviar producidos a partir de huevos maduros y ovulados de esturión. Sin embargo, hoy en día se sigue ofreciendo principalmente caviar, que consiste en huevos inmaduros extraídos de esturiones muertos junto con los ovarios. Este es el método convencional para extraer el caviar. En el caso del caviar de esturiones de acuicultura, inicialmente se supuso que también en este caso, como en el caso del caviar salvaje en el pasado, los huevos inmaduros tendrían una concentración suficiente sin un tratamiento adicional contra las invasivas etapas de lavado para eliminar los restos del tejido de las gónadas y volver a envasarlos. Sin embargo, la experiencia adquirida en los últimos 20 años en la extracción de caviar del esturión de acuicultura ha demostrado que estas huevas inmaduras de esturiones de acuicultura muertos son demasiado blandas y solo pueden transformarse en un producto que sea adecuado para volver a envasarse y conservarse durante más de 2 a 3 meses usando bórax u otros conservantes o mediante pasteurización.

La matanza de hembras para extraer el caviar de las capturas silvestres, combinada con la drástica sobrepesca, la contaminación industrial, agrícola y doméstica de las aguas residuales y la construcción de presas y diques que bloquean las rutas de migración a las zonas de desove de agua dulce, ha supuesto una enorme amenaza para las poblaciones silvestres de las aproximadamente 27 especies diferentes de esturiones. En muchas regiones, la pesca furtiva y el comercio ilegal siguen prevaleciendo, a pesar de la protección de los esturiones por la Convención de Washington sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). En todo el mundo se han puesto en marcha programas de repoblación muy costosos que, sin embargo, según informes de la Sociedad Mundial para la Conservación del Esturión, por ejemplo, lamentablemente están teniendo poco éxito, sobre todo en China, pero también en Irán y Rusia. Solo las medidas para conservar y repoblar las poblaciones de los EE. UU. y Canadá han tenido algún éxito inicial. Además de la captura permitida de animales reproductores, varias especies de esturión procedente de acuicultura también se están liberando en el medio silvestre, con diversos grados de éxito, como parte de los programas de conservación para salvar las poblaciones en peligro de extinción. Las poblaciones de cangrejos de río y cangrejos nobles también están gravemente amenazadas, entre otras cosas, por la contaminación ambiental y las enfermedades importadas, tales como la peste del cangrejo. Los avances significativos en el cultivo de cangrejos de río en la acuicultura y las medidas de repoblación extensiva desempeñan un papel importante en la conservación de las poblaciones autóctonas. En la acuicultura, las hembras se mantienen vivas para la reproducción y los huevos se obtienen mediante extracción por masaje abdominal ("stripping"). Sin embargo, en la producción de caviar para la acuicultura, hasta ahora, las hembras de esturión solían matarse simplemente de la manera convencional porque no se dominaban métodos más delicados. Esto ignora por completo el hecho de que muestran un rendimiento reproductivo considerablemente mejorado con la edad. Incluso el "método de la cesárea", que se practica ocasionalmente en Rusia, no es en absoluto uno de los métodos más delicados, ya que se asocia con una alta tasa de mortalidad de los esturiones tratados de esta manera.

Estado de la técnica

Por el documento RU 2 232 523 C2 se conoce un método para producir caviar granulado a partir de huevos de esturión ovulados. Los huevos ovulados recolectados se tratan inicialmente en una solución acuosa caliente de un conservante del 1,5 por ciento al 2 por ciento para prepararlos para la posterior pasteurización a temperaturas de 65 °C a 70 °C. Además del hecho de que cada proceso de calentamiento tiene un efecto significativo sobre el sabor de las huevas, el uso de huevos ovulados, que tienen una envoltura del huevo muy blanda y pegajosa, no garantiza que resistan los tratamientos posteriores con conservantes sin reventar. Pero incluso una pequeña fracción de huevos reventados deteriora significativamente la calidad del caviar, ya que los huevos reventados son difíciles de eliminar. La pasteurización da como resultado la desnaturalización de las valiosas proteínas y le da al caviar un sabor harinoso.

En relación con la extracción de huevos ovulados del esturión, se conoce el uso de un catéter para este propósito, por ejemplo, a partir de la publicación de M. Szczepkowski y col.: "A simple method for collecting sturgeon eggs using a catheter" (Arch. Pol. Fich. (2011) 19:123-128). Como resultado, los huevos pueden fluir fácilmente o ser aspirados al vacío. También es conocido simplemente masajear los huevos para sacarlos de la cavidad abdominal del esturión. Este método se conoce como "masaje abdominal" y es el método de recolección más delicado.

El estado de la técnica más cercano a la invención se describe en el documento WO 2007/045233 A1. Se describe un método para producir caviar o productos similares al caviar a partir de huevos maduros ovulados pero no fecundados de animales acuáticos, preferiblemente peces, mediante el tratamiento exógeno de los huevos maduros en una solución, en donde se produce un cambio morfológico endógeno de la envoltura acelular del huevo, que separa el óvulo (ovoplasma con la membrana plasmática del huevo circundante) del medio ambiente, con estabilización estructural. La solución utilizada aquí contiene agua y al menos un componente catiónico (cationes de calcio, Ca^{++}) que se disuelve en agua a una concentración predeterminada e induce la estabilización estructural al entrar en contacto con los huevos. El calcio es una molécula de transducción de señales endógena que inicia una onda de calcio en el óvulo en su ovoplasma, lo que a su vez conduce a una reacción cortical y a la liberación y activación de la ovoperoxidasa. Esta enzima asegura la reticulación estructural irreversible de las cadenas proteicas en la envoltura extracelular del huevo mediante la incorporación de moléculas de tirosina en la zona radiada interna y la zona radiada externa. El proceso inducido en el huevo vivo, que se metaboliza, conduce por lo tanto a la deseada estabilización estructural de la envoltura del huevo. Dicha estabilización no se puede lograr en huevos inmaduros, porque los receptores y las cascadas de enzimas correspondientes aún no han madurado. En el caso de los huevos muertos, el proceso no puede ocurrir en absoluto, dado que el metabolismo ya no tiene lugar. Debido al líquido ovárico, cuando entran en contacto con el agua, los huevos vivos y maduros forman inmediatamente una capa pegajosa para que, en la naturaleza, puedan adherirse a las piedras y plantas en el área de desove. Por lo tanto, antes de iniciar el tratamiento, los huevos se enjuagan con una solución salina que no daña los huevos vivos (solución "fisiológica") para eliminar el líquido ovárico. Además, los huevos vivos y maduros tienen un contenido natural de potasio en el ovoplasma. Por lo tanto, por ejemplo, no se les añadieron dosis dañinas de potasio (por ejemplo, para desencadenar la ovulación) desde el exterior antes de la recolección.

La cadena de reacción descrita se denomina en la bibliografía "segunda reacción". Se trata de una reacción metabólica lenta que, tras la fusión de un primer espermatozoide con el huevo, forma una estructura físico-mecánica permanente para proteger al huevo contra otros espermatozoides agregados fuera del huevo (poliespermia), pero sobre todo contra las toxinas ambientales, los microbios y los daños mecánicos al embrión emergente. En el método conocido, esta

segunda reacción se inicia sin que haya tenido lugar la fecundación por un espermatozoide. La estabilización estructural lograda proporciona un “efecto de explosión” y una liberación explosiva del ovoplasma líquido al consumir el producto. La preferencia por una intensidad específica del efecto de explosión depende en gran medida del uso del caviar y del consumidor.

Además, por el documento EP 2 522 226 B1 se sabe cómo conservar las huevas inmaduras de peces criados en acuicultura en una composición producida a partir del flavonoide y antioxidante taxifolina (dihidroquercetina) y una sal orgánica, en particular citrato de potasio. Sin embargo, las altas concentraciones de la composición utilizada aquí provocan cambios sorprendentes en el entorno intracelular de los iones, que inician la muerte celular programada (apoptosis). Por lo tanto, las huevas tratadas de esta manera resultan muertas inmediatamente. Las publicaciones SU 1662469 A1 y RU 2 048 111 C1 también describen métodos para la conservación de huevos de esturión, en los cuales se usan compuestos de potasio en concentraciones tan altas que se desencadena inmediatamente la apoptosis en los huevos que se han obtenido en estado inmaduro y no ovulado mediante el sacrificio, y mueren. Lo mismo se aplica también al documento EP 2 868 207 B1, correspondiente al documento RU 2 232 523 C2 mencionado anteriormente, en donde tiene lugar una desnaturalización adicional por calentamiento.

La publicación de G. E. Bledsoe y col.: “Caviars and Fish Roe products” (Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 43, N.º 3, 1 de mayo de 2003, páginas 317 a 356) también describe el uso del nitrato de potasio, en el contexto del uso extensivo del nitrato como conservante general para huevos de cangrejos, esturiones y otros peces. Sin embargo, esto ocurre, como es habitual en todos los procesos de conservación, a concentraciones tan altas o en combinación inextricable con otros conservantes, que se produce un efecto citotóxico que altera significativamente el equilibrio osmótico y mata inmediatamente los huevos tratados. Además, solo se conservan los huevos inmaduros de peces sacrificados en una fase temprana de desarrollo, que, por un lado, tienen que ser extraídos mecánicamente de las gónadas, anticipando posibles daños y, por otro lado, aún no tienen ninguna estructura completamente desarrollada en la envoltura del huevo madura, por lo que no pueden usarse en la invención.

El método descrito en el documento DE 2 416 685 A tiene como objetivo reemplazar los compuestos que contienen nitritos, que son perjudiciales para la salud, con el fin de obtener el color rojo de los sacos de las huevas de salmónidos. En este caso, las sustancias que contiene en nitritos y nitratos se reemplazan por compuestos con citratos y sulfitos como anión. El producto de pescado utilizado son gónadas intactas, denominadas sacos de huevas, que se obtienen al sacrificar el pescado y contienen huevos no ovulados. Las gónadas intactas se enjuagan inicialmente con agua y una solución salina al 3 %, ya sean frescas o después de descongelarlas, en caso de que se hayan congelado. Una solución de NaCl al 3 % corresponde a más de tres veces la concentración de una solución salina fisiológica y, por lo tanto, daña las células vivas. Los citratos estabilizadores del color, solos o junto con sulfitos como aditivos, se usan como compuestos de sodio u opcionalmente como compuestos de potasio en una salmuera saturada de NaCl (36,5 %), es decir, más de 40 veces la concentración de solución salina, para el tratamiento de los sacos de huevas. Esto mata inmediatamente las células de los sacos de huevas y, por lo tanto, conduce a la deseada inhibición de la autólisis enzimática (deterioro) y a la destrucción de los microorganismos por deshidratación. La estabilización simultánea del color se lleva a cabo con sulfito de sodio y citrato de sodio en un máximo del 0,35 % en la salmuera y, opcionalmente, con citrato de potasio del 0,15 % al 0,30 % en la salmuera. Estas concentraciones en el enjuague aplicado externamente corresponden a una exposición de 15 mmol/l a 30 mmol/l de iones K⁺. En este caso, se busca una concentración de compuesto de citrato de entre 300 y 700 ppm en los sacos de huevas. Por lo tanto, estos son aditivos que permanecen en el producto final. Los huevos inmaduros resultan muertos inmediatamente.

El documento JP S63 — 36 763 A describe un método para reducir el cloruro de sodio en la conservación de las huevas de peces con el fin de reducir el sabor salado. Aquí, el cloruro de sodio también se sustituye por diversos compuestos de potasio. Sin embargo, esto ocurre nuevamente en concentraciones tan altas que los huevos, que son huevos inmaduros, mueren y ya no pueden realizar un trabajo metabólico. El documento JP 2001-299 285 A describe un método para tratar las huevas congeladas en un estado inmaduro para mejorar la textura. Aquí, los huevos se enjuagan a 5 °C durante un máximo de 24 h y usando productos químicos que contienen potasio. Una duración de tratamiento tan larga interrumpe todos los procesos metabólicos. Dado que las huevas se han congelado sin protección contra la congelación, los huevos inmaduros ya no tienen ninguna actividad metabólica y tampoco son fértiles. Por lo tanto, tampoco pueden usarse para la invención reivindicada. Sin embargo, el método reivindicado por la invención no se refiere a la conservación, decoloración o congelación posterior y letal, sino a la producción original de caviar y productos similares al caviar a partir de huevos vivos, maduros, no tratados. La conservación o la congelación después del tratamiento de los huevos vivos son solo etapas adicionales opcionales de la invención. Se prescinde por completo de la decoloración, ya que no es necesaria.

A partir de la publicación de Huang Hui y col.: “Effect of Synthetic Preservatives on Volatile Flavor Compounds in Caviar of Sturgeon” (*Huso dauricus* × *A. schrenckii*) ([J] FOOD SCIENCE, 2015, 36(12): 97-103), se sabe que es preferible impedir la pérdida de sabor durante el almacenamiento en frío del caviar mediante la conservación sintética con los conservantes sorbato de potasio (E202, ácido sórbico) y ascorbato (vitamina C). En este sentido, se usó un sorbato de potasio constante de 0,5 por mil en diversos grupos de prueba. Se utilizaron huevos inmaduros, que están destinados a proporcionar un sabor más intenso como resultado del tratamiento conservante. Se considera que el sorbato de potasio inhibe el crecimiento y la fermentación del moho, pero también puede alterar el sabor de un producto.

La publicación de L. Dufresne y col.: “Kinetics of actin assembly attending fertilization or artificial activation of sea urchin eggs” (Experimental Cell Research, Elsevier, Ámsterdam, NL, vol. 172, N.º 1, septiembre de 1987, páginas 32 a 42) se refiere a la activación artificial de huevos de erizos de mar. Aunque la presente invención no se refiere al tratamiento de huevos de erizo de mar, debido a que no tienen una estructura adecuada (solo una envoltura del huevo de dos capas), esta publicación se analizará brevemente aquí. Por un lado, se utilizan huevos de erizo de mar que se obtuvieron inyectando una solución de KCl 0,5 M con una concentración extremadamente alta de cloruro de potasio en la cavidad abdominal del erizo de mar. Como resultado, el huevo ya se ha visto fuertemente influenciado en lo que respecta a su estado de polarización eléctrica y su contenido natural de potasio en el ovoplasma ha cambiado evidentemente. Además, todos los huevos de erizo de mar entran en contacto con el agua antes del tratamiento y forman una capa de gel que posteriormente debe eliminarse mecánicamente. Esto también cambia fundamentalmente las propiedades morfológicas y fisiológicas de la envoltura acelular del huevo. Los huevos de erizo de mar, por lo tanto, no se pueden usar en la invención, no solo por su estructura fundamentalmente diferente, sino también por las masivas intervenciones metabólicas realizadas por el cloruro de potasio durante su recolección. Además, el agua de mar libre de calcio no está desionizada; contiene, entre otras cosas, más de 10 g de sodio, 0,43 g de potasio y 1,3 g de magnesio y 20 g de cloro por litro. Por lo tanto, enjuagar los huevos en agua libre de calcio no corresponde a enjuagar en una solución salina que no dañe los huevos vivos y maduros.

La estructura de la envoltura de huevos de peces y crustáceos sigue un patrón básico y se describe para el método según la terminología de la publicación de Siddique y col.: “A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology”, (J. Appl. Ichthyol. (2014), 1–10). La siguiente breve descripción pretende proporcionar una concordancia conceptual.

Al madurar los huevos (ovocitos, óvulos) en los ovarios del animal, el folículo, que consiste en células de la granulosa (también conocidas como células foliculares, membrana folicular, epitelio folicular) y células tecales (también conocidas como teca interna, teca externa), rodea al huevo para suministrarle sustancias de señalización y nutrientes. Entre las células de la granulosa y las células tecales, también se encuentra la lámina basal (también conocida científicamente como membrana perifolicular, membrana, lámina basal). El ovoplasma (plasma ovocitario, olema, citoplasma, interior del huevo) está rodeado por la membrana plasmática del huevo (membrana ovocitaria, membrana plasmática MP, envoltura celular del huevo). Durante la ovulación, el huevo se eluye de las células foliculares y se libera en la cavidad abdominal del pez. El huevo ovulado solo conserva su envoltura acelular del huevo formada de forma autónoma (también conocida científicamente como matriz extracelular o membrana extracelular), que se formó durante la maduración del huevo y se forma estructuralmente desde el exterior hacia el interior a partir de:

- la capa alveolar, AL (también denominada científicamente capa de gel, capa adhesiva, envoltura de gel, envoltura gelatinosa (segunda externa), capa 3, corion (2)), que es la capa más externa de la envoltura acelular del huevo
- la zona radiada externa, ZRE (también denominada científicamente envoltura vitelina externa (zona radiada = envoltura vitelina), zona vitelina externa, envoltura vitelina externa, capa 2, capa de corion 2, zona pelúcida externa lat., zona radiada externa lat., capa 1B de la envoltura, segunda envoltura), parte exterior de la envoltura vitelina, que se encuentra directamente debajo de la capa alveolar
- la capa epitaxial, EP (también denominada científicamente capa epitaxial 1, capa 4, capa exterior de la primera envoltura), que separa la ZRE de la ZRA, no está presente en todos los tipos de huevos
- la zona radiada interna, ZRI (también denominada científicamente envoltura vitelina interna, zona vitelina interna, membrana vitelina interna, capa de corion 1, zona pelúcida interna lat., zona radiada Interna lat., capa 1A de la envoltura, capa interna de la primera envoltura), que es la parte interior de la membrana vitelina, estrechamente conectada con la ZRA, y
- el espacio perivitelino (también denominado científicamente matriz extraovocitaria, espacio con las protuberancias de las microvellosidades del ovoplasma), que es el espacio estrecho entre la ZRI y la membrana plasmática del huevo, en el cual el ovoplasma inserta numerosas microvellosidades (MV).

Los óvulos ovulados vivos son excitables eléctricamente mediante canales iónicos que están ubicados en su membrana plasmática. Los cambios en las propiedades eléctricas de la membrana plasmática constituyen, entre otras cosas, un requisito previo para la activación del huevo y tienen un efecto en la envoltura del huevo. Un trabajo pionero sobre invertebrados marinos demostró las corrientes iónicas de los cationes de potasio a través de la membrana plasmática del huevo, que provocan un cambio temporal de potencial a través de la membrana plasmática (potencial de fecundación, FP). Este potencial se genera mediante la activación de una corriente de entrada transitoria dependiente del voltaje hacia el interior del huevo. Se ha demostrado que la despolarización del potencial de la membrana plasmática (RP) es el resultado del flujo de iones a través de la membrana plasmática del huevo (corriente de iones (corriente de fecundación, FC)). Esta corriente fluye a través de las aberturas de canales iónicos grandes, inespecíficos y altamente conductores, que pueden ser activados por espermatozoides o por efectos químicos o

mecánicos artificiales. Los modelos hipotéticos sobre el papel de los diferentes canales iónicos y los iones relevantes hasta la fecha presentan diferencias específicas de especie.

En los óvulos, el potasio desempeña un papel central en la naturaleza; véase la publicación de E. Tosti y col.: "Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans" (2004 Human Reproduction Update, vol. 10, n.º págs. 53-65). El potasio, K^+ , es el catión que determina de manera decisiva el potencial de reposo del óvulo. En esto, el gradiente de potasio⁺ y la permeabilidad del huevo a los iones están regulados por las proteínas de transporte y los canales iónicos. Según estudios realizados en el Instituto Alfred Wegener, las concentraciones naturales de cationes potasio intracelulares son de 50 mmol/l en huevos maduros no fecundados del esturión *A. baerii*. El calcio extracelular, por otro lado, no afecta al potencial de reposo o al potencial de fecundación del huevo y tampoco participa en el primer bloqueo eléctrico rápido (véase a continuación). La composición de iones en el interior del óvulo es diferente de la composición de iones en el entorno externo. Esta separación entre el interior de la célula y el medio externo debe mantenerse para la actividad metabólica y, por lo tanto, para la supervivencia celular. La diferente distribución de las cargas eléctricas dentro y fuera de la célula forma un gradiente eléctrico a través de la membrana plasmática del huevo, que se puede medir como una diferencia de potencial (potencial de reposo).

Definición del problema

Partiendo del estado de la técnica más cercano a la invención según el documento WO 2007/045233 A1, que también se usa para este tipo de producción de caviar y productos similares al caviar, el **problema** en la presente invención es desarrollar aún más el método descrito en la misma sobre la base de huevos vivos, no fecundados, maduros y ovulados de peces o crustáceos, de tal manera que se puede lograr una modificación de las propiedades sensoriales con respecto a la textura, el sabor, el transporte, el almacenamiento y la ultracongelación de los huevos maduros y ovulados. Sin embargo, a este respecto, deben mantenerse las ventajas mencionadas anteriormente del caviar o de los productos similares al caviar que pueden producirse mediante el método o de otro modo, que también se reivindican en la invención. La **solución** a este problema se define en la reivindicación principal. Otras realizaciones ventajosas de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes y en las reivindicaciones de producto y se explican con más detalle a continuación en el contexto de la invención.

Según la invención, el método reivindicado para la producción de caviar o un producto similar al caviar basado en huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo se caracteriza por que, en una etapa de exposición al potasio, el potasio se disuelve en agua como componente catiónico en una concentración de cationes de potasio de entre 0,1 mmol/l y 3,0 mmol/l, en donde antes de la adición de un donante de potasio para la formación del componente catiónico, el agua se desioniza y está a una temperatura en el intervalo de temperatura natural de desove para los peces y crustáceos, y porque los huevos vivos, maduros y ovulados se tratan en la solución durante un tiempo de exposición al potasio de entre 5 minutos y 30 minutos, en donde, finalmente, la inmersión de los huevos vivos, maduros y ovulados se lleva a cabo en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento.

En el método reivindicado por la invención, se utilizan huevos vivos, maduros y ovulados que se pueden obtener de forma natural sin dañar al pez o al crustáceo. Los huevos vivos, maduros y ovulados son fértiles, pero no están fecundados. El líquido ovárico se ha eliminado mediante un enjuague previo con una solución salina (del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento) que no daña los huevos vivos, maduros y ovulados, por lo que no se puede formar una capa de gel pegajosa sobre la envoltura exterior. Además, los huevos ovulados tienen un contenido natural de potasio que no ha sido alterado artificialmente. Solo se utilizan concentraciones citofisiológicamente eficaces de cationes de potasio. Los huevos vivos y ovulados, que tienen más de dos capas, es decir, tres o más capas, en la envoltura del huevo en peces y crustáceos, se activan eléctricamente. El producto de partida son huevos vivos, maduros, ovulados, fértiles pero no fecundados con un metabolismo completamente funcional, de modo que incluso con las concentraciones más bajas de cationes de potasio, que no causan daño y tampoco dejan rastros en el huevo, pueden desencadenarse procesos de transporte a través de la membrana plasmática del huevo y procesos metabólicos en el ovoplasma. El caviar o los productos similares al caviar producidos de esta manera presentan una textura novedosa con una elasticidad ventajosamente estabilizadora a través de una nueva capa acelular hialínica (capa estabilizadora elástica) en la envoltura del huevo, que se vuelve algo más blanda a temperatura ambiente sin comprometer la estabilidad del caviar. El grado deseado de estabilización elástica se puede determinar fácilmente mediante autocomprobación (grado de elasticidad de los huevos). El sabor es agradablemente fresco y picante, sin ser "a pescado". La pureza de los huevos utilizados, incluso sin la adición de conservantes, por ejemplo bórax, que ya está prohibido en muchos países, da como resultado una larga vida útil (de 9 a 12 meses) a temperaturas estándar de entre -2 °C y -4 °C. Por primera vez, los huevos ovulados tratados con este método también se pueden congelar sin pérdida de calidad alguna, dando como resultado enormes ventajas en términos de almacenamiento y transporte, véase a continuación.

Al poner los huevos vivos, maduros y ovulados en contacto con los cationes de potasio (K^+) en concentraciones fisiológicas, es decir, concentraciones que no dañan las células (entre 0,1 mmol/l y 3,0 mmol/l) según la invención, los huevos ovulados cambian en el contexto de eventos eléctricos y se desencadena lo que se conoce como la "primera reacción", que en un período muy breve (en la región de segundos a minutos) conduce a la eliminación inducida eléctricamente de la pegajosidad al entrar en contacto con el agua y, en el transcurso posterior del tratamiento, a la formación de una nueva capa estabilizadora elástica dentro de la envoltura del huevo. Esta nueva capa estabilizadora

dota a la envoltura del huevo de elasticidad, de modo que incluso en esta fase, la invención ya ha producido un caviar o un producto similar al caviar de la más alta calidad que también puede someterse a etapas de procesamiento opcionales, en particular conservación y ultracongelación (a -18 °C), sin comprometer la calidad.

La activación de un huevo comprende y pasa a través de toda una serie de cascadas citobiológicas. La “segunda reacción (lenta)” (bloqueo lento) con una reacción cortical utilizada en el documento WO 2007/045233 A1 va seguida de la activación enzimática dependiente del calcio para la amplificación y, finalmente, de una alteración estructural masiva de la envoltura del huevo mediante la reticulación irreversible con tirosina de las cadenas proteicas en la zona radiada interna y la zona radiada externa. En la naturaleza, esto prepara la primera división celular para el desarrollo embrionario. Por el contrario, la “primera reacción (rápida)” (bloqueo rápido, bloqueo eléctrico, bloqueo eléctrico rápido) empleada en la presente invención con la posterior despolarización/hiperpolarización y su continuidad durante un período que varía dependiendo de la especie animal se encuentra al comienzo de todas las cascadas citobiológicas. Ambos procesos difieren significativamente en las sustancias utilizadas, a saber, A) los cationes de potasio para el bloqueo eléctrico rápido con despolarización de la envoltura del huevo y la activación del huevo desencadenada de este modo y la formación de una nueva zona única en la envoltura del huevo (formación de una capa estructurante elástica) y B) los cationes de calcio para el bloqueo mecánico lento con una reconstrucción morfológica controlada enzimáticamente en las capas existentes de la envoltura del huevo (formación de una capa estabilizadora estructural).

El primer evento eléctrico es la despolarización rápida o incluso la hiperpolarización en milisegundos y, en la naturaleza, esta pretende impedir que más espermatozoides se adhieran al huevo después de la fecundación. La hiperpolarización rápida se desencadena a partir de una hiperpolarización constante en los siguientes hasta 60 minutos (en algunas especies de animales acuáticos, tales como las langostas, por ejemplo, incluso hasta 5 horas). Si bien los espermatozoides que permanecen en las proximidades del huevo aún pueden adherirse tras el rápido bloqueo eléctrico y permanecer atrapados en la capa vitelina de la envoltura del huevo (capa blanda), no pueden penetrar a través de la membrana plasmática del huevo para la fecundación real, como se puede observar en los moluscos. Si la exposición al catión de potasio continúa según el método reivindicado de la invención, se observa la formación de una zona hialina completamente nueva (translúcida, vítrea, similar a un gel) (capa estabilizadora elástica), desconocida hasta ahora en la bibliografía, en el huevo vivo, fértil, pero no fecundado y maduro, ovulado, que es GAG positivo (aumento de la presencia de glucosaminoglicanos) y eosinófilico (puede teñirse con el tinte de diagnóstico rojo ácido, eosina) para la visualización de los orgánulos celulares, las proteínas plasmáticas, el tejido conectivo y sus precursores), y en los cuales los espermatozoides quedarían atascados. Esta capa estabilizadora elástica comienza a formarse dentro de la hiperpolarización constante después de 10 s en las subregiones sobre la envoltura del huevo y, una vez completada, se ubica entre la zona radiada externa y la capa alveolar en huevos vivos con un diseño estructural similar al de los peces y crustáceos (al menos tres capas en la envoltura del huevo). La causa de la formación de la nueva capa estabilizadora elástica se observa en la despolarización constante de la envoltura del huevo por el suministro de cationes de potasio en concentraciones fisiológicas (entre 0,1 mmol/L y 3,0 mmol/L).

Según la legislación de la UE para los Estados Miembros relativa a los suplementos alimenticios, solo los compuestos de potasio enumerados en ellos, tales como, por ejemplo, el bicarbonato de potasio (hidrogeno carbonato de potasio, KHCO_3) (n.º CAS 298-14-6), el carbonato de potasio (K_2CO_3) (n.º CAS 584-08-7), el citrato de potasio (n.º CAS 6100-05-6), el hidróxido de potasio (KOH) (n.º CAS 1310-58-3), el cloruro de potasio (KCl) (n.º CAS 7447-40-7), K, yoduro de potasio (KI) (n.º CAS 7681-11-0), yodato de potasio (KIO_3) (n.º CAS 7758-05-6), pueden ser utilizados con fines nutricionales. De manera similar, según la propuesta de orden del Parlamento Europeo y del Consejo de fecha 10 de noviembre de 2003 (COM (2003) 671 final), estos compuestos pueden añadirse a los alimentos. Ciertos compuestos de potasio tales como, por ejemplo, el citrato de potasio (E 332), el lactato de potasio (E 326) y los ortofosfatos de potasio (E 340), también pueden añadirse a los alimentos con fines tecnológicos. El método según la invención para el tratamiento de huevos vivos y maduros de peces o crustáceos con cationes de potasio en concentraciones que pueden ser toleradas por las células (concentración fisiológica, es decir, no dañina para el huevo) y sin la formación de residuos permite producir caviar o productos similares al caviar que cumplen con todos los requisitos nacionales e internacionales de las autoridades, los distribuidores y los consumidores en lo que respecta a la calidad. Los estudios sobre las concentraciones de iones intracelulares usando espectroscopía de emisión óptica (OES) en el citoplasma de los huevos realizados en el Instituto Alfred Wegener, en los cuales se utilizó potasio como sustancia nueva para la despolarización constante de la envoltura del huevo externa, no mostraron ningún cambio en la concentración en el ovoplasma después del tratamiento, incluso con diferentes concentraciones y duración del tratamiento. Por lo tanto, los cationes de potasio empleados en el método según la invención deben por lo tanto considerarse claramente como un coadyuvante de procesamiento. Un coadyuvante de procesamiento se utiliza en el procesamiento industrial y la producción de productos alimenticios. Los coadyuvantes de procesamiento son aditivos alimenticios que se añaden para facilitar los procesos técnicos tales como el corte y el filtrado. Sin embargo, en el producto final, los coadyuvantes de procesamiento no deben estar presentes en absoluto, o solo en cantidades residuales (pequeñas) inevitables. A diferencia de los aditivos alimentarios cambiantes, que también deben declararse en el envase, los coadyuvantes de procesamiento ya no deben tener ningún efecto en el producto final, lo que es particularmente ventajoso. Su uso debe ser técnicamente inevitable, tecnológicamente neutro, inocuo para la salud e inocuo desde el punto de vista del olor y el sabor. Dado que las sustancias ya no están presentes o activas en los alimentos tratados, no es necesario indicar su uso. Esto también se aplica a los residuos, los productos de reacción o las trazas.

Según la invención, los huevos ovulados se tratan en un baño de solución (una solución acuosa, una solución con agua). Los huevos ovulados se añaden y se dejan en el baño de solución hasta que, dependiendo de la especie de huevo utilizada, se alcance el grado de estabilización deseado (elástico y posiblemente estructural). A continuación, los huevos simplemente se retiran del baño. Para impedir de manera fiable una mayor estabilización no deseada por los cationes en la solución aún adherente tras la retirada, según la invención, después de lograr la estabilización elástica (y opcionalmente estructural) deseada, para retirar los cationes introducidos respectivamente de los huevos ovulados maduros, los huevos vivos, maduros y ovulados se hunden (sumergen brevemente) en una solución salina (solución salina fisiológica, del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento) lo que no los daña. Esto enjuaga los cationes e interrumpe inmediatamente los procesos de estabilización causados por ellos. El grado (deseado) de estabilización de la envoltura del huevo logrado hasta ahora se conserva de manera fiable como estado final.

Es particularmente preferible y ventajoso que al menos una sal de potasio, preferiblemente la sal de ácido cítrico (citrato de potasio E332) y/o la sal de ácido clorhídrico (cloruro de potasio E508) y/o la sal de ácido sórbico (sorbato de potasio E202) se disuelva en el agua como donante de potasio para la formación del componente catiónico. Debe entenderse que el término “donante de potasio” significa un compuesto que contiene potasio que, tras su disolución en agua, suministra los cationes de potasio, en donde su concentración está determinada por la concentración del compuesto de potasio respectivo y su fórmula estructural en el agua. De hecho, todas las sales de potasio mencionadas están aprobadas como aditivos alimenticios con números E, aunque en la invención solo se usan como coadyuvantes de procesamiento que ya no están presentes en el producto final y no tienen que declararse. Según una siguiente modificación del método, una concentración particularmente ventajosa y preferida de los cationes de potasio en una solución con agua previamente desionizada es de 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,65 mmol/l, 1,6 mmol/l o 2,0 mmol/l, preferiblemente 1,0 mmol/l o 1,5 mmol/l. En este sentido, todos los intervalos (y otros parámetros) dados en el contexto de esta invención también abarcan todos los valores límite e intermedios (números enteros y no enteros). Para poder producir las concentraciones de cationes de potasio citadas en el agua, debe estar desionizada. Sin embargo, dado que las moléculas de agua también se descomponen constantemente en el agua, debe entenderse que un grado de desionización solo puede lograrse por medios técnicos (conductividad eléctrica en el agua entre 1 μ S y 15 μ S a 25 °C como medida de la desionización alcanzable).

Además, el tiempo de exposición al potasio en la etapa de exposición al potasio es preferiblemente y ventajosamente de 10 minutos, 12 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. Sin embargo, es evidente que se pueden seleccionar otros tiempos de exposición al potasio dentro del intervalo citado. La formación de la nueva capa estabilizadora elástica, que sella la envoltura del huevo, comienza solo unos segundos (hasta 10 s) después del inicio del tratamiento. Sin embargo, dado que no todos los huevos ovulados reaccionan simultáneamente con una despolarización constante y la formación de la capa estabilizadora en las subregiones de la superficie de la envoltura del huevo, se recomienda un tiempo de tratamiento prolongado de hasta 10 minutos para lograr una despolarización constante en todos los huevos tratados. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento, migra hacia fuera y finalmente se localiza entre la zona radiada externa y la capa alveolar en toda la envoltura del huevo alrededor del huevo. Como resultado, los huevos vivos, maduros y ovulados se estabilizan elásticamente mediante la invención de tal manera que se pueden salar, reenvasar y ultracongelar sin problemas.

Como modificación opcional adicional, en el método reivindicado en la invención, se lleva a cabo adicionalmente una etapa de exposición al calcio, que puede llevarse a cabo después de llevar a cabo la etapa de exposición al potasio o antes de la misma. Los cambios respectivos en la envoltura del huevo se producen independientemente entre sí en ambas secuencias de las maneras descritas. En la etapa de exposición al calcio, el calcio, como componente catiónico, se disuelve preferiblemente y ventajosamente en otra solución con agua en una concentración que no dañe los óvulos vivos y maduros (es decir, una concentración fisiológica) (entren 0,1 mmol/L y 3 mmol/L), en donde el agua se desioniza antes de la adición de un donador de calcio para la formación del componente catiónico. Los huevos vivos, maduros y ovulados se tratan en la etapa de exposición al calcio (entre 9 minutos y 30 minutos) hasta que se logra la estabilización estructural deseada de la envoltura del huevo. El grado deseado de estabilización estructural se puede determinar fácilmente mediante autocomprobación (grado de efecto de explosión de los huevos). La temperatura está en el intervalo de temperatura natural de desove de peces y crustáceos, entre 1 °C y 29 °C. Finalmente, la inmersión de los huevos vivos, maduros y ovulados se lleva a cabo en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento.

En la etapa de exposición al calcio, se usa ventajosa y preferiblemente al menos una sal de calcio, preferiblemente citrato de calcio, cloruro de calcio y/o sorbato de calcio, como donante de calcio (proveedor de calcio, véase “donante de potasio” para la definición). Las sales de calcio están permitidas como aditivos alimenticios en la Unión Europea con los números E333 y E509 sin una restricción de límite superior; El E203 tiene una restricción de límite superior. Para distinguir mejor los dos tipos de iones, el texto alemán original utiliza la grafía “Kalium” para “potasio” y “Calcium” (en lugar de “Kalzium”) para “calcio”.

El calcio ya está presente fisiológicamente en el huevo y es un componente esencial en el metabolismo celular. Es conocido por el documento WO 2007/045233 A1, al que ya se ha hecho referencia anteriormente, el uso de cloruro de calcio para consolidar estructuralmente la envoltura del huevo mediante la reticulación irreversible de proteínas mediante la incorporación de moléculas de tirosina. Además de la elasticidad mejorada y ajustable de la envoltura del huevo, que es el logro fundamental de la invención, puede consolidarse mecánicamente estructuralmente aún más mediante la etapa de exposición al calcio. Por lo tanto, se puede lograr una combinación estabilizadora óptima para

tipos específicos de caviar y sustitutos del caviar. Esto es particularmente ventajoso para huevos ovulados inestables muy grandes (de más de 3,2 mm de diámetro, por ejemplo huevos del esturión Beluga o del esturión blanco) o para aquellos que son particularmente blandos cuando están en estado ovulado maduro (fuerza máxima inferior o igual a 0,3 N hasta que estallan en la prueba de dureza, por ejemplo huevos del esturión Sterlet). La aplicación de ambas etapas del tratamiento da como resultado un caviar o un producto similar al caviar de muy alta calidad para huevos ovulados que son problemáticos (tamaño, blandura).

La concentración de los cationes de calcio en la otra solución es ventajosa y preferiblemente de 0,5 mmol/l, 0,8 mmol/l, 1,0 mmol/l, 1,5 mmol/l, 1,6 mmol/l o 2,0 mmol/l. El tiempo de exposición al calcio a este respecto es preferiblemente de 10 minutos, 12,5 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 20 minutos o 25 minutos. La elección de la duración del tratamiento debe tener en cuenta el hecho de que la resistencia de la envoltura del huevo aumenta constantemente a medida que aumenta el tiempo de exposición al calcio hasta alcanzar un valor límite. En la naturaleza, después de aproximadamente 60 minutos, los huevos fecundados de los peces adquieren una envoltura del huevo extremadamente endurecida que ya no es apta para el consumo. Esto puede tardar hasta 24 horas para la langosta.

Un parámetro importante en el método reivindicado en la invención es la temperatura de las soluciones en las cuales se tratan los huevos maduros. Esta debe ser fisiológica, lo que significa que no inhibe los procesos naturales en los huevos vivos. En el método reivindicado, la temperatura de las soluciones está siempre en el intervalo de la temperatura natural de desove de los peces o crustáceos. Esto asegura que la activación eléctrica de la envoltura del huevo provocada en la etapa de exposición al potasio se lleve a cabo de manera fiable con una despolarización que comienza en el potencial de reposo. Por el contrario, a temperaturas de desove no naturales, por ejemplo, superiores a 15 °C para los peces o crustáceos de las regiones polares, no se produce ninguna activación eléctrica de los huevos y los huevos vivos, maduros y ovulados no pueden estabilizarse eléctrica o enzimáticamente. Se vuelven atréticos. Lo mismo se aplica a los huevos ovulados de peces o crustáceos de las zonas templadas y tropicales. En general, a temperaturas de las soluciones por encima de 35 °C, la degeneración provoca una grave pérdida de calidad en los huevos ovulados.

Para adaptar las temperaturas de las soluciones a los hábitats naturales, la presente invención divide ampliamente en tres zonas climáticas los entornos de vida de los peces y crustáceos, cuyos huevos vivos, maduros y ovulados pueden usarse durante los períodos de reproducción natural: zonas polares (en los polos), zonas templadas (entre las zonas polares y la zona tropical), zona tropical (alrededor del ecuador). La presente invención proporciona preferiblemente y ventajosamente que la temperatura de una solución (exposición al potasio) y/o de la otra solución (exposición al calcio) en un intervalo de temperatura polar se tome entre 1 °C y 15 °C, preferiblemente entre 5 °C y 12 °C, de forma particularmente preferible 10 °C, en un intervalo de temperatura templada se tome entre 10 y 20 °C, preferiblemente 15 °C, de forma particularmente preferible 12 °C, o en un intervalo de temperatura tropical se tome entre 20 °C y 29 °C, preferiblemente 27 °C, de forma particularmente preferible 21 °C. Las temperaturas que dan como resultado un cambio, degeneración, muerte celular, de los huevos, como es el caso, por ejemplo, de la pasteurización mediante calentamiento a temperaturas por encima de 40 °C, se evitan en la invención en cualquier punto del método.

Dado que las concentraciones de cationes utilizadas en el método según la invención desencadenan reacciones fisiológicas específicas de los animales de naturaleza eléctrica (exposición al potasio) y metabólica (exposición al calcio) y, por lo tanto, influyen en el procesamiento hasta obtener un producto final comestible estable, siempre se debe suponer que se utilizará agua desionizada en la solución para lograr una concentración exacta de cationes (cargados positivamente) activos eléctricamente (potasio) o metabólicamente (calcio). Por lo tanto, es técnicamente alcanzable y, por lo tanto, preferible y ventajoso que el agua desionizada a 25 °C tenga una conductividad eléctrica entre 1 µS/cm y 15 µS/cm, preferiblemente 10 µS/cm o menos, de forma particularmente preferible 1 µS/cm. Dependiendo de la fuente regional, el agua potable y el agua de pozo se componen de una composición muy variable de diferentes iones, que en determinadas circunstancias pueden incluso tener efectos antagónicos sobre el metabolismo celular. A una temperatura de 25 °C, la conductividad eléctrica del agua más pura, por ejemplo, es de 0,055 µS/cm, del agua desionizada es de 1 µS/cm, del agua de lluvia es de 50 µS/cm o del agua potable es de 500 µS/cm. Para poder obtener resultados reproducibles en el método reivindicado, es importante conocer la conductividad eléctrica del agua desionizada.

Dado que las células vivas en forma de óvulos ovulados maduros activables se tratan con el método según la invención, también es importante, entre otras cosas, que las soluciones se adapten al metabolismo de las células para que también puedan tener lugar los procesos metabólicos inducidos en el método. Por lo tanto, es ventajoso y preferible que la una y/o la otra solución tenga un pH (fisiológico, no perjudicial para el organismo vivo) de entre 6,8 y 8,0, preferiblemente entre 7,0 y 7,9, de forma particularmente preferible entre 7,2 o 7,4 o 7,5. En particular, el pH establecido en la solución es relevante para la reacción metabólica lenta en la etapa de exposición al calcio. Dado que los procesos enzimáticos en la célula están fuertemente regulados por el pH, también se examinó el pH intracelular en la etapa de exposición al potasio (proceso eléctrico). Sin embargo, el pH en el ovoplasma de los huevos tratados con las diversas sustancias que contienen potasio a diferentes concentraciones y durante diferentes duraciones permanece sustancialmente inalterado en el pH óptimo de entre 7 y 8 y presenta las diferencias individuales esperadas para peces y crustáceos individuales.

En la invención, las diversas etapas de exposición se usan para la estabilización endógena (elástica y opcionalmente estructuralmente) de la envoltura del huevo de los huevos vivos, maduros y ovulados. Por lo tanto, el caviar o el producto similar al caviar ya está listo para un procesamiento adicional, tal como la salazón y el envasado. Durante la ovulación, los huevos vivos y maduros son expulsados de las células foliculares para que no se adhieran más residuos tisulares de los vasos sanguíneos o residuos de células foliculares que las bacterias u hongos podrían colonizar, adherir. Por lo tanto, los huevos ovulados recolectados tienen una alta pureza y, por lo tanto, las mejores condiciones para una larga vida útil. Esto se garantiza de forma fiable si, tras la última etapa de exposición llevada a cabo para la conservación y la intensificación del sabor, se lleva a cabo una salazón suave con cloruro de sodio del 2,0 % al 3,8 %, preferiblemente al 3,5 %, con respecto a la cantidad de caviar o producto similar al caviar. A este respecto, el cloruro de sodio debe estar preferiblemente libre de donantes de potasio y calcio, tal como están contenidos, por ejemplo, en los agentes antiaglomerantes, ya que esto impide una alteración incontrolada de la envoltura del huevo de los huevos ovulados tratados debido a la salazón. El caviar de huevos de esturión se sala en seco con sal común simple (cloruro de sodio, NaCl); la salazón húmeda se lleva a cabo con frecuencia cuando las huevas de otras especies de peces se procesan a productos similares al caviar, tales como caviar de salmón y de trucha. La salazón en el caso del área específica de la invención es un proceso de salazón muy ligero, también conocido como "Malossol", que es una clara indicación de alta calidad. Se prescinde preferiblemente por completo de la pasteurización o el calentamiento a una temperatura de 60 °C o más para el caviar o producto similar al caviar reivindicado en la invención, ya que esto no es necesario y solo perjudicaría la calidad del producto y sus propiedades sensoriales. Como resultado de la salazón Malossol, el caviar o los productos similares al caviar producidos con el método reivindicado tienen una vida útil mínima de al menos 9 a 12 meses si se almacenan a -2 °C. No se congelan en el proceso debido a la ligera salazón.

Una mejora adicional en la calidad del caviar o producto similar al caviar producido resulta de la invención si, según una modificación adicional, el caviar o el producto similar al caviar se almacena en recipientes de vidrio sellados herméticamente durante varios meses, preferiblemente de uno a tres meses, preferiblemente y ventajosamente después de la conservación y la intensificación del sabor. El caviar "madura" durante el almacenamiento y, dependiendo del grado de madurez, la intensidad del sabor aumenta. Sin embargo, esta maduración debe considerarse como un desarrollo adicional del sabor (como ocurre con el queso, por ejemplo) y no tiene nada que ver con la "fase de madurez" de los huevos maduros utilizados en la invención en el sentido de un desarrollo biológico. Aquí, la madurez se refiere a la posibilidad de fecundación y, por lo tanto, a la fase de desarrollo de los huevos vivos. Cuando el caviar está maduro en relación con el sabor, se almacena en recipientes de vidrio que proporcionan suficiente espacio para que madure, ya que no se comprime (como en el caso de los envases en latas metálicas con tapa deslizante) y, por lo tanto, conserva sus aceites intensos en sabor. El caviar envasado en vidrio de esta manera según la invención no debe confundirse con el caviar pasteurizado, que también se envasa con frecuencia en vidrio. Además, el almacenamiento en recipientes de vidrio respetuosos con el medio ambiente evita el sabor metálico, a menudo criticado, del caviar envasado convencionalmente en recipientes metálicos.

Según la siguiente modificación del método, es preferible y ventajoso congelar el caviar o el producto similar al caviar en un intervalo de temperatura entre -20 °C y -15 °C, preferiblemente a -18 °C, después de la conservación y la intensificación del sabor o el almacenamiento y la maduración del sabor. Idealmente, el caviar madura en sabor para el consumo humano hasta el grado de madurez deseado para el cliente respectivo y se congela fresco después de 14 días tras la producción o después de madurar durante un máximo de 3-4 meses. El caviar se congela en recipientes de vidrio de 500 g antes de volver a envasarlo o después de volver a envasarlo para el cliente final en frascos de 30 g, 50 g, 125 g, 250 g o 500 g (posiblemente hasta 1000 g) que se pueden sellar al vacío. El caviar obtenido por sacrificio convencional no se puede congelar. Aunque el caviar pasteurizado o calentado se puede congelar, presenta pérdidas de calidad extremas debido al tratamiento térmico. La posibilidad de congelar el caviar o el producto similar al caviar según la invención significa que se puede optimizar la comercialización del caviar que satisfaga las demandas actuales de alimentos precocinados. Hasta ahora, la comercialización se ha visto limitada por las temperaturas específicas de transporte y almacenamiento de -2 °C a -4 °C, que deben respetarse estrictamente, ya que la mayoría de los proveedores no pueden mantenerlas. Por lo tanto, el caviar obtenido convencionalmente se trata o pasteuriza con conservantes nocivos tales como bórax, por ejemplo, para conservarlo durante un período de al menos 12 meses y más. Sin embargo, el caviar producido con la presente invención puede simplemente congelarse y, por lo tanto, almacenarse y mantenerse fresco durante un período de tiempo más largo. Los estudios han demostrado que el caviar descongelado lentamente en la nevera entre +4 °C y +7 °C no pierde sabor ni textura.

Los huevos vivos, maduros y ovulados utilizados en la invención son fértiles pero no están fecundados. Por lo general, no se humedecen con agua y tienen un contenido natural de potasio en el ovoplasma. Dichos huevos vivos pueden liberarse desde las gónadas a la cavidad abdominal del pez y recolectarse desde allí a través de la abertura genital. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante el desove natural, mediante masaje abdominal (masaje de la cavidad abdominal desde el exterior) o mediante el uso de un catéter, a través del cual se drenan o succionan los huevos fuera de la cavidad abdominal. Los huevos liberados desde las gónadas a la cavidad abdominal se denominan huevos ovulados (fase 5 de madurez), que todavía están rodeados por un líquido de ovulación viscoso. Para evitar la formación de una capa pegajosa sobre los huevos al entrar en contacto con el agua, el líquido de ovulación se enjuaga con una solución salina fisiológica (del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento) antes de iniciar el tratamiento. Los huevos ovulados se pueden obtener de animales vivos, lo que es particularmente sostenible. Una buena visión general de las diferentes fases de madurez del bacalao se ofrece en la publicación de I. G. Katsiadaki y col.,: "Assessment of quality of cod roes and relationship between quality and maturity stage" (J. Sci Food Agric 79:1249-1259 (1999)), en particular en la

Tabla 1 del mismo. Una definición numérica de la fase de madurez es posible con la ayuda de lo que se conoce como el “índice de polarización”. Esto se calcula a partir de la relación de la distancia entre el núcleo celular y la membrana plasmática celular respecto al diámetro del huevo entre el polo animal y el polo vegetativo (semieje mayor). Según una realización adicional de la invención, es por lo tanto preferible y ventajoso tratar huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos con un índice de polarización PI de $0,05 \leq PI \leq 0,15$, preferiblemente $0,05 \leq PI \leq 0,12$. Los huevos con este PI son particularmente adecuados para la recolección para el tratamiento según la invención. Se puede encontrar más información sobre el índice de polarización PI de los huevos, por ejemplo, en las directrices para la cría del esturión (publicación de la **FAO** Ankara 2011 Fisheries and Aquaculture Technical Paper 570 “Sturgeon Hatchery Practices and Management for Release - Guidelines”).

El método reivindicado por la invención puede usarse para tratar los huevos vivos, maduros y ovulados de peces y crustáceos (nombre científico *Crustacea*) cuyos huevos tienen la estructura básica requerida para la invención (más de dos capas en la envoltura del huevo) y que son adecuados para el consumo en forma de caviar o productos similares al caviar. Es preferible y ventajoso tratar huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos capturados en la naturaleza o procedentes de acuicultura, que se han obtenido en estado ovulado mediante masaje abdominal u otra recolección específica, tal como cateterismo, por ejemplo. En este sentido, por ejemplo, también se pueden recolectar animales destinados a la repoblación en la naturaleza, tales como los procedentes de un proyecto de repoblación. Los ingresos por la venta de caviar y productos afines se pueden destinar a medidas de repoblación. Es particularmente preferido y ventajoso que, en el método reivindicado, se traten huevos vivos, maduros y ovulados de peces óseos vivos modernos y primitivos, preferiblemente de especies vivas de esturión. El método se puede utilizar a continuación para producir caviar (auténtico) de la más alta calidad. Sin embargo, también se pueden producir otros productos similares al caviar de la más alta calidad a partir de langostas u otros crustáceos, por ejemplo cangrejos de río, con el método reivindicado. Además, los huevos ovulados muy grandes (por encima de 3,2 mm de diámetro) o blandos e inestables (textura en la de dureza inferior a 0,3 N, por encima de la cual los huevos estallan) pueden tratarse preferiblemente y ventajosamente, ya que el método reivindicado en la presente invención también puede comprender opcionalmente dos etapas de exposición con una estabilización tanto elástica (estimulada eléctricamente) como estructural (estimulada enzimáticamente) de la envoltura del huevo.

Finalmente, la invención también reivindica diferentes productos procedentes de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo que pueden producirse con el método reivindicado, pero también con otros métodos. Los productos se caracterizan por que además se forma una capa estabilizadora elástica en forma de una capa eosinófila hialina con glucosaminoglicanos incorporados en la envoltura del huevo. Sin embargo, en este caso, el huevo vivo no está fecundado, por lo que la capa estabilizadora elástica no se produce en la naturaleza. En el caso de la invención, la capa estabilizadora elástica se encuentra entre la zona radiada interna y la capa alveolar, preferiblemente entre la zona radiada externa y la capa alveolar. Por lo tanto, solo puede producirse en el caso de huevos vivos con una estructura de más de dos capas en la envoltura del huevo. Los erizos de mar, por ejemplo, solo tienen exactamente dos capas en la envoltura del huevo. La nueva capa estabilizadora es transparente, similar a un gel y elástica y se puede teñir histológicamente de rojo con eosina y azul con alcian. Durante la producción con el método reivindicado en la invención, sus características están influenciadas por la concentración de cationes de potasio utilizada en la etapa de exposición al potasio y su posición está influenciada por el tiempo de exposición al potasio.

Para retirar el líquido ovárico, antes del tratamiento, los huevos vivos, maduros y ovulados se tratan con una solución salina (del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento) que no daña los huevos. Se trata de una solución salina fisiológica. Además, es ventajoso y preferible que la solución salina se forme como una solución salina al 0,9 por ciento. Para preparar una solución salina al 0,9 por ciento, se disuelven 9 g de cloruro de sodio (NaCl) por 1 litro de agua empleada. Esta concentración corresponde a la presencia natural en el organismo humano, por lo que se denomina solución salina “fisiológica”.

Además, se reivindica un caviar o un producto similar al caviar producido de huevos no fertilizados, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo, que se caracteriza porque en la envoltura del huevo se forma adicionalmente una reticulación irreversible de cadenas de proteínas mediante moléculas de tirosina incorporada. En este sentido, esta reticulación irreversible adicional está ubicada en la zona radiada interna y la zona radiada externa de los huevos vivos y ovulados de peces o crustáceos. La reticulación irreversible conduce a una estabilización estructural adicional de la envoltura del huevo. Junto con la estabilización elástica existente, también se pueden por tanto utilizar para tratar óvulos ovulados especialmente grandes o blandos. El caviar o el producto similar al caviar se pueden preparar con el método reivindicado, en donde el grado de estabilización estructural en la envoltura del huevo depende entonces del tiempo de exposición al calcio y de la concentración de cationes de calcio en la etapa de exposición al calcio. También se pueden usar otros métodos para producir caviar o un producto similar al caviar con la misma naturaleza de reticulación irreversible de proteínas en la envoltura del huevo. Se pueden encontrar realizaciones adicionales del método y productos de la invención en la siguiente sección específica de la descripción relativa a las realizaciones ilustrativas.

Realizaciones ejemplares

El método para la producción de caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos y dichos productos según la invención y sus ventajosas modificaciones se describen en detalle a continuación para una mejor comprensión de la invención con la ayuda de realizaciones ejemplares y figuras, en las cuales:

- 5 Las **figuras** 1A, B y C muestran imágenes de SEM para comparar huevos vivos extraídos en estado inmaduro y maduro (estado de la técnica),
 - 10 La **figura** 2 muestra una primera tabla de mediciones de grosor de la envoltura del huevo durante el tratamiento de huevos vivos y maduros de esturión siberiano,
 - La **figura** 3 muestra una segunda tabla de mediciones del grosor de la envoltura del huevo durante el tratamiento de huevos vivos y maduros de esturión Beluga,
 - 15 Las **figuras** 4A, B, C y D muestran imágenes de SEM de la serie de tratamientos para la formación de la capa estabilizadora de huevos vivos y maduros de esturión tratados de forma diferente mediante el tratamiento con cationes de potasio, en comparación con el tratamiento doble con cationes de potasio y calcio, así como con cationes de calcio únicamente,
 - 20 Las **figuras** 5A, B, C y D muestran imágenes de TEM relativas la estructura de las capas de la envoltura del huevo con la formación de la nueva capa estabilizadora (SL) entre la zona radiada externa (ZRE) y la capa alveolar (AL),
 - 25 Las **figuras** 6A, B, C y D muestran imágenes de TEM de los gránulos corticales de huevos de esturión maduros no tratados y tratados de forma diferente (solo cationes de potasio, tratamiento doble con cationes de potasio y calcio, solo cationes de calcio),
 - Las **figuras** 7A, B, C y D muestran imágenes microscópicas ópticas de huevos maduros no tratados del esturión siberiano y de huevos vivos y maduros del esturión siberiano tratados con iones de potasio,
 - 30 Las **figuras** 8A, B, C, D muestran imágenes de microscopía óptica de huevos vivos y maduros tratados con cationes de calcio y de huevos vivos y maduros de esturión siberiano tratados con cationes de potasio y con cationes de calcio, y
 - 35 Las **figuras** 9A y B muestran imágenes de SEM y microscópicas ópticas de la estructura de la envoltura del huevo del esturión Beluga después del tratamiento de los huevos vivos y maduros con cationes de potasio y calcio.
- Es conocido a partir de estudios de las relaciones entre el peso o la edad de los esturiones y el tamaño del grano de caviar o la cantidad de caviar recolectado que el diámetro del huevo y, por lo tanto, la calidad del caviar aumenta con el aumento del peso o la edad del esturión. Además, la cantidad de caviar recolectado y, por lo tanto, su éxito económico aumenta con el aumento del peso o la edad del esturión. Los esturiones en su entorno natural no alcanzan la madurez sexual hasta la edad de 12 a 26 años, dependiendo de la especie. La mayoría de los esturiones pasan la fase de crecimiento hasta su primera reproducción en el mar o en los estuarios y a continuación emigran a los ríos para encontrar sus zonas de desove en un terreno pedregoso en agua dulce. Los esturiones en acuicultura también necesitan aproximadamente de 5 a 16 años, dependiendo de la especie de esturión, para alcanzar la madurez sexual inicial y, por lo tanto, la primera recolección de caviar. En la acuicultura, la recolección repetida de caviar de hembras vivas durante muchos años presupone una cría respetuosa con los animales, con una alimentación óptima y una baja densidad de población, y siempre es rentable desde el punto de vista económico y ecológico debido a la madurez sexual tardía y a la larga esperanza de vida. La producción de caviar en el intervalo de toneladas económicamente interesante es posible fácilmente con un flujo de trabajo coordinado desde la recolección y el tratamiento de los huevos extraídos por masaje abdominal hasta el caviar. Las medidas de escalamiento adecuadas pueden lograr una producción diaria de 80 kg o más, dependiendo de la edad del pez y la cantidad de caviar asociado.
- En el método reivindicado, se utilizan huevos vivos y maduros que se han limpiado previamente con solución salina fisiológica. Se trata, por lo tanto, de huevos ovulados que previamente han sido expulsados de las gónadas por finas fibras musculares de las células foliculares debido a su estado de madurez (fase de preparación para la ovulación y fertilidad), un proceso conocido como ovulación. Los óvulos ovulados se liberan, sin residuos celulares y otros residuos, en las trompas de Falopio y la cavidad abdominal de los peces. A continuación se pueden extraer masajeando el abdomen sin comprometer la vida del pez. La superficie completamente limpia de los huevos no ofrece nichos ni arrugas para la infestación por bacterias y hongos, lo que prolonga la vida útil del caviar o de los productos similares al caviar. No es necesario utilizar métodos de conservación tales como bórax, que es perjudicial para la salud humana. Las figuras 1A, B y C muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) del estado de la técnica de un huevo vivo y del proceso de ovulación. La figura 1A muestra un óvulo inmaduro con células foliculares tales como las que se encuentran en el caviar convencional de esturión muerto. La **figura** 1B muestra la ovulación in situ y la liberación del óvulo maduro desde la célula folicular circundante. La **figura** 1C muestra entonces un huevo de esturión vivo y maduro que obviamente es completamente liso y limpio.

En una realización ilustrativa con huevos vivos y maduros después de la ovulación, un posible flujo de trabajo para el método reivindicado se explica con más detalle a continuación con algunas etapas adicionales opcionales:

- 5 • extracción por masaje abdominal de huevos vivos en la fase V de madurez de esturiones hembras vivas tras la disolución de las vesículas germinales,
- 10 • transporte inmediato de los huevos vivos y ovulados extraídos por masaje abdominal junto con el líquido ovárico a un laboratorio de caviar (se evitan en gran medida los tiempos de espera, los inevitables tiempos de espera se pasan en hielo y sin oxígeno cubriendo el líquido ovárico con una película de plástico impermeable al aire),
- 15 • enjuague minucioso inmediato los huevos vivos ovulados en una solución salina fisiológica al 0,9 por ciento hasta que el líquido ovárico se elimine por completo,
- llevar a cabo la etapa de exposición al potasio:
 - preparar una solución de cationes de potasio de 0,1 a 2 milimolares a partir de citrato potásico en agua desionizada con una conductividad de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (a 25 °C) y una temperatura en el intervalo de temperatura polar de 10 °C,
- 20 • introducir los huevos vivos, maduros y ovulados en la solución durante un tiempo de exposición al potasio de 10 minutos, y
- retirar los huevos tratados de la solución, y
- 25 • sumergir brevemente los huevos tratados en una solución salina fisiológica al 0,9 por ciento.

También son posibles otros métodos para extraerlos huevos maduros y ovulados. Incluso con el uso de huevos vivos maduros y ovulados tomados de un animal previamente sacrificado, la sangre y la grasa deben enjuagarse, lo que se logra mediante el tratamiento previo con una solución salina preferiblemente fisiológica. Mediante la inmersión, la elasticidad y el grosor de la capa estabilizadora se pueden controlar adicionalmente (es decir, además de seleccionar la duración del tiempo de exposición). Debido a la influencia eléctrica de los cationes de potasio que se han introducido, el tratamiento descrito provoca la formación de una capa estabilizadora elástica hialina entre la zona radiada externa y la capa alveolar en la envoltura del huevo de los huevos vivos y ovulados. En huevos ovulados de tamaño y blandura normales, un tratamiento con la etapa de exposición al potasio es suficiente. Sin embargo, cuando se utilizan huevos ovulados particularmente grandes, blandos o sensibles de algunos géneros de esturión, por ejemplo, *Huso huso*, *Acipenser transmontanus* o *Acipenser ruthenus*, también se puede añadir (o poner delante) una etapa de exposición al calcio:

- 40 • implementación adicional de la etapa de exposición al calcio:
 - preparar otra solución de cationes de calcio de 0,5 a 2 milimolares de cloruro cálcico en agua desionizada con una conductividad de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (a 25 °C) y a una temperatura en el intervalo de temperatura polar de 10 °C,
- 45 • introducir los huevos vivos, maduros y ovulados en la otra solución durante un tiempo de exposición al calcio de 12 minutos, y
- retirar los huevos ovulados tratados de la otra solución, y
- 50 • sumergir brevemente los huevos ovulados tratados en una solución salina fisiológica al 0,9 por ciento.

Además de la capa estabilizadora elástica del paso de exposición al potasio, esto produce una reticulación proteica estructural adicional de la envoltura del huevo que en los peces y crustáceos se encuentra en las zonas radiata interna y radiata externa de la envoltura del huevo que ya están presentes. Esta reticulación proteica estructural adicional de la envoltura del huevo mediante residuos de tirosina confiere a los huevos especialmente grandes, que antes del tratamiento eran blandos o sensibles, una mayor resistencia plástica, además de la elasticidad obtenida durante la exposición al potasio. La inmersión también se usa aquí para una mayor controlabilidad. El producto resultante es caviar (auténtico) de huevos vivos, maduros y ovulados, que a continuación se puede procesar de la siguiente manera:

- 60 • mezcla del caviar con cloruro de sodio seco, NaCl (3,5 g/100 g de caviar, 3,5 %) que no contiene donantes de potasio ni calcio (antiaglomerantes libres de K^+ - y Ca^{++}), lo que corresponde a la salazón con malossol para su conservación,
- llenar recipientes de vidrio, preferiblemente tarros de 500 g para madurar, con caviar ligeramente salado y sellar herméticamente al vacío los recipientes con tapones de rosca y etiquetar,

- almacenar los recipientes de vidrio a -2 °C durante 2 a 4 meses para que el caviar siga madurando y, opcionalmente
- congelar el caviar fresco o el caviar madurado según los requisitos del cliente en recipientes de vidrio a -18 °C.

Los huevos vivos, maduros y ovulados tratados en la etapa de exposición al potasio forman una zona completamente nueva debido al tratamiento: la capa estabilizadora, que tiene una estructura elástica e hialínica (similar a un gel). La capa estabilizadora se puede teñir fácilmente para su detección. Está ubicada entre la capa alveolar AL y la zona radiada externa ZRE y hasta ahora no se ha descrito en la bibliografía. Debe hacerse referencia a la introducción a la descripción con el correspondiente glosario en **Siddique** para el diseño estructural del huevo de peces y crustáceos.

La tabla en la **figura 2** se basa en las mediciones del grosor (en μm) de la envoltura extracelular del huevo en huevos maduros y ovulados de esturión siberiano, sobre la base de criosecciones con un grosor de capa constante (10 μm), usando análisis de imágenes controlado por ordenador (Zeiss), bajo la influencia de diferentes tratamientos para estabilizar la envoltura del huevo. La tabla muestra la formación de una nueva capa estabilizadora **SL** y el grosor de las capas existentes (**ZRI**, **ZRE**, **AL**) de la envoltura del huevo bajo tratamiento con diferentes concentraciones añadidas en mmol/l de cationes de potasio K^+ solos (de citrato de potasio) y en combinación con cationes de calcio Ca^{++} (de cloruro de calcio) durante las diversas etapas de exposición según la invención. Se trataron huevos vivos, maduros y ovulados del esturión siberiano *Acipenser baerii*. Además de las siglas ya explicadas anteriormente y en **Siddique**, **Mv** significa el valor medio y **Std** significa la desviación estándar. Los valores dados son los de la nueva capa estabilizadora elástica **SL**. Además, se hace referencia al estado de la técnica según el documento WO 2007/045233 A1 mencionado anteriormente.

Los controles de calidad después de los tratamientos mostraron que solo se logra un grosor de la envoltura del huevo de al menos 12 μm a partir de concentraciones de cationes de potasio de 1 mmol/l y 1,5 mmol/l y se forma un producto intermedio que ha perdido su pegajosidad y es lo suficientemente estable como para el procesamiento posterior del caviar. Además, se ha demostrado que una duración de tratamiento preferida de 10 minutos es razonable, de modo que todos los huevos vivos de la solución reaccionan metabólicamente. Una cantidad de tratamiento de 2,5 kg de caviar (en aproximadamente 25 L de solución) se podría obtener en una unidad de tratamiento. El examen sensorial del caviar después del tratamiento con cationes de potasio según la invención mostró que la textura elástica del caviar del esturión siberiano no presentaba ninguna diferencia en las concentraciones que variaban entre 1 mmol/l y 1,5 mmol/l. Por el contrario, los huevos ovulados tratados en una solución con concentraciones más bajas de cationes de potasio tienen una textura diferente y solo unos pocos huevos son estables, mientras que los huevos no tratados son muy blandos y revientan. Según las pruebas sensoriales que se llevaron a cabo, un tratamiento con dos etapas de exposición (cationes de potasio y calcio) conduce a un producto sólido y perlado, también denominado “superexplosivo” en el caso de los huevos del esturión siberiano.

La tabla en la **figura 3** muestra la presencia y el grosor (en μm) de las capas de la envoltura extracelular del huevo con diferentes tratamientos, según la invención de huevos grandes y vivos del esturión Beluga *Huso huso*. Durante el tratamiento de este caviar con cationes de potasio (procedentes de citrato de potasio), también se observó la formación de la nueva capa estabilizadora eosinofílica **SL**, que también está ubicada entre la **ZRE** y la **AL** en la envoltura extracelular del huevo. Las pruebas sensoriales llevadas a cabo en los huevos grandes del esturión Beluga mostraron que el tratamiento doble con cationes de potasio y calcio produce resultados óptimos con respecto a la textura de los frágiles huevos vivos, maduros y ovulados.

Las **figuras 4A, B, C y D** muestran, a manera de ejemplo, imágenes de SEM del cambio en la estructura de la envoltura extracelular del huevo de huevos vivos, maduros y ovulados de esturión siberiano sometidos a diversos tratamientos. Se muestran dos aumentos: a la izquierda, 6000 veces y a la derecha (secciones), 12000 veces. Los tratamientos siempre se llevaron a cabo en el huevo vivo, que se ultracongeló en hexano a -80 °C para mantener su estado nativo para la producción de criosecciones histológicas.

Figura 4A En huevos maduros, ovulados no tratados, las zonas de la envoltura del huevo no muestran una separación clara entre sí (estado de la técnica).

Figura 4B Bajo la influencia de 0,5 mmol/l de potasio, la nueva capa estabilizadora **SL** ya se está formando entre la zona radiada externa **ZRE** y la capa alveolar **AL**, mientras que la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE** muestran una organización proteica suelta sin cambios, como en los huevos no tratados.

Figura 4C El tratamiento doble secuencial de los huevos ovulados con cationes de potasio y calcio muestra ambos rasgos morfológicos característicos en la SEM, a saber, la capa estabilizadora **SL** mediante el tratamiento con potasio Y la torsión y reticulación de las cadenas proteicas de la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE**, lo que es característico de un tratamiento con calcio, compárese con la **figura 4D**.

Figura 4D Un tratamiento con calcio solo produce una fuerte torsión y reticulación de las cadenas proteicas sueltas de la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE** (estado de la técnica), compárese con la **figura 4A** y la **figura 4B** sin tratamiento con calcio.

Las **figuras 5A, B, C y D** muestran imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM, con un aumento de 3000 veces) de la estructura multicapa de la envoltura del huevo de esturión maduros durante el tratamiento con 1,0 mmol/l de cationes de potasio. La **figura 5A** muestra la zona radiada interna **ZRI** con fibrillas blandas y turbias separadas de la zona radiada externa **ZRE** por la capa epitaxial **EP** (el fenómeno solo puede identificarse ultraestructuralmente). La zona radiada externa **ZRE** se caracteriza por una red filamentosa de fibrillas alargadas. La **figura 5B** muestra la formación ultraestructural de la nueva capa estabilizadora **SL** con una estructura de grano fino directamente entre la zona radiada externa **ZRE** y, según la **figura 5C**: la capa alveolar **AL**, que penetra hasta la periferia de la envoltura del huevo, según la **figura 5D**: por pequeños conductillos (pequeños conductos, canales). Los análisis ultraestructurales confirman que el tratamiento con cationes de potasio (1,0 mmol/l) según la invención conduce a la formación de una nueva capa estabilizadora **SL** desconocida hasta ahora con una estructura amorfa y una posición entre la zona radiada externa **ZRE** y la capa alveolar **AL** en peces y crustáceos.

Las **figuras 6A, B, C y D** muestran imágenes de TEM (con un aumento de 3000 veces) de los gránulos corticales **CG** en el ovoplasma periférico dentro de la membrana plasmática de los huevos maduros ovulados, en donde la **figura 6A** muestra un huevo no tratado (estado de la técnica), la **figura 6B** muestra un huevo tratado con cationes de potasio, la **figura 6C** muestra un huevo tratado con cationes de potasio y calcio y la **figura 6D** muestra un huevo tratado solo con cationes de calcio (estado de la técnica).

Los gránulos corticales son orgánulos secretores (regiones estructuralmente delimitables) que se encuentran en los huevos y están estrechamente relacionados con el evento de fecundación. Los gránulos corticales contienen enzimas tales como la peroxidasa y elementos estructurales para la reticulación por tirosina de la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE**. Como se analizó mediante TEM bajo la influencia de los distintos tratamientos, la reacción cortical y la liberación de su contenido se desencadenan exclusivamente por el tratamiento con cationes de calcio. Un proceso idéntico también se produce en la fecundación natural por la onda de calcio inducida por los espermatozoides en la membrana plasmática del huevo. En el huevo no tratado (**figura 6A**), los gránulos corticales (**CG**) con su complemento enzimático pueden verse claramente como vesículas grandes y redondas (burbujas) en el ovoplasma periférico, que también contienen elementos estructurales. Del mismo modo, los gránulos corticales **CG** siguen presentes sin cambios durante el tratamiento con potasio solo según la invención (**figura 6B**). Sin embargo, se observa un fuerte transporte vesicular en la membrana del huevo desde el ovoplasma hasta la envoltura acelular del huevo. En la **figura 6A** y la **figura 6B**, la yema está marcada con **D**. En un tratamiento doble con cationes de potasio y calcio (**figura 6C**), se produce tanto la liberación (flechas) del contenido de los gránulos corticales **CG** como la formación de la nueva capa estabilizadora **SL**. El tratamiento solo con cationes de calcio (**figura 6D**), a su vez, solo conduce a una reacción cortical, en donde el contenido se libera en la envoltura acelular del huevo y los residuos de tirosina inician la reticulación enzimática de la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE**. Las vacuolas **V** vacías permanecen en el ovoplasma.

Para el cribado diagnóstico de las criosecciones para detectar el efecto del potasio en la invención, se muestran imágenes microscópicas ópticas (aumento de 400 veces) del estado de la técnica de huevos vivos no tratados del esturión siberiano *Acipenser baerii* en la **figura 7A** y la **figura 7B**. La fotografía de la izquierda de la **figura 7A** muestra la tinción con HE (tinción con hematoxilina-eosina); la fotografía de la derecha de la **figura 7B** muestra la tinción con azul alcian. Esta prueba tiñe los glucosaminoglicanos, GAG, el ácido hialurónico y la fibrina. Se puede observar que el azul alcian falta en las distintas capas de la envoltura del huevo, pero es más pronunciado en el ooplasma **OP**. Las capas individuales se distinguen como se ha descrito anteriormente y sus grosores se muestran mediante flechas de dos puntas.

Por el contrario, la **figura 7C** y la **figura 7D** muestran fotografías de criosecciones de huevos vivos y maduros en estado ovulado del esturión siberiano *Acipenser baerii* tratados con el método de etapa de exposición al potasio reivindicado en la invención. Los huevos se trataron con una concentración de 1,5 mmol/l de cationes de potasio (procedentes de citrato de potasio). Cabe señalar la aparición de la nueva capa estabilizadora **SL** entre la zona radiada externa **ZRE** y la capa alveolar **AL** en la envoltura extracelular del huevo. La fotografía de la izquierda de la **figura 7C** muestra que, después de la tinción con eosina, esta nueva capa estabilizadora **SL** es particularmente eosinófila. La fotografía de la derecha de la **figura 7D** muestra que, después de la tinción con azul alcian, esta nueva capa estabilizadora **SL** es particularmente rica en GAG. La elasticidad particularmente ventajosa de la nueva capa estabilizadora **SL** puede derivarse de ello.

Para el cribado diagnóstico de las criosecciones para determinar el efecto del calcio por sí solo y el efecto del tratamiento doble con los cationes de potasio y calcio, la **figura 8A** y la **figura 8B** muestran fotografías del estado de la técnica de criosecciones de huevos maduros del esturión siberiano *Acipenser baerii* tratados con el método según el documento WO 2007/045233 A1, con un aumento de 400 veces. La fotografía de la izquierda en la **figura 8A** muestra la tinción con HE (tinción con hematoxilina-eosina); la fotografía de la derecha en la **figura 8B** muestra la tinción con azul alcian. Se trataron los huevos ovulados del esturión siberiano. La fotografía de la izquierda en la **figura 8A** con la tinción con HE revela las cadenas proteicas reticuladas por moléculas de tirosina en la zona radiada interna

ZRI y en la zona radiada externa **ZRE**. Además, se puede observar una clara separación entre las dos zonas. La reticulación da como resultado la estabilización estructural de la envoltura del huevo. En la fotografía de la derecha de la **figura 8B**, con la tinción con azul alcán, se puede observar que la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE** se tiñen muy poco, lo que implica que hay poco GAG y una menor elasticidad, mientras que en el ooplasma **OP**, una fuerte tinción indica una gran cantidad de GAG.

La **figura 8C** y la **figura 8D** muestra fotografías de criosecciones de huevos vivos ovulados procesados con el método reivindicado, que se han tratado en la etapa de exposición adicional al calcio con el método según el documento WO 2007/045233 A1. Los huevos maduros ovulados del esturión siberiano *Acipenser baerii* se trataron con 1,5 mmol/l de cationes de potasio (procedentes de citrato de potasio) en la etapa de exposición al potasio y con 1,6 mmol/l de cationes de calcio (procedentes de cloruro de calcio) en la etapa de exposición al calcio. Además de consolidar la reticulación de la envoltura del huevo que se muestra en las fotografías de la **figura 8A** y la **figura 8B**, la nueva capa estabilizadora hialina **SL** con su función estabilizadora elástica para la envoltura del huevo también se puede ver ahora en las fotografías de la **figura 8C** y la **figura 8D**. Por lo tanto, los huevos vivos, maduros y ovulados tratados del esturión siberiano se estabilizan tanto elásticamente (mediante GAG) como estructuralmente (mediante la reticulación de proteínas) y forman un caviar perfecto.

La **figura 9A** muestra una imagen de SEM característica (con un aumento de 12.000 veces) de la envoltura del huevo de huevos vivos y maduros del esturión Beluga *Huso huso* después de un tratamiento doble según la invención. La **figura 9B** muestra una imagen de microscopio óptico (con un aumento de 400 veces) de la envoltura del huevo de huevos vivos y maduros del esturión Beluga *Huso huso* después de un tratamiento doble según la invención. Ambas imágenes muestran la nueva capa estabilizadora **SL** y la reticulación de la zona radiada interna **ZRI** y la zona radiada externa **ZRE**. Además, es perceptible que los huevos de *Huso huso* tienen una capa alveolar **AL** extremadamente distintiva con grandes vacuolas **V**. El cribado con la ayuda de las criosecciones con tinción H&E confirma la formación de la invención de la nueva capa estabilizadora elástica **SL**, con una etapa de exposición a los cationes de potasio y la reticulación adicional de las proteínas en la envoltura del huevo, con dos etapas de exposición a los cationes de potasio y calcio.

Lista de símbolos de referencia

AL	Capa alveolar
Ca⁺⁺	Cationes de calcio
CG	Gránulos corticales
CYT	Citoplasma (OP)
D	Yema
EP	Capa epitaxial
K⁺	Cationes de potasio
Mv	Valor medio
OP	Plasma de ovocito (ovoplasma)
pAL	Capa alveolar (hacia la periferia de la envoltura del huevo)
PO	Membrana plasmática de ovocitos (óvulo)
SL	Capa estabilizadora
Std	Desviación estándar
V	Vacuola
ZRI	Zona radiada interna
ZRA	Zona radiada externa

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo, en donde los huevos vivos, maduros y ovulados están en un estado fértil pero no fecundado y tienen un contenido natural de potasio en el ovoplasma, mediante el tratamiento de los huevos vivos, maduros y ovulados en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento y, posteriormente, en una solución que contiene agua y al menos un componente catiónico disuelto en la misma que actúa para estabilizar la envoltura del huevo de los huevos vivos, maduros y ovulados,
caracterizado porque en una etapa de exposición al potasio, el potasio se disuelve en agua como el componente catiónico en una concentración de cationes de potasio de entre 0,1 mmol/l y 3,0 mmol/l, en donde antes de la adición de un donante de potasio para la formación del componente catiónico, el agua se desioniza y está a una temperatura en el intervalo de temperatura natural de desove para los peces y crustáceos de entre 1 °C y 29 °C, y **porque** los huevos vivos, maduros y ovulados se tratan en la solución durante un tiempo de exposición al potasio de entre 5 minutos y 30 minutos, en donde, finalmente, la inmersión de los huevos vivos, maduros y ovulados se lleva a cabo en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento.
2. El método según la reivindicación 1,
caracterizado porque el donante de potasio empleado es al menos una sal de potasio, preferiblemente la sal de ácido cítrico y/o la sal de ácido clorhídrico y/o la sal de ácido sórbico.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado porque** la concentración de los cationes de potasio en la una solución es de 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,65 mmol/l, 1,6 mmol/l o 2,0 mmol/l, preferiblemente 1,0 mmol/l o 1,5 mmol/l.
4. El método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el tiempo de exposición al potasio en la etapa de exposición al potasio está entre 10 minutos, 12 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos.
5. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque después o antes de la etapa de exposición al potasio, en una etapa de exposición al calcio en otra solución, el calcio se disuelve en agua como componente catiónico en una concentración de los cationes de calcio de entre 0,1 mmol/l y 3 mmol/l, en donde antes de la adición de un donante de calcio para la formación del componente catiónico, el agua se desioniza y está a una temperatura de entre 1 °C y 29 °C, que está en el intervalo de temperatura natural de desove de peces y crustáceos, y porque los huevos vivos, maduros y ovulados se tratan en la solución durante un tiempo de exposición al calcio de entre 9 minutos y 30 minutos, en donde, finalmente, la inmersión de los huevos vivos, maduros y ovulados se lleva a cabo en una solución salina del 0,6 por ciento al 1,0 por ciento.
6. El método según la reivindicación 5,
caracterizado porque el donante de calcio empleado es al menos una sal de calcio, preferiblemente citrato de calcio, cloruro de calcio y/o sorbato de calcio.
7. El método según la reivindicación 5 o la reivindicación 6,
caracterizado porque la concentración de los cationes de calcio en la otra solución es de 0,5 mmol/l, 0,8 mmol/l, 1,0 mmol/l, 1,5 mmol/l, 1,6 mmol/l o 2,0 mmol/l.
8. El método según una de las reivindicaciones 5 a 7,
caracterizado porque el tiempo de exposición al calcio en la etapa de exposición al calcio es de 10 minutos, 12,5 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 20 minutos o 25 minutos.
9. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque la temperatura de la una solución en la etapa de exposición al potasio y/o de la otra solución en la etapa de exposición al calcio en un intervalo de temperatura polar está entre 1 °C y 15 °C, preferiblemente entre 5 °C y 12 °C, de forma particularmente preferible 10 °C, en un intervalo de temperatura moderada está entre 10 °C y 20 °C, preferiblemente 15 °C, de forma particularmente preferible 12 °C, o en un intervalo de temperatura tropical está entre 20 °C y 29 °C, preferiblemente 27 °C, de forma particularmente preferible 21 °C.
10. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque el agua desionizada tiene una conductividad eléctrica a 25 °C de entre 1 µS/cm y 15 µS/cm, preferiblemente 10 µS/cm o inferior, de forma particularmente preferible 1 µS/cm.
11. El método según una de las reivindicaciones anteriores,

caracterizado porque la una y/o la otra solución tiene un pH de entre 6,8 y 8,0, preferiblemente entre 7,0 y 7,9, de forma particularmente preferible 7,2 o 7,4 o 7,5.

- 5 12. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque, después de la última etapa de exposición llevada a cabo con fines de conservación e intensificación del sabor, se lleva a cabo una salazón suave con cloruro de sodio del 2,0 % al 3,8 %, preferiblemente al 3,5 % con respecto a la cantidad de caviar o producto sustituto del caviar, en donde el cloruro de sodio está libre de donantes de potasio y calcio.
- 10 13. El método según la reivindicación 12,
caracterizado porque, después de la conservación y la intensificación del sabor, el almacenamiento del caviar o el producto similar al caviar se lleva a cabo en recipientes de vidrio sellados herméticamente durante varios meses, preferiblemente de uno a tres meses, a una temperatura entre -2 °C y -4 °C.
- 15 14. El método según la reivindicación 12 o la reivindicación 13,
caracterizado porque, después de la conservación y la intensificación del sabor o el almacenamiento, el caviar o el producto similar al caviar se congela a se congela a una temperatura en el intervalo entre -20 °C Y -15 °C, preferiblemente a -18 °C.
- 20 15. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque se tratan huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos con un índice de polarización "PI" de $0,05 \leq PI \leq 0,15$, preferiblemente $0,05 \leq PI \leq 0,12$.
- 25 16. El método según una de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque se tratan huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos capturados en la naturaleza o procedentes de acuicultura y que se recolectan en un estado ovulado mediante desove o masaje abdominal.
- 30 17. El método según la reivindicación 16,
caracterizado porque se recolectan huevos vivos, maduros y ovulados de peces óseos actuales y primitivos, preferiblemente de especies de esturión, o huevos vivos y maduros de crustáceos, preferiblemente de langostas.
- 35 18. Método según una de las reivindicaciones anteriores 6 a 17,
caracterizado porque se tratan huevos vivos, maduros y ovulados de gran tamaño, con un tamaño de grano mayor o igual a 3,2 mm de diámetro, o huevos vivos, maduros y ovulados blandos, inestables, con una carga antes de la ruptura menor o igual a 0,3 N.
- 40 19. El método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la solución salina es una solución salina al 0,9 por ciento.
- 45 20. Un caviar o un producto similar al caviar a partir de huevos vivos, maduros y ovulados de peces o crustáceos que tienen tres o más capas en la envoltura del huevo, en donde los huevos vivos, maduros y ovulados están en un estado fértil pero no fecundado y tienen un contenido natural de potasio en el ovoplasma,
caracterizado porque se forma una capa estabilizadora elástica (SL) en la envoltura del huevo entre la zona radiada interna (ZRI) y la capa alveolar (AL), preferiblemente entre la zona radiada externa (ZRE) y la capa alveolar (AL), y tiene propiedades eosinofílicas e hialínicas y se incorpora a los glicosaminoglicanos.
- 50 21. El caviar o producto similar al caviar según la reivindicación 20,
caracterizado porque, además, se desarrolla una reticulación irreversible de cadenas proteicas mediante moléculas de tirosina integradas en la envoltura del huevo en la zona radiada interna (ZRI) y en la zona radiada externa (ZRE).

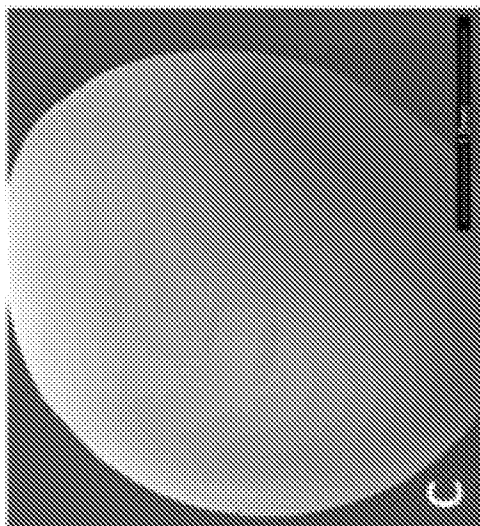


Figura 1C
Estado de la técnica

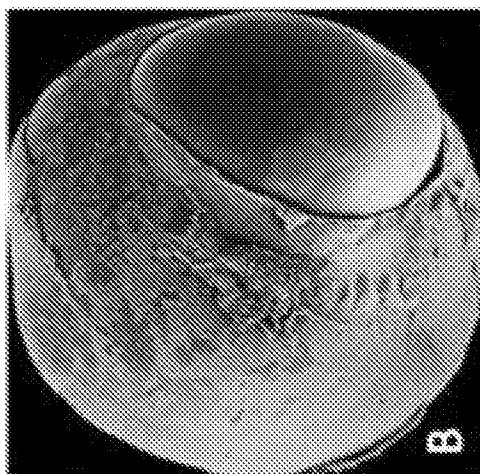


Figura 1B
Estado de la técnica

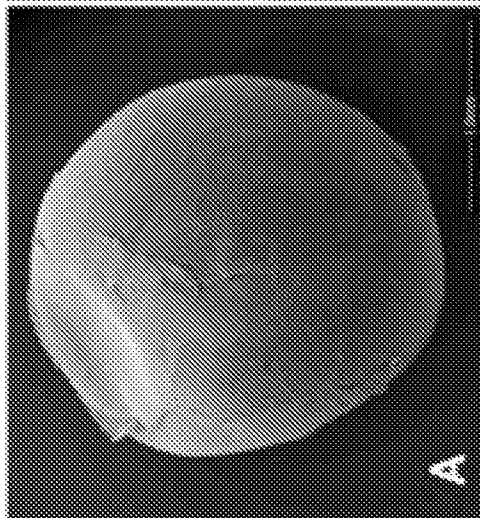


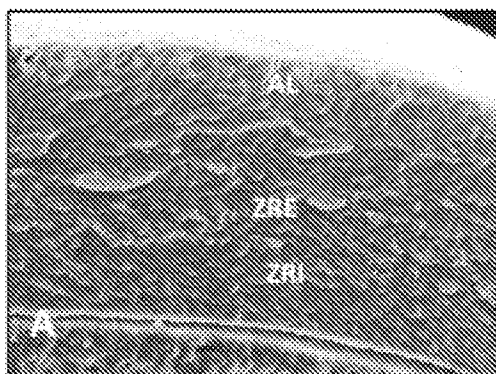
Figura 1A
Estado de la técnica

Capas de la envoltura del huevo	ZRI Mv	ZRI Std	ZRE Mv	ZRE Std	SL Mv	SL Std	AL Mv	AL Std
Control no tratado	21,2	6,0	32,9	7,5	0,0	0,0	64,2	9,6
K⁺ procedente de citrato de potasio								
K ⁺ 0,1 mmol/l	18,0	5,5	24,8	4,7	6,3	0,6	72,2	16,4
K ⁺ 0,5 mmol/l	30,5	5,3	28,9	5,3	6,9	1,0	97,4	29,7
K ⁺ 1,0 mmol/l	18,8	4,4	19,0	3,0	12,6	1,5	77,3	3,7
K ⁺ 1,5 mmol/l	17,5	2,5	27,7	5,8	12,5	3,7	73,2	13,5
K ⁺ 0,5 mmol/l + Ca ⁺⁺ 0,8 mmol/l	17,3	1,6	27,3	3,8	12,0	1,9	67,4	8,9
WO 2887/045233 A1								
Ca ⁺⁺ 0,4 mmol/l	16,7	4,7	27,7	5,1	0,0	0,0	92,0	17,6
Ca ⁺⁺ 0,8 mmol/l	21,0	3,9	27,0	6,4	0,0	0,0	92,4	25,3

Figura 2

Capas de la envoltura del huevo	ZRI Mv	ZRI Std	ZRE Mv	ZRE Std	SL Mv	SL Std	AL Mv	AL Std
Control no tratado	12,6	1,9	9,8	1,7	0,0	0,0	37,6	5,9
K⁺ procedente de citrato de potasio								
K ⁺ 0,5 mmol/l	15,7	0,4	15,0	2,4	13,2	1,8	61,8	9,2
K ⁺ 0,65 mmol/l	17,0	3,2	13,8	2,4	17,0	2,1	60,0	8,2
K ⁺ 0,65 mmol/l + Ca ⁺⁺ 1,6 mmol/l	13,1	1,5	12,0	2,4	10,7	0,0	53,5	9,2

Figura 3



Estado de la técnica
Figura 4A

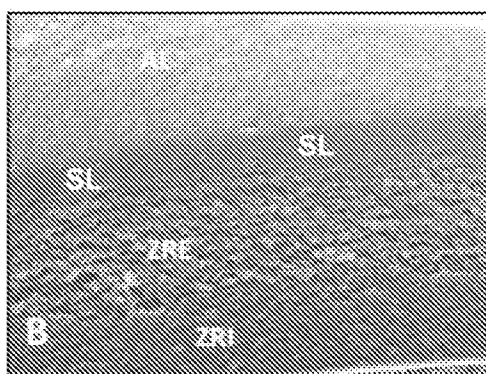
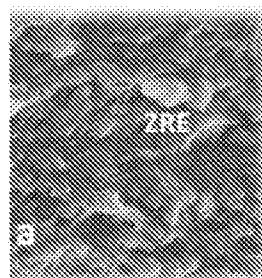


Figura 4B

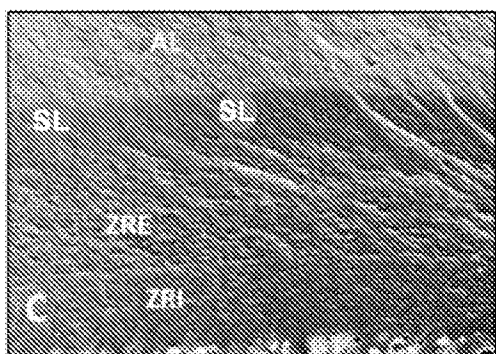
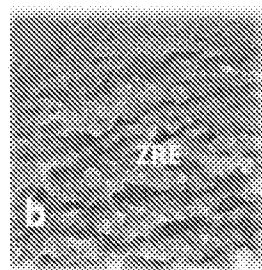
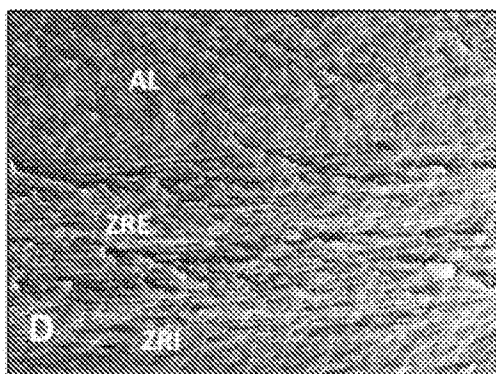
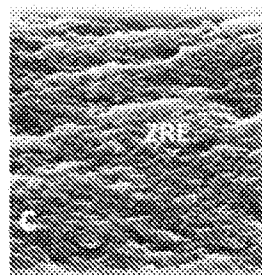
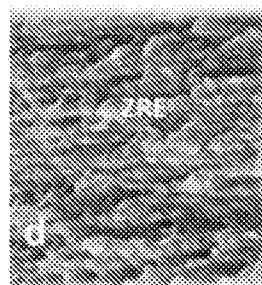


Figura 4C



Estado de la técnica
Figura 4D



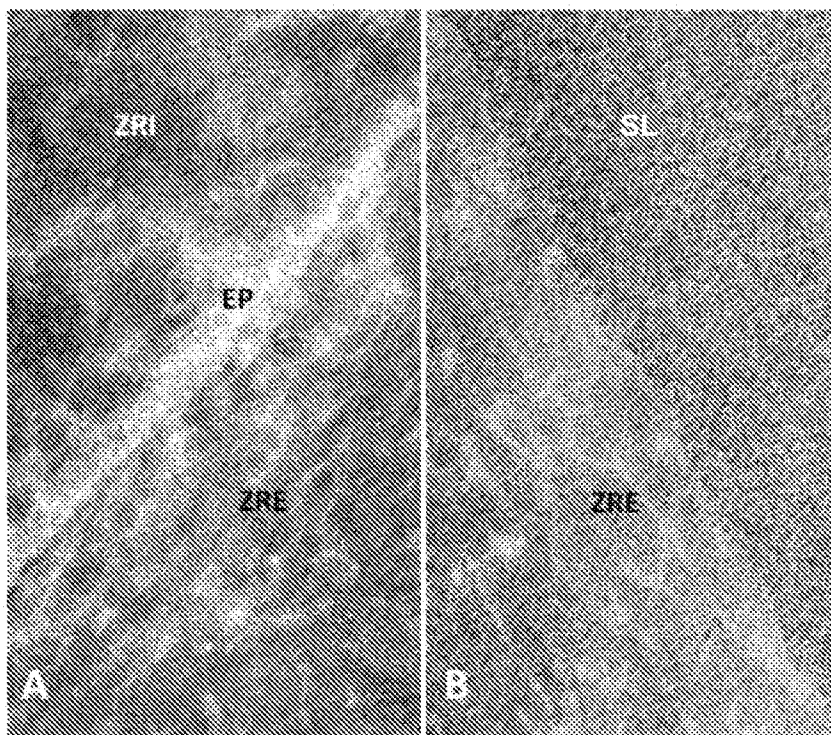


Figura 5A

Figura 5B

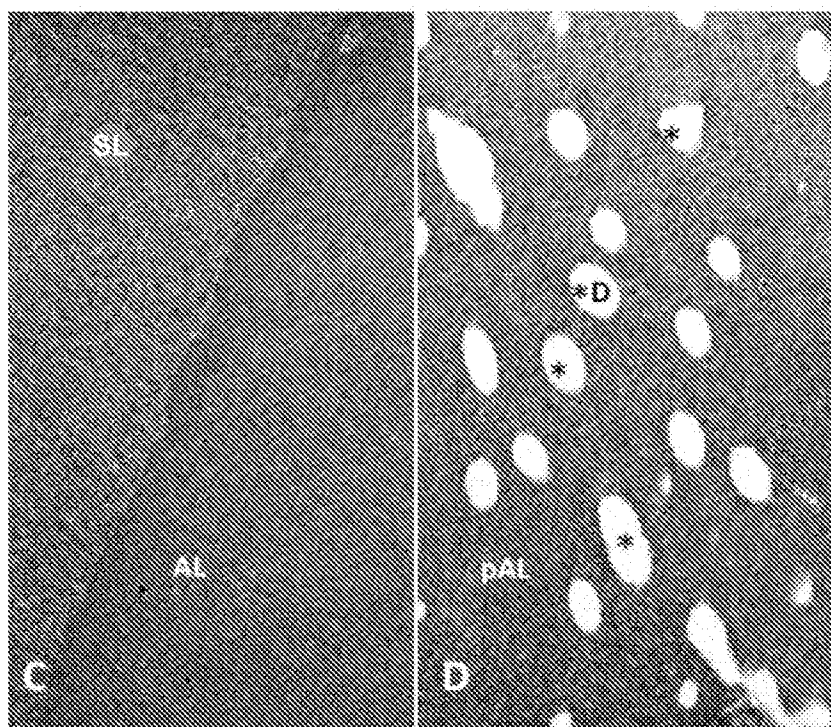


Figura 5C

Figura 5D

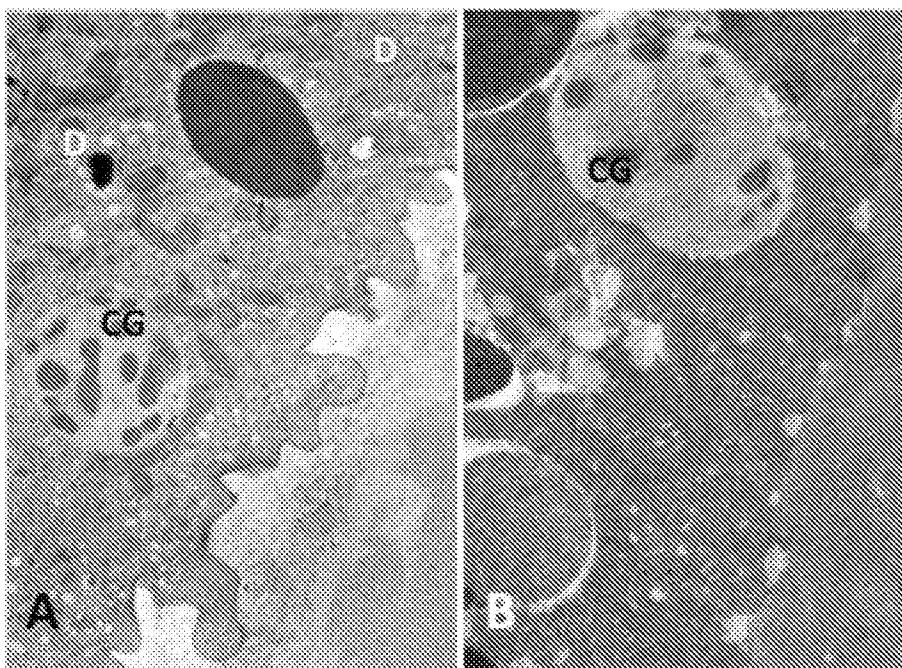


Figura 6A Estado de la técnica

Figura 6B

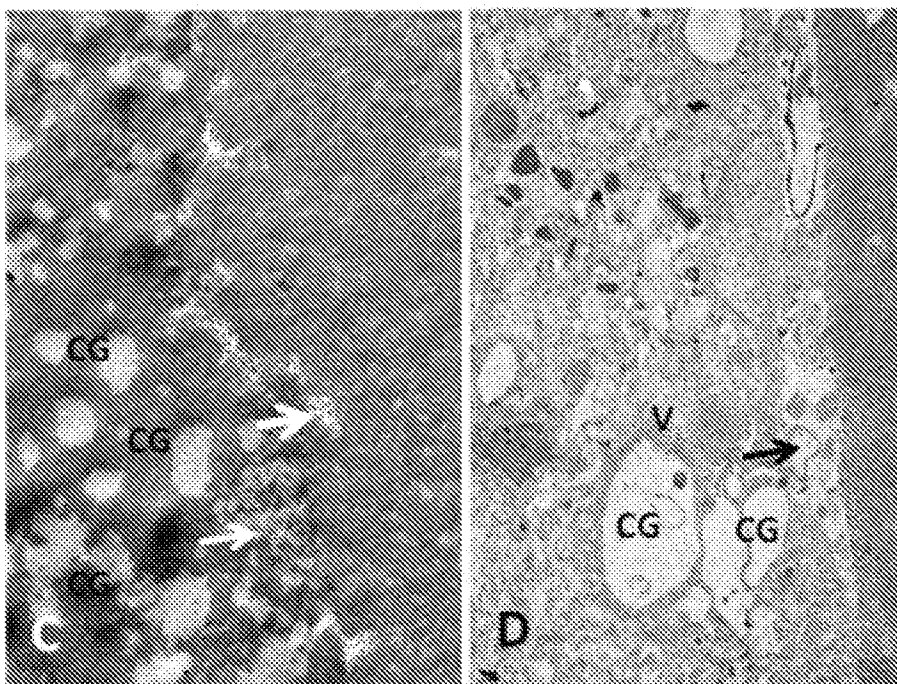


Figura 6C

Estado de la técnica Figura 6D

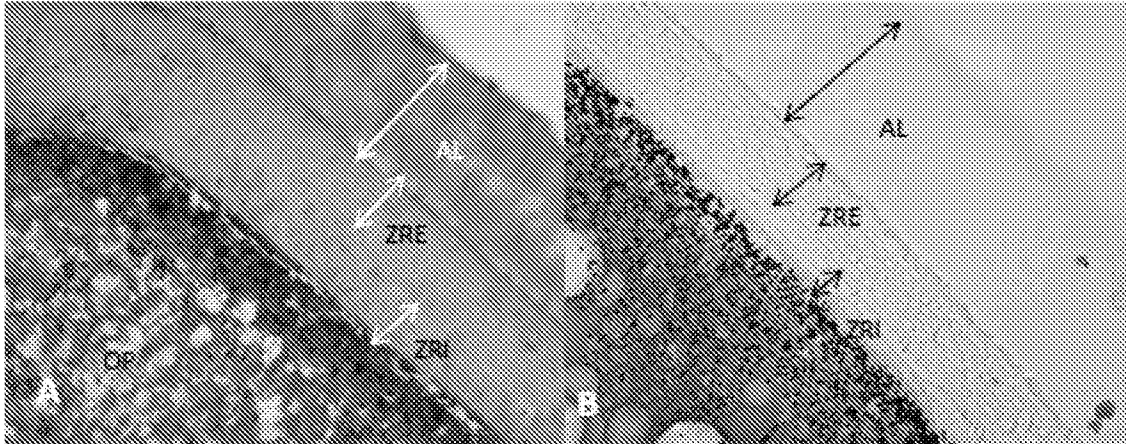


Figura 7A Estado de la técnica

Estado de Figura 7B la técnica

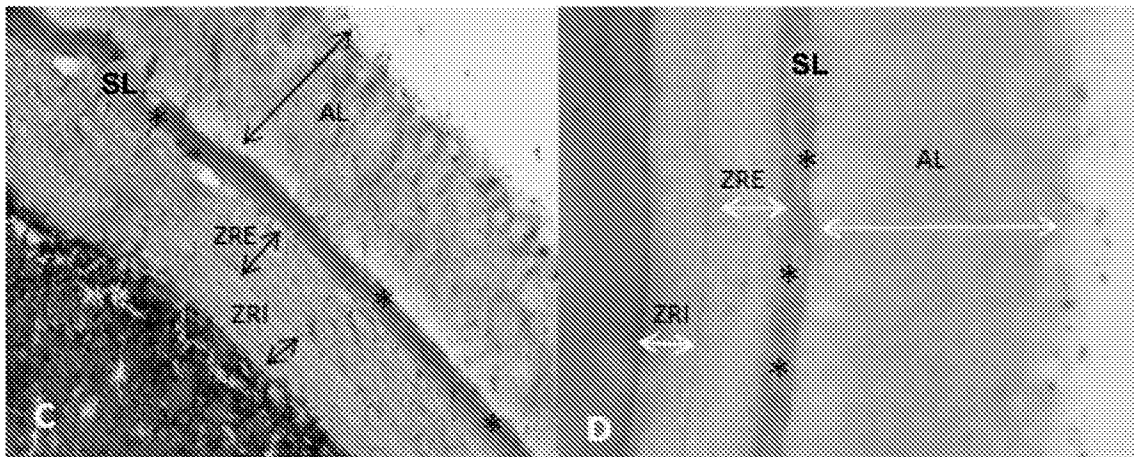


Figura 7C

Figura 7D

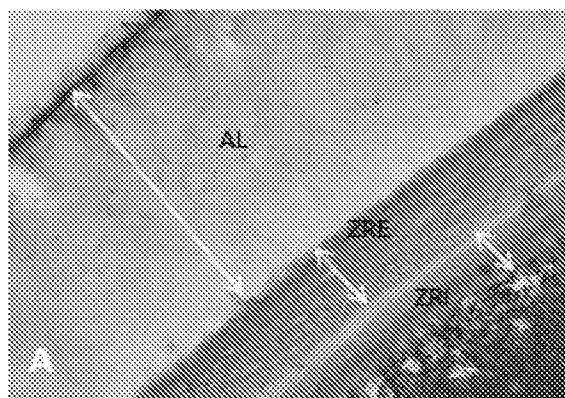
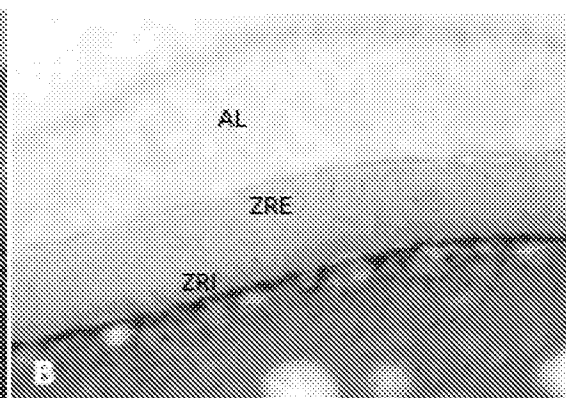


Figura 8A Estado de la técnica



Estado de **Figura 8B** la técnica

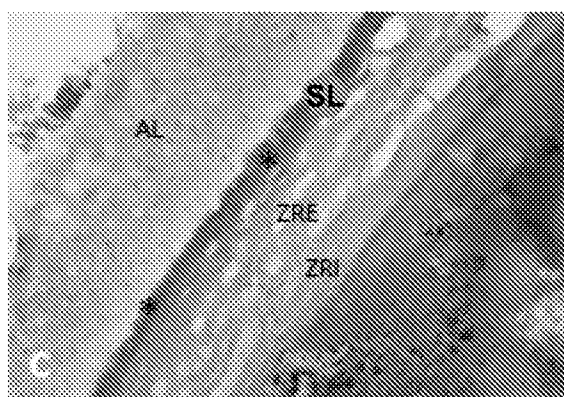


Figura 8C

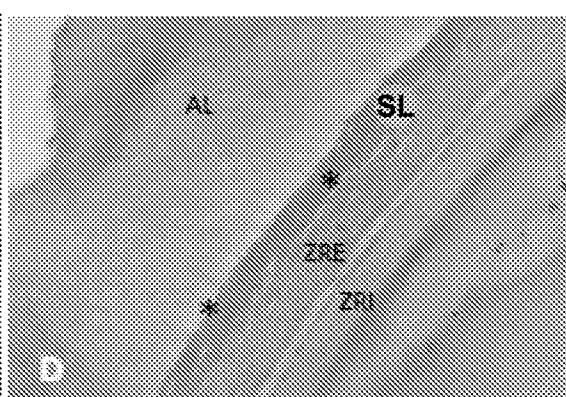


Figura 8D

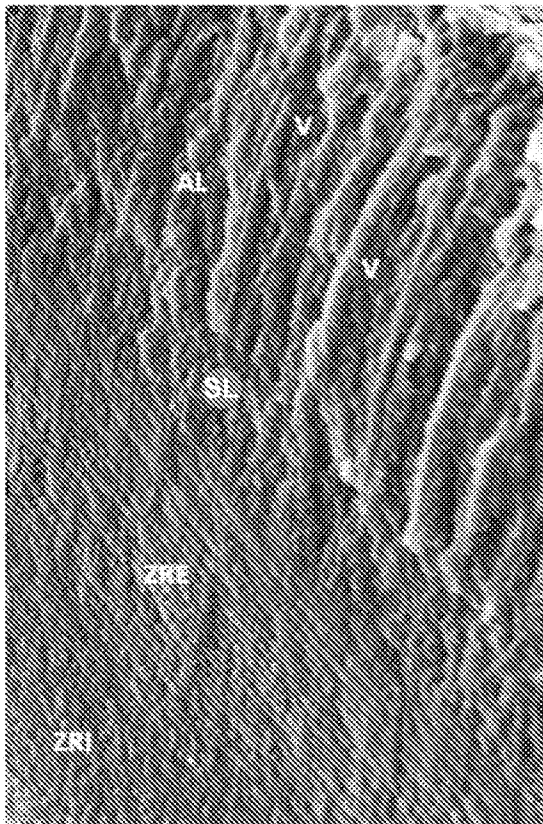


Figura 9A

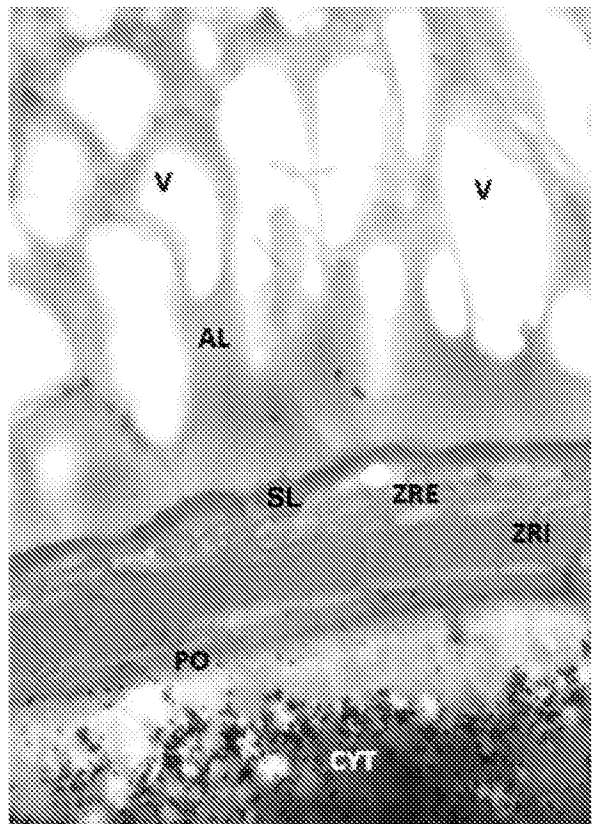


Figura 9B