



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 186 467**

② Número de solicitud: 200000516

⑤ Int. Cl.7: **C07C 39/08**

A23L 1/30

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.03.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

Fecha de la concesión: **03.08.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Brenes Balbuena, Manuel y
Castro Gómez-Millán, Antonio de**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.**

㉑ Resumen:

Obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.

El procedimiento para la obtención de un extracto fenólico, con alta concentración en sustancias antioxidantes, consiste en ultrafiltrar diferentes soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa conservadas durante meses (soluciones del tratamiento con hidróxido sódico, aguas de lavado, salmueras) mediante membranas de tamaño de poro entre 1000-10000 daltons, adsorber las sustancias fenólicas en resinas no-iónicas, recuperar los fenoles mediante el empleo de etanol, evaporar el disolvente orgánico, tratar con carbón activo la solución acuosa resultante, congelar el líquido a temperaturas inferiores a 0°C y liofilizar. Mediante este procedimiento se consigue obtener un extracto sólido con un contenido en hidroxitirosol superior al 60-80%. El procedimiento también permite obtener un extracto rico tanto en hidroxitirosol como en el glucósido del ácido elenólico.

ES 2 186 467 B1

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

DESCRIPCION

Obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del área de Agroalimentación, en concreto en la obtención de sustancias de origen natural a partir de subproductos de la industria alimentaria. Sin embargo, el procedimiento de invención puede tener también una gran importancia para la industria Farmacéutica, Cosmética y Química.

Estado de la técnica

La elaboración de aceitunas verdes estilo español o sevillano implica una etapa de tratamiento de los frutos con una solución de NaOH, lavado posterior de los mismos con agua, seguido de su inmersión en salmuera. Durante la permanencia en ella, generalmente tiene lugar una fermentación de tipo láctico, con lo que la salmuera se enriquece en dicho ácido. De otra parte, las aceitunas poseen una alta concentración de sustancias fenólicas, en especial oleuropeína, (Amiot et al., 1986; J. Agric. Food Chem. 34, 823-826). El tratamiento alcalino hidroliza la oleuropeína dando lugar al fenol hidroxitirosol y al glucósido del ácido elenólico (Brenes and de Castro, 1998; J. Sci. Food Agric. 77, 353-358). Así, las soluciones de hidróxido sódico, aguas de lavado y salmueras se encuentran muy enriquecidas en ambas sustancias (Sánchez et al., 1995; J. Sci. Food Agric. 37, 19-24.; Brenes et al., 1995; J. Agric. Food Chem. 43, 2702-2706). Todas estas soluciones representan un grave problema de vertido y la obtención de sustancias de interés alimentario, nutricional y de salud a partir de las mismas podría ayudar a disminuir o resolver el grave problema medioambiental que representan.

Otra de las preparaciones comerciales de aceitunas de mesa es la elaboración de aceitunas ennegrecidas por oxidación. En este tipo de elaboración las aceitunas se conservan en soluciones acidificadas con ácido acético y opcionalmente también se emplea NaCl. Los frutos se conservan durante meses en estas soluciones acuosas y a lo largo de este periodo se van difundiendo, entre otras, las sustancias fenólicas desde el fruto a los medios líquidos que las rodean. Paralelamente, debido a las condiciones ácidas del medio, la oleuropeína se va hidrolizando en el medio ácido y se va formando hidroxitirosol (Brenes et al., 1993; J. Food Sci. 58, 347-350). Estas soluciones acidificadas, ricas en hidroxitirosol, son también, en la actualidad, vertidos de la industria del aderezo de aceitunas.

Tanto las soluciones de conservación de las aceitunas ennegrecidas por oxidación como las salmueras de fermentación de las verdes estilo español son líquidos disponibles a lo largo de todo el año. Sin embargo, las soluciones de hidróxido sódico y las aguas de lavado se generan en un periodo corto de tiempo, entre 1 y tres meses. Por ello, es necesario un método de conservación de estas soluciones con vistas a no producirse malos olores, pérdidas de sustancias fenólicas por oxidación del medio, etc. No existe ningún estudio sobre este tema y el procedimiento de invención

contempla esta etapa previa a la extracción de las sustancias de interés.

Los compuestos que se pretenden obtener son en primer lugar un extracto fenólico muy rico en hidroxitirosol (3,4-dihidroxifenil etanol). Esta sustancia tiene un alto interés alimentario, nutricional y cosmético ya que es un ortodifenol de gran capacidad antioxidante. De hecho, es, en gran medida, responsable del alto grado de estabilidad que posee el aceite de oliva frente a los de semilla. (Baldioli et., 1996; J. Am. Chem. Oil Soc. 73,1589-1593).

Otra de las sustancias que se obtienen mediante la aplicación de la presente invención es el glucósido del ácido elenólico. El interés por la misma reside en su actividad antibacteriana y antivírica (Heinze et al., 1975; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 8, 421-425).

Finalmente, no existe ningún método patentado o artículo publicado sobre la obtención de estas sustancias, bien puras o en extractos, a partir de los diferentes líquidos del aderezo de aceitunas de mesa. A lo largo de varios años se ha desarrollado un proceso de obtención de dichas sustancias, fruto del cual, es el procedimiento que se patenta.

Descripción de la invención

Consiste en obtener un extracto fenólico, rico en hidroxitirosol, a partir de diferentes líquidos del aderezo de aceitunas.

Los líquidos a partir de los cuales se puede obtener el extracto fenólico son las soluciones de hidróxido sódico, aguas de lavado y salmueras de fermentación del proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo español y, por otra parte, las soluciones ácidas de conservación de las aceitunas destinadas a negras oxidadas o de color cambiante.

Cuando se emplean salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo español o soluciones ácidas de conservación de las aceitunas negras por oxidación o de color cambiante se parte de líquidos que han estado conservados en el fermentador en contacto con las aceitunas al menos durante 5-8 meses. Estas salmueras de fermentación pueden proceder del proceso tradicional con lavados de los frutos después del tratamiento con NaOH, o bien de procesos en los que no se lavan las aceitunas con lo cual la concentración en sustancias fenólicas de las mismas es mucho mayor (González et al., 1984; Grasas y Aceites 35, 155-159).

Cuando se parte de soluciones de hidróxido sódico o aguas de lavado del proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo español es necesario conservar estos líquidos durante un periodo de tiempo de al menos 5-6 meses, lo cual puede llevarse a cabo en los mismos fermentadores en los que se procesan las aceitunas. Este periodo de conservación es necesario para que se produzca la hidrólisis del glucósido del ácido elenólico y a la vez del ácido elenólico con lo cual el extracto fenólico obtenido estará libre de estos compuestos y, por tanto, más enriquecido en hidroxitirosol. Para la conservación de estas soluciones líquidas se procederá a la bajada del pH de las mismas por debajo de 4-5 unidades mediante el empleo de ácidos inorgánicos, tales como HCl, fosfórico, etc.

Posteriormente, se procederá antes de 24 horas a la inoculación de estos líquidos mediante inóculo de bacterias lácticas. Alternativamente, para las aguas de lavado, se puede proceder simplemente a la inoculación de estos líquidos sin necesidad de corrección del pH. Durante todas estas manipulaciones siempre hay que tener mucho cuidado en no producir excesiva aireación de los líquidos, lo cual implicaría oxidación de hidroxitirosol y, por tanto, pérdidas del producto a obtener.

Todos los líquidos de los que se parte, soluciones conservadas de hidróxido sódico y aguas de lavado, salmueras de fermentación y soluciones acidificadas, presentan una cierta coloración y turbidez debido a la presencia de microorganismos y polímeros fenólicos, entre otros, que es necesario eliminar. Para ello, se empleará la ultrafiltración o nanofiltración, mediante el uso de membranas tubulares de corte molecular entre 1000 y 10000 daltons. De esta forma se consigue un permeado con poca coloración en el cual se han eliminado, además de microorganismos, compuestos de peso molecular mayor de 1000-10000.

A continuación, el permeado obtenido en la ultrafiltración se someterá al tratamiento con resinas no-iónicas. Estas resinas, por ejemplo resinas Amberlite de la serie XAD, adsorberán preferentemente a las sustancias fenólicas, en especial hidroxitirosol. Este proceso se puede llevar a cabo mediante tratamiento en baño, o bien en columnas en serie rellenas de estas resinas. Los fenoles adsorbidos en las columnas se liberarán de las mismas mediante el empleo de solventes tales como etanol o metanol.

El extracto alcohólico, el cual contendrá un cierto porcentaje de agua, se destilará para evaporar el disolvente orgánico, con vistas a recuperarlo. El concentrado acuoso, muy rico en sustancias fenólicas, será sometido posteriormente a un tratamiento con carbón activo. El objeto de dicho tratamiento es la eliminación casi completa de la coloración residual que todavía tiene el extracto, así como de olores y sabores extraños. Este tratamiento con carbón activo se puede llevar a cabo bien en baño o en columnas en serie.

Finalmente, el extracto acuoso se congelará a temperaturas inferiores a 0°C y someterá a un proceso de liofilización a vacío. Una vez finalizadas todas las etapas se obtendrá un residuo sólido con cantidades superiores al 60-80% en hidroxitirosol, comprobado por HPLC y RMN, junto con menores porcentajes de tirosol.

El líquido que fue sometido al tratamiento con resinas no-iónicas está muy enriquecido en ácidos orgánicos, en particular láctico o bien acético, y libre de color y sustancias fenólicas. Por ello, este líquido puede ser utilizado tal cual en algunas fases del proceso de elaboración de aceitunas de mesa, tales como conservación o envasado, o bien, ser sometido a un proceso de concentración mediante ósmosis inversa, y ser utilizado también en diferentes fases del proceso de elaboración de aceitunas.

El procedimiento de invención que se patenta permite también la obtención de otro tipo de extractos. Por ejemplo, si el líquido de que se parte para aplicar el procedimiento no ha tenido un periodo de conservación previa superior a 5-6 meses,

el extracto final contendrá con una gran porcentaje de glucósido de ácido elenólico. Como se ha comentado, este compuesto presenta propiedades antimicrobianas con lo cual puede ser interesante obtener un extracto no sólo rico en antioxidantes, sino también, en sustancias antimicrobianas.

Finalmente, si lo que se pretende es obtener sólo el glucósido del ácido elenólico, se partirá de soluciones de hidróxido sódico o bien aguas de lavado y se someterán por un periodo superior a 24 horas a aireación en medio alcalino. De esta forma, se consigue oxidar el hidroxitirosol y, por tanto, después en el extracto obtenido no se encuentra en cantidades apreciables acompañando al glucósido del ácido elenólico y tirosol. Con este procedimiento hay que tener la precaución de emplear mayores cantidades de resina y carbón activo para lograr una buena decoloración del líquido.

Ejemplo de realización de la invención

Ejemplo 1

Un ejemplo de obtención de un extracto fenólico con alta concentración en hidroxitirosol consiste en tratar 1000 kg de aceitunas con 500 litros de una solución de hidróxido sódico de un 2% (p/v), se retira esta solución alcalina cuando ha penetrado hasta 2/3 de la pulpa y se cubren las aceitunas con 500 litros de agua. Después de 14 horas, el agua de lavado se coloca en un recipiente con cierre anaeróbico para evitar la oxidación de las sustancias fenólicas. Se inocula esta agua de lavado a las 24 horas con un cultivo de bacterias lácticas, con vistas a alcanzar 10⁶ UFC/ml. El desarrollo de estos microorganismos dará lugar a la bajada del pH del medio por debajo de 4.5 unidades, como consecuencia de la producción de ácido láctico. A continuación, las aguas se mantienen en condiciones anaeróbicas durante 12 meses y se procederá a la extracción y purificación de las sustancias fenólicas.

En primer lugar, se ultrafiltran las aguas de lavado con un equipo de UF-OI de membranas tubulares de corte molecular 4000 daltons, con lo cual se consiguen unos 450 litros de permeado. Mediante esta técnica se elimina la mayoría de los compuestos de peso molecular mayor a 4000 daltons, en particular polímeros coloreados, aunque también se pierde parte de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Así, el color, medido como la diferencia de absorbancia entre 440 y 700 nm, en el permeado es de 0.06. La concentración de hidroxitirosol también baja de 4 g/l hasta 3 g/l.

Seguidamente, el agua de lavado, sin apenas coloración, se somete a un tratamiento con resina no-iónica, amberlite de la serie XAD. La realización de esta etapa en baño implica tratar los 450 litros de agua de lavado ultrafiltrada con 75 kg de resina. Después de unas 5-24 horas de contacto se elimina mediante filtración el agua de lavado, se lava con agua la resina, se elimina este agua y se recuperan los fenoles adsorbidos en la resina mediante el empleo de etanol (150 litros de etanol se ponen en contacto con la resina durante una hora y se recupera el etanol mediante filtración). Durante esta etapa también se pierde hidroxitirosol (20%).

La solución etanólica se somete a destilación con vistas a recuperar el etanol, quedando un resi-

duo acuoso (20 litros), con cierta coloración amarillenta (<0.1). Este residuo acuoso se somete a tratamiento con carbón activo en baño para la completa eliminación del color, olor y sabores residuales. El tratamiento en baño implica añadir 1 kg de carbón activo al residuo acuoso y eliminar mediante filtración el carbón.

Finalmente, el extracto acuoso se congela a -20°C y se liofiliza para la completa eliminación del agua. A lo largo de estas últimas etapas se perderá también un cierto porcentaje de hidroxitirosol (20%). Con todo ello, al final se obtiene un residuo sólido con una alta concentración en hidroxitirosol ($> 70\%$), con apenas coloración y con una cantidad de antioxidantes recuperado superior al 50% del inicial en las aguas de lavado.

Ejemplo 2
Otro ejemplo de aplicación de la invención consiste en la obtención de glucósido del ácido elenólico. Para ello, se parte del agua de lavado obtenida según el ejemplo 1. Esta agua de lavado fresca se somete a oxidación mediante la inyección

de aire u oxígeno en la masa líquida por un periodo de tiempo de 48 horas. A continuación, se procede a ultrafiltrar el agua de lavado en similares condiciones a las descritas en el ejemplo 1. El color del permeado en este caso es superior a 0.1 y la concentración del glucósido del ácido elenólico ha disminuido desde 7 g/l hasta 6 g/l. Seguidamente, el agua de lavado se somete a tratamiento con resinas amberlite de la serie XAD, de forma similar al ejemplo 1, sólo que la cantidad de resina es 125 kg. El extracto etanólico obtenido en la regeneración de la resina también se somete a destilación y el residuo acuoso a tratamiento con carbón activo, aunque las cantidades de carbón son superiores a las empleadas en el ejemplo 1, 2 kg. El extracto acuoso también se congela y liofiliza, con lo cual al final se obtendrá un residuo blanquecino-amarillento con una concentración de glucósido de ácido elenólico superior al 70%. En este ejemplo se habrá recuperado también una cantidad superior al 50% de la inicial de glucósido en el agua de lavado.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa, **caracterizado** porque cuando la sustancia antioxidante a obtener es hidroxitirosol, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

- a) ultrafiltración de las soluciones por membranas de tamaño de poro entre 1000-10000 daltons.
- b) tratamiento del permeado obtenido en la etapa anterior con resinas no iónicas.
- c) recuperación de las sustancias antioxidantes adsorbidas en las resinas no iónicas mediante tratamiento con disolventes.
- d) destilación de la disolución procedente de la etapa anterior para obtener un concentrado acuoso.
- e) tratamiento con carbón activo de dicho concentrado acuoso.
- f) congelación del extracto acuoso a temperaturas inferiores a 0°C y liofilización a vacío

consiguiéndose un residuo sólido con una concentración superior al 60% en hidroxitirosol.

2. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa utilizadas como líquidos de partida son salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo español, procedentes de procesos con o sin lavados después del tratamiento de las aceitunas.

3. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa utilizadas como líquidos de partida son soluciones ácidas del proceso de elaboración de aceitunas negras oxidadas, conservadas por un periodo superior a 5 meses.

4. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa utilizadas como líquidos de partida son las soluciones de hidróxido sódico o las aguas de lavado del proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo español.

5. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según las reivindicaciones 1 y 4, **caracterizado** porque las soluciones de hidróxido sódico o las aguas de lavado del proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo español se someten previamente a las siguientes etapas:

- corrección del pH hasta un valor inferior a 5 mediante el empleo de ácidos.

- inoculación de dichas disoluciones con bacterias lácticas

- conservación de dichas disoluciones durante un periodo de tiempo superior a 5 meses.

6. Procedimiento de obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque el disolvente utilizado para la recuperación de las sustancias antioxidantes adsorbidas en las resinas no iónicas es etanol.

7. Procedimiento para la obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa, **caracterizado** porque cuando la sustancia antioxidante a obtener es glucósido del ácido elenólico, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

a) aireación de las soluciones de hidróxido sódico o de aguas de lavado del proceso de elaboración de aceitunas verdes en medio alcalino por un periodo superior a 24 horas.

b) ultrafiltración de las soluciones aireadas en la etapa anterior a través de membranas de tamaño de poro entre 1000-10000 daltons.

c) tratamiento del permeado obtenido en la etapa anterior con resinas no iónicas.

d) recuperación de las sustancias antioxidantes adsorbidas en las resinas no iónicas mediante tratamiento con disolventes.

e) destilación de la disolución procedente de la etapa anterior para obtener un concentrado acuoso.

f) tratamiento con carbón activo de dicho concentrado acuoso.

g) congelación del extracto acuoso a temperaturas inferiores a 0°C y liofilización a vacío.

8. Procedimiento para la obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el tratamiento con resinas no iónicas se lleva a cabo en una proporción de 0.27 Kg/litro solución a tratar.

9. Procedimiento para la obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa según las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado** porque el disolvente utilizado para la recuperación de las sustancias antioxidantes adsorbidas en las resinas no iónicas es etanol en una proporción comprendida entre 2-4 litros/kg resina.

10. Utilización del extracto obtenido mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-6 para el enriquecimiento nutricional de alimentos tales como leche y derivados, zumos y grasas.

11. Utilización del extracto obtenido mediante un procedimiento según las reivindicaciones 7-9 para el enriquecimiento nutricional de alimentos tales como leche y derivados, zumos y grasas.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 186 467

② Nº de solicitud: 200000516

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07C 39/08, A23L 1/30

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BRENES, M. et al.: "Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing", J. Agric. Food Chem., (1995), Vol. 43 (10), páginas 2702-6, ISSN:0021-8561.	
A	BRENES, M. et al.: "Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives", J. Food Sci., (1993), Vol. 58 (2), páginas 347-350, ISSN:0022-1147.	
A	ES 2051238 A1 (INGENIERÍA Y DESARROLLO AGRO INDUSTRIAL, S.A.) 01.06.1994	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.03.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1