



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 350 789**

② Número de solicitud: 200930366

⑤ Int. Cl.:  
**A23L 1/015** (2006.01)  
**A23L 1/221** (2006.01)  
**A23L 1/28** (2006.01)  
**C12N 1/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.06.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**27.01.2011**

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Moreno Arribas, María Victoria;**  
**Mendiola León, José Antonio;**  
**Ibáñez Ezequiel, Elena;**  
**Pozo-Bayón, María Ángeles y**  
**Andújar-Ortiz, Inmaculada**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

② Título: **Procedimiento para la eliminación de compuestos odorantes presentes en preparaciones de levaduras mediante el empleo CO<sub>2</sub> supercrítico.**

③ Resumen:

Procedimiento para la eliminación de compuestos odorantes presentes en preparaciones de levaduras mediante el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico.

La presente invención describe un método de extracción de compuestos odorantes de extractos de levadura, tanto procedentes de preparados comerciales como de lías de fermentación, mediante el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico. La presente invención también se refiere al uso del extracto de compuestos odorantes obtenidos en dicho proceso para su uso como aromatizantes en productos alimentarios.

ES 2 350 789 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la eliminación de compuestos odorantes presentes en preparaciones de levaduras mediante el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico.

La presente invención se refiere a un procedimiento de desodorización de preparados de levaduras de uso enológico basado en el empleo de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. El procedimiento implica además la obtención de un extracto aromático concentrado libre de solventes con diferentes posibles aplicaciones.

**Estado de la técnica anterior**

En la actualidad el empleo de preparados enológicos a base de levaduras secas inactivas (LSI) es muy habitual en la industria enológica tanto para la mejora de los procesos fermentativos (fermentación alcohólica y maloláctica), como para la de las características organolépticas de los vinos (disminución de la astringencia, mejora de las propiedades del color, aroma, etc). Es por ello que en los últimos años, hay un gran número de empresas biotecnológicas que comercializan este tipo de productos para diferentes aplicaciones en vinos (Pozo-Bayón *et al.*, 2009, Food Research International, 42: 754-761). Generalmente, la clasificación de estos productos se realiza en base a su aplicación tecnológica, siendo el grupo de los “nutrientes fermentativos” junto con el de los “coadyuvantes organolépticos” los más ampliamente utilizados.

Este tipo de preparados de levaduras secas inactivas son producidos a partir de levaduras enológicas (*Saccharomyces cerevisiae*) que han sido sometidas a diferentes tratamientos (generalmente plasmolisis o choque térmico) para eliminar su capacidad fermentativa. Una vez inactivadas las células son sometidas a diferentes tratamientos enzimáticos y/o fisicoquímicos seguidos de distintas etapas de purificación. Dependiendo del tipo de procesamiento empleado se pueden obtener extractos de levadura (EL) (contienen únicamente las partes solubles de la célula tras la completa autólisis de la misma), autolisados de levadura (AL) (formados tanto por materia soluble como por insoluble procedente de las paredes y membranas celulares tras la autólisis parcial de las células), o paredes de levaduras (PL) (obtenidas por centrifugación durante el proceso de obtención de extractos de levadura). La mayor parte de preparaciones enológicas que se comercializan son del tipo AL o PL. Debido a que durante el proceso de autólisis celular se produce una autodigestión del contenido citoplasmático de la célula, la mayor parte de este tipo de preparaciones esta formado por una fracción soluble en agua y compuesta por péptidos, aminoácidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos (en los autolisados de levaduras). Como se ha indicado, en algunos tipos de preparados (autolisados y paredes) también hay una importante proporción de lípidos procedentes de las paredes y membranas celulares (Feuillat, 2001, Bulletin de l'OIV, 849-850:753-771). La distinta proporción de estos compuestos en cada preparación es la responsable de las diferentes aplicaciones de estos productos en vinificación. Además, cada tipo de preparado puede diferir en su composición dependiendo de la cepa de levadura empleada, de las condiciones de procesamiento, etc.

Durante el procesamiento de los preparados de LSI, hay varias etapas en las que estos productos son sometidos a elevadas temperaturas. Así, tanto durante la obtención de EL, AL y PL hay una etapa final de secado en la que se persigue la obtención de un producto fácilmente dosificable en el vino en forma de polvo, que es el que se adquiere comercialmente. El secado de este tipo de productos se produce en la mayor parte de los casos mediante los procesos de *roller drying* o *spray drying* (<http://www.eurasyp.org>). En el primero de los procedimientos el secado se produce por pulverización del preparado sobre un tambor rotatorio caliente, que hace que la temperatura del producto rápidamente alcance los 100°C. Por tanto en los primeros segundos se produce la evaporación del agua de la muestra. Durante el tiempo restante de permanencia del producto en el rodillo, el agua remanente se evapora debido a la diferencia de presión de vapor entre la interfase del producto y la capa de aire vecinal. En el *spray drying*, el tiempo de secado es muy corto, del orden de unos pocos segundos y el secado se produce por contacto del líquido con un gas a elevada temperatura (Onwulata, 2005, en: Encapsulated and powdered foods, pg 273).

Debido a la elevada concentración de polisacáridos así como de compuestos nitrogenados (aminoácidos y péptidos) presentes en estas preparaciones, durante el procesamiento de las mismas y debido a las altas temperaturas a las que son sometidos durante la etapa final de secado, se pueden producir reacciones entre los grupos carbonilos de los azúcares y los grupos amino de los aminoácidos (y péptidos), para dar lugar a precursores de distintos tipos de compuestos, entre los que se encuentran importantes moléculas odorantes, caracterizadas por presentar en general, muy bajos umbrales de percepción. Esta reacción se conoce como reacción de Maillard y entre los compuestos que se producen cabe destacar, por su importancia para el aroma de los alimentos, algunos heterocíclicos volátiles que pueden contener oxígeno, nitrógeno, y/o azufre en su molécula como pirroles, furanos, thiazoles, pirazoles, etc. También durante la reacción de Maillard, se puede producir la reacción entre dicarbonilos y amino ácidos libres que serán deaminados y decarboxilados durante la degradación de Strecker para dar lugar a los correspondientes aldehídos, muchos de los cuales también son importantes moléculas odorantes (metional, furfural, etc).

Actualmente hay diferentes trabajos en la literatura que se han llevado a cabo con el objetivo de caracterizar el perfil volátil de las preparaciones de LSI que indican que efectivamente los compuestos volátiles formados durante el procesamiento térmico de las mismas son los más abundantes (Comuzzo *et al.* 2006, Food Chemistry, 99, 217-230; Pozo-Bayón, *et al.*, 2009, Journal of the Science of Food and Agriculture: DOI 10.1002/jsfa.3638.

Desde el punto de vista de las características organolépticas del vino, es importante tener en cuenta las consecuencias que la adición de los LSI pueden tener en el aroma del vino, ya que lo interesante para los elaboradores es que

el producto ejerza su acción específica en el vino, pero sin provocar efectos adversos. En este sentido, recientemente se ha comprobado en vinos modelo la capacidad de algunos compuestos volátiles de muy bajo umbral de percepción, presentes en las preparaciones de LSI, como algunas pirazinas, de ser liberados a los vinos (Pozo-Bayón, *et al.*, 2009, Journal of the Science of Food and Agriculture: DOI 10.1002/jsfa.3638). Esta liberación se produce de forma progresiva, y por tanto su concentración aumenta con el tiempo de contacto de las preparaciones de LSI en el vino. Este hecho, podría tener consecuencias sensoriales importantes e inesperadas en el vino acabado. Concretamente, en algunos estudios se ha comprobado que los vinos suplementados con preparaciones LSI presentan diferencias sensoriales con respecto a los vinos control (Comuzzo *et al.* 2006, *Food Chemistry*, 99: 217-230). Aunque en vinos de poca intensidad aromática, la adición de estos preparados parece mejorar sus características sensoriales, en otros casos, como en aquellos vinos caracterizados por presentar un fuerte carácter varietal, la adición de LSI tiene un marcado efecto negativo en las características sensoriales del vino.

En cualquier caso, la modificación de las características sensoriales de los vinos es un efecto colateral e indeseable que actualmente está aparejado al empleo de preparaciones de LSI. Es por tanto de interés para el sector enológico la búsqueda de procedimientos para eliminar o reducir la liberación de compuestos odorantes presentes en las LSI a los vinos. La presente invención tiene como objetivo la aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a las preparaciones de LSI para eliminar o reducir los compuestos odorantes indeseables sin producir la modificación de la composición no volátil del preparado, que es la responsable de los efectos beneficiosos de su empleo durante la vinificación.

La aplicación de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas para la desodorización de matrices alimentarias ha sido llevada a cabo con éxito en el caso de extractos de hierbas aromáticas (López-Sebastian, *et al.*, 1998 Journal Agricultural and Food Chemistry, 46: 13-19) aceites (Ziegler y Liaw, 1993, Journal of the American Oil Chemistry Society, 70: 947:953) y grasa láctea (Haan y de Graauw, 1990, The Journal of Supercritical Fluids, 3, 15-19) entre otros. Además la idoneidad del empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico para la extracción de pirazinas (que son el grupo de compuestos aromáticos más representativos del aroma de los preparados de LSI) ha sido demostrada por Shen *et al.*, 2006 (Journal of Chemistry Engineering Data, 51:2056-2064), e incluso Sanagi *et al.*, 1997 (Journal of Chromatography A 785: 361-367) lo han empleado para la extracción selectiva de estos compuestos de semillas de cacao.

### 30 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una procedimiento basado en la aplicación de CO<sub>2</sub> supercrítico para la mejora de preparados de levaduras secas inactivas (LSI) que actualmente se comercializan como aditivos enológicos en la elaboración de los vinos. El procedimiento que se propone consiste en la aplicación de CO<sub>2</sub> supercrítico junto a un modificador (etanol) en unas condiciones de presión, tiempo y temperatura específicas, que permiten la reducción o eliminación de compuestos odorantes que se producen durante el procesamiento térmico al que se someten estas preparaciones y que pueden pasar al vino modificando negativamente sus características sensoriales. Además el procedimiento propuesto permite la recuperación de un extracto concentrado con los compuestos odorantes extraídos que puede ser de interés para otras aplicaciones (agentes aromatizantes de alimentos).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la desodorización de preparaciones de levadura seca inactiva (LSI) empleadas como aditivos enológicos mediante el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico que comprende:

- 45 a. Adición de un cosolvente que se selecciona entre etanol y soluciones hidroalcohólicas con contenido de etanol mayor al 80%, a una muestra de LSI
- b. Calentar la mezcla obtenida en el paso a) a una temperatura de entre 50-80°C
- 50 c. Adicionar CO<sub>2</sub> con un caudal de 1 a 3 mL/min hasta conseguir una presión de entre 150-250 atm.
- d. Continuar la extracción de los compuestos volátiles del paso c) durante un tiempo de entre 90 a 180 minutos.

55 En una realización preferida, el procedimiento descrito anteriormente además comprende una etapa de recogida del extracto de compuestos volátiles procedentes de la muestra de LSI.

60 Un fluido supercrítico es una sustancia a temperatura y presión simultáneamente superiores a sus valores críticos, y que tiene una densidad superior a la densidad crítica. El punto crítico de una sustancia es aquel valor de temperatura, presión y densidad para el cual el volumen es igual al de una masa igual de vapor o, en otras palabras, en el cual las densidades del líquido y del vapor son iguales. En la presente invención, se emplea CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. Es decir en condiciones de presión, temperatura y densidad superiores a su punto crítico definido por una presión de 72.04 atm, 31°C y 470 kg/m<sup>3</sup>.

65 En condiciones supercríticas, el dióxido de carbono adquiere poder de solvatación (una propiedad típica de los líquidos) y puede ser utilizado como disolvente de diversos componentes alimentarios, aprovechando además su baja viscosidad, alto coeficiente de difusión, gran penetrabilidad y elevada velocidad de extracción. Otra ventaja adicional

## ES 2 350 789 A1

es que variando las condiciones de presión y temperatura y, con ello la densidad del fluido supercrítico, se puede cambiar su selectividad como disolvente hacia diversos componentes, extrayéndolos diferencialmente, sin necesidad de cambiar el fluido extractante. En el procedimiento al que se refiere la presente invención además de la recuperación del preparado de LSI desodorizado, la recuperación del producto extraído (concentrado de aromas libre de solventes) se lleva a cabo mediante la reducción de la presión del CO<sub>2</sub> y el fluido supercrítico se convierte en un gas que se evapora totalmente de forma espontánea.

El empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico, que se utiliza en el procedimiento descrito en la presente invención, es muy adecuado para su aplicación en matrices alimentarias como las preparaciones de LSI a las que se refiere específicamente la presente invención y los extractos concentrados aromáticos con posibles aplicaciones en la industria alimentaria. Entre otras ventajas destacan:

- a. La baja toxicidad y por tanto su compatibilidad con los productos alimentarios. EL CO<sub>2</sub> es un solvente seguro (GRAS) y aceptado por la FDA y EFSA para su empleo en alimentos.
- b. La elevada capacidad de penetración del fluido supercrítico en las matrices porosas debido a su baja viscosidad y elevada difusividad del fluido. Con ello se consigue una transferencia de materia más rápida y extracciones por tanto más rápidas.
- c. La posibilidad de realizar las extracciones de forma dinámica, lo que asegura que el fluido fresco pase constantemente por la muestra, produciendo la completa extracción del compuesto de interés.
- d. La posibilidad de variar la presión y temperatura del fluido modifica su densidad y por tanto, su capacidad de solvatación, con lo que se pueden extraer selectivamente componentes específicos de una muestra compleja. Esta última característica es de gran interés en la aplicación del procedimiento al que se refiere la presente invención a las preparaciones de LSI, ya que se ha conseguido eliminar los compuestos odorantes sin modificar la composición no volátil presente en las mismas.
- e. Otras ventajas asociadas al empleo de CO<sub>2</sub> son sus moderadas condiciones de temperatura y presión críticas (31.1°C y 73.04 atm), no es corrosivo o inflamable y tiene un coste relativamente bajo comparado con otros solventes.

En el procedimiento descrito en la presente invención, las muestras a tratar pueden ser cualquiera de los preparados de levaduras secas inactivas del tipo nutrientes de fermentación o coadyuvantes para la mejora de las características organolépticas de los vinos que actualmente se comercializan para aplicaciones enológicas en forma de polvo. También podría tratarse de lías de vinificación.

Para solventar la posible limitación del empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico debido a su naturaleza apolar, en la presente invención se ha recurrido además al empleo de un cosolvente, como el etanol (también considerado seguro, no tóxico y admitido para su empleo en alimentos), para que actúe como modificador dotando al CO<sub>2</sub> de una mayor polaridad.

En una realización preferida, en el procedimiento según descrito anteriormente la muestra colocada en la celda de extracción ha sido sometida previamente a un proceso de molienda criogénica.

La molienda criogénica consiste en aplicar un líquido criogénico (N<sub>2</sub>) o bien partir de una muestra previamente congelada (-70°C) con el objetivo de producir una congelación rápida de la misma y proceder a su molienda o triturado mediante el empleo de un molinillo de bolas. De esta manera se consigue romper parte de las células de levaduras que siguen intactas y reducir el tamaño de la muestra consiguiendo un tamaño de partícula más homogéneo y un aumento de la superficie de contacto de los solventes extractores y la muestra. Por otro lado, al realizar el proceso a baja temperatura se consigue realizar la extracción sin modificar la composición volátil de la muestra, evitando la pérdida de volátiles y aumentando el rendimiento de la extracción.

En otra realización preferida, en el procedimiento según descrito anteriormente la cantidad de cosolvente a emplear varía entre el 8 y 40% del peso de la muestra en la celda de extracción.

En otra realización preferida, en el procedimiento según descrito anteriormente la presión de CO<sub>2</sub> varía entre 150-250 atm.

En otra realización preferida, en el procedimiento según descrito anteriormente las muestras de la etapa a son lías de fermentación.

El dispositivo necesario para desarrollar el procedimiento al que se refiere la presente invención consiste de un sistema extractivo que se muestra en la Fig 1 y que consta de una botella de CO<sub>2</sub> con sifón (1), una bomba de doble pistón (2) que se encarga de impulsar el CO<sub>2</sub> líquido hasta la celda de extracción de acero inoxidable de 11 mL (12) situada en un horno (11) en la que se encuentra depositada la muestra. El CO<sub>2</sub> se mezcla con un modificador (etanol) (3) que es impulsado por su correspondiente bomba (4). Tanto la presión del flujo de CO<sub>2</sub> como del modificador son indicadas en los puntos de control de presión (5) y la cantidad que llega a la celda de extracción es controlada con

## ES 2 350 789 A1

las válvulas (6) y (7) para el CO<sub>2</sub> y el modificador respectivamente. La válvula antiretorno (8) favorece la mezcla de los fluidos en el baño calefactor (9) donde la mezcla es calentada a la temperatura de extracción y el fluido resultante pasa por una válvula on/off (10) y se introduce en la celda de extracción donde se encuentra contenida la muestra (preparación de LSI) y donde se alcanza la presión de trabajo. Debido a una disminución en la presión y/o temperatura de trabajo al pasar por las válvula de micro regulación (13), el extracto resultante se recoge en un vial que se encuentra contenido en celda de expansión (11), refrigerada gracias al empleo de un baño de hielo. A la salida de la celda de expansión se encuentra un medidor de flujo másico (16).

El procedimiento al que se refiere la presente invención se describe detalladamente a continuación:

Cerrar la válvula on/off para el CO<sub>2</sub> (6) y abrir la botella de CO<sub>2</sub> (1). Encender el baño calefactor (9) a la temperatura de trabajo (60°C). Abrir la válvula on/off para CO<sub>2</sub> (6) y presurizar a la presión de trabajo con la bomba de CO<sub>2</sub> hasta la válvula on/off para la mezcla CO<sub>2</sub>/modificador calefactada (10). Cargar la muestra (preparación de LSI) en la celda de extracción (12), en forma de sándwich entre dos zonas de lana de vidrio o filtros de celulosa. En caso de emplear modificador añadir una cantidad de modificador (etanol) a la muestra en el que se pueden seguir dos procedimientos a) añadirlo al caudal de de CO<sub>2</sub> con la bomba del modificador (4) o b) mezclarlo con el preparado de LSI antes de cargarlo en la celda de extracción (en la relación muestra: cosolvente de trabajo). Tras cargar la celda de extracción esta se sitúa dentro del horno (11) en la línea del CO<sub>2</sub>, con la válvula de microregulación (13) cerrada y se abre la válvula (10). Mientras el sistema adquiere la presión y temperatura de trabajo, mantener esta configuración. Poner un vial de recogida (15) dentro de la celda de expansión (14) e introducir esta en un baño de hielo para favorecer la recogida de los compuestos volátiles. Una vez alcanzadas las condiciones de trabajo abrir la válvula de microregulación (13) el máximo número de vueltas que permita sin que se produzca la caída de la presión. Mantener esta configuración el tiempo de extracción necesario, regulando la válvula (13) para que la lectura del medidor de flujo másico sea constante. Una vez alcanzado este tiempo (120 minutos) cortar primero el caudal del modificador apagando la bomba (4) y cerrando la válvula (7). A continuación se apaga la bomba de CO<sub>2</sub> y se cierran las válvulas on/off (6) y (10). Cuando caiga la señal en el medidor de flujo másico (16) el sistema se habrá despresurizado y se recoge tanto el extracto del vial de recogida (15) como la preparación de LSI desodorizada.

La preparación de LSI que se recoge tras la desodorización con CO<sub>2</sub> supercrítico está seca y es exactamente igual de aspecto a la del inicio del proceso. Además mantiene su composición no-volátil inalterada. El extracto (15) obtenido es de una gran intensidad aromática y se encuentra en el vial de extracción de donde se puede recuperar con un solvente adecuado y ser tratado (secado, micro o nano encapsulación) por aplicación de distintas tecnologías que no entran a formar parte del objetivo de la presente invención.

El procedimiento que se describe en la presente invención puede usarse, pero sin limitarse en los siguientes sectores:

Biotecnológico-enológico: Obtención de preparaciones de LSI libres de compuestos odorantes indeseables para su empleo en vinificación.

Alimentario: El procedimiento podría hacerse extensivo para la extracción de compuestos del aroma de preparaciones de LSI con el fin de obtener extractos aromáticos concentrados y libres de solventes que pueden ser empleados como agentes aromatizantes en distintos tipos de productos alimentarios (panadería, bollería, snacks, alimentos precocinados). De la misma forma el procedimiento al que se refiere la presente invención podría ser empleado para la extracción de compuestos del aroma de lías de fermentación, que son subproductos de la industria enológica con unas características muy similares a los preparados de LSI a los que se refiere la presente invención, lo que constituiría una revalorización de este tipo de productos.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un producto obtenible por el procedimiento anteriormente descrito que comprende el extracto de los compuestos volátiles odorantes procedentes de la muestra de LSI tratada.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto según mencionado anteriormente como agente aromatizante para distintos tipos de productos alimentarios.

En este sentido, el campo de aplicación comprendería cualquier tipo de alimento en el que las notas aromáticas a “tostado”, “palomitas”, “carne-horneada”, “caldo de carne”, etc fueran requeridas. Esto incluiría alimentos tales como productos horneados a base de cereal (pan, bollería, snacks) bien para compensar la pérdida de aromas originados durante el horneado o bien para reforzar el aroma natural del producto. También los extractos aromáticos podrían ser aplicados para potenciar el aroma de un gran número de alimentos precocinados en los que las condiciones de procesamiento a los que son sometidos (congelación, tratamientos térmicos, etc) podrían haber reducido la intensidad de su aroma original.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el dispositivo empleado y las condiciones del proceso de desodorización de preparaciones de LSI al que se refiere la presente invención.

Figura 2. Muestra el cromatograma del perfil volátil obtenido por GC-MS en la muestra de LSI de tipo coadyuvante organoléptico desodorizada siguiendo el proceso descrito en la presente invención y de la misma muestra control (sin desodorizar).

Figura 3. Muestra el cromatograma del perfil volátil obtenido por GC-MS de un vino sintético suplementado con un preparado de LSI del tipo coadyuvante organoléptico tras la desodorización y de la misma muestra control (sin desodorizar).

Figura 4. Muestra el aspecto de una preparación de LSI antes y después del proceso de desodorización al que se refiere la presente invención.

Figura 5. Muestra el cromatograma del perfil volátil obtenido por GC-MS de un vino sintético suplementado con un preparado de LSI del tipo nutriente fermentativo tras la desodorización y de la misma muestra control (sin desodorizar).

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el proceso de desodorización por CO<sub>2</sub> supercríticos de un preparado de LSI comercial para uso enológico.

### Ejemplo 1

La muestra consistente en un preparado comercial en forma de polvo de LSI de uso enológico y empleado como adyuvante para la mejora de las características organolépticas de los vinos tintos fue depositada en una bandeja formando una capa muy fina e inmediatamente congelada a -70°C. Se procedió posteriormente a la molienda de la muestra mediante el empleo de un molinillo de bolas. Se aplicaron 5 ciclos de 3 minutos cada uno y con una intensidad de 25 Hz.

En la celda de extracción se introdujo 2 g de la muestra en forma de polvo triturada, 1 mL de etanol que actuó como cosolvente facilitando la extracción de los compuestos del aroma más polares y un poco de lana de vidrio en cada extremo para evitar la salida de partículas sólidas contenidas en la muestra a las vías de circulación del fluido extractor. A continuación se calentó el horno a una temperatura de 60°C. Se inició la adición de CO<sub>2</sub> en dirección hacia el mezclador hasta que se consiguieron unas condiciones estables a una presión de 200 bar y un caudal de CO<sub>2</sub> de 1.54 mL/min.

El extracto rico en compuestos odorantes procedentes del preparado se recogió en un vial de vidrio que se encontraba en un baño de hielo, para evitar la pérdida de compuestos muy volátiles. Este extracto se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas para caracterizar su perfil volátil en el que se determinaron potentes compuestos odorantes. La duración del proceso de desodorización fue de 120 minutos.

Las preparaciones desodorizadas fueron presentadas para oler a 20 personas, que indicaron claramente la ausencia de olor o una clara reducción del mismo en comparación con las muestras control. Este hecho fue además corroborado experimentalmente utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME). Para ello 1 g del preparado desodorizado se introdujo en viales especiales y se cerraron herméticamente con un tapón de Septum y se introdujeron en un baño a 50°C y se dejó en equilibrio 10 minutos. Los compuestos volátiles liberados al espacio de cabeza se analizaron con una fibra de SPME de Carboxen-Polidimetilsiloxano. La extracción se realizó durante 40 minutos a 50°C. El mismo procedimiento se realizó con la misma muestra control. La Fig. 2 muestra los cromatogramas obtenidos en los que claramente se aprecia una reducción y en algunos casos la ausencia total de muchos compuestos volátiles odorantes.

Finalmente se simuló el efecto de la desodorización en la liberación de compuestos del aroma presentes en el preparado de LSI desodorizado a vinos sintéticos. Se procedió al análisis de los compuestos volátiles tras la aplicación del preparado LSI desodorizado (400 mg) a un vino sintético (8 mL), formado por etanol 12% (v:v), 4 g/L de ácido tartárico y al que se ajustó el pH a 3.5 con NaOH. La mezcla se depositó en un vial que se introdujo en un baño a 50°C y que se dejó equilibrar por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió al análisis de los volátiles liberados al espacio de cabeza mediante el empleo de la misma fibra de SPME descrita en el párrafo anterior. La fibra se expuso al espacio de cabeza por 20 minutos. Transcurrido este tiempo la fibra se desorbió en el inyector del cromatógrafo de gases y se procedió al análisis de los compuestos volátiles extraídos y su detección por GC-MS. El proceso se repitió con una muestra control (sin desodorizar). La comparación de los perfiles volátiles de la muestra desodorizada y del control se muestran en la Fig 3, en los que se puede comprobar claramente la reducción e incluso en algunos casos la desaparición de la mayor parte de compuestos volátiles en la preparación de LSI desodorizada.

## ES 2 350 789 A1

La muestra desodorizada presentó un aspecto similar a la muestra desodorizada (Fig 4). Además se procedió a la caracterización de las macromoléculas liberadas por la preparación de LSI desodorizada a los vinos sintéticos (principalmente compuestos nitrogenados y azúcares) y su comparación con la misma preparación control (sin desodorizar). Además se comprobó como la desodorización con fluidos supercríticos en las condiciones descritas en el procedimiento al que se refiere la presente invención no modifica significativamente la composición macromolecular (compuestos nitrogenados, polisacáridos) que es la principal responsable de los efectos deseados en los vinos.

### Ejemplo 2

La muestra consistió en un preparado comercial en forma de polvo de LSI empleado habitualmente en vinificación como nutriente fermentativo, tanto para la elaboración de vinos tintos como de vinos blancos. La muestra fue depositada en una bandeja formando una capa muy fina e inmediatamente congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se procedió posteriormente a la molienda de la muestra mediante el empleo de un molinillo de bolas. Se aplicaron 5 ciclos de 3 minutos cada uno y con una intensidad de 25 Hz.

En la celda de extracción se introdujo 2 g de la muestra en forma de polvo triturada, 1 mL de etanol que actuó como cosolvente. La muestra se dispuso en la celda de igual forma que en el ejemplo anterior. El proceso de desodorización se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el ejemplo anterior. Tan sólo el tiempo de extracción se aumentó hasta 150 minutos, ya que la carga odorante inicial de estas preparaciones era mayor que en el ejemplo anterior.

Tras la aplicación del proceso se obtuvo un extracto aromático concentrado libre de solventes de gran intensidad aromática y de agradable olor que fue descrito como a frutos secos tostados. Además se obtuvo el polvo del preparado desaromatizado que presentaba una disminución muy importante en su intensidad odorante y una apariencia idéntica al original.

La preparación desodorizada se añadió a vinos sintéticos en las mismas condiciones descritas en el ejemplo anterior para comprobar el efecto del procedimiento empleado en la liberación de compuestos odorantes al vino. Para ello se emplearon las condiciones experimentales descritas en el ejemplo anterior y el análisis de los compuestos volátiles se llevó igualmente a cabo por GC-MS. La comparación de los perfiles volátiles de la muestra desodorizada y del control se muestran en la Fig 5, en la que se puede comprobar que el perfil cromatográfico de la muestra desodorizada presenta una importante reducción o incluso la desaparición de muchos de los compuestos volátiles presentes en la muestra original.

# ES 2 350 789 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la desodorización de preparaciones de levadura seca inactiva (LSI) mediante el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:

10 a. Adición de un cosolvente que se selecciona entre etanol y soluciones hidroalcohólicas con contenido de etanol mayor al 80%, a una muestra de LSI

b. Calentar la mezcla obtenida en el paso a) a una temperatura de entre 50-80°C

15 c. Adicionar CO<sub>2</sub> con un caudal de 1 a 3 mL/min hasta conseguir una presión de entre 150-250 atm.

d. Continuar la extracción de los compuestos volátiles del paso c) durante un tiempo de entre 90 a 180 minutos.

20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la muestra de LSI ha sido sometida previamente a un proceso de molienda criogénica.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la cantidad de cosolvente a emplear varía entre el 20 y 40% del peso de la muestra.

25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que además comprende una etapa de recogida del extracto de compuestos volátiles procedentes de la muestra de LSI.

30 6. Producto obtenible por el procedimiento según la reivindicación 5 que comprende el extracto de los compuestos volátiles odorantes procedentes de la muestra de LSI tratada.

7. Uso del producto según la reivindicación 6 como agente aromatizante para distintos tipos de productos alimentarios.

35

40

45

50

55

60

65



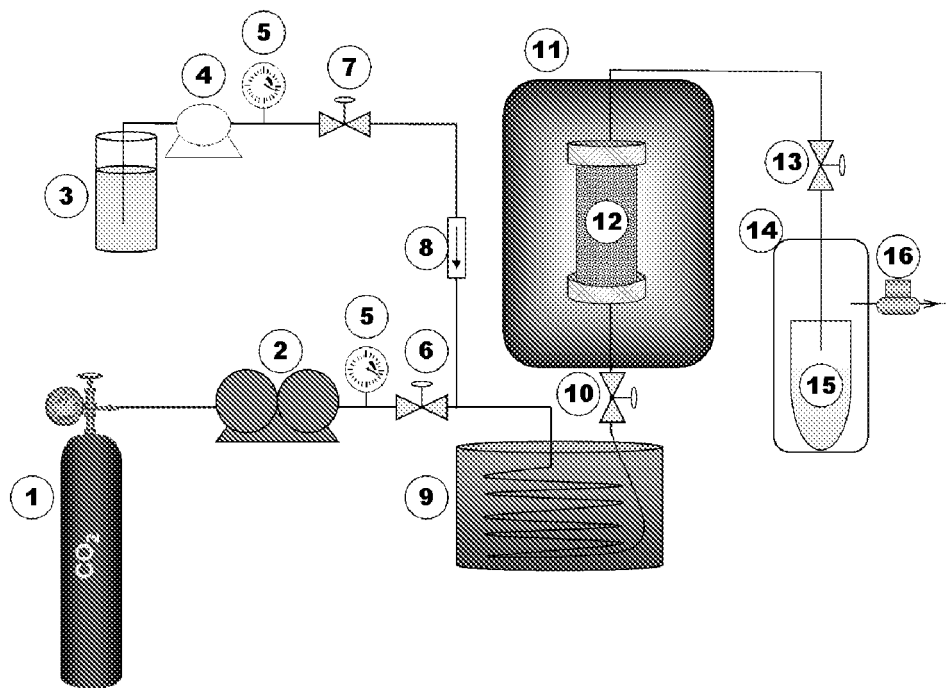


FIG. 1

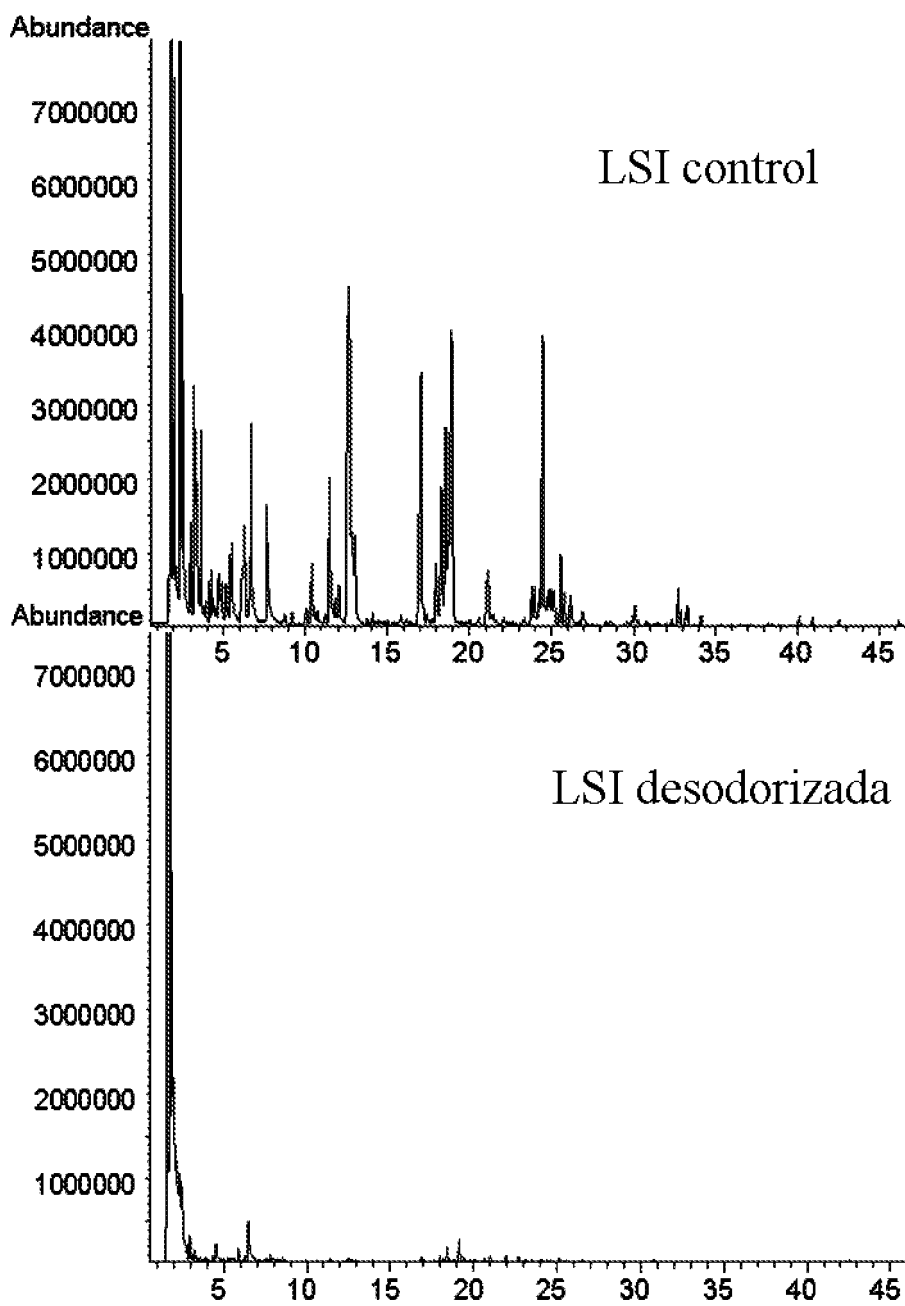


FIG. 2

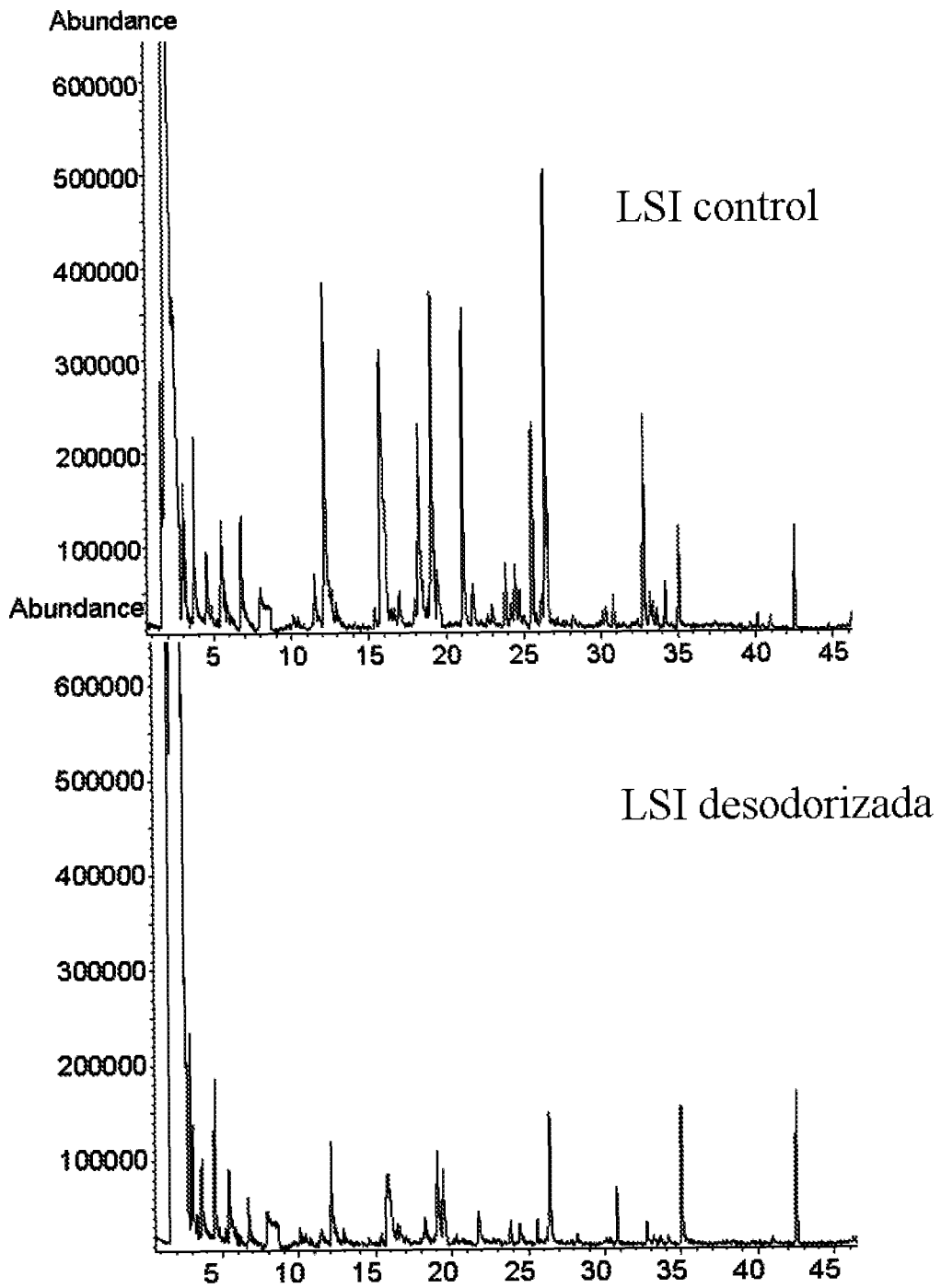
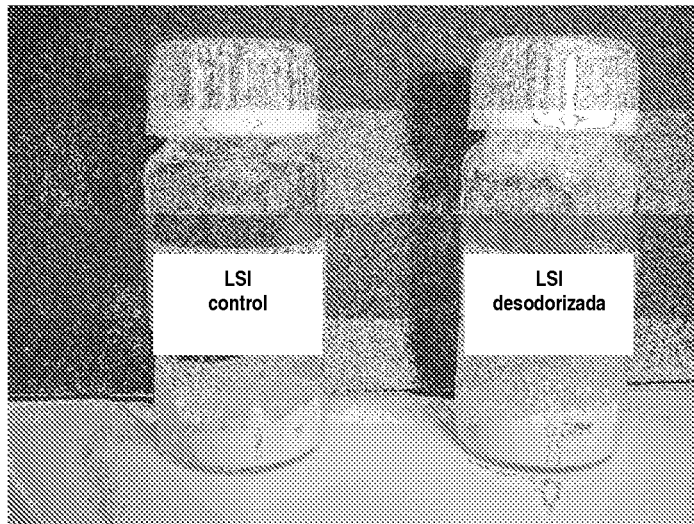


FIG. 3



**FIG. 4**

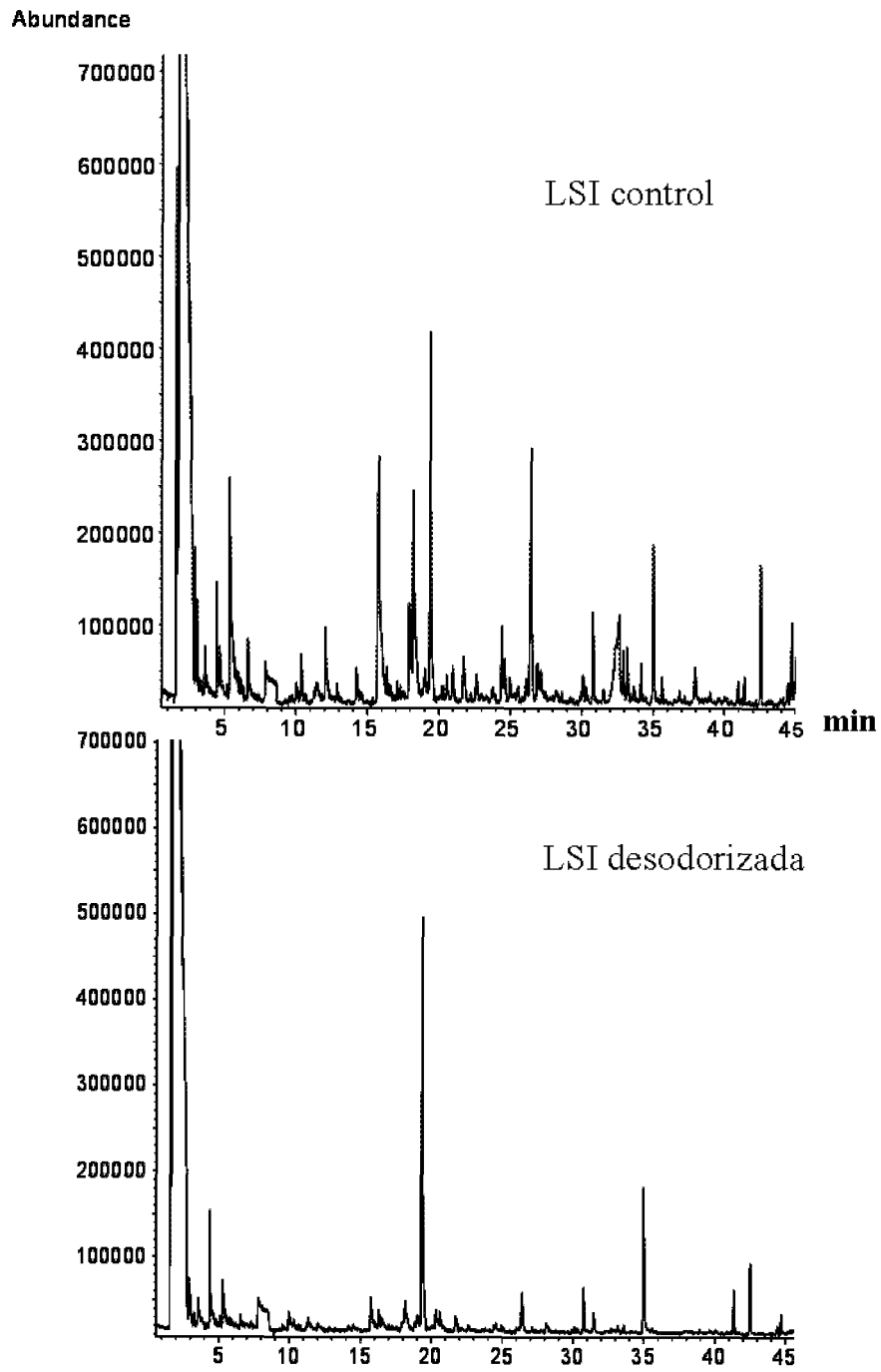


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930366

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.06.2009

②③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CA 1179546 A1 (STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH) 18.12.1984 , todo el documento.	1, 2
A	US 5306637 A (LIN HO-MU et al.) 26.04.1994	
A	VALDERRAMA, J O et al.: "Extraction of Astaxantine and Phycocyanine from Microalgae with Supercritical Carbon Dioxide", J. Chem. Eng. Data (2003), vol. 48 (4), pp.: 827-830, todo el documento.	1-7
A	EP 0920812 A1 (SAPPORO BREWERIES) 09.06.1999	
A	JP 4248968 A (SAPPORO BREWERIES) 04.09.1992 (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 13.12.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 199242, N° DE ACCESO 1992-344703.	
A	KR 100522945 B1 27.01.2006 (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 13.12.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200682, N° DE ACCESO 1998-568384.	1-7

#### 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  
15.12.2010

Examinador  
A. Maquedano Herrero

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A23L1/015** (01.01.2006)

**A23L1/221** (01.01.2006)

**A23L1/28** (01.01.2006)

**C12N1/00** (01.01.2006)

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

A23L, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.12.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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



**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CA 1179546 A1 (STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH )	18.12.1984
D02	VALDERRAMA, J O et al.: "Extraction of Astaxantine and Phycocyanine from Microalgae with Supercritical Carbon Dioxide", J. Chem. Eng. Data (2003), vol. 48 (4), pp.: 827-830, todo el documento.	

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

La solicitud reivindica un procedimiento para la desodorización de levaduras de uso enológico basado en el empleo de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. Asimismo, se reivindica el extracto aromático obtenido, así como su utilización como agente aromatizante alimentario. Las condiciones de extracción mediante CO<sub>2</sub> supercrítico son de presión de entre 150-250 atmósferas y temperatura de entre 50-80° C. Se emplea etanol o soluciones hidroalcohólicas de éste como cosolvente del CO<sub>2</sub>.

D01 describe la extracción mediante CO<sub>2</sub> supercrítico de sustancias aromáticas, responsables del sabor amargo, de extractos de levadura de cerveza. No utilizan cosolvente y las condiciones ambientales son de presión entre 98-200 (hasta 250) atmósferas y temperatura de entre 40-70° C (hasta 100° C).

D02 describe un procedimiento muy parecido al de la solicitud, en el que el material de partida son algas en lugar de levaduras y los compuestos que se obtienen son distintos.

D01 representa el estado de la técnica más cercano. El problema planteado tanto por la solicitud, como por D01 es el mismo: eliminar sustancias aromáticas indeseadas de un extracto de levadura. La forma de solucionarlo es similar en ambos casos. Extraer mediante CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. La diferencia entre el procedimiento de D01 y el de la solicitud es que en D01 no utilizan cosolvente y en la solicitud emplean etanol. Sin embargo, el experto en la materia conoce la práctica habitual de utilizar cosolventes en las extracciones con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas y el etanol es uno de los más utilizados.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1 y 2 no cumplen el requisito de actividad inventiva. Sin embargo, el resto de las reivindicaciones (3-7) sí que lo cumplen.

Por otro lado, se considera que las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad.