

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 520**

51 Int. Cl.:

C12H 1/056 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2006 E 06779014 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1917345**

54 Título: **Utilización de extracto de biomasa fúngica como auxiliar tecnológico para el tratamiento de líquidos alimenticios**

30 Prioridad:

04.07.2005 FR 0507066

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

15.04.2014

73 Titular/es:

**KITOZYME S.A. (100.0%)
PARC INDUSTRIEL DES HAUTS SARTS, ZONE II,
RUE HAUTECLAIRE 4
4040 HERSTAL, BE**

72 Inventor/es:

**TEISSEDRE, PIERRE-LOUIS;
BORNET, AURÉLIE;
BRUYERE, JEAN-MICHEL y
GAUTIER, SANDRINE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 455 520 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

Utilización de extracto de biomasa fúngica como auxiliar tecnológico para el tratamiento de líquidos alimenticios.

5 La invención se refiere al tratamiento de líquidos alimenticios por un auxiliar tecnológico extraído de biomasa fúngicas.

10 En el campo del tratamiento de los líquidos alimenticios, en particular del tratamiento de los líquidos alimenticios obtenidos a partir de vegetales, como los zumos de frutas o las bebidas fermentadas, y en particular los vinos, los champanes, las cervezas o las sidras, es conocido el tratamiento mediante unos auxiliares tecnológicos del producto que se debe obtener para eliminar unos compuestos indeseables, en particular que son la causa de inestabilidad y de riesgos alimenticios, o para ajustar su composición.

15 Es conocida en particular la utilización de unos compuestos tales como la bentonita, el caolín, el PVPP, una gelatina alimenticia, una cola de pescado, la caseína y el caseinato de potasio, la ovalbúmina, la lactalbúmina, el dióxido de silicio en forma de gel o de solución coloidal, etc., para el tratamiento de los líquidos alimenticios, como los mencionados anteriormente.

20 Las micotoxinas, y en particular la ocratoxina A (OTA) y las aflatoxinas, son sistemáticamente controladas en los alimentos y las bebidas desde que se han demostrado sus efectos tóxicos (nefrotoxicidad, neurotoxicidad, inmunodeficiencia, carcinogenicidad sospechada). Se recomienda actualmente no superar una dosis diaria en micotoxinas de 0,3-0,9 µg/día. Hasta que una directiva europea fije el límite, la Office International de la Vigne et du Vin (OIV) recomienda no superar un contenido de 2 µg/l en los vinos.

25 Unos experimentos en laboratorio y en el viñedo han explorado, por otra parte, la pista de la lucha biológica, mediante *Trichoderma*, el hongo antagonista de *Aspergillus carbonarius*. Se ha observado tres veces menos contaminación. Sin embargo, los resultados dependen realmente de la cepa de OTA. Los medios para luchar contra OTA dependen esencialmente de la profilaxis del viñedo, con el inconveniente de apreciar la aparición de residuos y metabolitos de pesticidas en las uvas y los mostos. Pocas soluciones aparecen hoy día, en particular a nivel enológico. Si las bayas de uva están contaminadas, entonces en la vinificación, el contenido en OTA aumenta durante la maceración. El contenido en OTA está en función del grado alcohólico. El alcohol es un disolvente de la molécula de OTA y la solubiliza en el vino. Para los vinos tintos, las termovinificaciones parecen ciertamente interesantes, a pesar de que siguen sin realizarse estudios complementarios sobre la optimización del calentamiento de la vendimia (tiempo de calentamiento, temperatura, proceso *flash* expansión). Las investigaciones en microbiología distinguen unos productos de desinfección en enología más eficaces que otros, pero con costes muy importantes y unos riesgos de la no selectividad (eliminación de las cepas de levaduras/bacterias útiles para la fermentación alcohólica o maloláctica). En cuanto a la utilización de auxiliares enológicos, como el gel de sílice, el carbón enológico, el caseinato de potasio, la gelatina o las bentonitas, los resultados no son muy concluyentes ya que eliminan muy poca OTA (salvo el carbón enológico y el caseinato de potasio) y conducen a unos inconvenientes mayores. Todos estos productos son susceptibles de conllevar la aparición de residuos alérgenos, en particular en los mostos y los vinos.

45 La utilización de carbón enológico adolece del inconveniente principal de eliminar la totalidad de los compuestos fenólicos (antocianos y taninos en particular). Los compuestos fenólicos son esenciales como constituyentes que condicionan el color y la percepción sensorial de los vinos y otras bebidas obtenidas en particular por fermentación.

50 Los geles de sílice y gelatina son totalmente ineficaces para eliminar la OTA y se utilizan normalmente para efectuar unos clarificados con la ayuda de taninos, con el fin de clarificar los mostos o los vinos (eliminar proteínas, o suavizar). Las utilidades de dosis demasiado elevadas de estos productos enológicos presentan el inconveniente principal de conllevar unas rupturas proteicas en el caso de la gelatina y conducir a riesgos importantes de pérdidas mayores de polifenoles para los geles de sílice.

55 En lo referente a las bentonitas, éstas se utilizan para las operaciones de clarificación o de estabilización de los mostos y de los vinos, y fijan ciertas proteínas inestables para permitir su eliminación. Son asimismo capaces de fijar unas materias colorantes. Sin embargo, unos trabajos muestran que éstas liberan unos porcentajes de aluminio importantes en los mostos y los vinos. Un aporte elevado de aluminio en la ración alimenticia es susceptible de tener repercusiones en materia de salud pública a nivel de enfermedades degenerativas.

60 Por otra parte, existen varias restricciones durante unos tratamientos enológicos sobre mosto o vino:

65 Para el desengrasado de los mostos y vinos blancos, la utilización de carbón enológico presenta el inconveniente principal de eliminar la totalidad de los compuestos fenólicos (antocianos y taninos en particular). El anexo IV del reglamento CE 1493/1999 prevé el tratamiento de los mostos blancos, de los vinos blancos nuevos todavía en fermentación y de los vinos blancos mediante carbones de uso enológico en ciertos límites (párrafo 1 apartado i, y párrafo 3 apartado o). A pesar de que la reglamentación comunitaria no precisa explícitamente la finalidad de este tratamiento, éste se puede efectuar sólo para limpiar los productos viti-vinícolas blancos y en ningún caso debe ser

utilizado para desodorizar unos vinos que presentan un mal sabor manifiesto. En efecto, prevé que los tratamientos pueden ser efectuados solamente con el fin de permitir una buena vinificación o una buena conservación de los productos en cuestión (artículo 42 del reglamento CE 1493/1999). Así, el carbón activo no es satisfactorio para resolver los problemas técnicos planteados anteriormente.

5 En lo referente a los tratamientos actuales de eliminación del hierro de los vinos, el contenido máximo en cobre fijado por el OIV es de 1 mg/l. Para el hierro, el riesgo de ruptura férrica interviene a partir de un contenido de aproximadamente 8 mg/l. La eliminación del hierro consiste en eliminar el exceso de hierro susceptible de provocar una ruptura férrica, que conlleva un aspecto "dudoso" inadecuado para el consumo. La presencia de un exceso de hierro se debe frecuentemente a una bodega en mal estado o a partículas de tierras presentes en las uvas durante la vendimia. Los productos de adición de los vinos tratados son el ferrocianuro de potasio (vino blanco y rosado) y el fitato de calcio (vino tinto).

15 Para el tratamiento con ferrocianuro de potasio, existen hoy día unas obligaciones técnicas, administrativas y analíticas. En particular, la eliminación total de ferrocianuro de potasio debe ser controlada sobre el vino después del tratamiento, es larga, costosa, meticulosa y con implicaciones en términos de seguridad alimenticia y de salud pública.

20 Para el tratamiento con fitato de calcio, ahí también existen obligaciones en lo referente a los controles analíticos y administrativos del tratamiento, bajo responsabilidad del enólogo.

- Tratamiento bajo control obligatorio de un enólogo,
- Después del tratamiento, el vino debe todavía contener trazas de hierro,
- Disposiciones sobre el control de la utilización del fitato acordado o a acordar por cada estado miembro.

25 En lo que se refiere a la presencia de metales pesados en los vinos, el contenido máximo en metales pesados en los vinos está controlado por el OIV. Es de 200 µg/l en plomo desde 1996, y de 10 µg/l en cadmio desde 1981.

30 El tratamiento con ferrocianuro de potasio puede también eliminar las trazas de metales pesados. Es asimismo posible eliminar unos metales principales y pesados, indirectamente con la ayuda de una electrodiálisis o con la ayuda de una resina intercambiadora de cationes. Sin embargo, este procedimiento es complicado de realizar y no es accesible a todos los productores, ya que su coste es elevado. Por otra parte, este procedimiento no está autorizado en todos los países.

35 Por otra parte, están establecidos unos criterios de pureza de los auxiliares tecnológicos en enología. Los productos enológicos son unos aditivos o unos auxiliares de fabricación. Para ello, cuando este es el caso, deben responder a los criterios de pureza definidos por la reglamentación. Algunos productos no están, bien o mal, definidos: es el caso de los carbones y de los taninos, por ejemplo.

40 Durante operaciones de vinificación, clarificación, estabilización, tratamientos específicos, conservación o filtración, son utilizados numerosos productos enológicos, aditivos, medios de filtro, o tratamientos específicos, y se encuentran generalmente más bien unos productos de vocación curativa, que permiten remediar ciertos problemas durante la crianza de los vinos. Se encuentran principalmente:

- 45 - los productos que eliminan el hierro, como el ferrocianuro de potasio para los vinos blancos, y el Afferol a base de fitato para los vinos tintos;
- los productos destinados a eliminar unos productos de oxidación, por ejemplo la caseína soluble, Casei + (caseinato de potasio), el Polylact (PVPP, Caseína), el Viniclar (PVPP));
- 50 - las bentonitas para eliminar los eventuales excesos de proteínas, por ejemplo Microcol en polvo o granulado.

Los agentes autorizados para el tratamiento de los líquidos alimenticios son conocidos por el experto en la materia, y referenciados por las legislaciones nacionales, como por ejemplo los agentes autorizados para el tratamiento de los vinos y de los zumos de frutas en los USA (27CFR24.246) o en Europa (reglamento CE 1493/1999 y CE 1622/2000).

60 Entre estos compuestos, algunos no son adecuados para tratar diferentes tipos de líquidos alimenticios, como por ejemplo diferentes vinos, diferentes cervezas, diferentes champanes, etc., o no son adecuados para la extracción de los diferentes compuestos que se deben eliminar.

Los auxiliares tecnológicos mencionados anteriormente deben ser utilizados de manera relativamente específica en función de la bebida que se debe tratar. Así, por ejemplo, para dos vinos diferentes, será necesario utilizar unos auxiliares tecnológicos diferentes, lo que plantea el problema de tener que utilizar diferentes auxiliares tecnológicos durante el tratamiento. Por ejemplo, para elaborar un vino blanco, se efectuará una clarificación del mosto con la ayuda de bentonita o de cola de pescado después de la presurización con el fin de eliminar posos y proteínas. Por el

contrario, en el caso de un vino tinto, se podrá utilizar PVPP, que fija los polifenoles de los vinos, para elaborar por ejemplo unos vinos jóvenes frescos.

De la misma manera, para dos etapas diferentes del procedimiento de tratamiento de la misma bebida, será necesario utilizar dos auxiliares tecnológicos diferentes, lo que plantea en particular unos problemas de almacenaje, de etiquetaje y de utilización. Por ejemplo, se procede a la eliminación de los productos de oxidación por la caseína o el PVPP, pero la eliminación de las materias fenólicas colorantes se efectúa mediante el carbón enológico, y se utilizan unas enzimas pectolíticas para degradar las pectinas. Por ejemplo, la bentonita no es utilizada, actualmente, para el tratamiento del producto final (conservación, embotellado, o crianza).

Por otra parte, los auxiliares tecnológicos conocidos tienen el riesgo de deteriorar las propiedades organolépticas, lo que es perjudicial para la bebida final, en particular en el ámbito de bebidas obtenidas a partir de vegetales, como las cervezas, los vinos, los champanes, las sidras, y los zumos de frutas.

Es conocida, en particular a partir de las solicitudes de patente FR 2 599 048 y EP 0 501 381, la utilización de un quitosano para el tratamiento de líquidos alimenticios de origen vegetal. Esta es también la enseñanza de Spagna *et al.* (Spagna Giovanni *et al.* "the stabilization of white wines by absorption of phenolic compounds on chitin and chitosan", Food research International, Applied Science, Barking, Vol. 29, n°3-4, 1996, páginas 241-248), que describe la eliminación de los polifenoles en un vino blanco mediante la utilización de quitosano. La utilización de la quitina está también descrita, pero, según este artículo, no es adecuada para eliminar los polifenoles. Sin embargo, la utilización del quitosano presenta el inconveniente de provenir de origen animal para casi la totalidad del quitosano disponible en el mercado, y por lo tanto de presentar riesgos de alergias. El quitosano disponible en el mercado proviene principalmente de caparazones de crustáceos (camarones, cangrejo, bogavante). En efecto, el quitosano es un polisacárido que ha demostrado su capacidad para clarificar y estabilizar unos líquidos alimenticios, y que está disponible comercialmente, pero únicamente para usos domésticos y no industriales como auxiliar para la fabricación doméstica del vino y de la cerveza. La utilización de este quitosano de origen animal como auxiliar tecnológico para el tratamiento y la estabilización de los líquidos alimenticios plantea por lo menos dos problemas. Por un lado, los auxiliares de tecnología de origen animal no son apreciados por la mayoría de los productores de líquidos alimenticios, y deben o deberán ser sistemáticamente citados en las etiquetas, tal como lo exigen las legislaciones en vigor o en preparación. Por otro lado, los extractos de crustáceos están desaconsejados para las personas alérgicas a los crustáceos, que son alertados en la etiqueta. Debe conocerse que la alergia a los crustáceos es una de las más habituales (el 3% de los adultos en los EE.UU., según un estudio reciente).

La solicitud de patente WO 98/17386 se refiere a un procedimiento para eliminar únicamente los pesticidas de los zumos de frutas utilizando, en particular, unos derivados de quitina o de quitosano. Sin embargo, de nuevo, los compuestos utilizados y descritos por la invención son de origen animal.

La solicitud de patente WO 98/17386 se refiere a un procedimiento para extraer los pesticidas y/o los fitoquímicos de líquidos alimenticios y no alimenticios. En esta solicitud, se hace referencia a la quitina y al quitosano, sin embargo, no se da ningún ejemplo en lo referente a estos compuestos. Los compuestos utilizados en los ejemplos de esta solicitud de patente se refieren a unos derivados de tipo alquilésteres o arilésteres de la quitina, de polisacáridos, o del quitosano. A pesar de que estos compuestos hidrófobos de tipo octanoil- o benzoil-quitina permiten la eliminación de los pesticidas, que son unas moléculas de naturaleza lipófila, no es evidente, sin experimento suplementario, que la quitina sola hubiera permitido eliminar los pesticidas. Por otro lado, no es posible extrapolar el tratamiento descrito en esta solicitud para la eliminación de otras moléculas, tales como unas proteínas, unos polifenoles, unas micotoxinas, unos metales, etc, moléculas que están presentes en los líquidos alimenticios de origen vegetal. Así, este documento no describe un auxiliar tecnológico que permite el tratamiento de líquidos alimenticios de origen vegetal sin deteriorar sustancialmente las propiedades organolépticas.

La solicitud de patente DE 198 10 094 (US n° 6.402.953) describe la utilización de quitina o de quitosano de origen fúngico para tratar los contaminantes radioactivos de solución acuosa, en particular para eliminar los metales pesados tales como el cesio, el uranio, el plutonio, etc. Esta solicitud está por lo tanto muy alejada del campo técnico de la presente invención, que se refiere al tratamiento de líquidos alimenticios de origen vegetal. Por otro lado, a partir del procedimiento de obtención del "absorbente" descrito en los ejemplos, el material a base de quitina de origen fúngico descrito en este documento no es puro, en el sentido en el que tiene el riesgo de conllevar la liberación de residuos solubles en el líquido alimenticio tratado, lo que está en contra del objetivo de la presente invención. Este compuesto impuro permitiría tratar el agua, pero no sería realmente adecuado para tratar unos líquidos alimenticios de origen vegetal, que comprenden en particular unas proteínas, unos polifenoles, unos metales, unas micotoxinas, para conservar en particular y/o no alterar sus propiedades organolépticas.

Así, la técnica anterior no permite proporcionar un auxiliar tecnológico que permita el tratamiento de líquidos alimenticios de origen vegetal, ya que bien el auxiliar tiene el riesgo de deteriorar sustancialmente las propiedades organolépticas liberando unos residuos, o bien tiene el riesgo de alterar las propiedades organolépticas eliminando unos compuestos beneficiosos, o bien no es adecuado para un uso alimenticio debido a una origen animal, en general indeseable.

Objetivos de la invención

Así, el objetivo principal de la invención consiste en resolver el problema técnico que consiste en el suministro de un auxiliar tecnológico que permita el tratamiento de líquidos alimenticios, en particular de origen vegetal, como en particular unas bebidas fermentadas (vino, cerveza, champanes, sidras, etc.), unos espirituosos (whisky, aguardiente, etc.) y unos zumos de frutas, sin deteriorar sustancialmente sus propiedades organolépticas.

Se ha buscado igualmente proporcionar un auxiliar tecnológico que presenta una seguridad alimenticia irreprochable, estando al mismo tiempo disponible en un gran volumen y a un coste compatible con las prácticas de producción de los líquidos alimenticios.

Se ha buscado también proporcionar un auxiliar tecnológico de origen natural no animal, de gran calidad y con una excelente trazabilidad.

Otro objetivo de la invención consiste en resolver también el problema técnico que consiste en el suministro de un auxiliar tecnológico para estabilizar los líquidos alimenticios terminados, preservando al mismo tiempo sus propiedades organolépticas.

Otro objetivo de la invención consiste en resolver el problema técnico que consiste en el suministro de un auxiliar tecnológico para descontaminar los líquidos alimenticios finales, en particular para obtener unos contenidos en impurezas por debajo de los niveles definidos por la legislación en vigor, en particular para los vinos, champanes, sidras y cervezas.

Un objetivo de la invención consiste en resolver el problema técnico que consiste en el suministro de un auxiliar tecnológico para clarificar los líquidos alimenticios finales.

Particularmente un objetivo de la invención consiste en resolver los problemas definidos anteriormente, en particular en el ámbito del tratamiento de los vinos, de los vinos tintos y/o vinos blancos y/o vinos rosados y/o vinos dulces naturales.

Asimismo, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un auxiliar tecnológico único para efectuar diferentes etapas del tratamiento de una bebida, y preferentemente del vino, del champán, de la sidra o de la cerveza. Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un auxiliar tecnológico utilizable para diferentes vinos, champanes, sidras, cervezas, etc.

Finalmente, un objetivo de la presente invención consiste en resolver el conjunto de los problemas técnicos mencionados anteriormente de manera fiable, poco costosos y utilizables industrialmente, y en particular menos costosos y más rentables que utilizando un quitosano no animal.

Descripción de la invención

Se conocía en el campo técnico, a priori, que un auxiliar tecnológico para el tratamiento de los líquidos alimenticios, en particular de los líquidos alimenticios de origen vegetal eventualmente obtenidos por fermentación alcohólica, preferentemente unos vinos, unas cervezas, unos champanes, unas sidras y unos zumos de frutas, debe ser ventajosamente cargado, en particular positivamente.

Así, el experto en la materia, para resolver los problemas técnicos mencionados anteriormente, que hubiera tenido la idea de utilizar un polímero natural de origen no animal hubiera podido utilizar el quitosano de origen vegetal para realizar el tratamiento de líquidos alimenticios, ya que el quitosano es un polímero catiónico y que puede por lo tanto captar los compuestos indeseables cargados aniónicamente. En efecto, se había inventado un procedimiento de producción de quitosano de origen no animal, a partir de recursos vegetales, más particularmente de origen fúngico, y más particularmente de un hongo de tipo *Aspergillus niger*. Sin embargo, se ha descubierto de manera sorprendente que el quitosano no es el polímero mejor indicado accesible por el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 03/068824 para clarificar y/o estabilizar los líquidos alimenticios.

De manera sorprendente, se ha descubierto que un extracto de biomasa fúngica que comprende mayoritariamente por lo menos un polisacárido no iónico puede ser utilizado de manera muy satisfactoria en el ámbito de los tratamientos de los líquidos alimenticios, en particular los líquidos alimenticios de origen vegetal, eventualmente obtenidos por fermentación alcohólica, y preferentemente unos vinos, unas cervezas, unos champanes, unas sidras y unos zumos de frutas.

Así, la presente invención se refiere a la utilización de un extracto de biomasa fúngica que comprende mayoritariamente por lo menos un polisacárido no iónico como auxiliar tecnológico para el tratamiento de líquidos alimenticios, en particular líquidos alimenticios de origen vegetal, eventualmente obtenidos por fermentación alcohólica, y preferentemente unos vinos.

Los inventores entienden por "auxiliar tecnológico" cualquier sustancia no consumida como ingrediente alimenticio en sí o voluntariamente utilizada en la transformación de las materias primas y que pueden tener como resultado la presencia no intencional de residuos técnicamente inevitables de esta sustancia o de sus derivados en el producto final. Los auxiliares tecnológicos no forman parte, en particular, a unos ingredientes del líquido alimenticio, son utilizados únicamente durante la preparación del producto para facilitarla, pero no entran en la composición del producto final.

Mediante la expresión "tratamiento de los líquidos alimenticios", preferentemente unos vinos, los inventores entienden en particular cualquier operación que pretende estabilizar el líquido mediante eliminación de los compuestos responsables de turbiedad o de inestabilidad en el tiempo, en convertir el líquido en apropiado para el consumo, en particular mejorando el aspecto, el sabor, llevando al mismo tiempo los contenidos en impurezas por debajo de los niveles definidos por la legislación en vigor.

Unos ejemplos de "líquidos alimenticios de origen vegetal" son los zumos de frutas, y unos ejemplos de "líquidos alimenticios de origen vegetal obtenidos por fermentación alcohólica" son las bebidas fermentadas (vinos, cervezas, etc.), y los espirituosos (whisky, aguardiente, etc.). Los líquidos alimenticios de origen vegetal que se pueden tratar mediante el extracto fúngico de la presente invención no están limitados, y se seleccionan por ejemplo entre las bebidas alcohólicas (vinos, sidras, champanes, etc.), los licores (vinos de licor, oporto, licores de frutas, etc.), las bebidas destiladas (coñac, ginebra, tequila, aguardiente, etc.), las bebidas alcoholizadas (anís, cócteles, etc.), los zumos de frutas (incluyendo las verduras), las sopas, los vinagres, incluyendo las mezclas de éstas, y una mezcla de una de las bebidas antes citadas de origen vegetal, con otra bebida de origen no vegetal para realizar una mezcla líquida alimenticia como, por ejemplo, una mezcla de leche y de zumo de frutas. Ventajosamente, el líquido alimenticio de origen vegetal se selecciona de entre una bebida fermentada y un zumo de fruta.

Los inventores entienden por "mayoritariamente por lo menos un polisacárido no iónico" un extracto que comprende una cantidad eficaz de polisacárido no iónico para ser utilizado como auxiliar tecnológico según la presente invención, presente en el auxiliar tecnológico en una cantidad superior a los otros compuestos presentes. La cantidad de polisacárido no iónico a utilizar en el auxiliar tecnológico puede ser determinada por el experto en la materia, y es preferentemente superior al 70% en masa con respecto a la masa total del auxiliar tecnológico total, preferentemente superior al 75%, preferentemente superior al 80%, preferentemente superior al 85%, preferentemente superior al 90%, y aún más preferentemente superior al 95%. Los otros compuestos presentes en el auxiliar tecnológico no actúan en el fenómeno de tratamiento del líquido alimenticio, por lo tanto es preferible eliminarlos parcial o totalmente, lo que aumenta la capacidad de tratar el líquido alimenticio en dosis equivalentes.

Los auxiliares se comportan en particular como una capa de material filtrante y por lo tanto no están presentes en el líquido final.

De manera general, la presente invención, que utiliza unos extractos fúngicos, es muy simple de utilizar. El extracto fúngico según la presente invención se utiliza preferentemente en forma de un polvo que floculará absorbiendo los compuestos indeseables. Su utilización es compatible con las prácticas empleadas para el tratamiento de los líquidos alimenticios comúnmente utilizados hoy día, no necesita un equipamiento particular, y es compatible con el precio habitual de los tratamientos utilizados, en particular para los tratamientos enológicos. Por lo tanto, están accesibles para todos los productores.

Así, se puede utilizar por ejemplo el extracto fúngico según la presente invención a una concentración comprendida entre 1 g/hl y 1 k g/hl de líquido que se debe tratar. Preferentemente se utiliza una cantidad comprendida entre 10 g y 500 g por hl de líquido a tratar, y aún más preferentemente entre 10 y 200 g/hl de líquido que se debe tratar.

Se puede añadir por ejemplo el extracto fúngico según la presente invención al líquido que se debe tratar contenido en una cuba, que es ventajosamente agitada para diluir el extracto fúngico. Esta operación se puede efectuar a temperatura ambiente (20-25°C) pero puede también hacerse en caliente o en frío, en unos límites razonables para no deteriorar la futura bebida. Esta operación se puede realizar durante un periodo comprendido entre algunas horas y algunos días, ajustado preferentemente por el experto en la materia. Después, se procede ventajosamente a la separación del extracto fúngico del líquido mediante unos métodos conocidos por el experto en la materia, como la filtración o la decantación.

La capacidad de producción de estos extractos fúngicos, unida a la presencia de una fuente fúngica renovable, da acceso a volúmenes compatibles con las necesidades de la industria alimenticia, como por ejemplo para la producción de los vinos, de las cervezas, de los champanes, de las sidras o de los zumos de frutas.

El extracto fúngico según la presente invención se puede utilizar en una etapa cualquiera del tratamiento del líquido alimenticio, y preferentemente en un máximo de etapas de este tratamiento.

Ventajosamente, el extracto fúngico según la presente invención permite la eliminación parcial o completa de compuestos indeseables, causas de inestabilidad o de riesgos sanitarios.

5 Ventajosamente, los compuestos indeseables se seleccionan de entre el grupo que consiste en coloides que causan la inestabilidad, unos coloides que causan la turbiedad, unos coloides que procuran unas propiedades organolépticas de mala calidad, unas proteínas, unos metales, unos metales pesados, en particular el cobre, el hierro, el cadmio y el plomo, unos pesticidas residuales como los fungicidas, los insecticidas y los herbicidas, y unas toxinas como las micotoxinas y las endotoxinas bacterianas, y su eliminación tiene como objetivo mejorar la calidad de líquido alimenticio.

10 Ventajosamente, el extracto fúngico según la presente invención permite el tratamiento de líquidos alimenticios finales (tratamientos después de la fermentación, como el embotellado o la crianza).

Así, se pueden eliminar unos compuestos indeseables en el líquido alimenticio para obtener una bebida lista para el consumo, o modificar la composición del líquido para obtener una bebida que tiene una composición preferida (color, sabor, etc.), y optimizada.

15 La ventaja de la utilización de los extractos fúngicos propuestos por los inventores es que permiten obtener una eficacia en particular en el tratamiento de los mostos, vinos y bebidas alcoholizadas o alcohólicas, para evitar la ruptura férrica, para eliminar los productos de oxidaciones, eliminar los eventuales biocidas (pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc.) y/o las proteínas sin tocar de manera importante a los otros constituyentes del líquido alimenticio, como los compuestos fenólicos, en particular para el vino, evitando al mismo tiempo cualquier riesgo de liberación de residuos, y cualquier riesgo de alergenidad.

20 Otra ventaja de los extractos fúngicos es permitir una reducción de los contaminantes tóxicos de las diversas bebidas, por ejemplo de los mostos, vinos y espirituosos, etc., tales como micotoxinas, metales pesados (plomo, cadmio), metales principales (hierro), pesticidas.

25 En el ámbito de la presente invención, el auxiliar tecnológico se utiliza ventajosamente para el tratamiento de las bebidas de origen vegetal, como los zumos de frutas, los vinos y/u otras bebidas procedentes de fermentación, como la cerveza, el champán, la sidra, y permite en particular:

- 30 a) eliminar las partículas terrosas;
- b) eliminar las partículas orgánicas con el fin de reducir la actividad fenoloxidásica;
- 35 c) reducir la flora microbiana indígena;
- d) reducir el contenido en coloides y la turbiedad;
- e) eventualmente disminuir la presencia de compuestos polifenólicos del mosto para disminuir la astringencia, antes de la fermentación;
- 40 f) eliminar unas partículas insolubles en el mosto;
- g) facilitar la decantación de los vinos nuevos por la precipitación parcial de las materias proteicas en exceso;
- 45 h) realizar un tratamiento preventivo de las rupturas proteicas y cuprosas;
- i) corregir unos caracteres organolépticos de los vinos procedentes de mostos alterados por unos hongos, como la podredumbre o el oídio;
- 50 j) eliminar unos contaminantes eventuales;
- k) corregir el color:
 - * de los mostos blancos procedentes de uvas negras de zumo blanco (eventualmente manchados),
 - * de los mostos muy amarillos procedentes de vides blancas,
 - * de los mostos oxidados;
- m) reducir la población indígena de microorganismos antes de la fermentación alcohólica para la siembra ulterior de las levaduras seleccionadas;
- 60 n) precipitar las partículas en suspensión: bien favoreciendo la caída libre de éstas, o bien coagulándose alrededor de las partículas que se deben eliminar arrastrándolas en los sedimentos;
- o) suavizar los vinos tintos quitándoles una parte de los taninos y polifenoles;
- 65 p) clarificar los vinos enturbiados por ruptura, subida de posos, insolubilización de materias colorantes, etc.;

- 5
- q) obtener la nitidez del vino;
- r) obtener la estabilidad biológica del vino mediante eliminación de los microorganismos (filtración esterilizante);
- s) facilitar la decantación de los vinos nuevos mediante la precipitación parcial de las materias proteicas en exceso;
- 10
- t) eliminar un exceso de cobre coloidal utilizado durante el tratamiento con sulfato de cobre pentahidratado en el vino para extraer el mal sabor y el olor que se debe al hidrógeno sulfurado y eventualmente a sus derivados;
- u) eliminar el exceso de hierro del vino, en prevención de rupturas férricas en utilización con una oxigenación combinada;
- 15
- v) prevenir las rupturas proteicas y cuprosas: proteger el vino contra la ruptura férrica ligera, impedir la precipitación de sustancias tales como las materias colorantes que, en el vino, están en el estado coloidal;
- w) fijar los iones férricos y disminuir así la tendencia a la ruptura férrica;
- 20
- x) disminuir el contenido del vino en hierro para evitar la ruptura férrica, o en cobre para evitar la ruptura cuprosa, y más generalmente en metales pesados;
- y) prevenir la ruptura férrica en el caso de vinos ricos en hierro, pero que no tiene ningún exceso de cobre; o
- 25
- z) disminuir el contenido del vino en taninos y otros polifenoles para combatir la tendencia al oscurecimiento, reducir la astringencia, o corregir el color de los vinos blancos manchados.

30

El auxiliar tecnológico según la presente invención no es una preparación enzimática a añadir al mosto o al vino para mejorar la filtrabilidad por hidrólisis enzimática, en particular por hidrólisis enzimática de las pectinas y/o de los glucanos cedidos al mosto o al vino por *Botrytis cinerea* y/o ciertas cepas de levadura.

35

Según una forma de realización ventajosa, el auxiliar tecnológico según la presente invención se utiliza para el tratamiento de un alcohol fermentado, líquido, que es particularmente delicado de tratar para conservar sus propiedades organolépticas.

La presente invención se refiere, según una forma de realización particular, a la utilización de extracto de biomasa fúngica para la clarificación de un líquido alimenticio de origen vegetal y preferentemente para la clarificación del vino.

40

Los inventores entienden por "clarificación del vino" la separación, antes o durante la fermentación, del líquido más o menos claro de las materias sólidas en suspensión en el mosto y/o el vino con la ayuda de auxiliares apropiados.

45

Los auxiliares utilizados deben ser conformes a las legislaciones en vigor, y en el ámbito del vino deben ser conformes a las prescripciones del Codex Oenologique International.

Los auxiliares tecnológicos según la presente invención son ventajosamente unos extractos de biomasa fúngica que comprenden mayoritariamente unos polisacáridos no iónicos, que comprenden mayoritariamente por lo menos un copolímero quitina-glucano.

50

Ventajosamente, el polisacárido no iónico comprende mayoritariamente unas unidades N-acetil-D-glucosamina (quitina) y D-glucosa (beta-glucano).

55

Preferentemente, el copolímero quitina-glucano es un copolímero que comprende mayoritariamente unas cadenas macromoleculares de unidades N-acetil-D-glucosamina unidas entre sí preferentemente por unas uniones alfa(1,6) (comúnmente denominada quitina) y unas cadenas macromoleculares de unidades D-glucosa unidas entre sí preferentemente mediante unas uniones beta (beta-glucano), por ejemplo de tipo beta(1,3), beta(1,4), beta(1,3-1,4), beta(1,6), con preferentemente una relación quitina/glucano que comprendida entre 95:5 y 5:95, preferentemente de 70:30 a 20:80, y más preferentemente de 70:30 a 40:60 (m/m).

60

Estos extractos son totalmente insolubles en los líquidos alimenticios tales como el vino, la cerveza, los zumos de frutas, etc.

Ventajosamente, el copolímero quitina-glucano es un copolímero (N-acetil-D-glucosamina)-(D-glucosa).

65

Ventajosamente, los auxiliares tecnológicos según la presente invención son obtenidos mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 03/068824 depositada a nombre de KitoZyme S.A. el 12/02/2003, que se

incorpora en la presente memoria en su totalidad como referencia.

5 El extracto fúngico se puede obtener a partir de recursos no animales, en particular a partir de pared celular de micelio fúngico de diferentes grupos, que incluyen *Zygomycetes*, *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* y *Deuteromycetes* y/o una mezcla de éstos, y preferentemente *Ascomycetes*. Las *Aspergillii* pertenecen al último grupo. En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento caracterizado porque la biomasa se selecciona entre el grupo que consiste en unos hongos filamentosos tales como *Aspergillum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, y *Schizosaccharomyces*, y los hongos comestibles tal como *Agaricus*, *Pleurotus*, *Boletus*, y *Lentinula*, y/o una mezcla de estos. La característica común de estos hongos es la presencia de polisacáridos en su pared celular, preferentemente de quitina y/o de beta-glucano. Según una forma de realización preferida, los extractos fúngicos son obtenidos a partir de *Aspergillus niger*, de manera económicamente muy rentable.

15 El procedimiento según la presente invención comprende la puesta en contacto de la biomasa con una solución básica, en la que se obtiene una fracción soluble en medio alcalino y una fracción insoluble en medio alcalino, y en la que la fracción soluble en medio alcalino está separada y la fracción insoluble en medio alcalino, que comprende mayoritariamente los polisacáridos no iónicos, está retenida.

20 La fracción insoluble en medio alcalino comprende mayoritariamente unos polisacáridos no iónicos que comprenden ventajosamente por lo menos un copolímero quitina-glucano.

Ventajosamente, la solución alcalina utilizada para digerir la biomasa fúngica es una solución acuosa de metal alcalino como, por ejemplo, el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el hidróxido de amonio, y preferentemente el hidróxido de sodio o de potasio.

25 Ventajosamente, la concentración del reactivo alcalino está preferentemente comprendida entre el 0,1 y el 40% (m/v), y preferentemente inferior al 10%, y preferentemente inferior al 1%. La reacción se realiza a una temperatura comprendida preferentemente entre 5 y 120°C, y preferentemente inferior a 60°C, y aún más preferentemente a temperatura ambiente. La biomasa se pone a reaccionar en suspensión en una solución alcalina a una concentración comprendida preferentemente entre 1 y 15% (masa seca, m/v), preferentemente comprendida entre el 3 y el 12%. La reacción se realiza preferentemente durante menos de 4 horas. La primera etapa de extracción permite eliminar los compuestos solubles en medio alcalino, incluyendo los pigmentos, las proteínas, algunos lípidos, y algunos polisacáridos distintos de los polisacáridos no iónicos. Ventajosamente, se elimina por lo menos una parte de los compuestos lipófilos cuyos residuos pueden ser liberados en el líquido alimenticio, lo que conlleva una alteración de su sabor.

35 Según una forma de realización preferida, la biomasa puede ser tratada mediante la primera solución alcalina, filtrada por una tecnología conocida por el experto en la materia, preferentemente con la ayuda de un filtro-prensa, y tratada nuevamente con una segunda solución alcalina a una concentración en reactivo alcalino equivalente a la primera etapa o diferente. Unos reactivos suplementarios pueden ser utilizados para mejorar la extracción de los polisacáridos buscados para la presente invención. Tales reactivos se seleccionan preferentemente entre los disolventes orgánicos como el ciclohexano, el acetato de etilo, el metanol o el etanol; unos agentes anti-espuma tales como el struktol; unos tensioactivos tales como el sulfato de dodecilo sódico, el poli(vinil alcohol), tween o un poloxamer; unas preparaciones enzimáticas que contienen la carboxilesterasa, la carboxílico éster hidrolasa, o la triacilglicerol-lipasa, unos agentes de blanqueamiento como el peróxido de hidrógeno. Una etapa preliminar al tratamiento alcalino puede estar constituida de uno o dos tratamientos rápidos en medio ácido, con la ayuda de un ácido mineral.

50 Para aislar el producto insoluble en medio alcalino de la biomasa celular que comprende mayoritariamente los polisacáridos no iónicos de tipo quitina-glucano, la primera etapa está seguida de unos lavados repetidos con agua, seguidos por una filtración, un tratamiento destinado a eliminar los compuestos lipídicos con la ayuda de un disolvente orgánico como el etanol, una filtración y un secado. Preferentemente, la filtración se realiza con un filtro-prensa.

55 Para enriquecer en quitina el extracto obtenido, que comprendería inicialmente mayoritariamente unos polisacáridos quitina y beta-glucano en forma de un copolímero, la primera etapa está por ejemplo seguida de unos lavados repetidos con agua, seguida de otras etapas como se ha descrito anteriormente. Se pueden así también obtener un polímero rico en quitina.

60 Una segunda etapa del procedimiento según la presente invención comprende la puesta en contacto de la fracción insoluble en medio alcalino con una disolución ácida, suspendiendo dicha fracción insoluble en medio alcalino y llevando dicha fracción suspendida en contacto con la solución ácida, con el fin de obtener una suspensión de la fracción insoluble en medio alcalino acidificado que comprende los polisacáridos no iónicos.

65 Después de la última etapa de filtración descrita anteriormente, el producto insoluble en medio alcalino puede ser suspendido en agua con el fin de obtener una concentración preferentemente comprendida entre el 1 y el 8% (m/v), y preferentemente comprendida entre el 1 y el 5% de producto insoluble suspendido en agua. Después, el pH de la

suspensión acuosa de producto insoluble en medio alcalino se ajusta por debajo de 7,0 mediante la adición de una solución ácida, preferentemente por debajo de 6,0, y más preferentemente superior a 3,0.

5 La solución ácida es preferentemente una solución acuosa de un ácido, como por ejemplo el ácido clorhídrico, acético, fórmico, láctico, glutámico, aspártico o glicólico, y preferentemente el ácido acético. Esta etapa es preferentemente realizada a una temperatura comprendida entre 5 y 60°C, y preferentemente inferior a 30°C.

10 Una tercera etapa del procedimiento según la presente invención comprende la puesta en contacto de la fracción insoluble en medio alcalino acidificada con por lo menos una preparación enzimática rica en enzimas de actividad beta-glucanasa, enzima beta-glucanasa que permite obtener el extracto de biomasa fúngica que comprende mayoritariamente los polisacáridos no iónicos enriquecidos en quitina. Ventajosamente, el procedimiento está caracterizado porque las preparaciones enzimáticas contienen por lo menos una enzima de actividad beta-glucanasa seleccionada entre el grupo de las actividades endo-beta-(1,3)-glucanasa, la exo-beta-(1,3)-glucanasa, la beta-(1,3)(1,4)-glucanasa, la beta-(1,6)-glucanasa, y una mezcla cualquiera de estas.

15 Ventajosamente, se añade una mezcla de enzimas a la suspensión de la fracción insoluble en medio alcalino acidificado para hidrolizar las cadenas beta-glucano que están asociadas con la quitina. La reacción de hidrólisis se realiza preferentemente a una temperatura comprendida entre 5 y 60°, y más preferentemente inferior a 40°. La duración de la reacción es preferentemente inferior a 5 días. En la solicitud WO 03/068824 se ilustran unas preparaciones preferidas.

20 Ventajosamente, el extracto de biomasa fúngica comprende por lo menos un copolímero de quitina-glucano, eventualmente enriquecido en quitina. La relación quitina/glucano puede ser fácilmente ajustado controlando las condiciones de reacción, en particular por la beta-glucanasa utilizada y por la duración de la reacción.

25 Se puede obtener por ejemplo un copolímero quitina-glucano que comprende una cantidad de quitina (poli(N-acetil-D-glucosamina)), inferior al 60% en masa con respecto a la masa total del copolímero, preferentemente inferior al 50%, y más preferentemente comprendida entre el 20 y el 50%. Este copolímero se obtiene en particular después de la primera etapa de tratamiento por una solución alcalina. En la solicitud WO 03/068824, ejemplos 1 y 2, se proporcionan unos ejemplos para obtener este copolímero.

30 Se puede obtener igualmente, por ejemplo, un copolímero quitina-glucano que comprende una cantidad de glucano (poli(D-glucosa)) inferior al 30% en masa con respecto a la masa total del copolímero, preferentemente inferior al 25%. Este polímero enriquecido en quitina se obtiene después de la tercera etapa de tratamiento por una enzima de actividad beta-glucanasa. En la solicitud WO 03/068824, ejemplos 4 y 5, se proporcionan unos ejemplos para obtener este copolímero.

35 En la única figura, se representa una vista esquemática del procedimiento de extracción de los polisacáridos no iónicos y de los diferentes extractos que pueden ser utilizados.

40 La figura ilustra los principales extractos que se pueden obtener a partir de hongos. Se hace referencia en la presente memoria a los extractos fúngicos utilizados en los ejemplos, sin limitar el alcance de la invención.

45 Así, el extracto F1 puede ser obtenido mediante el tratamiento de hongos por una solución alcalina, preferentemente a una concentración inferior al 10%. El extracto F4 se obtiene mediante el tratamiento de hongos por una primera solución alcalina a una concentración preferentemente inferior al 10%, seguido del tratamiento por una segunda solución alcalina a una concentración preferentemente superior al 10%. El extracto F2 se obtiene mediante el tratamiento de hongos por solución alcalina, el tratamiento por una solución ácida, y el tratamiento por una enzima a actividad beta-glucanasa.

50 Otros objetivos, características y ventajas de la invención se pondrán claramente de manifiesto al experto en la materia a partir de la descripción explicativa que hace referencia a unos ejemplos proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

55 Los ejemplos forman parte de la presente invención y cualquier característica que aparece nueva con respecto a un estado de la técnica anterior cualquiera a partir de la descripción tomada en su conjunto, que incluyen los ejemplos, forma parte de la invención en su función y en su generalidad.

60 Así, cada ejemplo tiene un alcance general.

Por otro lado, en los ejemplos, todos los porcentajes son proporcionados en masa, salvo que se indique lo contrario, y la temperatura se expresa en grado Celsius salvo que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, salvo que indicación contraria.

Ejemplos

Los procedimientos de clarificación y de tratamiento de los líquidos alimenticios por la utilización de extractos procedentes de biomasa fúngicas son realizados en el caso de los mostos de uva y de los vinos tintos, blancos, rosados y dulces naturales, pero son únicamente ilustrativos y no aportan ningún cambio al alcance de la protección solicitada. En particular, los vinos son unas bebidas cuya composición es muy compleja y "frágil". Realizando el tratamiento de los vinos por el extracto fúngico según la presente invención, éste se ilustra la diversidad de los líquidos que se pueden tratar.

En los ejemplos siguientes, se hace referencia a los extractos fúngicos F1, F2 y F4. Estos extractos son obtenidos de la manera siguiente:

Para preparar el extracto fúngico F1, se pone en suspensión una masa de 50 kg (peso seco) de biomasa *Aspergillus niger* húmeda en una solución de ácido clorhídrico a una concentración del 1%, y después se filtra. La materia sólida se pone después en suspensión en una solución de hidróxido de sodio al 0,25%, y después se filtra. La materia sólida se lava 4 veces con agua, y después se seca. Después, se pone en suspensión en el etanol, se filtra y se seca. Se obtienen aproximadamente 20 kg de materia F1.

Para preparar el extracto fúngico F2, se pone en suspensión una masa de 50 kg (peso seco) de biomasa *Aspergillus niger* húmeda en suspensión en una solución de ácido clorhídrico a una concentración del 1%, y después se filtra. La materia sólida se pone después en suspensión en una solución de hidróxido de sodio al 0,25%, y después se filtra. La materia sólida se lava 4 veces con agua, y después se pone en suspensión en agua. Se añade ácido acético glacial hasta un pH de 5,3. Se añade 1 kg de preparación enzimática rica en beta-glucanasa, y la reacción continúa durante 4 días a temperatura ambiente. Se filtra la materia, y después se pone en suspensión en etanol en presencia de hidróxido de potasio, a 60°C durante 1 hora, y después se filtra. La materia se pone después en suspensión en etanol, y después se filtra. La materia constituida del copolímero rico en quitina se seca después. Se obtienen aproximadamente 8 kg de materia F2.

Para preparar el extracto fúngico F4, se pone en suspensión una masa de 50 kg (peso seco) de biomasa *Aspergillus niger* húmeda en una solución de ácido clorhídrico a una concentración del 1%, y después se filtra. La materia sólida se pone después en suspensión en una solución de hidróxido de sodio al 0,25%, y después se filtra. La materia se pone después en presencia de una solución de hidróxido de sodio concentrada al 30% a 100°C durante 2 horas. Después se lava varias veces con agua, y después se pone en suspensión en etanol, se filtra y se seca. Se obtienen aproximadamente 5 kg de materia F4.

Las características moleculares y de pureza de los extractos fúngicos son proporcionados en la tabla 1.

Tabla 1 - Características moleculares y pureza de los extractos fúngicos

	Quitina en % del copolímero quitina-glucano	Beta-glucano en % del copolímero quitina-glucano	Pureza del copolímero quitina- glucano en % másico del extracto fúngico
F1	46	54	97
F4	26	74	98
F2	78	22	97

En los ejemplos siguientes, se hace referencia asimismo a unos productos C1 y F7, que son ambos unos quitosanos, utilizados en forma de polvo sólido.

El C1 es un quitosano de origen crustáceo disponible comercialmente. (Chitoclear LV, Primex, pureza del 99%, grado de acetilación 16 mol%, masa molecular media viscosimétrica 70.000).

El F7 es un quitosano de origen fúngico, obtenido por desacetilación de un extracto fúngico rico en quitina (KitoZyme, pureza del 97%, grado de acetilación 10 mol%, masa molecular media viscosimétrica 10.000).

Ejemplo 1: Estabilización de los mostos de vinos tintos y blancos por un extracto fúngico.

Unos mostos de vinos tintos y blancos se trataron por adición de los extractos fúngicos F1, F2, F7 y C1 durante la fermentación. La fermentación se efectuó con una levadura *S. cerevisiae* *lalvin* BM 45 a 22°C. Durante 6 días, se efectúa la adición de un extracto fúngico a una dosis de 10 o 50 g/hl, salvo para el vino control. La fermentación se detiene 3 días más tarde.

Para este estudio, se han utilizado 110 litros de mosto de uvas rojas de cepa Grenache negra y 110 litros de mosto de uvas blancas de cepa Grenache blanca que provienen de INRA de Pech Rouge à Gruissan (Aude). Estos 110 litros de mosto tinto o blanco se repartieron en 11 cubas de 10 litros cada una. Cada cuba se trató después con levadura utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BM 45 de Lalvin, con rehidratación en agua tibia

incorporando unos nutrientes (tiamina 60 mg/hl; fosfato de amonio 200 mg/l).

La fermentación se lleva hasta la temperatura de 22°C y dura 9 días. Después de 6 días de fermentación se añade, a una dosis de 10 g/hl o 50 g/hl dentro de las cubas, uno de los compuestos siguientes:

- el extracto fúngico F2
- el extracto fúngico F1
- el quitosano F7 o C1
- el extracto fúngico F4

La cuba control no sufre ningún tratamiento. La fermentación se prosigue hasta detención después del agotamiento de los azúcares al final de los tratamientos (3 días). Durante la fermentación, se efectúa diariamente la medición de la temperatura y la medición de la masa volúmica, con el fin de seguir la evolución de dicha fermentación.

La turbiedad, el contenido en proteínas y la concentración en compuestos polifenólicos son dosificados sobre los vinos al final de la fermentación, como se explica a continuación.

La turbiedad se mide por turbidimetría, procedimiento oficial de OIV (resolución Oeno 4/2000 - Turbiedad de los vinos) y expresada en NTU (unidad de turbiedad nefelométrica). La disminución de la turbiedad se mide mediante el procedimiento oficial de OIV, resolución OENO 4/2000. Se trata de la medición de la reducción de la transparencia de un líquido debida a la presencia de materias no disueltas. El aparato utilizado es un turbidímetro 2100N de marca HACH. La unidad de medición del índice de turbiedad, el NTU, corresponde a la medición de la luz difundida por una suspensión de referencia de formazina bajo un ángulo de 90° con respecto a la dirección del haz incidente. La realización de la medición debe hacerse a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

El contenido en proteínas se determina mediante el procedimiento de Bradford, expresado en mg de proteínas/l. La dosificación utilizada para la eliminación de las proteínas se efectúa mediante la determinación del contenido en nitrógeno proteico en los vinos (método de Bradford MM, Anal. Biochem., 1976, 72, 248-254). El procedimiento de Bradford consiste en hacer reaccionar una muestra de mosto con un reactivo, el reactivo de Bradford. El protocolo se desarrolla en 2 etapas: en una primera etapa, se mezclan 10 ml de mosto o de vino con 10 ml de acetona. Se enfría esta mezcla a -20°C durante 30 minutos. Después, esta mezcla se centrifuga a 4000 rpm aproximadamente durante 10 minutos. Después se separa la acetona, y se redisuelve el precipitado con 1 ml de sosa 0,1 M y 4 ml de reactivo de Bradford. Se ajusta esta mezcla con 10 ml con agua destilada. Después de 15 minutos, se lee la absorbencia a 595 nm contra un blanco que contiene 1 ml de sosa 0,1 M, 4 ml de reactivo de Bradford y 5 ml de agua destilada. La concentración obtenida se expresa en mg equivalente de albúmina de suero bovino/l.

El contenido en compuestos polifenólicos totales (CPT) se determina mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu, expresado en mg de equivalente de ácido gálico (mg eq. GAE/l). El análisis de los compuestos polifenólicos totales se efectúa según el procedimiento descrito en "Singleton VL, Drapper DE, The transfer of phenolic compounds from grapes seeds into wine, J. Enol. Vitic. 1964, 15, 131-145". El procedimiento de Folin-Ciocalteu se basa en una reacción colorimétrica cuya respuesta depende de los compuestos fenólicos presentes en los extractos fenólicos analizados. El desarrollo de la coloración depende del número de grupos hidroxilos o de grupos potencialmente oxidables. Los grupos fenólicos deben estar en forma fenolato para conllevar la oxidación de los aniones fosfotúngsticos y fosfomolibdicos presentes en el reactivo. Prácticamente, se introducen 200 µl de vino tinto diluido 5 veces, o 200 µl de vino blanco, en un frasco de 20 ml. Se añaden 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, 12 ml de agua destilada y 4 ml de Na₂CO₃ (al 20%). Se ajusta hasta el indicador de nivel con agua destilada. La absorbencia se determina después de 30 minutos en el espectro-otómetro a 765 nm, siendo el contenido en compuestos fenólicos totales calculado con respecto a una recta de calibración realizada con el ácido gálico.

Variación	Vino tinto			Vino blanco		
	% de turbiedad	% de proteína	% de CPT	% de turbiedad	% de proteína	% de CPT
Control	3670 NTU	184 mg/l	2341 GAE/l	130 NTU	120 mg/l	280 GAE/l
F1 50 g/hl	-93%	-91%	-33%	-96%	-83%	-64%
F1 10 g/hl	-93%	-77%	-41%	-90%	-80%	-55%
F2 50 g/hl	-89%	-75%	-40%	-97%	-83%	-54%
F2 10 g/hl	-90%	-66%	-37%	-96%	-86%	-70%
F7 50 g/hl	-91%	-80%	-27%	-99%	-88%	-33%
F7 10 g/hl	-90%	-72%	-26%	-98%	-92%	-40%
C1 50 g/hl	-92%	-97%	-33%	-99%	-87%	-34%
C1 10 g/hl	-94%	-74%	-46%	-98%	-86%	-46%

*CPT: compuestos fenólicos totales; variación con respecto al control que ha sufrido las mismas etapas

Se aprecia claramente a partir de la tabla 2 que los vinos están estabilizados sin que la totalidad de los polifenoles sean eliminados.

En los ejemplos 2, 3 y 4 siguientes, un vino tinto (ejemplo 2), un vino blanco (ejemplo 3), y un vino rosado (ejemplo 4) se trataron mediante adición de los extractos F4 y C1 a dosis de 10, 50 y 200 g /hl, con un tiempo de contacto de 24 horas, con o sin agitación suave.

5 Para este estudio, se han utilizado:

- un vino tinto tradicional, fechado en 2002, que contiene las cepas grenache, syrah y carrignan. Este vino está envasado en botellas de 750 ml. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 1850 mg /GAE/l.
- 10 - un vino blanco chardonnay, paradoja de blanco, fechado en 1999 del campo de Virginia Castel. Este vino está envasado en botellas de 750 ml. Este vino presenta la característica de estar vinificado como un vino tinto que incluye una fase de maceración y un aumento de temperatura. Así, los contenidos en catequina, dímeros son muy superiores a los de un vino blanco que sufre una vinificación clásica. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 1000 mg GAE/l.
- 15 - un vino rosado tradicional, fechado en 2002. Este vino está envasado en botellas de 750 ml. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 365 GAE/l.

20 Para cada ensayo, por ejemplo sobre un vino tinto, se homogeneiza en una primera etapa el conjunto de las botellas de 750 ml de vino, después se reparten en alícuotas de 100 ml. Se añaden a cada una de estas alícuotas los compuestos F4 o C1, a una dosis de 10 g/hl, 50 g/hl o 200 g/hl, con un tiempo de contacto de 24 horas, con o sin agitación suave, a temperatura ambiente.

Dosificación utilizada para la dosificación de taninos en los ejemplos 2a, 2b, 3a y 3b

25 Para la determinación, se efectúa sobre columna el fraccionamiento de la materia fenólica, mediante estimación cualitativa del material colorante (según Bourzeix et al., 1979). Esta estimación se efectúa por fraccionamiento sobre columna. Se separan 3 fracciones. Estas diferentes fracciones evolucionan durante el envejecimiento del vino:

- 30 1. Los monómeros antocianos libres gracias a una mezcla de 999 vol. de metanol y 1 vol. de HCl 12N. Estos monómeros son recogidos en 20 ml de eluido y después se mide la densidad óptica a 538 nm con el fin de evaluar el porcentaje de esta fracción.
- 35 2. Los polímeros rojos, es decir las formas poco condensadas gracias a una mezcla de ácido fórmico y de agua (1/1 en vol.). Estos polímeros rojos son recogidos en 20 ml de eluido y después se mide la densidad óptica a 525 nm con el fin de evaluar el porcentaje de esta fracción.
- 40 3. Los polímeros amarillos y marrones, es decir las formas condensadas gracias al ácido fórmico puro. Estos polímeros amarillos y marrones son recogidos en 20 ml de eluido y después se mide la densidad óptica a 525 nm con el fin de evaluar el porcentaje de esta fracción.

Dosificación utilizada para la dosificación de taninos en los ejemplos 2c y 2d

45 Análisis de los taninos del vino (Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D, 1998 Traité d'oenologie 2. chimie du vin stabilisation et traitement, Dunod, Paris p203)

50 Este procedimiento se denomina asimismo dosificación de taninos, procedimiento LA o también procedimiento de dosificación de los taninos proantocianicos. Se basa en la reacción de Bate-Smith. El calentamiento en medio ácido de las procianidinas conduce a la ruptura de ciertas uniones y a la formación de carbocationes, que se transforman parcialmente en cianidina si el medio es suficientemente oxidante. Para ello, el modo de realización comprende la preparación de dos muestras que contienen cada una 4 ml de vino diluido al 1/50, 2 ml de agua y 6 ml de HCl puro (12N); unos de los tubos se calienta en baño maría a 100°C durante 30 minutos y se le añade 1 ml de etanol al 95% para solubilizar el color rojo aparecido (D2); el otro no se calienta, pero recibe 1 ml de etanol al 95% (D1). Se mide la diferencia

55 $\Delta d = D2 - D1$ de la densidad óptica a 550 nm bajo 10 mm de recorrido óptico; por comparación con una solución de oligómeros procianídicos de referencia se obtiene la concentración:

$$LA \text{ (g/l)} = 19,33 \times \Delta d$$

60 Dosificación utilizada para el análisis de la intensidad colorante, el color, el brillo y la composición del color del vino en los ejemplos 2a, 2b, 2c, 2d, 3a y 3b.

65 El análisis de la materia colorante del vino se realiza según "Etude de la couleur du vin" (Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D, 1998 Traité d'oenologie 2. chimie du vin stabilisation et traitement, Dunod, Paris p206-207). Este estudio se define mediante 4 parámetros:

ES 2 455 520 T3

- la intensidad colorante representa la importancia del color.

$$IC = DO\ 420 + DO\ 520 + DO\ 620$$

- el matiz corresponde al nivel de evolución del color hacia el naranja. Este aumenta durante el envejecimiento del vino.

$$T = DO420 / DO520$$

- La composición del color corresponde a la contribución en forma de % de cada uno de los tres componentes del color global.

$$DO\ 420\ (\%) = (DO\ 420 / IC) \times 100$$

$$DO\ 520\ (\%) = (DO\ 420 / IC) \times 100$$

$$DO\ 620\ (\%) = (DO\ 420 / IC) \times 100$$

- El brillo está relacionado con la forma del espectro. Cuando más dominante sea el color rojo del vino y brillante, más elevado es este parámetro.

$$dA(\%) = (1 - (DO\ 420 + DO\ 620 / 2 \times DO\ 520)) \times 100$$

Ejemplo 2 - Tratamiento de vinos finales mediante un extracto de biomasa fúngica, o un extracto de biomasa de crustáceos: vinos tintos

Este ejemplo sirve particularmente para la ilustración de los efectos siguientes:

- * Mejora de la claridad
- * Mejora de la composición del color del vino
- * Variación del pH del vino
- * Eliminación de una parte de los polifenoles
- * Conservación de la materia fenólica del vino

Ejemplo 2a - Características de los vinos rojos después del tratamiento, sin agitación con un tiempo de contacto de 24 horas

Tabla 3 - Variaciones de pH y del contenido en compuestos fenólicos totales en los vinos tintos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

		Variación *	CPT	Variación
		(%)	(mg eq. GAE/l)	(%)
Control	3,75		1850	
F4 10 g/hl	3,73	-0,5%	1799	-2,74%
F4 50 g/hl	3,73	-0,5%	1784	-3,56%
F4 200 g/hl	3,77	+0,5%	1697	-8,22%
C1 10 g/hl	3,74	-0,3%	1834	-0,82%
C1 50 g/hl	3,77	+0,5%	1672	-9,59%
C1 200 g/hl	3,81	+1,6%	1672	-9,59%

* con respecto al control

Se aprecia claramente a partir de la tabla 3 que el pH del vino varía de manera despreciable, y que la totalidad de los polifenoles se conserva con una variación despreciable.

Tabla 4 - Fraccionamiento de la materia fenólica de los vinos tintos control y tratados: después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas

	Monómeros	Variación	Polímeros rojos	Variación	Polímeros marrones	Variación
	%	%	%	%	%	%
Control	37,53		39,50		22,96	
F4 50 g/hl	37,00	-1,4%	42,10	+6,2%	20,90	-9,9%
F4 200 g/hl	36,44	-3,0%	42,85	+8,0%	20,70	-10,8%

ES 2 455 520 T3

	Monómeros	Variación	Polímeros rojos	Variación	Polímeros marrones	Variación
C1 50 g/hl	36,68	-2,3%	40,20	+1,7%	23,11	+0,7%
C1 200 g/hl	36,92	-1,7%	41,02	+3,6%	22,05	-4,4%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 4 que se obtiene una reorganización en beneficio de los polímeros rojos.

5 Tabla 5 - Intensidad colorante, matiz y brillo de los vinos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad colorante	Variación %	Matiz	Variación %	Brillo	Variación %
Control	1,06		1,05		27,42	
F4 10 g/hl	0,93	-12,6%	0,96	-8,6%	31,04	+13,2%
F4 50 g/hl	0,99	-6,9%	0,97	-7,6%	29,56	+7,8%
F4 200 g/hl	0,89	-16,4%	0,94	-10,5%	30,96	+12,9%
C1 10 g/hl	0,95	-10,7%	0,99	-5,7%	30,32	+10,6%
C1 50 g/hl	0,88	-17,3%	0,96	-8,6%	32,66	+19,1%
C1 200 g/hl	0,87	-18,2%	0,95	-9,5%	31,19	+13,8%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 5 que la intensidad colorante y el matiz disminuyen, mientras que el brillo se mejora.

10 Tabla 6 - Composición del color de los vinos tintos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	DO 420 nm	Variación %	DO 520 nm	Variación %	DO 620nm	Variación %
Control	42,60		40,80		16,50	
F4 10 g/hl	40,64	-4,6%	42,03	+3,0%	17,32	+5,0%
F4 50 g/hl	40,50	-4,9%	41,51	+1,7%	17,97	+8,9%
F4 200 g/hl	39,63	-7,0%	42,00	+2,9%	18,35	+11,2%
C1 10 g/hl	41,67	-2,2%	41,78	+2,4%	16,54	+0,2%
C1 50 g/hl	40,90	-4,0%	42,61	+4,4%	16,47	-0,2%
C1 200 g/hl	40,00	-6,1%	42,06	+3,1%	17,93	+8,7%

15 Se aprecia claramente a partir de la tabla 6 que aparece una ligera reorganización del color: la densidad óptica a 420 nm (amarillo-verde) disminuye mientras que la densidad óptica a 520 nm (púrpura) y la densidad óptica a 620 nm (azul-verdoso) aumentan.

20 **Ejemplo 2b - Características de los vinos tintos después del tratamiento con agitación suave, con un tiempo de contacto de 24 horas.**

		Variación* (%)	CPT (mg eq. GAE/l)	Variación* (%)
Control	3,77		1850	
F4 10 g/hl	3,71	-1,6%	1807	-2,3%
F4 50 g/hl	3,73	-1,1%	1850	0%
F4 200 g/hl	3,75	-0,5%	1744	-5,7%
C1 10 g/hl	3,76	-0,3%	1522	-12,3%
C1 50 g/hl	3,78	+0,3%	1585	-14,3%
C1 200 g/hl	3,87	+2,7%	1585	-14,3%

*con respecto al control

Se aprecia claramente a partir de la tabla 7 que el pH del vino varía de manera despreciable, los polifenoles se conservan con una variación despreciable.

25 Tabla 8 - Fraccionamiento de la materia fenólica de los vinos tintos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Monómeros %	Variación %	Polímeros rojos %	Variación %	Polímeros marrones %	Variación %
Control	39,6		38,7		21,6	
F4 50 g/hl	31,7	-19,9%	44,5	+15,0%	23,7	+9,7%
F4 200 g/hl	32,3	-18,5%	44,8	+16,0%	22,9	+5,7%

ES 2 455 520 T3

	Monómeros	Variación	Polímeros rojos	Variación	Polímeros marrones	Variación
	%	%	%	%	%	%
C1 50 g/hl	37,5	-5,3%	47,1	+21,6%	15,4	-29,0%
C1 200 g/hl	41,2	+3,9%	44,0	+13,8%	14,8	-31,7%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 8 que se obtiene una reorganización en beneficio de los polímeros rojos.

5 Tabla 9 - Intensidad colorante, matiz y brillo de los vinos tintos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad colorante	Variación %	Matiz	Variación %	Brillo	Variación %
Control	1,0		1,0		30,4	
F4 10 g/hl	0,7	-26%	0,9	-3,0%	39,0	+28%
F4 50 g/hl	0,8	-23%	0,9	-4,1%	26,8	-12%
F4 200 g/hl	0,7	-34%	1,0	+7,2%	35,6	+17%
C1 10 g/hl	0,9	-15%	1,0	+1,0%	32,9	+8%
C1 50 g/hl	0,8	-25%	0,9	-4,1%	35,1	+15%
C1 200 g/hl	0,8	-18%	1,1	+10,3%	29,2	-4%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 9 que la intensidad colorante disminuye, y que el matiz es estable, mientras que el brillo se mejora.

10 Tabla 10 - Composición del color de los vinos tintos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas: densidad óptica en las longitudes de onda de absorción 420, 520 y 620 nm

	DO 420 nm	Variación %	DO 520 nm	Variación %	DO 620nm	Variación %
Control	40,7		41,8		17,9	
F4 10 g/hl	42,3	+3,9%	45,0	+7,6%	12,7	-29,2%
F4 50 g/hl	38,1	-6,4%	40,6	-3,0%	21,3	+19,3%
F4 200 g/hl	45,5	+11,8%	43,7	+4,5%	10,7	-39,9%
C1 10 g/hl	41,9	+3,0%	42,7	+2,0%	15,4	-13,9%
C1 50 g/hl	40,6	-0,3%	43,5	+4,0%	15,9	-11,0%
C1 200 g/hl	44,3	+8,8%	41,4	-1,0%	14,3	-20,0%

15 Se aprecia claramente a partir de la tabla 10 que aparece una muy ligera reorganización del color: la densidad óptica a 420 nm (amarillo-verdoso) aumenta, la densidad óptica a 520 nm (púrpura) aumenta, y la densidad óptica a 620 nm (azul-verdoso) disminuye.

20 **Ejemplo 3- Tratamiento de los vinos finales mediante un extracto de biomasa fúngica, o un extracto de biomasa de crustáceos: vinos blancos**

Ejemplo 3a - Tratamiento del vino blanco sin agitación, con un tiempo de contacto de 24 horas

25 Tabla 11 - Variaciones de pH y del contenido en compuestos fenólicos totales en los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	pH	Variación (%)	CPT (mg eq. GAE/l)	Variación (%)
Control	3,65		1000	
F4 10 g/hl	3,77	+3,3%	1000	0%
F4 50 g/hl	3,77	+3,3%	975	-2,5%
F4 200 g/hl	3,79	+3,8%	975	-2,5%
C1 10 g/hl	3,79	+3,8%	1000	0%
C1 50 g/hl	3,84	+5,2%	1000	0%
C1 200 g/hl	3,97	+8,8%	910	-9,0%

30 Se aprecia claramente a partir de la tabla 11 que el pH del vino varía de manera despreciable, y que los polifenoles se conservan con una variación despreciable.

ES 2 455 520 T3

Tabla 12 - Intensidad colorante, matiz y contenido en taninos de los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad colorante	Variación %	Matiz	Variación %	Taninos (g/l)	Variación %
Control	0,58		3,3		1,23	
F4 10 g/hl	0,46	-20,7%	4,1	+25,5%	1,17	-8,6%
F4 50 g/hl	0,44	-24,1%	3,9	+20,6%	1,17	-5,6%
F4 200 g/hl	0,43	-25,9%	3,9	+20,3%	1,19	-7,0%
C1 10 g/hl	0,45	-22,4%	3,9	+21,2%	1,08	-15,6%
C1 50 g/hl	0,40	-31,0%	4,3	+31,6%	1,12	-12,5%
C1 200 g/hl	0,49	-15,5%	3,2	-0,6%	1,14	-10,9%

5 Se aprecia claramente a partir de la tabla 12 que la intensidad colorante disminuye, el color aumenta, mientras que la totalidad de los taninos se conserva con una variación despreciable.

Tabla 13 - Composición del color de los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas: densidad óptica a las longitudes de onda de absorción 420, 520 y 620 nm

	DO 420 nm	Variación %	DO 520 nm	Variación %	DO 620nm	Variación %
Control	70,7		21,7		7,6	
F4 10 g/hl	76,5	+8,2%	18,7	-13,9%	4,8	-37,1%
F4 50 g/hl	76,5	+8,2%	19,5	-10,3%	4,0	-47,1%
F4 200 g/hl	76,0	+7,5%	19,3	-10,8%	4,6	-39,5%
C1 10 g/hl	76,4	+8,1%	19,3	-10,9%	4,2	-44,5%
C1 50 g/hl	78,1	+10,5%	18,2	-16,2%	3,7	-51,6%
C1 200 g/hl	70,9	+0,2%	21,9	+0,7%	7,3	-4,2%

15 Se aprecia claramente a partir de la tabla 13 que aparece una muy ligera reorganización del color: La densidad óptica a 420 nm (amarillo-verdoso) aumenta, la densidad óptica a 520 nm (púrpura) y a 620 nm (azul-verdoso) disminuyen.

Ejemplo 3b - Tratamiento del vino blanco con agitación suave, con un tiempo de contacto de 24 horas

Tabla 14 - Variaciones de pH y del contenido en compuestos fenólicos totales en los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

		Variación (%)	CPT (mg eq. GAE/l)	Variación (%)
Control	3,73		1000	
F4 10 g/hl	3,76	+0,8%	909	-9,1%
F4 50 g/hl	3,77	+1,0%	909	-9,1%
F4 200 g/hl	3,81	+2,1%	873	-12,7%
C1 10 g/hl	3,77	+1,1%	873	-12,7%
C1 50 g/hl	3,80	+1,9%	862	-13,8%
C1 200 g/hl	3,98	+6,7%	850	-15,0%

25 Se aprecia claramente a partir de la tabla 14 que el pH del vino varía de manera despreciable, y que la totalidad de los polifenoles se conserva con una variación despreciable.

Tabla 15 - Intensidad colorante, matiz y contenido en taninos de los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad colorante	Variación %	Matiz	Variación %	Taninos (g/l)	Variación %
Control	0,54		3,4		1,28	
F4 10 g/hl	0,56	+3,7%	3,3	-3,5%	0,94	-26,6%
F4 50 g/hl	0,53	-1,9%	3,2	-5,0%	0,90	-29,7%
F4 200 g/hl	0,49	-9,3%	3,3	-2,9%	0,96	-25,0%
C1 10 g/hl	0,52	-3,7%	3,2	-5,9%	1,00	-21,9%
C1 50 g/hl	0,51	-5,6%	3,2	-6,8%	0,81	-36,7%
C1 200 g/hl	1,09	+102%	2,2	-35,3%	0,77	-39,8%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 15 que la intensidad colorante disminuye, que el matiz disminuye, mientras que la totalidad de los taninos disminuye ligeramente.

- 5 Tabla 16 - Composición del color de los vinos blancos control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas: densidad óptica a las longitudes de absorción 420, 520 y 620 nm

	DO	Variación	DO	Variación	DO	Variación
	420 nm	%	520 nm	%	620nm	%
Control	71,8		21,1		7,1	
F4 10 g/hl	70,4	-1,9%	21,4	+1,4%	8,1	+14,7%
F4 50 g/hl	70,4	-1,9%	21,7	+2,9%	7,8	+9,9%
F4 200 g/hl	71,8	+0,1%	21,7	+2,9%	6,4	-9,4%
C1 10 g/hl	72,0	+0,3%	22,5	+6,4%	5,5	-22,3%
C1 50 g/hl	69,8	-2,8%	22,0	+4,0%	8,2	+15,9%
C1 200 g/hl	59,2	-17,5%	26,9	+27,2%	13,9	+96,2%

- 10 Se aprecia claramente a partir de la tabla 16 que aparece una muy ligera reorganización del color: la densidad óptica a 420 nm (amarillo-verdoso) disminuye, y la densidad óptica a 520 nm (púrpura) y 620 nm (azul-verdoso) aumentan.

Ejemplo 4 - Tratamiento de los vinos finales mediante un extracto de biomasa fúngica, o un extracto de biomasa de crustáceos: vino rosado

- 15 **Ejemplo 4a - Tratamiento del vino rosado sin agitación, con un tiempo de contacto de 24 horas**

Tabla 17 - Variaciones de pH y del contenido en compuestos fenólicos totales en los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

		Variación	CPT	Variación
		(%)	(mg eq. GAE/l)	(%)
Control	3,55		365	
F4 10 g/hl	3,55	+0,0%	347	-4,9%
F4 50 g/hl	3,56	+0,3%	365	+0,0%
F4 200 g/hl	3,60	+1,4%	350	-4,1%
C1 10 g/hl	3,55	+0,0%	342	-6,3%
C1 50 g/hl	3,56	+0,3%	350	-4,1%
C1 200 g/hl	3,60	+1,4%	325	-11,0%

- 20 Se aprecia claramente a partir de la tabla 17 que el pH del vino varía de manera despreciable, la totalidad de los polifenoles se conserva con una variación despreciable.

- 25 Tabla 18 - Fraccionamiento de la materia fenólica de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Monómeros	Variación	Polímeros rojos	Variación	Polímeros marrones	Variación
	%	%	%	%	%	%
Control	52,5		43,6		4,0	
F4 50 g/hl	58,7	+11,8%	36,4	-16,5%	5,0	+25,3%
F4 200 g/hl	27,3	+9,1%	38,5	-11,7%	4,3	+7,8%
C1 50 g/hl	44,4	-15,4%	40,2	-7,8%	15,4	+288%
C1 200 g/hl	45,7	-12,8%	41,1	-5,7%	13,2	+232%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 18 que se obtiene una reorganización en beneficio de los monómeros y de los polímeros marrones.

- 30 Tabla 19 - Intensidad colorante, matiz y brillo de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad colorante	Variación	Matiz	Variación	Brillo	Variación
		%		%		%
Control	0,13		1,0		40,8	
F4 10 g/hl	0,14	+7,7%	1,0	+1,0%	39,4	-3,6%
F4 50 g/hl	0,15	+15,4%	1,1	+3,9%	35,8	-12,3%

	Intensidad	Variación	Matiz	Variación	Brillo	Variación
	colorante	%		%		%
F4 200 g/hl	0,12	-7,7%	1,0	+1,0%	40,5	-0,7%
C1 10 g/hl	0,13	+0,0%	1,1	+1,9%	40,1	-1,7%
C1 50 g/hl	0,12	-7,7%	1,0	+1,0%	41,2	+1,0%
C1 200 g/hl	0,37	+185%	1,3	+26,2%	13,1	-67,9%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 19 que la intensidad colorante disminuye, que el matiz es estable, así como el brillo.

- 5 Tabla 20 - Composición del color de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 sin agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	DO	Variación	DO	Variación	DO	Variación
	420 nm	%	520 nm	%	620 nm	%
Control	52,5		43,5		3,9	
F4 10 g/hl	47,1	-10,3%	45,1	+3,7%	7,7	+97%
F4 50 g/hl	46,7	-11,1%	43,7	+0,5%	9,5	+144%
F4 200 g/hl	47,7	-9,2%	45,6	+4,8%	6,7	+70,5%
C1 10 g/hl	47,9	-8,8%	45,5	+4,6%	6,5	+67%
C1 50 g/hl	48,1	-8,4%	45,9	+5,5%	6,0	+54%
C1 200 g/hl	47,7	-9,1%	36,5	-16,1%	15,7	+303%

- 10 Se aprecia claramente a partir de la tabla 20 que aparece una muy ligera reorganización del color: la densidad óptica a 420 nm (amarillo-verdoso) disminuye, y la densidad óptica a 520 nm (púrpura) y a 620 nm (azul-verdoso) aumentan.

Ejemplo 4b - Tratamiento del vino rosado con agitación suave, con un tiempo de contacto de 24 horas

- 15 Tabla 21 - Variaciones de pH y del contenido en compuestos fenólicos totales en los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

		Variación	CPT	Variación
		(%)	(mg eq. GAE/l)	(%)
Control	3,54		365	
F4 10 g/hl	3,51	-0,9%	255	-30,0%
F4 50 g/hl	3,50	-1,1%	269	-26,3%
F4 200 g/hl	3,56	+0,6%	237	-34,9%
C1 10 g/hl	3,55	+0,3%	309	-15,2%
C1 50 g/hl	3,59	+1,4%	324	-11,1%
C1 200 g/hl	3,71	+4,8%	279	-23,3%

- 20 Se aprecia claramente a partir de la tabla 21 que el pH del vino varía de manera despreciable, la totalidad de los polifenoles se conserva con una variación despreciable.

Tabla 22 - Fraccionamiento de la materia fenólica de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Monómeros	Variación	Polímeros rojos	Variación
	%	%	%	%
Control	61,1		38,9	
F4 50 g/hl	57,1	-6,4%	42,9	+10,1%
F4 200 g/hl	57,5	-5,9%	42,1	8,0%
C1 50 g/hl	63,6	+4,1%	36,4	-6,4%
C1 200 g/hl	65,9	+7,9%	34,1	-12,4%

- 25 Se aprecia claramente a partir de la tabla 22 que se obtiene una reorganización en beneficio de los polímeros rojos.

Tabla 23 - Intensidad colorante, matiz y brillo de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	Intensidad	Variación	Matiz	Variación	Brillo	Variación
	colorante	%		%		%
Control	0,12		0,99		99,9	

30

	Intensidad	Variación	Matiz	Variación	Brillo	Variación
	colorante	%		%		%
F4 10 g/hl	0,14	+16,7%	1,02	+3,0%	99,9	-0,0
F4 50 g/hl	0,14	+16,7%	1,01	+2,0%	99,9	-0,0
F4 200 g/hl	0,12	+0,0%	1,00	+1,0%	99,9	-0,0
C1 10 g/hl	0,13	+8,3%	1,03	+4,0%	99,9	-0,0
C1 50 g/hl	0,11	-8,3%	1,01	+2,0%	99,9	+0,0
C1 200 g/hl	0,16	+33,3%	1,10	+11,1%	99,9	-0,0

Se aprecia claramente a partir de la tabla 23 que la intensidad colorante aumenta, que el matiz es estable, así como el brillo.

- 5 Tabla 24 - Composición del color de los vinos rosados control y tratados, después de la adición de los productos F4 y C1 con agitación, tiempo de contacto de 24 horas.

	DO	Variación	DO	Variación	DO	Variación
	420 nm	%	520 nm	%	620nm	%
Control	46,6		47,2		+6,2	
F4 10 g/hl	46,0	-1,2%	44,7	-5,3%	+9,3	+49,5%
F4 50 g/hl	45,9	-1,3%	45,2	-4,2%	+8,8	+42,2%
F4 200 g/hl	46,7	+0,3%	46,3	-2,0%	+7,0	+12,6%
C1 10 g/hl	46,9	+0,7%	45,4	-3,8%	+7,7	+23,4%
C1 50 g/hl	46,6	+0,2%	46,1	-2,3%	+7,2	+16,6%
C1 200 g/hl	46,8	+0,5%	42,2	-10,6%	+11,0	+76,8%

- 10 Se aprecia claramente a partir de la tabla 24 que aparece una muy ligera reorganización del color: la densidad óptica a 420 nm (amarillo-verdoso) es estable, la densidad óptica a 520 nm (púrpura) disminuye, y la densidad óptica a 620 nm (azul-verdoso) aumenta.

En los ejemplos 5 y 6, el contenido en metales pesados y metales principales se ha efectuado por espectrometría de absorción atómica

- 15 Para estos estudios, se ha utilizado:

- 20 - un vino de país tinto, de cepa merlot, fechado en 2003, del campo La Lande Pennautier (Aude). La uva sufrió una maceración pero no se filtró ni se aclaró. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 2075 mg GAE/l. Este vino está envasado en botellas de 750 ml.
- 25 - un vino de país blanco de cepa chardonnay, fechado en 2003, del campo La lande Pennautier (Aude). La uva sufrió un prensado directo y después una vinificación de baja temperatura a 20°C. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 273,3 mg GAE/l. Este vino está envasado en botellas de 750 ml.
- 30 - un vino dulce natural de cepa garnacha y macabeu, fechada en 2003, de la cava cooperativa de Baixas (Pirineos orientales). La uva sufrió un prensado directo, una clarificación con la ayuda de bentonita granulada y después una mutación con alcohol puro al 96% en volumen sobre mosto y finalmente una clarificación desprotenizante y una centrifugación. Su contenido en compuestos fenólicos totales es de 370,8 mg GAE/l. Este vino está envasado en botellas de 750 ml.

El procedimiento de dosificación utilizado para el análisis de la eliminación de los metales pesados (plomo, cadmio) y principales (hierro) en los ejemplos 5 y 6 es:

- 35 - determinación del contenido en minerales de los diferentes ensayos (según el procedimiento oficial de OIV: Recueil des méthodes internationales d'analyses du vin y des moûts p217-224, p227-228, p231-234). El contenido en cobre y en hierro se determinó por espectrometría de absorción atómica (SAA) de llama. El contenido en cadmio y en plomo se determinó por espectrometría de absorción atómica (SAA) de horno.

40 **Ejemplo 5 - Eliminación de los metales pesados (plomo, cadmio) en los vinos tinto, blanco y dulce natural.**

Se contaminaron artificialmente los vinos tinto, blanco y dulce natural con unos metales pesados (plomo a 500 µg/l y cadmio a 20 µg/l simultáneamente). Los extractos F1, F2, F7 o C1 se ponen en contacto con los vinos a las dosis de 10, 50 o 200 g/hl. Los contenidos en metales en los vinos control y en los vinos tratados son determinados por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito.

Como recordatorio, las recomendaciones de OIV en cuanto a los contenidos máximos en metales pesados en los vinos son de 200 µg/l para el plomo, 10 µg/l para el cadmio.

Tabla 25 - Eliminación de los metales pesados (plomo y cadmio) en los vinos tinto, blanco y dulce

		Plomo (µg/l)			Cadmio (µg/l)		
		Rojo	Blanco	Dulce	Rojo	Blanco	Dulce
Contenido inicial (µg/l)		150	111	110	19	18	10
F1	200 g/hl	33%	58%	38%	54%	17%	25%
F1	50 g/hl	31%	29%	26%	56%	12%	12%
F1	10 g/hl	21%	10%	32%	57%	18%	13%
F2	200 g/hl	51%	50%	-	21%	17%	17%
F2	50 g/hl	41%	44%	15%	27%	23%	17%
F2	10 g/hl	41%	27%	42%	14%	19%	21%
F7	200 g/hl	74%	65%	84%	25%	8%	17%
F7	50 g/hl	66%	52%	54%	29%	5%	23%
F7	10 g/hl	37%	43%	47%	26%	11%	6%
C1	200 g/hl	40%	73%	88%	32%	38%	17%
C1	50 g/hl	32%	78%	78%	21%	38%	43%
C1	10 g/hl	17%	50%	0%	11%	38%	19%

5 Se aprecia claramente a partir de la tabla 25 que el plomo y el cadmio son eliminados hasta el 50% para el plomo y el 57% para el cadmio.

Ejemplo 6 - Utilización de los extractos fúngicos según la presente invención para evitar las rupturas debidas a la presencia de hierro en los vinos rojos, blancos y dulces

10 Los vinos tinto, blanco y dulce natural se contaminaron artificialmente con hierro a 20 mg/l. Los extractos F1, F2, F7 o C1 se ponen en contacto con los vinos a las dosis de 10, 50, o 200 g/hl. El contenido en hierro en los vinos control y en los vinos tratados es determinado por espectrometría de absorción atómica de llama.

15 Tabla 26 - Eliminación del hierro en los vinos tintos, blancos y dulces

		Vino tinto	Vino blanco	Vino dulce
Contenido inicial en hierro (mg/l)		23	6	5
F1	200 g/hl	73%	32%	77%
F1	50 g/hl	72%	22%	42%
F1	10 g/hl	70%	20%	23%
F2	200 g/hl	80%	34%	51%
F2	50 g/hl	72%	16%	24%
F2	10 g/hl	71%	24%	10%
F7	200 g/hl	90%	91%	98%
F7	50 g/hl	86%	54%	90%
F7	10 g/hl	75%	20%	59%
C1	200 g/hl	91%	80%	94%
C1	50 g/hl	77%	60%	88%
C1	10 g/hl	73%	25%	59%

Se aprecia claramente a partir de la tabla 26 que el hierro está eliminado hasta el 80%.

20 Ejemplo 7 - Eliminación de las micotoxinas en los vinos tintos, blancos y dulces naturales

Para este estudio, se utilizaron unos vinos tinto, blanco y dulce idénticos a los de los ejemplos 5 y 6. Estos vinos tinto, blanco y dulce natural se contaminaron artificialmente con ocratoxina A (OTA) a una dosis de 5 µg/l. Los extractos F1, F2, F7 o C1 son puestos en contacto con los vinos a las dosis de 500 g/hl. Como recordatorio, la OIV recomienda no superar un contenido en ocratoxina A de 2 µg/l en los vinos. No se ha reconocido hasta ahora ningún tratamiento específico.

30 Los contenidos en ocratoxina A en los vinos control y en los vinos tratados, se determinan mediante el procedimiento oficial de la OIV (resolución Oeno 16/2001). La determinación se efectúa calculando el contenido en OTA mediante la determinación de la ocratoxina A en el vino después del paso sobre una columna de inunoafinidad y HPLC con detección fluorimétrica, según "Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography." A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. Journal of Chromatography A, 864 (1999) 89-101.

Tabla 27 - Eliminación de las micotoxinas en los vinos tintos, blancos y dulces naturales, con diferentes pH

	Vino tinto			Vino blanco			Vino dulce natural		
	pH	OTA (µg/l)	%		OTA (µg/l)	%	pH	OTA (µg/l)	%
Control		3,0			4,5			4,6	
F1	3,11	1,4	53%	3,08	2,0	56%	3,14	2,5	46%
	4,09	1,3	57%	3,78	1,6	65%	4,04	2,6	43%
	4,39	1,5	50%	4,25	2,5	45%	4,39	2,5	46%
F2	3,08	0,8	73%	3,07	1,4	69%	3,09	2,3	50%
	4,10	1,0	67%	3,79	2,1	53%	4,03	3,0	35%
	4,39	1,1	63%	4,34	2,2	51%	4,35	2,3	50%
F7	3,51	1,0	66%	3,54	2,6	42%	3,61	3,8	17%
	4,52	0,5	83%	4,22	2,1	53%	4,61	3,4	26%
	4,82	0,6	80%	4,72	1,9	58%	4,92	3,5	24%
C1	3,55	0,9	70%	3,45	3,8	16%	3,70	4,2	9%
	4,55	1,1	63%	4,20	3,3	27%	4,61	2,7	41%
	4,70	0,9	70%	4,58	4,0	11%	4,90	4,3	7%

5 Se aprecia claramente a partir de la tabla 27 que la ocratoxina A está eliminada hasta el 73%. La cantidad de micotoxinas está entonces por debajo de las recomendaciones para los vinos tintos y blancos.

Ejemplo 8 - Clarificación de los mostos de vino tinto por F1 a la dosis de 50 g/hl, con respecto a un control que ha sufrido una decantación natural (cuba de 10 l)

10 Un mosto de la cava A (cuba de 10 l) y un mosto de la cava B (cuba de 10 l) se han tratado mediante adición del extracto fúngico F1. Este extracto se añade al final de la fermentación alcohólica a la dosis de 50 g/hl. El mosto control se clarifica por decantación natural.

15 Se efectúan los análisis clásicos de azúcar, TAV, la acidez total (Ac. T), la acidez volátil (Ac. V), SO₂ total (SO₂T), SO₂ volátil (SO₂L) así como el pH y la turbiedad.

Resultados:

20 Tabla 28 - Variación de la turbiedad de los mostos y de los vinos tintos procedentes del mosto de la cava A (cuba de 10 l)

	Turbiedad (NTU)	Variación (%)
Mosto de partida control	1655	
Vino control	1655	0,0%
Vino tratado - F1 50 g/hl	25	98,5%

25 Tabla 29 - Características analíticas de los mostos y de los vinos tintos procedentes del mosto de la cava A (cuba de 10 l)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Mosto de partida	198,0	0,05	2,82	0,05	18	3	3,43
Vino control	3,1	13,23	4,44	0,27	30	2	3,24
Vino tratado - F1 50 g/hl	3,6	13,24	4,50	0,24	28	2	3,25

30 Tabla 30 - Variación de la turbiedad de los mostos y de los vinos tintos procedentes del mosto de la cava B (cuba de 10 l)

	Turbiedad (NTU)	Variación (%)
Mosto de partida control	3048	
Vino control	2332	23,4%
Vino tratado - F1 50 g/hl	749	75,4%

30 Tabla 31 - Características analíticas de los mostos y de los vinos tintos procedentes del mosto de la cava B (cuba de 10 l)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Mosto de partida control	195,0	0,05	2,82	0,05	18	3	3,43

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Vino control	4,0	12,86	3,99	0,34	47	2	3,39
Vino tratado - F1 50 g/hl	3,9	12,89	4,09	0,37	51	2	3,43

El tratamiento por la quitina-glucano F1 contribuye a la mejora de la clarificación de los vinos tintos, sin alteración del contenido en compuestos fenólicos totales y taninos, con respecto al vino control que ha sufrido una decantación natural.

5 **Ejemplo 9 - Clarificación de los mostos de vino dulce natural en mal estado sanitario por F1 a la dosis de 50 g/hl, con respecto a un control que ha sufrido un clarificado tradicional (gelatina/bentonita)**

10 Un mosto de vino dulce natural en mal estado sanitario del viñedo D (cuba de 3 hl) se trató mediante adición del extracto fúngico F1 antes de la depuración (antes de la fermentación alcohólica), a la dosis de 50 g/hl. El vino control sufrió una clarificación con los productos tradicionales, gelatina y bentonita.

Resultados:

15 Tabla 32 - Variación de la turbiedad (cuba de 3 hl, mal estado sanitario)

	Turbiedad (NTU)	Variación (%)
Mosto de partida control	333,5	
Vino control	1,76	-99,5%
Vino tratado - F1 50 g/hl	1,66	-99,5 %

20 Tabla 33 - Características analíticas de los mostos y de los vinos dulces naturales procedentes del mosto del viñedo D (cuba de 3 hl, mal estado sanitario)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Mosto de partida control	267,6	0,01	1,34	0,0	13	3	3,47
Vino control	106,0	14,86	2,76	0,43	1151	400	3,75
Vino tratado - F1 50 g/hl	94,0	16,86	2,98	0,53	140	50	3,74

25 Tabla 34 - Compuestos fenólicos totales (CPT), taninos e intensidad colorante de los mostos y de los vinos dulces naturales del viñedo D (cuba de 3 hl, mal estado sanitario)

	CPT (mg eq. ác. gálico /l)	Taninos (g/l)	DO 280
Mosto de partida control	1017,2	0,28	0,1
Vino control	665,3	0,20	0,1
Vino tratado - F1 50 g/hl	753,5	0,20	0,1

La adición de F1 genera una disminución de la turbiedad equivalente a la obtenida después del tratamiento tradicional (gelatina/bentonita), sin alteración del contenido en compuestos fenólicos totales y taninos, ni de intensidad colorante.

30 **Ejemplo 10 - Clarificación de los mostos de vino dulce natural en buen estado sanitario por F1 a la dosis de 50 g/hl, con respecto a un control que ha sufrido un clarificado tradicional (gelatina/bentonita)**

35 Un mosto de vino dulce natural en buen estado sanitario del viñedo D (cuba de 3 hl) se ha tratado mediante adición de extracto fúngico F1 antes de la depuración (antes de la fermentación alcohólica), a la dosis de 50 g/hl. El vino control ha sufrido una clarificación con los productos tradicionales gelatina y bentonita.

2- Resultados:

40 Tabla 35 - Variación de la turbiedad (cuba de 3 hl, buen estado sanitario)

	Turbiedad (NTU)	Variación (%)
Mosto de partida control	147,0	
Vino control	2,5	-98,3 %
Vino tratado con depuración - F1 50 g/hl	3,9	-97,3 %
Vino tratado antes de la mutación - 50 g/hl	3,6	-97,5 %

Tabla 36 - Características analíticas de los mostos y de los vinos dulces naturales procedentes del mosto del viñedo D (cuba de 3 hl, buen estado sanitario)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Mosto de partida control	212,0	0,01	2,09	0,0	18	3	3,44
Vino control	120,0	16,86	2,82	0,64	86	2	3,81
Vino tratado con depuración - F1 50 g/hl	102,0	18,37	2,75	0,58	60	2	3,82
Vino tratado antes de la mutación - F1 50 g/hl	115,0	17,54	2,77	0,62	64	2	3,81

- 5 Tabla 37 - Compuestos fenólicos totales (CPT), taninos e intensidad colorante de los mostos y de los vinos dulces naturales procedente del mosto del viñedo D (cuba de 3 hl, buen estado sanitario)

	CPT (mg eq. ác. gálico/l)	Taninos (g/l)	DO 280
Mosto de partida control	790,6	0,09	0,09
Vino control	291,3	0,05	0,07
Vino tratado - con depuración F1 50 g/hl	280,0	0,06	0,07
Vino tratado antes de la mutación - F1 50 g/hl	289,0	0,06	0,07

- 10 La adición de F1 genera una disminución de la turbiedad equivalente a la obtenida después del tratamiento tradicional (gelatina/bentonita), sin alteración del contenido en compuestos fenólicos totales y taninos, ni de la intensidad colorante. Además, la adición de F1 en la depuración o antes de la mutación no tiene incidencia sobre la calidad de la clarificación.

- 15 **Ejemplo 11 - Clarificación de los mostos de vinos rosados por F1 a la dosis de 50 g/hl, con respecto a un control que ha sufrido un clarificado tradicional.**

Un mosto de vino rosado de la cava C (cuba de 300 hl) se trató mediante la adición de extracto fúngico F1 después de la fermentación alcohólica, a la dosis de 50 g/hl. El control ha sufrido un clarificado tradicional.

- 20 Resultados:

Tabla 39 - Variación de la turbiedad (cuba de 300 hl)

	Turbiedad (NTU)
Mosto de cuba control	1710
Vino control	185
Vino tratado - F1 50 g/hl	82

- 25 Tabla 40 - Características analíticas de los mostos y de los vinos rosados procedentes del mosto de C (cuba de 300 hl)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Mosto de partida control	100	0,01	1,71	0,0	11	2	3,45
Vino control	1,9	13,78	2,98	0,26	64	2	3,55
Mosto tratado - F1 50 g/hl	110	0,01	1,83	0,0	14	2	3,44
Vino tratado - F1 50 g/hl	1,7	13,37	3,01	0,23	56	5	3,56

- 30 El tratamiento del mosto de vino rosado después de la fermentación alcohólica por F1 permite clarificar los mostos de vino rosado de manera tan eficaz como por el clarificado tradicional. El contenido en compuestos fenólicos totales, el contenido en antocianos y la densidad óptica a 280 nm permanecen sin cambiar con respecto al control.

Ejemplo 12 - Eliminación de las micotoxinas en los vinos tintos naturalmente contaminados

- 35 Un vino tinto del viñedo C (cuba de 426 hl) y un vino tinto del viñedo D (cuba de 3 hl) que contienen un contenido en ocratoxina A próximo del contenido máximo recomendado por la ON (2 µg/l) se trataron mediante adición del extracto fúngico F1. Se han ensayado varias dosis de tratamiento: 129 g/hl, 300 g/hl, 400 g/hl y 500 g/hl. El extracto fúngico se deja en contacto con el vino durante 3 días. El vino control no sufrió ningún tratamiento.

Resultados:

Tabla 41 - Eliminación de las micotoxinas en el vino tinto C (cuba de 426 hl)

	OTA (µg/l)	Variación (%)
Control	1,7	-
F1 - 129 g/hl	1,4	-17,6%

5

Tabla 42 - Características analíticas del vino tinto C (cuba de 426 hl)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Control	1,9	12,50	10,28	7,82	28	3	3,38
F1 - 129 g/hl	2,1	12,57	9,69	7,24	28	3	3,37

10

El tratamiento F1 a la dosis de 129 g/hl genera una disminución del 17,6% del contenido en OTA de vino tinto. El tratamiento F1 no conlleva ninguna modificación de los parámetros clásicos de análisis de los vinos. Los contenidos en compuestos fenólicos totales (aprox. 2400 mg/l), taninos (aprox. 3.3 g/l) y antocianos (aprox. 470 mg/l), y la intensidad colorante (DO280 nm = 0.57) sobre unas extracciones efectuadas 2 días y 1 semana después del tratamiento están sin cambios con respecto al control.

15

Tabla 43 - Eliminación de las micotoxinas en el vino tinto del viñedo D (cuba de 3 hl)

	OTA (µg/l)	Variación (%)
Control	2,7	-
F1- 300 g/hl	2,2	-18,5%
F1 - 400 g/hl	2,1	-22,2%
F1- 500 g/hl	2,0	-25,9%

Tabla 44 - Características analíticas de los vinos tintos del viñedo D (cuba de 3 hl)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Control	1,5	13,66	3,47	0,59	25	2	3,55
F1 - 300 g/hl	1,4	13,63	3,42	0,59	30	3	3,55
F1 - 400 g/hl	1,5	13,51	4,78	2,30	34	2	3,52
F1 - 500 g/hl	1,4	13,33	6,61	4,19	34	2	3,43

20

La eliminación de OTA en el vino tinto es dosis-dependiente. Los contenidos en compuestos fenólicos totales (aprox. 2070 mg/l), taninos (aprox. 2.43 g/l) e intensidad colorante (DO280 nm = 0,47) después del tratamiento están sin cambios con respecto al control. Sea cual sea la dosis de tratamiento F1 añadida al vino (300 g/hl, 400 g/hl, 500 g/hl) esta no genera ninguna modificación de los parámetros clásicos de análisis de los vinos.

25

Ejemplo 13 - Eliminación de las micotoxinas en los vinos tintos naturalmente contaminados, a pequeña escala

30

Un vino tinto del campo M (botellas de 1 l) que contiene unos contenidos superiores o iguales en OTA a la recomendación de la ON han sido tratados mediante adición del extracto fúngico F1, a varias dosis y según unas condiciones de temperatura y de tiempo variables, en una o dos adiciones. El extracto fúngico se deja en contacto con el vino durante 3 días. El vino control no ha sufrido ningún tratamiento.

Resultados:

35

Tabla 45 - Características analíticas de los vinos tintos del campo M (botellas de 1l)

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
Control	1,1	12,97	5,36	2,60	13	2	3,69
F1 - 200 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,2	13,09	3,65	0,56	6	2	3,73
F1 - 300 g/hl 0°C, 3 días	1,1	13,14	3,64	0,55	6	2	3,73
F1 - 400 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,3	13,03	3,61	0,54	7	2	3,74
F1 - 2 x 200 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,3	13,05	3,59	0,57	5	2	3,76
F1 - 500 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,1	13,10	3,59	0,55	6	2	3,74
F1 - 500 g/hl 0°C, 3 días	1,0	13,11	3,59	0,56	7	2	3,75

	Azúcar (g/l)	TAV (%vol)	Ac.T (g/l H ₂ SO ₄)	Ac.V (g/l H ₂ SO ₄)	SO ₂ T (mg/l)	SO ₂ L (mg/l)	pH
F1 - 300 g/hl 10 días	1,0	12,89	3,62	0,59	7	2	3,73

Tabla 46 - Eliminación de las micotoxinas en el vino tinto del campo M (botellas de 1l)

	OTA (µg/l)	Variación (%)
Control	3,0	
F1 - 200 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	2,3	-23,3%
F1 - 300 g/hl 0°C, 3 días	2,0	-33,3%
F1 - 400 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,9 A	-36,7%
F1 - 2 x 200 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	1,8	-40%
F1 - 500 g/hl Temperatura ambiente, 3 días	2,0	-33,3%
F1 - 500 g/hl 0°C, 3 días	1,9	-36,7%
F1 - 300 g/hl 10 días	2,0	-33,3%

5 La eliminación es de por lo menos 23% con el tratamiento F1 a la dosis de 200 g/hl. Los contenidos en compuestos fenólicos totales (aprox. 2432 mg/l), taninos (aprox. 2.95 g/l), antocianos (aprox. 415 mg/l) e intensidad colorante (DO280 nm = 0,56) después del tratamiento están sin cambios con respecto al control.

10 El protocolo de tratamiento más eficaz es la adición sucesiva de 2 veces 200 g/hl de F1, que permite disminuir el contenido en OTA hasta 1,8 µg/l. El tiempo de contacto de F1 (3 días o 10 días) con el vino no tiene influencia sobre la eliminación del contaminante.

Ejemplo 14 - Filtración de una cerveza blanca en presencia de quitina-glucano a una dosis de 200 g/hl a escala de laboratorio

15 Un lote de 10 litros de cerveza blanca se selecciona para ser filtrado sobre una sonda vertical en presencia de quitina-glucano a una dosis de 200 g/hl. La quitina-glucano utilizada se presenta en forma de un polvo de granulometría comprendido entre 50 y 90 µm.

20 En una primera etapa, se forma una precapa de quitina-glucano sobre una sonda vertical de apertura de 30 µm. El polvo de quitina-glucano se pone en suspensión al 10% en agua, y se mezcla durante 1 hora antes de ser depositado sobre el filtro por circulación en circuito cerrado a un caudal de 20 hl.h⁻¹.m⁻².

25 En una segunda etapa, se reduce el caudal de circulación a 8 hl.h⁻¹.m⁻², y se hace circular una mezcla agua/cerveza y después cerveza en circuito abierto. La cerveza se pone previamente en presencia de quitina-glucano a una dosis de 200, g/hl en un recipiente de aluvionado. La cerveza se filtra al caudal de 7 a 8 hl.h⁻¹.m⁻² sobre pasta de quitina-glucano hasta que todo el volumen esté filtrado. La cerveza se coloca después en frío a 8°C, y después se efectúa una extracción para análisis del nitrógeno coagulable y de los polifenoles totales.

30 Resultados:

Tabla 48 - Eliminación de las micotoxinas en la cerveza

	Cerveza IN	Cerveza OUT	% eliminado por filtración sobre quitina-glucano
Nitrógeno coagulable	378 mg/l	162 mg/l	57%
Polifenoles totales	230 mg/l	225 mg/l	2%

35 El polvo de quitina-glucano forma una pasta poco compresible sobre el soporte filtrante utilizado. El contenido en proteínas, caracterizado por el contenido en nitrógeno coagulable, de la cerveza filtrada sobre esta pasta (OUT) es inferior del 57% al contenido en proteínas de la cerveza control (IN). El contenido en polifenoles totales permanece sin cambios.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de tratamiento de un líquido alimenticio de origen vegetal que comprende la puesta en contacto de un líquido alimenticio de origen vegetal con por lo menos un auxiliar de tecnología, siendo dicho auxiliar de tecnología un extracto fúngico que comprende mayoritariamente por lo menos un polisacárido no iónico, comprendiendo dicho polisacárido no iónico mayoritariamente por lo menos un copolímero quitina-glucano.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el polisacárido no iónico comprende mayoritariamente unas unidades N-acetil-D-glucosamina (quitina) y D-glucosa (beta-glucano).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano presenta una relación quitina/glucano comprendida entre 95:5 y 5:95 (m/m).
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano presenta una relación quitina/glucano comprendida entre 70:30 y 20:80 (m/m).
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano comprende una cantidad de quitina (poli(N-acetil-D-glucosamina)) inferior a 60% en masa con respecto a la masa total del copolímero.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano comprende una cantidad de quitina (poli(N-acetil-D-glucosamina)) comprendida entre 20 y 50% en masa con respecto a la masa total del copolímero.
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano comprende una cantidad de glucano (poli(D-glucosa)) inferior a 30% en masa con relación a la masa total del copolímero.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el copolímero quitina-glucano comprende una cantidad de glucano (poli(D-glucosa)) preferentemente inferior a 25% con respecto a la masa total del copolímero.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la eliminación parcial o completa de compuestos indeseables, causas de inestabilidad o de riesgos sanitarios.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque los compuestos indeseables se seleccionan de entre el grupo que consiste en los coloides que causan la inestabilidad, los coloides que causan la turbiedad, los coloides que proporcionan unas propiedades organolépticas de mala calidad, las proteínas, los metales, los metales pesados, particularmente el hierro, el cadmio y el plomo, los pesticidas residuales como los fungicidas, los insecticidas, y los herbicidas, y las toxinas como las micotoxinas y las endotoxinas bacterianas, y porque su eliminación tiene como objeto mejorar la calidad del líquido alimenticio.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de líquidos alimenticios acabados.
- 50 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la clarificación de un líquido alimenticio de origen vegetal.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el líquido alimenticio de origen vegetal se selecciona de entre una bebida fermentada y un zumo de frutas.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la bebida fermentada es un vino.
- 55 15. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la bebida fermentada es una cerveza.

