



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 164 565**

② Número de solicitud: 009902315

⑤ Int. Cl.⁷: C12G 3/02

/(C12G 3/02

C12R 1:645

C12R 1:84

C12R 1:865)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **21.10.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2002

⑦ Solicitante/s: **Lidia Mingorance Cazorla
C/ Restoy, 9 - 1º - C
04003 Almería, ES
José María Molina Ruiz,
Josefa María Clemente Jiménez,
Francisco J. las Heras Vázquez y
Felipe Rodríguez Vico**

⑦ Inventor/es: **Mingorance Cazorla, Lidia;
Molina Ruiz, José María;
Clemente Jiménez, Josefa María;
Las Heras Vázquez, Francisco J. y
Rodríguez Vico, Felipe**

⑦ Agente: **González Crespo, Carmen**

④ Título: **Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas que consiste en la extracción de zumo con bajo contenido en aceite esencial y clarificación hasta un nivel máximo de pulpa del 15%; pasteurización del zumo de naranja por calentamiento hasta 80° centígrados durante 12 segundos; inoculación del zumo con un cultivo de microorganismos; incubación del material permitiendo el intercambio de aire estéril y la salida de CO₂; adición de sacarosa y conservación.

ES 2 164 565 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un producto, derivado del zumo de naranja, que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, incluyendo este procedimiento la aplicación de cualquier levadura aislada del medio natural u obtenida de una colección pública, presentando el producto obtenido una composición en alcoholes y compuestos aromatizantes que puede variar dependiendo de la levadura empleada, pero que no impide su aplicación al consumo humano como bebida de baja graduación alcohólica, aunque sus propiedades organolépticas puedan ser diferentes.

Campo de la invención

Esta invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada a la fabricación de bebidas en general.

Antecedentes de la invención

Las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación etanólica por levaduras han sido uno de los productos biotecnológicos más antiguos. En un principio se obtuvieron como medio de conservación de alimentos líquidos y después como producto en sí mismo. Tradicionalmente para la fermentación de mostos de diferentes frutas se utilizan las poblaciones de levaduras existentes en el ecosistema del que se obtienen los frutos. Durante el proceso de fermentación se produce una evolución de las poblaciones microbianas en la que unas substituyen a otras a medida que la composición química del medio fermentado va cambiando. Las primeras poblaciones están compuestas por levaduras productoras de compuestos que proporcionan gran parte del aroma y sabor afrutado y fresco del producto. En la última fase de la fermentación, *Saccharomyces sp.*, más resistente al etanol, supera al resto de microorganismos y se responsabiliza de la síntesis de la mayor parte del alcohol. En el caso concreto de la fermentación de la naranja, el proceso presenta una diferencia fundamental respecto a otros mostos de otras frutas. En la corteza del fruto de la naranja bacterias del género *Lactobacillus* coexisten con diversos tipos de levaduras y hongos. Nuestro equipo de investigación ha comprobado que, durante las primeras fases de la fermentación, *Lactobacillus* desplaza al resto de microorganismos, dando lugar a una fuerte acumulación de ácido láctico. Puesto que a 18°C las levaduras tardan varios días en adquirir una densidad de población apreciable, en el mejor de los casos se obtienen una fermentación mixta con la acumulación de alcohol y ácido láctico, que proporcionan al producto un olor y sabor desagradables. La fermentación espontánea del mosto de naranja, por tanto, no da lugar a un producto con las propiedades organolépticas de los obtenidos a partir de otros mostos como uva, manzana, cebada, etc. Esta es posiblemente la causa por

la que no se ha comunicado hasta el momento la transformación del zumo de naranja en bebida alcohólica mediante la fermentación natural del mismo.

La utilización de cultivos puros de levaduras en la fermentación se aplica desde antiguo de forma rutinaria, Ibias y col. en Alimentación, Equipos y tecnología, marzo 1995, aunque solo es práctica habitual en la vinificación de los mostos de uva de algunas denominaciones de origen y en la fabricación de cerveza. Con esta práctica, inóculo en forma de levadura seca o pie de cuba, es decir un inóculo de levaduras que se realiza en un fermentador de gran volumen, que comprende entre un 4% y un 5% del volumen total del fermentador, consiguiéndose una mayor velocidad de fermentación, un mayor rendimiento y el mantenimiento de las características enológicas y organolépticas independientemente de la cosecha.

El zumo de naranja natural constituye un medio de cultivo con características especiales y diferentes al zumo concentrado. La presencia en el primero de un gran número de componentes orgánicos de composición definida y que pueden ser considerados aromas y saborizantes para los consumidores son en realidad sustancias que presumiblemente limitan el crecimiento de otros microorganismos diferentes a los de la flora habitual de la naranja como microambiente. Estos compuestos, entre los que destacan alcoholes, aldehídos, sesquiterpenos y algunos compuestos volátiles del tipo del S,S'-etileno-ditioacetato, han sido resumidos por Naf en J. Essent. Oil Ros 1996. En este estudio se describen y cuantifican los compuestos más característicos del zumo natural de naranjas. Este estudio, analizado conjuntamente con el de Moshonas en Journal of Food Science 1989, permite establecer las diferencias en compuestos volátiles entre los zumos naturales y los empacutados asépticamente. Durante el proceso de concentración de zumo, por evaporación del agua que contiene, estos compuestos volátiles son eliminados. Un resultado similar, pero en menor medida, se obtiene durante la pasteurización del zumo. Estos compuestos están fuertemente implicados en el sabor del zumo y su reposición determina la calidad del producto. El equipo que presenta esta invención ha comprobado que el proceso de esterilización, por pasteurización, es determinante para la posterior fermentación del zumo puesto que elimina a los microorganismos capaces de obtener materia y energía a partir del zumo de naranja, pero la propia fermentación introduce aromatizantes que definen un nuevo producto.

Existen precedentes de la fermentación de subproductos de la naranja para la obtención de etanol como combustible, pero que pueden considerarse técnica y conceptualmente muy alejados de esta invención. Así en Grohmann y col. en Applied Biochemistry and Biotechnology (1996), se presenta la fermentación de pulpa de naranja con una cepa recombinante de *Escherichia coli* que expresa los genes de la piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis*.

Las diferentes levaduras que pueden participar en la fermentación de un mosto en general y

del zumo de naranja en particular presentan diferencias en su capacidad para producir compuestos aromatizantes del producto final, por ejemplo acetaldehído y acetato de etilo. Este hecho está bien documentado: Romano y col., 1994; Querol Microbiology International.

Los autores de la presente invención han empleado diferentes levaduras para el diseño de la misma. En este sentido han aislado una levadura de la especie *Hanseniaspora uvarum* que aparece en elevado número durante las primeras fases de la fermentación espontánea del zumo de naranja. Esta cepa presenta una mayor capacidad de síntesis de acetaldehído y acetato de etilo que las cepas de *Saccharomyces* con las que fue comparada, y menor capacidad de síntesis de etanol que éstas. No obstante, esta cepa es tolerante a etanol hasta una concentración del 8% en volumen v/v en zumo de naranja. Esta cepa ha sido utilizada para la fermentación de zumo de naranja, por el procedimiento objeto de esta patente, obteniéndose un producto que no presenta alteración de aspecto con relación al zumo sin fermentar y que presenta una composición en compuestos orgánicos volátiles implicados en el aroma y sabor de los alimentos como etanol, acetato de etilo y acetaldehído característico y diferente al obtenido tras la fermentación con otras cepas de levadura. El hecho de que la levadura utilizada para el procedimiento determine las características específicas del producto justifica que en esta invención se proteja el desarrollo del procedimiento con cualquier levadura, así como los productos obtenidos. Igualmente se han utilizado otras levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*, evaluándose las características de los productos obtenidos.

Descripción de la invención

El procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, que la invención propone presenta dos objetivos básicos, debiendo indicarse que en primer lugar, en la presente invención se diseña y describe un procedimiento para la fermentación dirigida por inoculación directa de zumo de naranja, en el cual sólo intervienen factores y microorganismos naturales que no impiden el uso alimentario del producto obtenido. Este procedimiento asegura una fermentación llevada a cabo por células de levadura, y la formación de unos compuestos definidos, que dan lugar a una bebida de propiedades características. Igualmente, este procedimiento está ajustado para su uso industrial en una nueva industria híbrida entre bodega clásica y cítrica convencional. En segundo lugar, otro objetivo de esta patente es obtener uno o unos productos derivados del zumo de naranja aptos para el consumo humano, con sabor y olor característicos y con mayor concentración de sustancias saborizantes y aromatizantes. Ni estos productos ni sus variantes derivadas existían hasta el momento de su preparación para esta invención.

De forma más concreta, el procedimiento para la obtención de un producto, derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su com-

posición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas objeto de la invención se configura el mismo como un procedimiento para obtener zumo de naranja, o derivados del mismo, con una composición en etanol del 8% v/v, y una composición en otros agentes aromáticos y saborizantes que se detalla en los ejemplos de esta invención. El producto obtenido por este procedimiento presenta unas características organolépticas y químicas específicas y dependientes del microorganismo utilizado para su fabricación.

Este procedimiento está basado en la inoculación de zumo de naranja natural pasteurizado con levaduras, describiéndose en esta invención el uso de dos cepas diferentes que ilustran convenientemente las aplicaciones de la misma. En primer lugar se ha utilizado una cepa de *Hanseniaspora uvarum*, aislada por los autores de esta patente y codificada como ZN3.1. De esta cepa ha sido depositado cultivo, conforme a las provisiones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en la Autoridad Internacional de Depósito de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 (Valencia), España. En segundo lugar se ha incluido la aplicación de la fermentación de zumo de naranja con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1351, proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo antes mencionada.

El proceso fermentativo se ha empleado con las diferentes levaduras sobre zumos de naranja naturales, pasteurizados y con pulpa o desprovistos de pulpa mediante centrifugación. Esta consideración es importante para esta invención, puesto que se obtienen productos similares en sabor y olor pero muy diferentes en aspecto y posibilidades de presentación.

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, de tres hojas de planos, en las cuales con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura número 1.- Corresponde a una vista de las gráficas obtenidas sobre el perfil de producción de etanol y consumo de glucosa y sacarosa cuando se efectúa la fermentación de zumo de naranja completo con *Hanseniaspora uvarum*.

La figura número 2.- Corresponde a una gráfica similar a la mostrada en la figura número 1 cuando se efectúa la fermentación de zumo de naranja completo con *Saccharomyces cerevisiae*.

La figura número 3.- Muestra una vista similar a las representadas en las figuras números 1 y 2, cuando se efectúa la fermentación de zumo de naranja sin pulpa con *Hanseniaspora uvarum* cepa, correspondiendo todos los gráficos mostrados en las figuras 1, 2 y 3 a ejemplos contemplados en la invención relativa a un procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural, mediante el empleo de levaduras alcohólicas.

Realización preferente de la invención

Una primera aplicación del procedimiento proporcionado por esta invención es la transformación, por medio de la fermentación dirigida, de zumo natural de naranja en una bebida de baja graduación alcohólica y elevada composición en acetaldehído y acetato de etilo.

El zumo natural de naranja se obtiene por rotura de las bolsas mesocárpicas del fruto y extracción del jugo en un proceso que industrialmente se desarrolla rompiendo suavemente la cáscara para que los aceites esenciales no se mezclen con el zumo. Este producto tiene entre un 10% y un 15% en volumen v/v de pulpa, dependiendo de la maquinaria utilizada para su extracción. Asimismo presenta una concentración de azúcares principales de 20-30 g/L de fructosa, 20-30 g/L de glucosa y 50-80 g/L de sacarosa. La acidez o pH varía entre 3 y 4 siendo este parámetro muy dependiente de la zona ecológica de origen de la fruta y de su estado de maduración.

El zumo de naranja procedente de la hidratación de zumo previamente deshidratado también puede ser utilizado para este proceso, ajustando a un pH ácido y a unos valores en la concentración adecuada de azúcares fermentables.

La primera aplicación de esta invención se refiere a la fermentación de zumo de naranja natural completo. Dicho procedimiento comprende básicamente las siguientes etapas:

- a) Exprimido de la naranja y acumulación del zumo natural mediante un extractor de zumo continuo con bajo contenido en aceite esencial. Para el desarrollo de esta invención se ha utilizado un extractor patentado por FMC.
- b) Pasteurización del material por calentamiento rápido hasta 80°C, en un intercambiador de calor preferentemente de al menos 3 cuerpos. En este proceso se pierde una importante cantidad del acetaldehído y del acetato de etilo. Estos aromas saborizantes se recuperan en el posterior proceso de fermentación.
- c) Inoculación del zumo de naranja con una cepa de levadura que disponga de capacidad de fermentación alcohólica. Para ello se prepara un precultivo de la cepa en un medio rico que utilice glucosa como fuente de carbono, este medio puede ser preferentemente YPD cuya composición es: extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, siendo estos tantos por ciento correspondientes a porcentajes en peso. La carga de la inoculación puede estar comprendida entre 0,01 y 0,1 unidades de absorbancia a 660 nm por mL de cultivo, o lo que es lo mismo, se debe inocular con una cantidad de unidades formadoras de colonias no inferior a $1 \cdot 10^4$ por mL de cultivo. El pH óptimo para la inoculación es muy amplio dado el extraordinario poder de tolerancia a la acidez que tienen las levaduras. No es necesario realizar ningún ajuste del pH si el zumo de entrada

está entre 3 y 4 unidades, raramente éste no es el caso. El parámetro que se debe utilizar para estandarizar el proceso es la relación entre la cantidad de azúcares y la acidez, de esta forma se obtienen resultados óptimos, siempre que los grados brix estén comprendidos en el intervalo 10°-15°.

- d) Formación de etanol y otros aromatizantes por fermentación y actividad microbiana. Con las levaduras utilizadas para el diseño de esta invención, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Pichia*, no es necesaria la adición de nutrientes no aportados directamente por el zumo de naranja. Los cultivos permanecen en condiciones aeróbicas en un recipiente dotado de válvula que permita el escape del CO₂ acumulado, y la entrada de aire filtrado para impedir la contaminación con otros microorganismos. El tiempo de la fermentación es inversamente proporcional a la temperatura de la misma. Se obtiene un buen rendimiento fermentativo entre 8 y 18°C. La fermentación puede realizarse también a 4°C en un plazo máximo de 60 días. Preferentemente la temperatura óptima es de 18°C, en estas condiciones en 60 horas se produce el agotamiento de la práctica totalidad de los azúcares fermentables y se alcanza una concentración de etanol del 8% en v/v en volumen. Esta circunstancia finaliza la actividad biológica en el producto.
- e) Modificación del sabor por adición de sacarosa en una concentración comprendida entre 5 y 10% en volumen.
- f) Almacenamiento del producto a 4°C.

En estas condiciones se ha comprobado experimentalmente que la población de la levadura no aumenta sustancialmente. Sin embargo, sí se registra la producción de sustancias volátiles y aromáticas procedentes de la fermentación. El producto formado mayoritariamente es etanol, que alcanza el 8% v/v durante una fermentación de 80 horas a 18°C.

Debe indicarse que los porcentajes citados anteriormente son en volumen v/v.

Esta fase del procedimiento puede ser monitorizada mediante la toma periódica de muestras y la determinación cuantitativa los componentes principales. El etanol puede ser cuantificado preferiblemente por el método enzimático basado en la reducción de Nicotinamin Adenin Dinucleótido oxidado, durante la oxidación de etanol a acetaldehído por acción de la alcohol deshidrogenasa y su cuantificación espectrofotométrica a 340 nm. La glucosa puede ser cuantificada por el método GOD-POD, por el que la glucosa es oxidada a ácido glucónico por la glucosa oxidasa, el H₂O₂ formado en esta reacción es reducido por la peroxidasa, que simultáneamente oxida a una molécula de o-dianisidina, la cual puede ser medida espectrofotométricamente a 450 nm. La sacarosa puede ser cuantificada tras su inversión mediante la fructosidasa, la cantidad de glucosa

formada puede ser medida por el método GOD-POD antes descrito. Igualmente el final de la fermentación puede certificarse por el cese en la producción de CO₂.

La cepa ZN3.1. presenta ciertas ventajas para este procedimiento, puesto que está muy bien adaptada a la vida en el zumo de naranja, y utiliza con muy alto rendimiento los nutrientes de este material. Además, esta cepa tiene un metabolismo de asimilación y fermentación de azúcares muy limitado y dependiente casi exclusivamente de la glucosa, lo que contribuye a una mínima alteración del aspecto del zumo y a que la posterior corrección del sabor sea también mínima.

Una segunda aplicación del método proporcionado por esta invención lo constituye su empleo en el procedimiento de obtención de zumo de naranja sin pulpa fermentado. Este producto presenta unas propiedades organolépticas diferentes al obtenido por el zumo completo. Estas diferencias se deben a la alteración específica de la pulpa por la peptinasa y otras enzimas, alteración que no se produce al eliminar la pulpa antes de la inoculación con la levadura.

Las etapas del procedimiento para obtener zumo de naranja sin pulpa fermentado son:

- a) Extracción del zumo en extractores de zumo continuo FMC con bajo contenido en aceite esencial.
- b) Eliminación de la pulpa con tamaños de partícula superiores a 0,5 mm mediante cribado del zumo en un filtro "finisher".
- c) Eliminación completa de la pulpa mediante centrifugación. Esta operación también puede hacerse por sedimentación. Este último procedimiento tiene la desventaja de que debe hacerse en frío, puesto que puede durar varias horas. En cualquier caso, el sobrenadante resultante debe ser claro y transparente. La calidad del producto depende, en buena medida, de la ausencia de turbidez.
- d) Inoculación del zumo centrifugado con una cantidad definida de células de una cepa de levadura alcoholera. Esta operación se realiza en la misma forma que la descrita en el punto c) de la primera aplicación de esta invención.
- e) Fermentación del zumo de naranja sin pulpa. Esta operación se realiza en recipientes llenos casi en su totalidad de líquido. La pequeña capa de aire debe estar conectada con el exterior por un dispositivo que permita la salida del CO₂ formado por la fermentación etanólica y la entrada de aire estéril. La fermentación se realiza preferentemente a 18°C durante 80 horas. Si se realiza a menor temperatura la duración debe extenderse hasta que se compruebe la falta de producción de CO₂. La producción de etanol y de las posibles fuentes de carbono para el crecimiento microbiano pueden monitorizarse mediante su cuantificación por los métodos descritos en la primera apli-

cación de esta invención.

- f) Clarificación del producto fermentado. Esta operación se realiza por centrifugación del zumo fermentado para eliminar la levadura. Dado que la levadura no crece significativamente durante el proceso, la clarificación puede opcionalmente realizarse por filtrado sin riesgo de que los filtros queden colapsados.
- g) Modificación del sabor por adición de sacarosa en un rango entre 5 % y 10 % de volumen v/v.
- h) Conservación a 4°C.

A continuación se describen unos ejemplos que detallan diferentes aspectos de la aplicación del procedimiento objeto de esta invención.

Ejemplo 1

Fermentación de zumo de naranja natural completo

Zumo de naranja natural, obtenido por extracción por el procedimiento descrito en el apartado de descripción de la invención y con una cantidad máxima de pulpa del 10 % se pasteuriza durante 12 segundos a 80°C. Se inocula con 1.10⁴ de unidades formadoras de colonias de la levadura de la cepa ZN3.1 por mL de cultivo, y en ningún momento del proceso se adicionan nutrientes o vitaminas que faciliten el crecimiento microbiano. Se incuba en condiciones aeróbicas en un recipiente que permita el intercambio de aire estéril durante un tiempo que oscila entre 80 y 100 horas a una temperatura entre 8 y 18°C. El perfil de producción de etanol y consumo de glucosa y sacarosa durante este tiempo se presenta en la figura 1. Como demuestran estos resultados, todo el etanol producido procede de la fermentación de la glucosa, ya que ésta resulta agotada durante el proceso. Por el contrario, la sacarosa no es metabolizada por ZN3.1 y su concentración no resulta modificada durante la fermentación. A pesar de esto la acumulación de compuestos orgánicos aromatizantes es muy alta.

La producción de compuestos orgánicos volátiles con efecto saborizante y/o aromatizante se detalla en la tabla 1. Estos compuestos fueron cuantificados por cromatografía de gases en una columna empacada con una fase estacionaria de C18. Se comprueba experimentalmente que la cantidad de acetato de etilo producido por ZN3.1. es dos órdenes de magnitud mayor que la producida por *Saccharomyces cerevisiae*. Igualmente la cantidad de acetaldehído producida por ZN3.1. es 10 veces mayor que la producida por *S. cerevisiae* (véase la tabla 2 del ejemplo 2). Esta circunstancia da lugar a un producto muy aromático. El análisis sensorial del producto, realizado tras la adición de sacarosa al 5 % v/v, da como resultado la calificación del producto como de sabor afrutado y ligeramente amargo, con un aroma dulce y fresco. El sabor amargo es debido a la degradación de la pulpa. Este sabor no llega a ser apreciable si la cantidad de pulpa se mantiene por debajo del 10 %.

TABLA 1

Contenido en compuestos orgánicos volátiles en zumo de naranja fermentado con *Hanseniaspora uvarum* ZN 3.1

Etanol	8 %
Acetaldehído	130 ppm
Metanol	29 ppm
Acetato de etilo	1200 ppm
Propanol	64 ppm
Alcohol Isoamílico	200 ppm

Debe indicarse que el cambio de unidades existente en la tabla número 1, en cuanto a tanto por ciento y ppm, se debe a que los elementos expresados en ppm están en menor cantidad que los expresados en tanto por ciento, y unificar estos datos en una sola unidad sería incorrecto.

El aspecto del producto es el mismo que el del zumo de naranja natural, no observándose cambio de color ni de propiedades físicas. Así, el pH pasa de 3.1 en el zumo natural a 3.8 en el zumo fermentado. Para el análisis sensorial del producto resultante se adicionó sacarosa hasta una concentración final contenida entre el 5 % y 10 % en volumen v/v. A partir de este momento el producto se almacenó a 4°C para retrasar la actividad metabólica de las levaduras. El producto refrigerado permanece inalterado durante 45 días.

Ejemplo 2

Fermentación de zumo de naranja natural completo

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero utilizando una levadura del género *Saccharomyces*, cepa CECT 1351. La cantidad de alcohol obtenida al final de la fermentación (80 horas) fue de un 8 %. Los consumos de glucosa y sacarosa aparecen monitorizados en la figura 2. Los compuestos aromáticos volátiles relacionados con las propiedades organolépticas del zumo fermentado aparecen en la tabla 2.

TABLA 2

Contenido en compuestos orgánicos volátiles en zumo de naranja fermentado con *Saccharomyces sp.*

Etanol	8 %
Acetaldehído	19 ppm
Metanol	31 ppm
Acetato de etilo	51 ppm
Propanol	93 ppm
Alcohol Isoamílico	520 ppm

Para los tantos por ciento y ppm de la tabla número 2, esta parte reitera lo citado sobre la tabla número 1.

Para el análisis sensorial del producto resultante se adicionó sacarosa hasta una concentración final contenida entre el 5 % y 10 % en volumen v/v. A partir de este momento el producto se almacenó a 4°C para retrasar la actividad metabólica de las levaduras. El producto refrigerado permanece inalterado durante 45 días.

Ejemplo 3

Fermentación de zumo de naranja natural sin pulpa

El zumo de naranja sin pulpa, obtenido como se describe en el apartado de descripción de la invención, se siembra con 1.10^4 de unidades formadoras de colonias de *Hanseniaspora uvarum* ZN3.1 por mL de medio y se incuba en condiciones anaeróbicas durante 150 horas a una temperatura de 18°C. Las células de levadura son retiradas por centrifugación, recogiendo menos de 3.6 mg de peso fresco de material por mL. Se añade sacarosa hasta que la cantidad total sea del 5 % y 10 % en volumen v/v. La producción de etanol, así como el consumo de glucosa y sacarosa, se presentan en la figura 3.

El sabor y aroma del producto es semejante al obtenido en el ejemplo 1, pero no se aprecia sabor amargo debido a la ausencia de pulpa. Por este mismo motivo, el producto es transparente y anaranjado, la intensidad del color depende de la variedad de naranja utilizada, de su grado de madurez y de las condiciones ecológicas del cultivo. La variedad sanguina es la que produce un color más rojizo debido al antocianato presente en el jugo celular.

Ejemplo 4

Fermentación del zumo de naranja sin pulpa

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 3, pero en este caso utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CECT 1351. Después de eliminar las células se obtiene un producto con un nivel alcohólico del 8 %, pero con un contenido en acetato de etilo y acetaldehído 100 y 10 veces menor respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, **caracterizado** por comprender las etapas de:

- a) Extracción del zumo con bajo contenido en aceite esencial y clarificación hasta un nivel máximo de pulpa del 15 % en volumen v/v.
- b) Pasteurización del zumo de naranja por calentamiento hasta 80°C durante 12 s.
- c) Inoculación del zumo de naranja natural con un cultivo de microorganismos.
- d) Incubación del material a una temperatura entre 8 y 18°C durante 80 a 100 horas, en un recipiente que permita el intercambio de aire estéril y la salida de CO₂.
- e) Adición de sacarosa hasta una concentración final comprendida entre un 5 y un 10 % en volumen v/v.
- f) Conservación a una temperatura comprendida entre -2 y 4°C.

2. Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, según la primera reivindicación, **caracterizado** porque

en el cultivo de microorganismos se utiliza una levadura natural o procedente de una Colección de Cultivos Tipo, con metabolismo fermentativo alcohólico.

3. Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, según la primera y segunda reivindicaciones, **caracterizado** por estar constituido por una composición alcohólica comprendida entre el 6 % y el 8 % en volumen v/v, así como por el contenido en acetaldehído y acetato de etilo, pH ácido, sabor afrutado y aromático.

4. Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, según la primera y segunda reivindicaciones, **caracterizado** porque el zumo no contiene pulpa tras su eliminación por centrifugación.

5. Procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica la modificación de su composición química por un proceso de fermentación dirigida y natural mediante el empleo de levaduras alcohólicas, según la cuarta reivindicación, **caracterizado** por ser transparente y presentar un color anaranjado, no turbio, y su composición alcohólica comprendida entre el 6 % y el 8 % en volumen v/v, así como por su pH ácido y su contenido en acetato de etilo y acetaldehído, compuestos ausentes en el zumo de naranja natural.

40

45

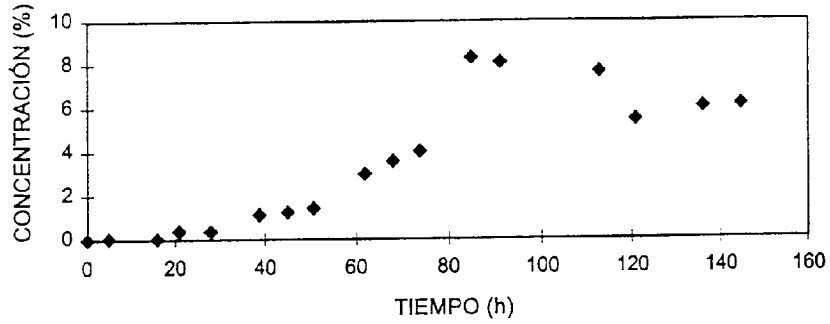
50

55

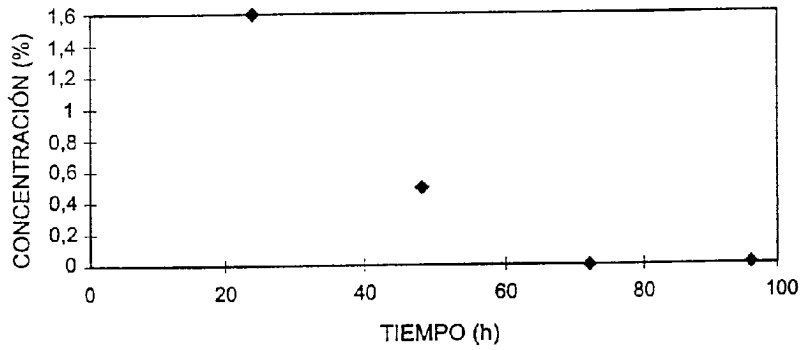
60

65

PRODUCCIÓN DE ETANOL



CONSUMO DE GLUCOSA



CONSUMO DE SACAROSA

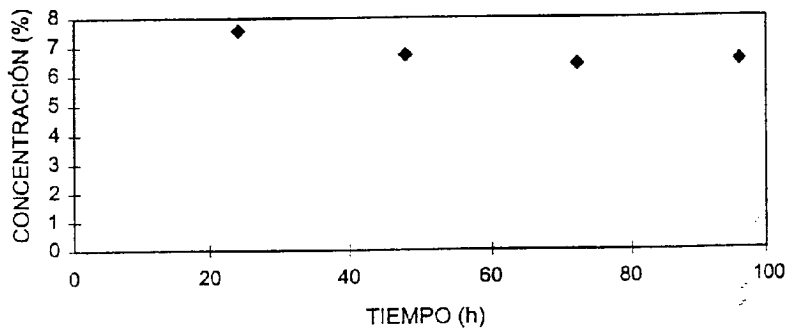
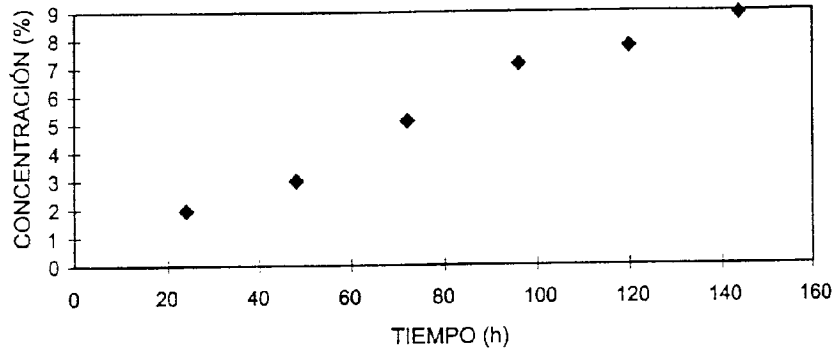
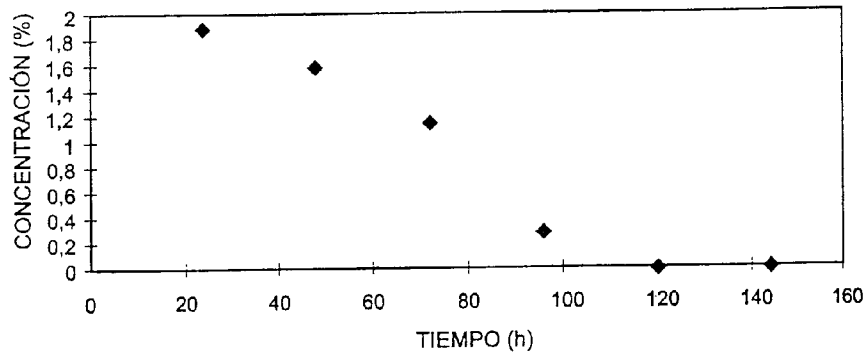


FIG. 1

PRODUCCIÓN DE ETANOL



CONSUMO DE GLUCOSA



CONSUMO DE SACAROSA

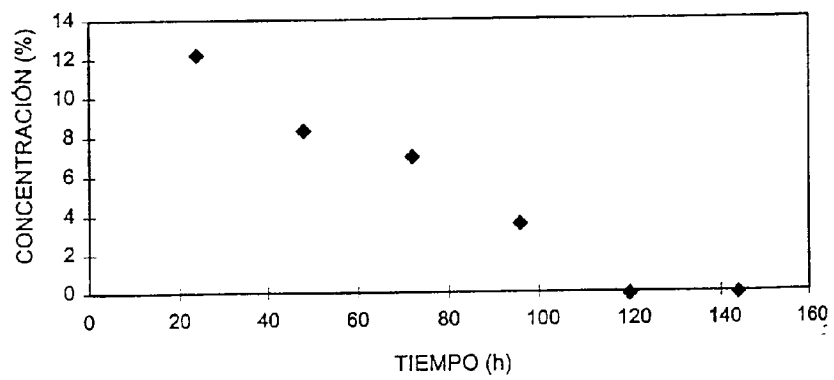
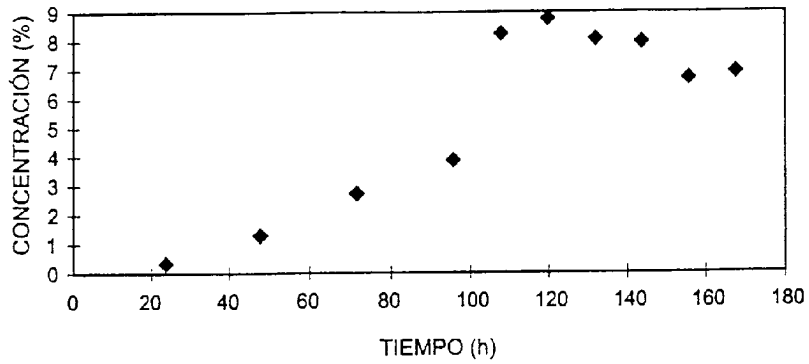
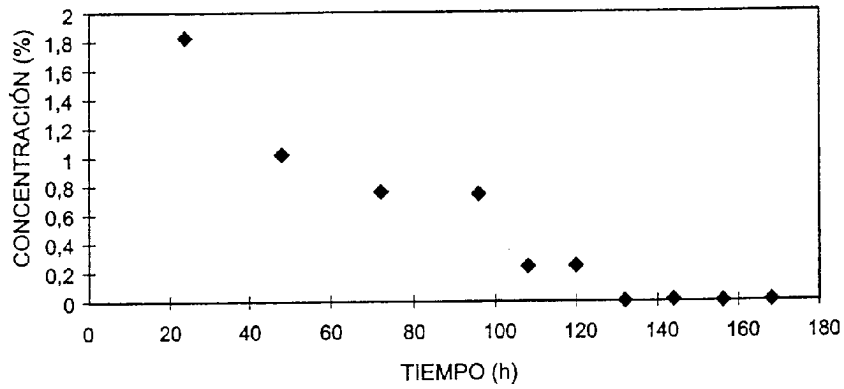


FIG. 2

PRODUCCIÓN DE ETANOL



CONSUMO DE GLUCOSA



CONSUMO DE SACAROSA

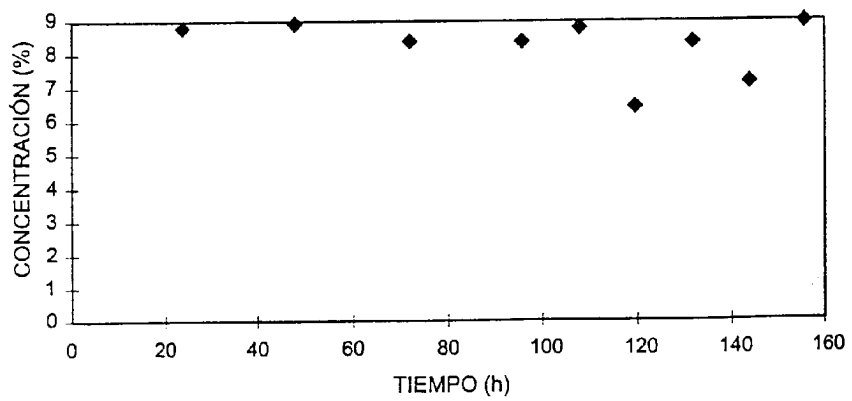


FIG. 3



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12G 3/02 // (C12G 3/02, C12R 1:645, 1:84, 1:865)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5266337 A (BÄRWALD et al.) 30.11.1993, columna 4, línea 14; columna 5, líneas 63-64; columna 6, líneas 10-13; reivindicaciones 1-2,4,9-10.	1-3
A	JP 06-014753 A (KANEBO LTD.) 25.01.1994. Recuperado de la Base de Datos WPI (World Patent Index) "on line". N.º acceso 1994-061465 [08] DW 199408. Resumen de la Base de Datos.	
A	JP 52-120196 A (SHIZUOKA KEN) 08.10.1977. Recuperado de WPI "on line". AN 1977-82213Y [25] DW 197746. Resumen de la Base de Datos.	
A	CN 1046556 A (WANG-N) 31.10.1990. Recuperado de WPI "on-line". AN 1991-201101 [28] DW 199128. Resumen de la Base de Datos.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

21.01.2002

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/1