

C12G 1/02 (2006.01)
C07C 53/126 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-197**
(22) Přihlášeno: **29.03.2019**
(40) Zveřejněno: **07.10.2020**
(Věstník č. 41/2020)
(47) Uděleno: **17.08.2023**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **27.09.2023**
(Věstník č. 39/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
BLASI, Mélanie, a kol. New methodology for removing carbonyl compounds from sweet wines. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55.25: 10382-10387, ISSN: 0021-8561; SAIDANE, Dorra, a kol. Reducing the sulfur-dioxide binding power of sweet white wines by solid-phase extraction. Food chemistry, 2013, 141.1: 612-615, ISSN: 0308-8146.
JP 2004222567 A.

(73) Majitel patentu:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D., Lednice, CZ
Ing. Michal Kumšta, Podivín, CZ
Bc. Josef Licek, Rudník, CZ

(54) Název vynálezu:
Použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně

(57) Anotace:
Použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně, kde směs mastných kyselin se střední délkou řetězce obsahuje kombinaci alespoň dvou mastných kyselin vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny kaprylové (C8), kyseliny kaprinové (C10) a kyseliny laurové (C12).

Použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález patří do oblasti technologie vín a týká se použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně.

10

Dosavadní stav techniky

Při alkoholové fermentaci při technologii vína vznikají vedle etanolu další produkty, mezi něž patří i karbonylové sloučeniny, které mohou být rovněž extrahovány z dubových sudů, v nichž
15 víno zraje, a mohou mít vliv na aroma výsledného vína. Jedním z prvních meziproductů fermentace je acetaldehyd, ale ve víně jsou přítomné i další karbonylové sloučeniny, například pyruvát, kys. 2-oxoglutarová, diacetyl a acetoin. Tyto karbonylové sloučeniny mohou v úměrných koncentracích sice příjemně doplňovat a zjemňovat chuť a aroma vína, ale při
20 vysokých koncentracích již ovlivňují víno negativně a dodávají mu chuť například kysaného zelí (diacetyl). Ve vysokých koncentracích jsou tedy tyto sloučeniny ve víně nežádoucí, navíc mohou mít neurotoxický účinek (způsobují například bolesti hlavy).

Použití vyšších mastných kyselin k inhibici aktivity kvasinek během alkoholové fermentace či mléčných bakterií během malolaktické fermentace a k redukci dávkování SO₂ při technologii
25 vína je podrobně diskutováno v CZ 2011-116. Přihláška popisuje směs vyšších mastných kyselin, obsahující kombinaci kyselin C8, C10 a C12 a jejich použití za účelem inhibice aktivity kvasinek a mléčných bakterií ve fázi dokvášení révových moštů a dále jejich aplikací do vína pro ochranu před sekundární fermentací a pro snížení dávkování oxidu siřičitého během celé technologie vína.

30 Účinky karbonylových sloučenin ve víně na lidské zdraví jsou negativní. Například acetaldehyd, který vzniká jako meziproduct při produkci etanolu z cukrů při alkoholové fermentaci nebo jako produkt chemické oxidace etanolu během skladování vína, ve víně způsobuje stopy zvětralosti.

Jeden ze známých způsobů, jak snížit obsah karbonylových sloučenin ve víně, je použití tradiční
35 výroby vína obsahující kroky ležení na kvasnicích (tzv. surlie) a malolaktickou fermentaci. Tyto způsoby výroby vína přirozeným způsobem snižují obsah karbonylových sloučenin, nicméně jsou však v průmyslovém měřítku málo využívané pro jejich zdlouhavost. Navíc lze tradiční metody použít jen pro vína bez zbytkového cukru, což významně omezuje možnost využití těchto metod.

40

JP 2004222567 A popisuje způsob odstranění nechtěných karbonylových složek z alkoholických
nápojů pomocí silně bazického iontoměniče a následným pročištěním alkoholického nápoje přes kolonu zachycující siřičitany. Nevýhodou tohoto postupu je jeho složitost a časová náročnost.

45 Blasi et al., New Methodology for Removing Carbonyl Compounds from Sweet Wines, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10382-10387, používá pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně fenylsulfonylhydrazin, vázaný na polymerním nosiči. Studie byla prováděna v modelových médiích obsahujících acetaldehyd, kyselinu pyrohroznovou a 2-oxoglutarovou.

50 Saidane et al., Reducing the sulfur-dioxide binding power of sweet white wines by solid-phase extraction, *Food Chemistry* 141 (2013) 612-615, používá fenylsulfonylhydrazin, na který se mají vázat karbonylové sloučeniny, obsažené ve víně. Pokus byl provedený na již nalahovaných vínech. Jako nosič byly použity dva druhy ligninu.

Nevýhodou posledních dvou postupů je použití fenylsulfonylhydrazinu ukotveného na nosiči, postupem čištění vína je tedy extrakce na pevné fázi, která má nižší účinnost.

I přes výše popsané metody tedy stále přetrvává potřeba jednoduchého, rychlého a efektivního způsobu snížení karbonylových sloučenin při současné technologii vína i při výrobě vín se zbytkovým cukrem.

Podstata vynálezu

Cílem předkládaného vynálezu je poskytnout alternativní způsob snížení karbonylových sloučenin ve víně po ukončení fermentace. Toho je dosaženo použitím směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce (medium-chain fatty acids, MCFA), jejíž přírůstek při ukončení alkoholové fermentace prokazatelně snižuje obsah karbonylových sloučenin ve víně.

Předmětem předkládaného vynálezu je použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce (medium-chain fatty acids, MCFA) pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně, kde směs mastných kyselin se střední délkou řetězce obsahuje kombinaci alespoň dvou mastných kyselin vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny kaprylové (C8), kyseliny kaprinové (C10) a kyseliny laurové (C12). S výhodou sestává směs z kyseliny kaprylové (C8) a kyseliny kaprinové (C10).

V jednom provedení použití podle předkládaného vynálezu sestává směs mastných kyselin se střední délkou řetězce z kombinace 50 % hmotn. kyseliny kaprylové (C8) a 50 % hmotn. kyseliny kaprinové (C10).

V jednom výhodném provedení použití podle předkládaného vynálezu jsou kyselina kaprylová (C8) a kyselina kaprinová (C10) jsou v hmotnostním poměru 2:8.

Ve výhodném provedení se směs mastných kyselin se střední délkou řetězce přidá do fermentovaného vinného moštu tak, aby výsledná koncentrace směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce byla v rozmezí od 5 do 50 mg/l moštu, s výhodou od 5 do 25 mg/l moštu, nejvýhodněji v koncentraci 10 až 20 mg/l.

V jednom provedení je směs mastných kyselin se střední délkou řetězce ve formě roztoku o koncentraci alespoň 10 g směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce na 100 ml rozpouštědla, přičemž rozpouštědlo je vybrané ze skupiny zahrnující etanol a/nebo vodu. Mastné kyseliny mohou být v roztoku ve formě svých sodných nebo draselných solí.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma experimentu v příkladu 1.

Obr. 2: Vývoj obsahu acetaldehydu v jednotlivých vzorcích.

Obr. 3: Vývoj obsahu acetoinu v jednotlivých vzorcích.

Obr. 4: Vývoj obsahu diacetylu v jednotlivých vzorcích.

Obr. 5: Vývoj celkového obsahu karbonylových sloučenin v jednotlivých vzorcích.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Výroba vína a různé metody ukončení alkoholové fermentace

5

K experimentu byly použity hrozny odrůdy Ryzlink Rýnský sklizené v roce 2018. Mošt byl odkalen a následně inokulován aktivními suchými vinnými kvasinkami (ASVK), fermentace byla řízena chlazením. Ukončení alkoholové fermentace bylo provedeno čtyřmi různými metodami, při obsahu zbytkového cukru přibližně 15 g.l⁻¹. V této fázi byly také odebrány kontrolní vzorky

10

pro stanovení obsahu karbonylových sloučenin (obr. 1).
V této fázi byl dokvášející mošt rozdělen do čtyř nádob o objemu 25 hl. Na každou nádobu byla aplikována jiná metoda ukončení alkoholové fermentace: přídavek 10 mg.l⁻¹ směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce (medium-chain fatty acids, MCFA) o složení 2 díly kyseliny kaprylové (C8) a 8 dílů kyseliny kaprinové (C10), přídavek 20 mg.l⁻¹ téže směsi MCFA, zchlazení na 5 °C a separace pevných částic od kapalin pomocí tzv. cross-flow filtrace. Po 24 hodinách byly odebrány první vzorky. Následoval přídavek 40 mg.l⁻¹ SO₂ do každé nádoby. Další odběry byly provedeny: 2. a 9. den. Po odběru provedeném v devátém dni byl vyrovnán obsah volného SO₂ na hodnotu 35 mg.l⁻¹. Poslední odběr byl proveden 34. den.

15

20

Příklad 2: Stanovení karbonylových sloučenin v jednotlivých vzorcích

Vzorky odebrané v příkladu 1 byly zpracovány v laboratořích Zahradnické fakulty v Lednici. Pomocí kapalinové chromatografie byly stanoveny jednotlivé karbonylové sloučeniny: acetaldehyd, pyruvát, kys. 2-oxoglutarová, diacetyl a acetoin. Jejich součet byl vyjádřen jako obsah celkových karbonylových sloučenin. Naměřené hodnoty byly zpracovány v softwaru STATISTICA (výrobce STAT Soft).

25

Základní parametry vín z jednotlivých odebraných vzorků jsou uvedeny v tabulce 1.

30

Tabulka 1: 10MCFA-dávkování 10mg/l, 20MCFA – dávkování 20mg/l, Chlazení/CHILL- ošetřeno zchlazením, Cross – filtrováno cross flow filtrem

Metoda	Den	Alkohol [%]	Zb. cukr [g/L]	Tit. kys. [g/L]	pH	Kys. jabl. [g/L]	Kys. vinná [g/L]	Kys. mléčná [g/L]	Volný SO ₂ [mg/L]	Celk. SO ₂ [mg/L]
10MCFA	1	11,88	11,5	6,7	3,29	1,5	3,3	0,2	14	67
	9	12,17	11	6,7	3,3	1,5	3,1	0,1	37	113
20MCFA	1	11,86	11,5	6,7	3,29	1,5	3,4	0,1	16	73
	9	12,21	11,4	6,7	3,3	1,5	3,3	0,1	35	112
Chlazení	1	11,86	13	6,2	3,29	1,4	2,6	0,1	12	60
	9	12,1	13	6,2	3,29	1,4	2,5	0	35	118
Cross	1	11,84	14,8	7,1	3,26	1,3	3,7	0,2	10	58
	9	11,88	14,8	7,1	3,27	1,5	3,5	0,2	33	131

35

Acetaldehyd

První den byla naměřena nejvyšší hodnota obsahu acetaldehydu u varianty cross. Následně však byla tato hodnota u varianty cross relativně stabilní, podobně jako u varianty 20 MCFA. Naopak u varianty chlazení byl zaznamenán nárůst obsahu acetaldehydu v průběhu měření. 34. den byla pro tuto variantu zaznamenána prokazatelně nejvyšší hodnota. Pravděpodobně je to způsobeno kvasinkami, které zůstávají ve víně a vytvářejí acetaldehyd, na který vážou, pro ně toxický, oxid siřičitý. Prokazatelně nejnižší obsah acetaldehydu byl naměřen u variant 20 MCFA a cross. Důvodem je, že během filtrace jsou odstraněny všechny kvasinky z vína, u varianty 20 MCFA je

40

inhibována aktivita kvasinek přidávkem mastných kyselin. Vývoj obsahu acetaldehydu v jednotlivých vzorcích je uveden na obr. 2 a v tabulkách 2, 3 a 4.

Tabulka 2: LSD test: obsah acetaldehydu (1. den)

5

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetaldehyd (mg/l), 1 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2
3	CHILL	17,98004	****	
2	20MCFA	18,10756	****	
1	10MCFA	18,30838	****	
4	CROSS	20,76767		****

Tabulka 3: LSD test: obsah acetaldehydu (9. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetaldehyd (mg/l), 9 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2
2	20MCFA	20,21577	****	
4	CROSS	20,56139	****	
1	10MCFA	21,78054	****	
3	CHILL	30,80051		****

10 Tabulka 4: LSD test: obsah acetaldehydu (34. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetaldehyd (mg/l), 34 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000					
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2	3
4	CROSS	20,77976	****		
2	20MCFA	21,36843	****		
1	10MCFA	23,42141		****	
3	CHILL	30,08241			****

Acetoin

15 Obr. 3 a tabulky 5, 6 a 7 znázorňují změny v obsahu acetoinu v jednotlivých vzorcích. Varianty cross a 20 MCFA mají relativně stabilní obsah acetoinu. Obsah acetoinu prokazatelně klesá u varianty 10 MCFA. Nejvíce znatelný je pokles u varianty chlazení. Tento vývoj je opačný vůči vývoji obsahu acetaldehydu. Důvodem je zřejmě hromadění NADH⁺ redukovaných koenzymů během vyvazování acetaldehydu na oxid siřičitý. Tyto koenzymy poté slouží jako donory H⁺ při
20 redukci acetoinu.

Tabulka 5: LSD test: obsah acetoinu (1. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetoin (mg/l), 1 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000						
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2	3	4
3	CHILL	8,93708	****			
1	10MCFA	9,98170		****		
4	CROSS	12,10402			****	
2	20MCFA	13,00362				****

25 Tabulka 6: LSD test: obsah acetoinu (9. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetoin (mg/l), 9 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000					
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2	3
3	CHILL	3,79294		****	
1	10MCFA	8,21783			****
2	20MCFA	12,16831	****		
4	CROSS	12,38833	****		

Tabulka 7: LSD test: obsah acetoinu (34. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Acetoin (mg/l), 34 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000						
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2	3	4
3	CHILL	3,13480	****			
1	10MCFA	7,94095		****		
2	20MCFA	11,914113			****	
4	CROSS	14,24459				****

5 Diacetyl

Výsledky měření obsahu diacetylu jsou zobrazeny na obr. 4 a v tabulkách 8, 9 a 10. U variant chlazení, 10 MCFA a 20 MCFA byl zaznamenán pokles obsahu diacetylu. Prokazatelně nejvyšší obsah byl naopak naměřen u varianty cross. Tento zvýšený obsah lze zřejmě vysvětlit absencí

10

Tabulka 8: LSD test: obsah diacetylu (1. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Diacetyl (mg/l), 1 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2
2	20MCFA	0,178118	****	
3	CHILL	0,178212	****	
1	10MCFA	0,193477	****	
4	CROSS	0,222435		****

15 Tabulka 9: LSD test: obsah diacetylu (9. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Diacetyl (mg/l), 9 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000					
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2	3
1	10MCFA	0,123630	****		
2	20MCFA	0,144627	****	****	
3	CHILL	0,153632		****	
4	CROSS	0,244558			****

Tabulka 10: LSD test: obsah diacetylu (34. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Diacetyl (mg/l), 34 den				
Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Acetaldehyd (mg/l) - průměr	1	2
1	10MCFA	0,130200	****	
2	20MCFA	0,150336	****	
3	CHILL	0,153108	****	
4	CROSS	0,247524		****

5 Celkový obsah karbonylových sloučenin

Změny v obsahu celkových karbonylových sloučenin jsou zobrazeny na obr. 5 a v tabulkách 11, 12 a 13. Prokazatelně nejvyšší hodnota byla 1. den naměřena po cross-flow filtraci. Další vývoj této varianty byl relativně stabilní. U ostatních variant byl první den naměřen nižší obsah celkových karbonylových sloučenin. U varianty chlazení byl však následně zaznamenán nárůst. V dalších termínech byl prokazatelně nejnižší obsah celkových karbonylových sloučenin pozorován u obou použitých dávek MCFA.

Na základě výsledků lze konstatovat, že přidavek MCFA při ukončení alkoholové fermentace prokazatelně snižuje obsah karbonylových sloučenin ve víně. Po použití cross-flow filtrace byl sledován relativně stabilní obsah jednotlivých karbonylových sloučenin, zřejmě je to způsobeno absencí kvasničných buněk a redukčních činidel ve víně po filtraci. Při použití chlazení byl zaznamenán pokles acetaldehydu po přidavku SO₂, nicméně v dalším vývoji byl naopak pozorován nárůst. Pravděpodobně ho vytváří přítomné kvasinky, které ho využívají jako vazné centrum pro toxický oxid siřičitý. Vývoj obsahu celkových karbonylových sloučenin při chlazení je podobný. Po vyrovnání obsahu SO₂ je obsah celkových karbonylových sloučenin srovnatelný při použití chlazení i cross-flow filtrace. Ve všech termínech odběrů byl však prokazatelně nejnižší obsah celkových karbonylových sloučenin naměřen u vín po přidavku MCFA.

25 Tabulka 11: LSD test: obsah celkových karbonylových sloučenin (1. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Karbonylové sloučeniny celkem (mg/l), 1 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Karbonyly celkem (mM) - průměr	1	2
1	10MCFA	1,024872	****	
2	20MCFA	1,042113	****	
3	CHILL	1,059821	****	
4	CROSS	1,187914		****

Tabulka 12: LSD test: obsah celkových karbonylových sloučenin (9. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Karbonylové sloučeniny celkem (mg/l), 9 den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Karbonyly celkem (mM) - průměr	1	2
1	10MCFA	1,026098	****	
2	20MCFA	1,057890	****	
4	CROSS	1,201739		****
3	CHILL	1,237907		****

30

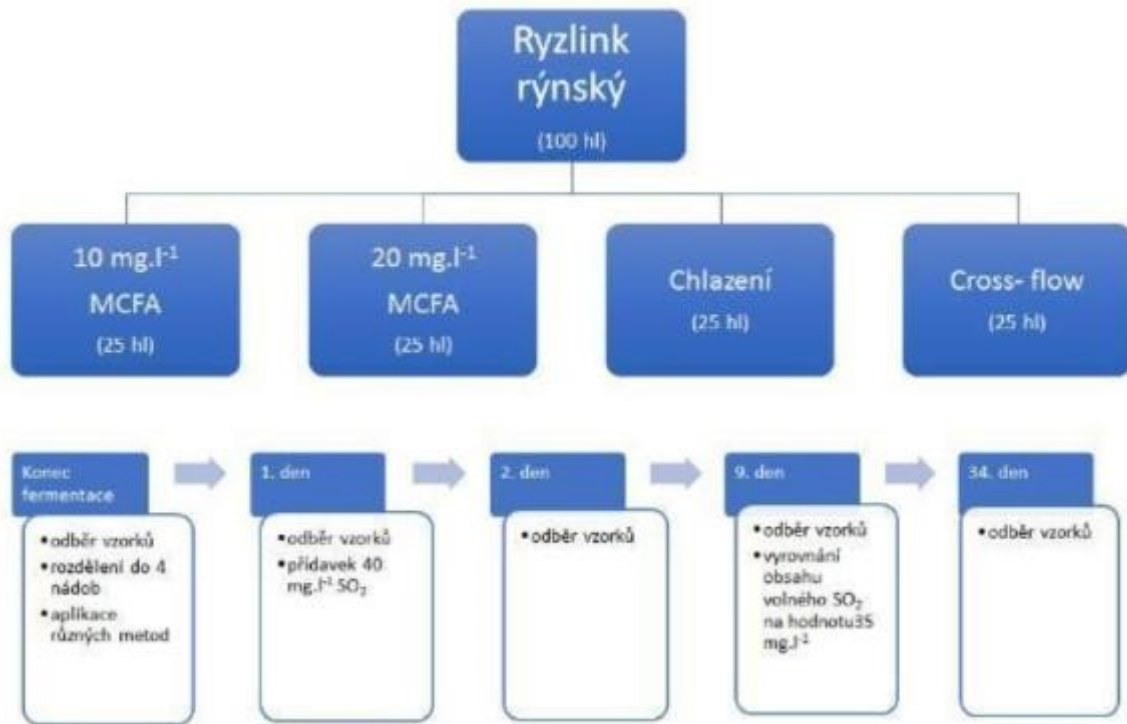
Tabulka 13: LSD test: obsah celkových karb. sloučenin (34. den)

LSD test (metoda nejmenších čtverců), Karbonylové sloučeniny celkem (mg/l), 34. den Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Metoda	Karbonyly celkem (mM) - průměr	1	2
1	10MCFA	1,064678	****	
2	20MCFA	1,089454	****	
4	CROSS	1,191304		****
3	CHILL	1,208398		****

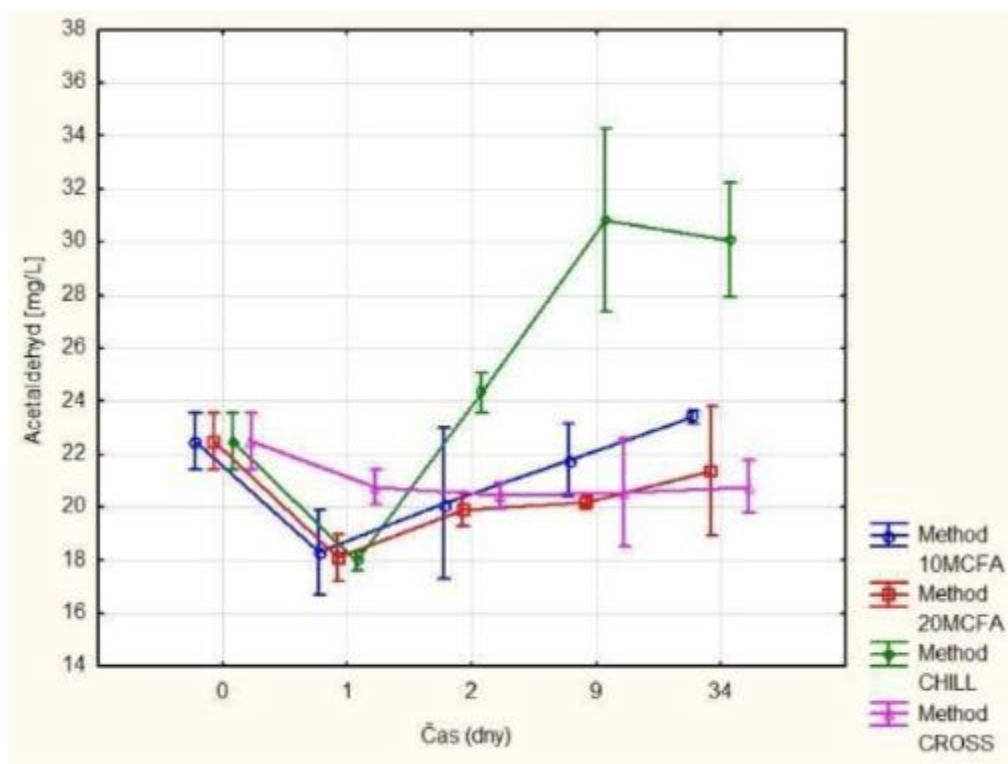
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce pro snížení obsahu karbonylových sloučenin ve víně, přičemž směs mastných kyselin se střední délkou řetězce obsahuje kombinaci alespoň dvou mastných kyselin vybraných ze skupiny sestávající z kyseliny kaprylové – C8, kyseliny kaprinové – C10 a kyseliny laurové – C12.
2. Použití podle nároku 1, kde směs mastných kyselin se střední délkou řetězce sestává z kombinace kyseliny kaprylové – C8 a kyseliny kaprinové – C10.
- 10 3. Použití podle nároku 2, kde směs mastných kyselin se střední délkou řetězce sestává z kombinace 50 % hmotn. kyseliny kaprylové – C8 a 50 % hmotn. kyseliny kaprinové – C10.
4. Použití podle nároku 2, kde kyselina kaprylová – C8 a kyselina kaprinová – C10 jsou v hmotnostním poměru 2:8.
- 15 5. Použití podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde se směs mastných kyselin se střední délkou řetězce přidá do fermentovaného vinného moštu na výslednou koncentraci směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce v rozmezí od 5 do 50 mg/l moštu, s výhodou od 5 do 25 mg/l moštu, nejvýhodněji v koncentraci 10 až 20 mg/l.
- 20 6. Použití podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde směs mastných kyselin se střední délkou řetězce je ve formě roztoku o koncentraci alespoň 10 g směsi mastných kyselin se střední délkou řetězce na 100 ml rozpouštědla, přičemž rozpouštědlo je vybrané ze skupiny zahrnující etanol a/nebo vodu, a přičemž mastné kyseliny se střední délkou řetězce jsou ve formě volných kyselin nebo jejich sodných nebo draselných solí.

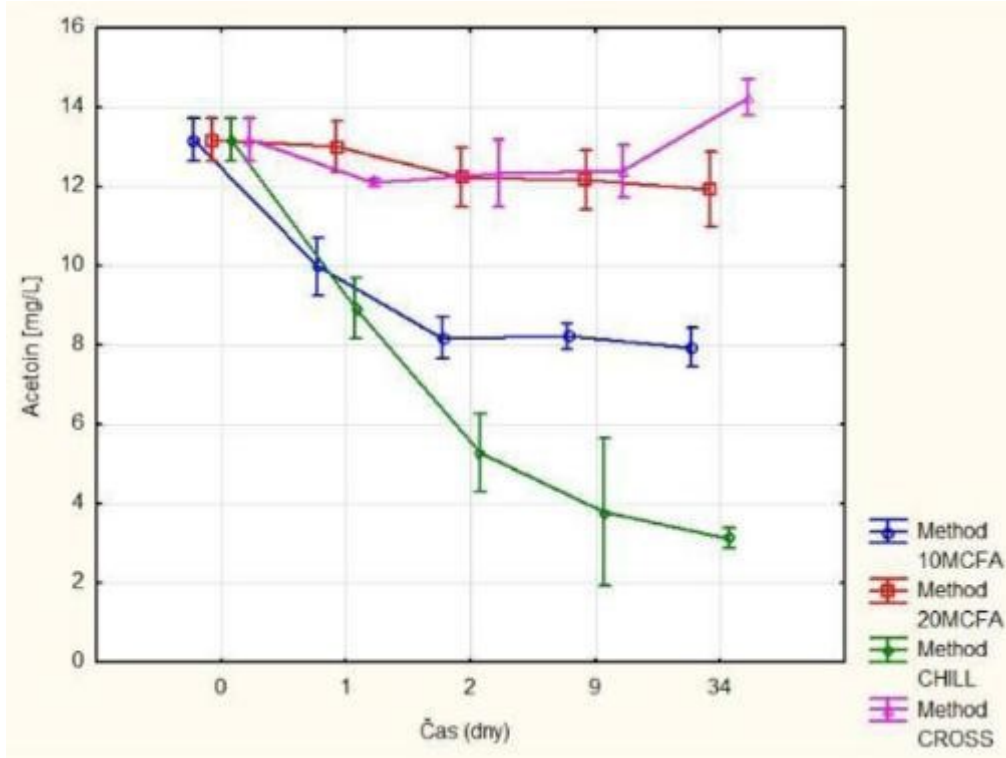
3 výkresy



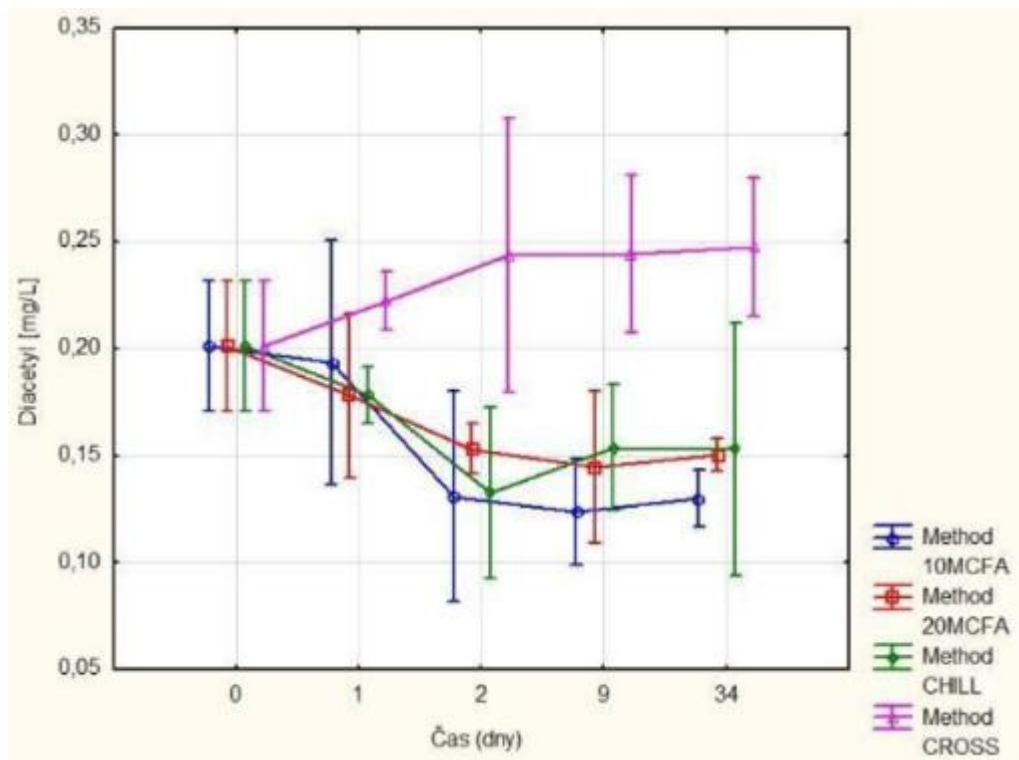
Obr. 1



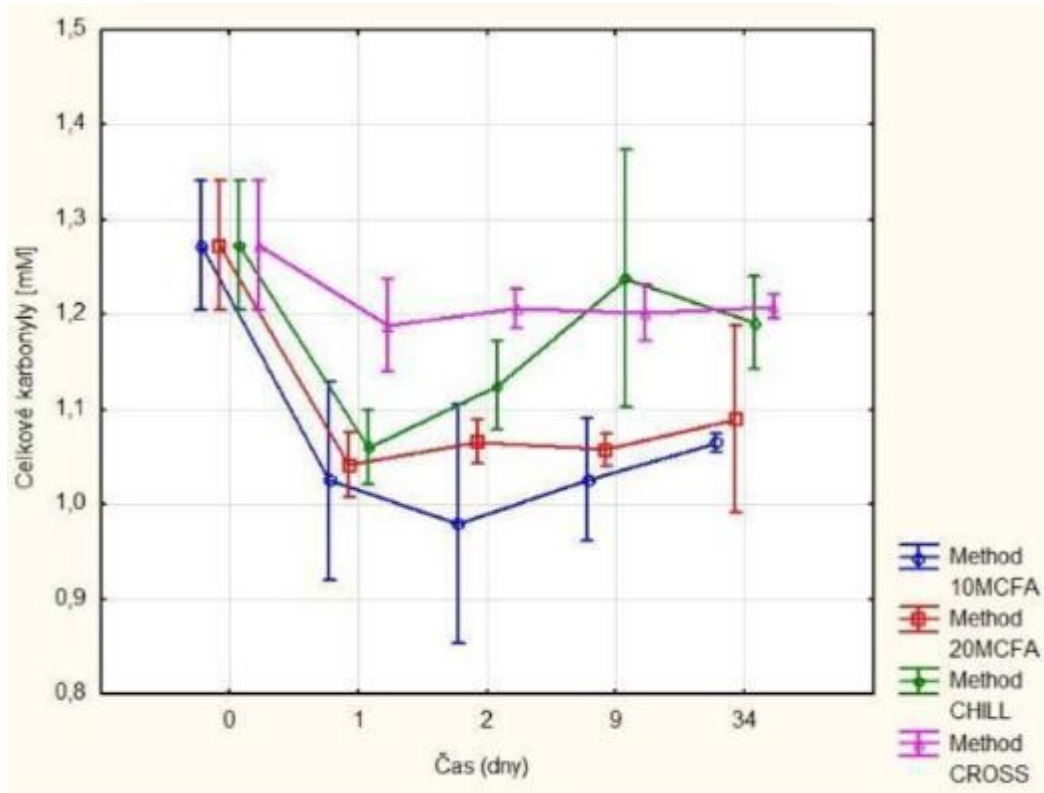
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5