

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
02 janvier 2020 (02.01.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/002833 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23L 2/56 (2006.01) A23L 27/12 (2016.01)
C12G 3/06 (2006.01) A23L 27/29 (2016.01)
C12C 5/02 (2006.01) A23L 33/175 (2016.01)
A23L 27/00 (2016.01)

MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2019/051574

(22) Date de dépôt international :

26 juin 2019 (26.06.2019)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1855786 27 juin 2018 (27.06.2018) FR

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(71) Déposants : OENOTROPIC INNOVATION [FR/FR] ;
45 Chemin des Lantanas, 97434 SAINT GILLES LES
BAINS (FR). NYSEOS [FR/FR] ; 53, rue Claude François,
34080 MONTPELLIER (FR).

(72) Inventeurs : BAUDOIN, Sacha ; 45 chemin des Lanta-
nas, 97434 SAINT GILLES LES BAINS (FR). BREYSSE,
Amélie ; Bât D - 4203, boulevard Paul Valéry, 34070
MONTPELLIER (FR). DELPECH, Stéphane ; 2700,
route de Mende, 34980 MONFERRIER-SUR-LEZ (FR).
DAGAN, Laurent ; 10, rue des Térébinthes, 34070 MONT-
PELLIER (FR).

(74) Mandataire : BREESE, Pierre ; IP TRUST, 2 rue de Cli-
chy, 75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

(54) Title: FLAVOUR RELEASER COMPRISING A PINEAPPLE EXTRACT AND A SULPHUR COMPOUND FOR PREPARATIONS CONTAINING AROMATIC PRECURSORS

(54) Titre : REVELATEUR D'AROMES COMPRENANT UN EXTRAIT D'ANANAS ET UN COMPOSE SOUFRE POUR PREPARATIONS CONTENANT DES PRECURSEURS AROMATIQUES

(57) Abstract: The present invention relates to a biological additive for treating preparations comprising aromatic precursors, in particular preparations based on vegetable musts and/or macerates such as wine, beer, fruit juices, beverages containing hops; this additive is particularly suitable for enhancing the intensity of the olfactory-taste perception of a beverage for consumption. More particularly, the invention relates to a flavour-releasing additive comprising a pineapple extract and a compound comprising a sulphur-containing compound at a concentration such that the concentration of free thiol in the reaction medium is at least 0.5 µM.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un additif biologique pour le traitement de préparations comprenant des précurseurs aromatiques, en particulier des préparations à base de moûts végétaux et/ou de macérats telles que le vin, la bière, les jus de fruits, les boissons à base de houblon; cet additif permet notamment d'amplifier l'intensité de la perception olfacto-gustative d'une boisson alimentaire. Plus particulièrement, l'invention concerne un additif révélateur d'arômes comprenant un extrait d'ananas et un composé comprenant un composé soufré à une concentration telle que la concentration en thiol libres dans le milieu réactionnel soit d'au moins 0,5 µM.



WO 2020/002833 A1

REVELATEUR D'AROMES COMPRENANT UN EXTRAIT D'ANANAS ET UN COMPOSE SOUFRE POUR PREPARATIONS CONTENANT DES PRECURSEURS AROMATIQUES

Domaine de l'invention

- 5 La présente invention a pour objet un additif biologique pour le traitement de préparations comprenant des précurseurs aromatiques, en particulier des préparations à base de moûts végétaux et/ou de macérâts telles que le vin, la bière, les jus de fruits, les boissons à base de houblon ; cet additif permet notamment d'amplifier l'intensité de la perception olfacto-gustative d'une boisson alimentaire.
- 10 Plus particulièrement, l'invention concerne un additif révélateur d'arômes comprenant un extrait d'ananas et un composé soufré ; il est ajouté à une concentration telle que la concentration en thiol libres dans le milieu réactionnel soit d'au moins 0,5 μM .

Etat de la technique

- 15 On connaît dans l'état de la technique la demande de brevet WO 2003/073868 décrivant des agents exhausteurs de goût pour aliments ou boissons qui contiennent un galacto-oligosaccharide à liaison α . Ces agents exhausteurs de goût permettent de renforcer le goût d'un aliment ou d'une boisson d'une manière consistant à atténuer l'aigreur, le goût amer, l'astringence et l'âpreté de l'aliment ou de
- 20 la boisson et/ou à renforcer l'arôme, la douceur et le goût inhérent des matières de l'aliment ou de la boisson.

- On connaît aussi la demande de brevet US 2012/0301593 décrivant l'utilisation d'extraits d'ananas comme intensifiant la saveur ainsi que des produits améliorant / aromatisant contenant soit des extraits d'ananas, soit des arômes artificiels d'ananas
- 25 sous forme concentrée.

- La demande de brevet WO 2009/032234 décrit l'utilisation d'extraits d'ananas comme renforçateurs de goût. Elle enseigne que la présence d'extraits d'ananas dans des produits alimentaires, combinés à au moins un autre agent aromatisant, permet d'obtenir des produits au goût renforcé mais dépourvu de tout arôme
- 30 d'ananas perceptible. L'invention porte sur des produits non alcooliques qui peuvent être utilisés comme digestifs, comme boissons rafraîchissantes.

La demande de brevet WO2008/018627 décrit un procédé de préparation d'un exhausteur de goût pour la bière, une boisson de type bière ou une boisson obtenue à partir d'une matière torréfiée. Ce procédé comprend les étapes de 1) chauffage d'une matière broyée de céréales, 2) le traitement de cette matière avec une protéase et 3) la récupération de l'extrait obtenu. Ledit extrait constitue l'exhausteur de goût qui peut être ajouté aux boissons précitées pour améliorer leurs goûts.

La demande de brevet JPH0678740A décrit un procédé de production d'un moût de brassage de bière, dans lequel une protéase est ajoutée. Cet ajout de protéase améliore la qualité de la bière, notamment son arôme.

Le brevet CN104099312 décrit une composition enzymatique liquide destinée au brassage de la bière et comprenant notamment 5-15 parts d'extrait de houblon, 5-10 parts de sucre, 5-8 parts d'extraits d'herbes chinoises, 4-6 parts d'un peptide antibactérien, 2-5 parts de polyol, 1-2 parts de sulfate d'ammonium, ainsi que 30-50 parts d'une préparation enzymatique liquide, 2-4 parts de glutathion et 0,5 parts de cystéine. La préparation enzymatique liquide peut être de la bromélaïne.

Inconvénients de l'art antérieur

Les solutions de l'art antérieur ont pour objectif soit de masquer les arômes naturels de la boisson, et sont utilisées comme agents de saveur, soit d'utiliser les propriétés des protéases pour améliorer l'arôme des boissons, soit simplement d'améliorer le brassage d'un moût végétal, mais cette application est limitée à la bière et autres boissons apparentées. Les résultats ne sont pas satisfaisants quel que soit le type de boisson, notamment pour le vin et la bière.

Avantages de l'invention

Les inventeurs ont mis en évidence que l'association d'un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et d'un acide aminé soufré ou d'un peptide comprenant un acide aminé soufré, constitue un additif révélateur d'arôme d'origine végétale actif notamment sur la bière, mais également sur d'autres types de boissons telles que le vin, les jus de fruits et les boissons à base de houblon.

A ce titre, l'invention concerne, selon son acception la plus générale, un révélateur d'arômes de préparations comprenant des précurseurs aromatiques, cet additif comprenant un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et un composé soufré.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention concerne un additif révélateur d'arômes pour préparations comprenant des précurseurs aromatiques, notamment des moûts végétaux et/ou de macérâts, caractérisé en ce qu'il comprend (i) un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et (ii) un composé soufré choisi parmi un acide aminé soufré ou un peptide comprenant un acide aminé soufré.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'additif révélateur d'arômes selon l'invention contient (i) un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et (ii) un composé soufré choisi parmi un acide aminé soufré ou un peptide comprenant un acide aminé soufré.

Par « révélateur d'arômes » au sens de l'invention, on entend un additif qui permet d'augmenter la perception des arômes naturels par exemple des moûts ou des macérâts sans ajout de molécules aromatiques. Sans être liés par une théorie, les inventeurs considèrent que l'additif selon l'invention permet de révéler les arômes par libération des thiols variétaux – composés naturellement présents dans les moûts et macérâts et responsables des arômes des boissons.

A titre d'exemple, les principaux thiols variétaux retrouvés dans les vins sont :

- le 3-mercapto-Hexanol ou 3MH dont les arômes rappellent le pamplemousse, les agrumes et les fruits exotiques ;
- l'acétate de 3-Mercapto-Hexyle ou A-3MH rappelant le buis et les fruits tropicaux ; et
- la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one ou 4MMP dont les arômes rappellent le buis.

La préparation peut être toute préparation qui contient des précurseurs de thiols aromatiques (aussi appelés thiols variétaux), telle qu'un moût végétal ou un macérât. La préparation peut contenir naturellement des précurseurs de thiols aromatiques ou ceux-ci peuvent avoir été ajoutés à la préparation, par exemple en ajoutant des précurseurs de thiols aromatiques synthétiques dans une préparation n'en contenant pas ou peu. Dans un mode de réalisation particulier, la préparation est une boisson.

A titre d'exemple, les moûts végétaux sont choisis parmi le vin, la bière ou les jus de fruits et les macérâts sont choisis parmi un macérât de houblon, de baie ou d'extrait de bourgeons. La boisson peut également être un mélange comprenant un moût végétal, ou un macérât ou un mélange des deux. La boisson dont l'arôme est révélé constitue le milieu réactionnel dans lequel l'additif a été ajouté.

L'invention peut également s'appliquer aux préparations aromatiques utilisées en parfumerie et tout autre domaine qui utilisent des moûts végétaux et/ou macérâts contenant des précurseurs aromatiques tel que la pharmacie, la cosmétique et la droguerie, cette liste n'étant pas exhaustive.

L'invention peut enfin s'appliquer à toute préparation dans laquelle des précurseurs de thiols variétaux ont été ajoutés afin d'apporter des arômes et pour lesquels on souhaite augmenter la perception dudit arôme, quelque soit la nature de la préparation.

L'extrait d'ananas présent dans l'additif révélateur d'arômes peut être obtenu à partir de différentes parties de l'ananas. On distingue deux grands types d'extraits en fonction de la nature de la bromélaïne qu'ils contiennent. Ainsi, on parle d'extrait d'ananas contenant de la bromélaïne de fruit (ou « fruit bromelain ») ou de la bromélaïne de tige (ou « stem bromelain »). Un « extrait d'ananas obtenu à partir du fruit » au sens de l'invention correspond à un extrait obtenu à partir de la peau, de la pulpe, de la chair et des feuilles de l'ananas. Un « extrait d'ananas obtenu à partir de la tige » au sens de l'invention correspond à un extrait obtenu à partir de la tige et des racines. De manière avantageuse, l'extrait d'ananas est issu du fruit de l'ananas et contient donc de la bromélaïne de fruit (fruit bromelain).

La présente invention repose sur la mise en évidence d'une action synergique entre un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et un acide aminé soufré sur la libération des thiols variétaux présents (initialement présents sous forme de précurseurs de thiols variétaux). Les inventeurs ont montré que pour optimiser la libération des thiols variétaux et donc la perception de l'arôme, il est nécessaire de maitriser la quantité de thiols libres présents dans la boisson avant l'ajout de l'additif.

Par « thiols libres » au sens de l'invention, on entend les thiols portés par la cystéine et/ou le glutathion.

Par « thiols aromatiques ou thiols variétaux », on entend les thiols libérés à partir de précurseurs de thiols aromatiques (ou précurseurs de thiols variétaux). Ces précurseurs sont inodores.

Lorsque le moût végétal ou le macérât comprend naturellement une quantité de thiols libres égale ou supérieure à 0,5 μM , la libération de thiols aromatiques peut être efficace sans ajout de l'additif Ceci peut être le cas pour la bière. Au contraire, lorsque la quantité de thiols présents dans le moût végétal ou le macérât est inférieure à 0,5 μM , il est très intéressant d'ajouter un additif selon l'invention pour augmenter la libération des thiols variétaux et donc de libérer plus d'arômes. Ceci est par exemple le cas du vin, mais également de la bière dans certains cas. La quantité de composé soufré ajoutée peut être ajustée en fonction de la teneur en thiols libres dans la préparation de départ. Cette quantité de composé soufré sera déterminée en tenant compte du fait que la concentration en thiols libres dans le milieu réactionnel doit être d'au moins 0,5 μM . Dans des modes de réalisation préférés, un additif est ajouté à la préparation lorsque la concentration en thiols libres dans le milieu réactionnel est d'au moins 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM ou 5 μM , par exemple d'au moins 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM ou 100 mM, voire 500 mM. Elle peut être égale à l'une de ces valeurs. La concentration en composé soufré n'est pas limitée par une borne supérieure et peut même être égale ou supérieure à 1M. La quantité de composé soufré à ajouter peut être adaptée par l'homme du métier en fonction des préparations considérées et de l'arôme recherché. Il est tout à fait possible d'ajouter un additif comprenant un composé soufré lorsque la concentration en thiol dans le moût ou macérât est égale ou supérieure à 0,5 μM pour optimiser la libération des thiols, le cas échéant.

On distingue donc la préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques qui est la préparation avant ajout de l'additif, du milieu réactionnel qui correspond à la préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques dans lequel l'additif a été ajouté.

5

Ainsi, lorsque le milieu réactionnel (boisson ou autre préparation contenant des précurseurs de thiols aromatiques) comprend moins de 0,5 μM de thiols libres, il est préconisé d'ajouter un additif selon l'invention pour élever la teneur en thiols libres au dessus de 0,5 μM et ainsi augmenter la perception des arômes.

10

Les inventeurs ont en particulier montré que l'ajout d'un additif révélateur d'arômes selon l'invention permet d'augmenter la libération, dans un milieu synthétique, dans un moût de bière et dans un moût de raisin, de thiols (notamment de thiols 3MH libres) qui sont des composés connus pour jouer un rôle majeur, notamment dans les

15

Un deuxième objet de l'invention concerne un procédé de préparation d'un additif révélateur d'arômes de préparations comprenant des précurseurs de thiols aromatiques consistant à :

20

- a. fournir une solution comprenant un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne ;
- b. ajouter une solution comprenant un composé soufré choisi parmi un acide aminé soufré et/ou un peptide comprenant un acide aminé soufré à la solution de l'étape a.

25

L'ajout de la solution de composé soufré et/ou sa concentration sont ajustées de sorte que la concentration en thiols libres dans le milieu réactionnel après ajout de l'additif soit d'au moins 0,5 μM .

30

L'extrait d'ananas peut être titré en bromélaïne de telle sorte qu'après l'ajout de l'additif au moût ou macérât, la concentration de l'extrait d'ananas dans le milieu réactionnel soit compatible avec les doses d'emploi usuelles des enzymes et protéases commerciales en œnologie et brasserie, soit de l'ordre 1 à 30 g / HL de milieu réactionnel. La quantité d'extrait d'ananas peut être adaptée par l'homme du

métier en fonction de la préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques considérée.

La détermination de la quantité de composés soufrés présente dans la préparation, comprenant des précurseurs de thiols aromatiques, notamment dans le moût ou macérât peut être réalisée soit au moment de l'ajout de l'additif, soit préalablement par type de boisson. Dans ce dernier cas, il est possible de préparer à l'avance des additifs adaptés aux différents types de préparations et de les ajouter sans étape de dosage de la quantité de thiols.

Ainsi, le composé soufré peut être ajouté au milieu réactionnel selon trois protocoles (non limitatifs) :

- (i) par ajout lors de l'étape de broyage/extraction telle que définie à l'Exemple 2, étape 1 ;
- (ii) par ajout pendant ou après l'étape de concentration/ filtration de l'extrait d'ananas telle que définie à l'Exemple 2, étape 2 ; ou
- (iii) par ajout dans le milieu réactionnel, avant, après ou simultanément à l'ajout de l'extrait d'ananas.

L'ajout du composé soufré peut être réalisé sous forme de poudre ou bien d'extraits riches en acide aminé soufré (écorce de levure sèche, crucifère, alliacés oignon, choux,...).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le composé soufré est ajouté simultanément à l'extrait d'ananas. De manière encore plus préférée, l'extrait d'ananas et le composé soufré sont préalablement mélangés dans une solution pour fournir un additif révélateur d'arômes prêt-à-l'emploi.

La présence du composé soufré dans le milieu réactionnel peut être obtenue par conversion ou bioconversion dans le milieu réactionnel de précurseurs dudit composé soufré.

Dans un autre mode de réalisation préféré du procédé, la préparation de précurseurs de thiols aromatiques est un moût végétal et/ou un macérât. Il peut notamment s'agir de vin, de bière ou de jus de fruits...

- 5 Un troisième objet de l'invention concerne un procédé de révélation des arômes d'une préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques consistant à ajouter une dose d'un additif selon l'invention à la préparation, lorsque la quantité de thiols libres dans ladite préparation est inférieure ou égale à 0,5 μM .
- 10 En d'autres termes, le procédé de révélation des arômes d'une préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques selon l'invention consiste à
- mesurer la concentration en thiols libres dans ladite préparation, puis
 - ajouter dans ladite préparation un additif tel que défini à l'une des revendications 1 à 4 lorsque la concentration en thiols libres dans le milieu
- 15 réactionnel est inférieur ou égale à 0,5 μM .

Il est à noter que l'ajout de l'additif est réalisé à température ambiante, c'est-à-dire à une température généralement comprise entre 15°C et 25°C, et inférieure à 37°C. Il n'est donc pas nécessaire de chauffer le moût pour que l'additif permette la

20 révélation des arômes.

Dans un mode de réalisation préféré, la préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques est une préparation à base de moût et/ou de macérât. Ce moût ou

25 macérât est de manière préférée une boisson telle que le vin, la bière, les jus de fruits...

La présente invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs de l'invention qui suivent.

30

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Effet de l'extrait enzymatique d'ananas non purifié sur la libération des thiols libres 4MMP et thiols totaux 3MH sur une solution de précurseurs (milieu synthétique).

- 5 **Figure 2 :** Effet de l'ajout de l'extrait enzymatique d'ananas purifié et/ou de cystéine sur la libération des thiols libres 3MH sur un moût de raisin blanc.

Figure 3 : Effet de l'ajout de l'extrait enzymatique d'ananas purifié sur la libération des thiols libres 3MH et thiols totaux 3MH sur un moût de bière.

10

PARTIE EXPERIMENTALE

EXEMPLE 1 : Caractérisation de l'extrait d'ananas: choix de la bromélaïne

- 15 Le choix de la forme optimale de la bromélaïne, une protéase à cystéine, constituant un principe actif de l'additif révélateur d'arômes de boissons fait partie de l'invention.

Le tableau ci-dessous présentent les différentes formes de bromélaïnes (en anglais « cysteine proteinases ») issus de la variété *Ananas comosus* répertoriés :

20

Nom scientifique ou commercial	Abbréviation	Masse moléculaire en Dalton	Point iso-électrique	Séquence	Glycolisation
Bromélaïne extraite de la tige					
Stem bromelain EC 3.4.22.32	F4 et F5	2800 (séquence + sucre)	>10	212 acides aminés	Glycosylé
Ananain EC 3.4.22.31	F9	23464 (séquence)	>10	216 acides aminés	Non Glycosylé
Comosain	F9/b	24509 et 23569	>10	N-term	Glycosylé

	SBA/a et SBA/b	23550 et 23560	4,8 et 4,9	N-term	Glycosylé
Bromélaïne extraite du fruit					
Fruit bromelain EC 3.4.22.33		23000	4,6	N-term	Non glocosylé

La bromélaïne se présente sous deux formes : une forme extraite du fruit, à savoir de la peau, de la pulpe, de la chair et des feuilles de l'ananas et appelée « fruit bromelain » et une forme extraite des racines et des tiges appelée « stem bromelain ».

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'extrait d'ananas comprend une bromélaïne extraite du fruit.

10 **EXEMPLE 2 : Extraction et pré-purification par filtration et ultrafiltration de l'activité enzymatique de l'extrait d'ananas**

La description qui suit présente un exemple non limitatif de procédé de préparation d'un additif selon l'invention.

15 **Etape 1 : Broyage et extraction**

100g de déchets d'ananas frais sont immergés dans 200 ml d'une solution de tampon phosphate 0,1M à pH 7 contenant de la cystéine à 15mM.

Le broyage est réalisé à vitesse maximale pendant 1 minute à l'aide d'un broyeur à ailettes en inox.

20 Le broyat est laissé au repos pendant 1 heure, puis centrifugé à 8000 tr/min pendant 20 minutes à +4°C.

Une spatule de poudre de Kieselguhrs est ajoutée au surnageant puis il est filtré sur papier filtre.

25 Pour obtenir l'extrait brut utilisé dans les expériences qui suivent, il est ensuite congelé et lyophilisé.

Etape 2 : Concentration/purification

Sur un aliquot de 50 mL d'extrait non congelé, les étapes suivantes sont appliquées :
L'extrait est concentré 5 fois à l'aide d'un pilote d'ultrafiltration muni d'une membrane avec un seuil de coupure de 10 kDa.

- 5 Une diafiltration contre un tampon phosphate 0,01 M pH 7 est ensuite réalisée.
Pour obtenir l'extrait purifié utilisé dans les expériences qui suivent, il est ensuite congelé et lyophilisé.

Etape 3 : Ajout de cystéine à la préparation d'extrait d'ananas

- 10 L'ajout d'acide aminé soufré peut être réalisé sous forme de poudre ou de l'ajout d'extraits riches en acide aminé soufré (écorce de levure sèche, crucifère, alliacés oignon, choux,...).

- Afin d'ajouter à la boisson un additif comprenant la quantité appropriée de composés soufrés, la quantité de ces composés (cystéine et glutathion sans être limitatif)
15 présente dans le milieu réactionnel est déterminé préalablement à l'ajout de l'additif.

EXEMPLE 3 : Effet de l'additif sur une solution de précurseurs (milieu synthétique)

- 20 Dans le cas d'une solution tampon d'acide tartrique à 3,5 g/L et pH 3,5, un extrait brut d'ananas riche en bromélaïne et obtenu selon l'étape 1 de l'exemple 2 est ajouté à une dose de 50 mg / ml dans la solution en présence de précurseur de thiols (1 μ M). Cet extrait brut est riche en cystéine. Les résultats sont présentés à la Figure 1.
25 On observe que la quantité de thiols libérés dans le milieu est augmentée en présence de cet extrait non purifié.

EXEMPLE 4 : Effet d'un révélateur d'arôme à base de bromélaïne et de cystéine sur un moût de raisin blanc

- 30 Dans le cas d'un mout de raisin blanc, un extrait végétal purifié riche en bromélaïne et obtenu selon les étapes 1 et 2 de l'Exemple 2 est ajouté à une dose de 10 mg / ml dans le moût. La somme des teneurs en cystéine et glutathion (thiols) présents

naturellement dans le mout de raisin est de 1,2 μM . Un ajout de cystéine à une concentration de 5mM dans le moût de raisin permet une augmentation de la libération des thiols libres 3MH par rapport à l'essai cystéine seule ou bien à l'essai protéase seule. Les résultats relatifs à cet extrait purifié sont présentés à la Figure 2.

5

Cet exemple montre que la teneur naturelle de ce moût de raisin en composés soufrés est insuffisante pour une bonne efficacité de l'extrait d'ananas sur la libération des thiols. D'autre part, l'association de l'extrait d'ananas purifié et d'une solution de cystéine permet d'augmenter de manière significative la quantité de thiols variétaux libérés.

10

EXEMPLE 5 : Effet de l'ajout d'un révélateur d'arôme à base d'extrait d'ananas comprenant de la bromélaïne sur un moût de bière

15

Dans le cas d'un moût de bière, la somme des teneurs en cystéine et glutathion (composés soufrés qui sont des porteurs de thiols libres) présents naturellement dans le moût de bière est de 1,9 μM .

Un extrait d'ananas purifié riche en bromélaïne et obtenu selon les étapes 1 et 2 de l'Exemple 2 est ajouté à une dose de 10 mg / ml dans le moût. La somme des teneurs en cystéine et glutathion (thiols libres) présents dans le milieu réactionnel est alors de 7,7 μM . On observe que la quantité de thiols variétaux libérés (3 MH libre et 3MH totaux) dans le milieu est augmentée en présence de cet extrait purifié.

20

Les résultats relatifs à ces essais sont présentés à la Figure 3.

25

Cet exemple montre que l'ajout de l'extrait enzymatique permet d'augmenter la libération des thiols variétaux. Ce résultat suggère que la teneur dans le milieu réactionnel en composés soufrés (thiols libres) est suffisante pour une bonne efficacité de l'extrait enzymatique, sans que l'ajout de cystéine ne soit nécessaire.

30

REVENDICATIONS

1 – Additif révélateur d'arômes pour préparations comprenant des précurseurs de thiols aromatiques caractérisé en ce qu'il comprend (i) un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne et (ii), un composé soufré choisi parmi un acide aminé soufré ou un peptide comprenant un acide aminé soufré.

2 – Additif révélateur d'arômes selon la revendication 1 dans lequel l'extrait d'ananas est obtenu à partir du fruit de l'ananas.

3 – Additif révélateur d'arômes selon l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel ledit acide aminé soufré est une cystéine.

4 - Additif révélateur d'arômes selon l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel ledit peptide comprenant acide aminé soufré est un glutathion.

5 – Procédé de préparation d'un additif révélateur d'arômes de préparations comprenant des précurseurs de thiols aromatiques consistant à :

a. fournir une solution comprenant un extrait d'ananas contenant de la bromélaïne ;

b. ajouter une solution comprenant un composé soufré choisi parmi un acide aminé soufré et/ou un peptide comprenant un acide aminé soufré à la solution de l'étape a..

6 - Procédé de révélation des arômes d'une préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques consistant à

- mesurer la concentration en thiols libres dans ladite préparation

- ajouter dans ladite préparation un additif tel que défini à l'une des revendications 1 à 4 lorsque la concentration en thiols libres dans le milieu réactionnel est inférieure à 0,5 μM .

7 – Procédé selon la revendication 6 dans lequel ledit additif est ajouté lorsque la quantité de thiols libres dans ladite préparation est inférieure ou égale à 1 μM .

5 8 –Procédé selon l'une des revendications 5 à 7 dans lequel ladite préparation comprenant des précurseurs de thiols aromatiques est une préparation à base de mouûts végétaux et/ou macérâts.

10 9 – Procédé selon la revendication 8 dans lequel ladite préparation est une boisson choisie parmi le vin, la bière et les jus de fruits.

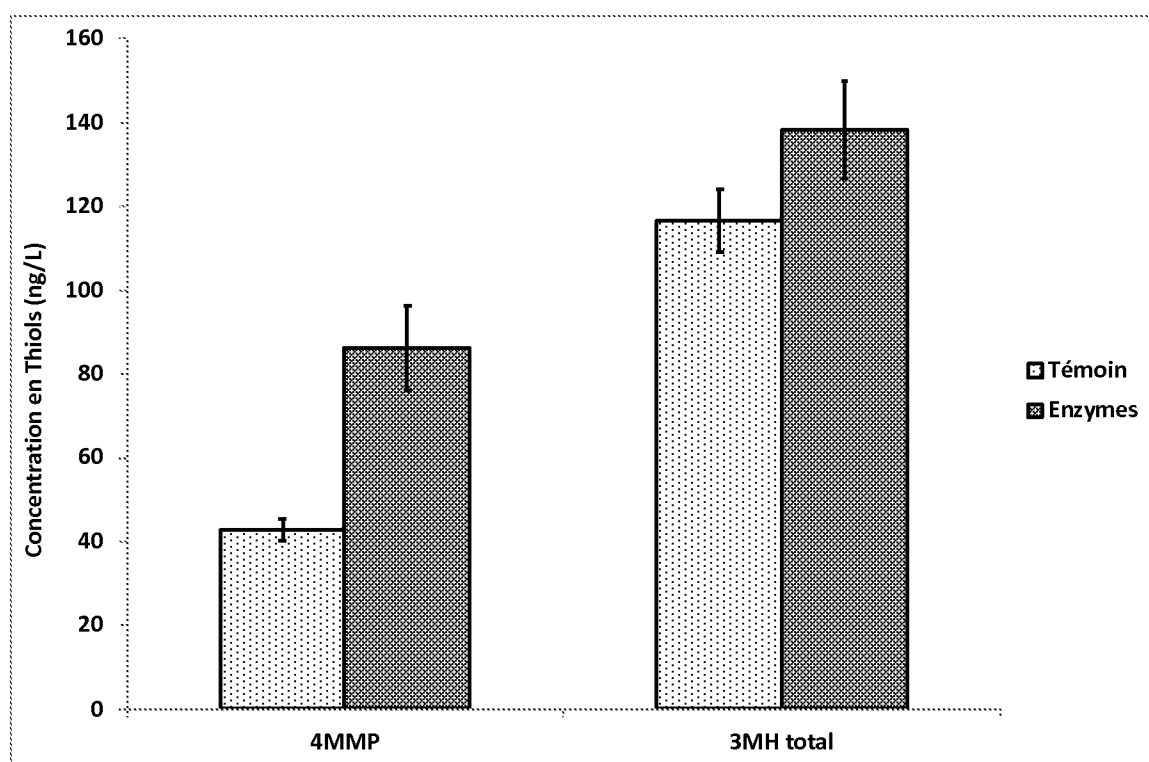


Figure 1

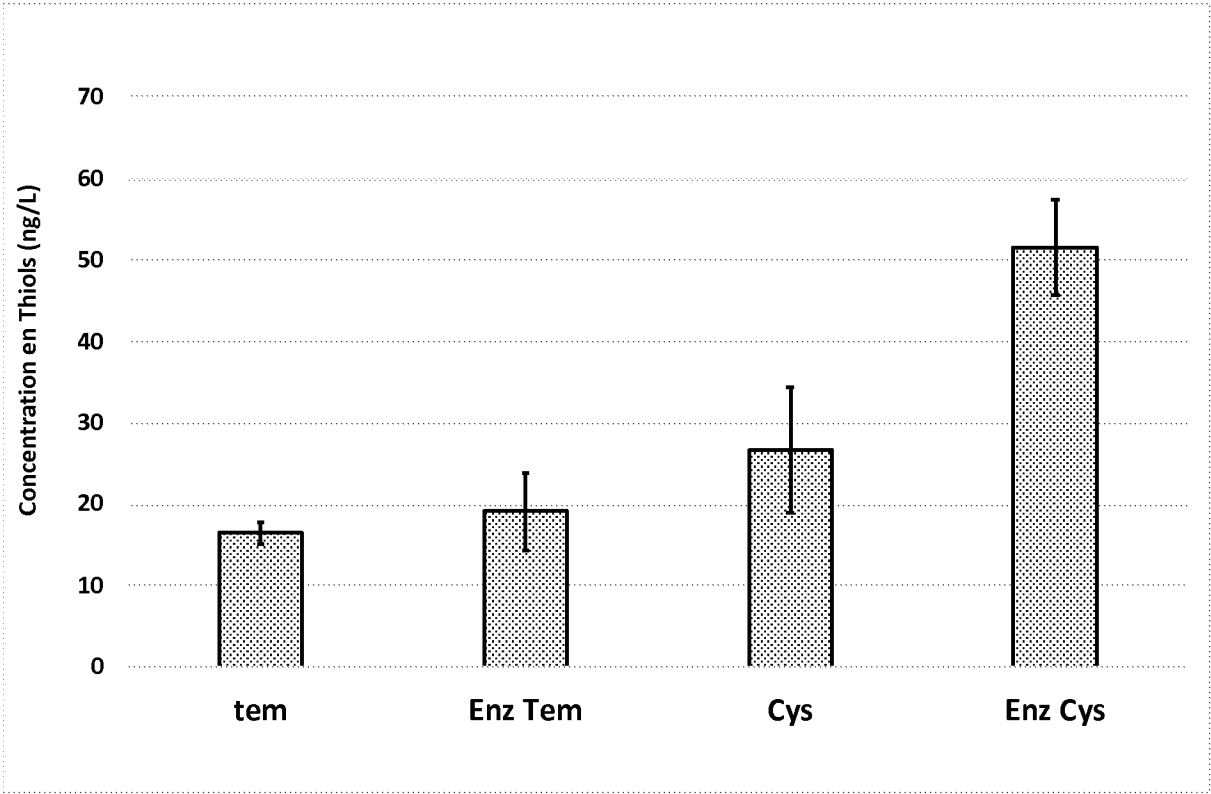


Figure 2

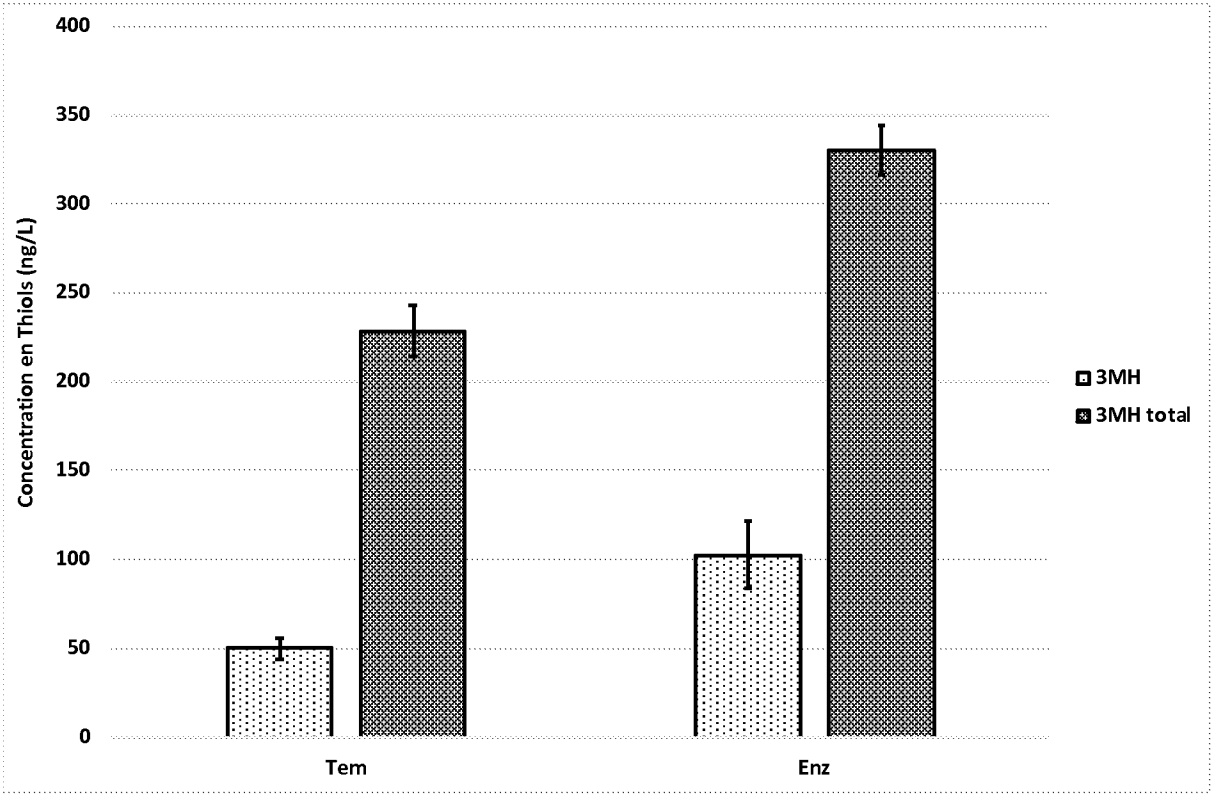


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/051574**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A23L 2/56(2006.01)i; **C12G 3/06**(2006.01)i; **C12C 5/02**(2006.01)i; **A23L 27/00**(2016.01)i; **A23L 27/12**(2016.01)i;
A23L 27/29(2016.01)i; **A23L 33/175**(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L; C12G; C12C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104099312 B (HUNAN XINHONGYING BIO ENGINEERING CO LTD) 24 August 2016 (2016-08-24) the whole document	1-9
X	US 3795745 A (BRENNER M) 05 March 1974 (1974-03-05) the whole document	1-9
X	CN 106754142 A (NINGXIA BEAUTY HABAHU ECOLOGY TRAVEL EXPL CO LTD) 31 May 2017 (2017-05-31) the whole document	1-3,5-9
X	DE 9412374 U1 (RAUCH PETZ GISELA G DR [DE]) 22 September 1994 (1994-09-22) the whole document	1-3
A	FR 2920156 A1 (BASF AG [DE]; FR DE LABORATOIRES D OENOLOGIE [FR]) 27 February 2009 (2009-02-27) the whole document	6,7
A	WO 02087360 A2 (NESTLE SA [CH]; ZHENG YING [US] ET AL.) 07 November 2002 (2002-11-07) the whole document	6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 2019

Date of mailing of the international search report

01 October 2019

Name and mailing address of the ISA/EP

**European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands**

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Piret-Viprey, E

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/051574**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2019063936 A1 (OENOTROPIC INNOVATION [FR] ET AL.) 04 April 2019 (2019-04-04) the whole document	1,2,4,5,8,9
A	US 3711292 A (SFAT M ET AL) 16 January 1973 (1973-01-16) the whole document	1,2
A	WO 2006061631 A1 (BIOCATALYSTS LTD [GB]; WILLIAMS HAYDN GREGG [GB]; GALLAGHER DENISE MAR) 15 June 2006 (2006-06-15) the whole document	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2019/051574

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104099312	B	24 August 2016	NONE			
US	3795745	A	05 March 1974	AT	329490	B	10 May 1976
				AU	3543971	A	17 May 1973
				BE	774929	A	01 March 1972
				CA	960980	A	14 January 1975
				CH	537978	A	15 June 1973
				CS	166703	B2	29 March 1976
				DD	95539	A5	12 February 1973
				DE	2158319	A1	28 September 1972
				DK	129858	B	25 November 1974
				ES	397413	A1	16 May 1974
				FI	49837	B	30 June 1975
				FR	2131259	A5	10 November 1972
				GB	1367947	A	25 September 1974
				IT	1053509	B	10 October 1981
				NL	7115489	A	26 September 1972
				OA	4057	A	30 September 1979
				PH	9286	A	13 August 1975
				US	3795745	A	05 March 1974
				ZA	7107423	B	26 July 1972
CN	106754142	A	31 May 2017	NONE			
DE	9412374	U1	22 September 1994	NONE			
FR	2920156	A1	27 February 2009	FR	2920156	A1	27 February 2009
				WO	2009024582	A1	26 February 2009
WO	02087360	A2	07 November 2002	AR	033199	A1	10 December 2003
				AR	033442	A1	17 December 2003
				AR	033443	A1	17 December 2003
				BR	0208259	A	09 March 2004
				BR	0208277	A	09 March 2004
				BR	0208302	A	09 March 2004
				CA	2441376	A1	07 November 2002
				CA	2441851	A1	03 October 2002
				CA	2441861	A1	03 October 2002
				CN	1529553	A	15 September 2004
				CN	1529554	A	15 September 2004
				CN	1635839	A	06 July 2005
				EP	1377173	A2	07 January 2004
				EP	1377174	A2	07 January 2004
				EP	1377175	A2	07 January 2004
				JP	4181411	B2	12 November 2008
				JP	4188090	B2	26 November 2008
				JP	4405731	B2	27 January 2010
				JP	2004518449	A	24 June 2004
				JP	2004519550	A	02 July 2004
				JP	2004526027	A	26 August 2004
				KR	20030086317	A	07 November 2003
				KR	20030096284	A	24 December 2003
				KR	20040016846	A	25 February 2004
				MX	PA03008547	A	08 December 2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2019/051574

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				MX	PA03008548	A 08 December 2003
				MX	PA03008549	A 08 December 2003
				MY	129402	A 30 March 2007
				MY	129696	A 30 April 2007
				MY	135338	A 31 March 2008
				NO	326124	B1 29 September 2008
				NO	326428	B1 08 December 2008
				NO	326884	B1 16 March 2009
				RU	2300902	C2 20 June 2007
				RU	2300903	C2 20 June 2007
				RU	2326550	C2 20 June 2008
				UA	74247	C2 15 November 2005
				UA	74433	C2 15 December 2005
				UA	84670	C2 25 November 2008
				US	2004076737	A1 22 April 2004
				US	2004081736	A1 29 April 2004
				WO	02076237	A2 03 October 2002
				WO	02076239	A2 03 October 2002
				WO	02087360	A2 07 November 2002
				ZA	200308236	B 30 March 2005
				ZA	200308239	B 30 March 2005
				ZA	200308240	B 30 March 2005
WO	2019063936	A1	04 April 2019	FR	3071504	A1 29 March 2019
				WO	2019063936	A1 04 April 2019
US	3711292	A	16 January 1973	NONE		
WO	2006061631	A1	15 June 2006	EP	1833306	A1 19 September 2007
				GB	2421890	A 12 July 2006
				US	2009324777	A1 31 December 2009
				WO	2006061631	A1 15 June 2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2019/051574

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23L2/56 C12G3/06 C12C5/02 A23L27/00 A23L27/12 A23L27/29 A23L33/175 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A23L C12G C12C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 104 099 312 B (HUNAN XINHONGYING BIO ENGINEERING CO LTD) 24 août 2016 (2016-08-24) le document en entier	1-9
X	US 3 795 745 A (BRENNER M) 5 mars 1974 (1974-03-05) le document en entier	1-9
X	CN 106 754 142 A (NINGXIA BEAUTY HABAHU ECOLOGY TRAVEL EXPL CO LTD) 31 mai 2017 (2017-05-31) le document en entier	1-3,5-9
X	DE 94 12 374 U1 (RAUCH PETZ GISELA G DR [DE]) 22 septembre 1994 (1994-09-22) le document en entier	1-3
	-/-	
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 septembre 2019		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 01/10/2019
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Piret-Viprey, E

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 920 156 A1 (BASF AG [DE]; FR DE LABORATOIRES D OENOLOGIE [FR]) 27 février 2009 (2009-02-27) le document en entier -----	6,7
A	WO 02/087360 A2 (NESTLE SA [CH]; ZHENG YING [US] ET AL.) 7 novembre 2002 (2002-11-07) le document en entier -----	6,7
X,P	WO 2019/063936 A1 (OENOTROPIC INNOVATION [FR] ET AL.) 4 avril 2019 (2019-04-04) le document en entier -----	1,2,4,5, 8,9
A	US 3 711 292 A (SFAT M ET AL) 16 janvier 1973 (1973-01-16) le document en entier -----	1,2
A	WO 2006/061631 A1 (BIOCATALYSTS LTD [GB]; WILLIAMS HAYDN GREGG [GB]; GALLAGHER DENISE MAR) 15 juin 2006 (2006-06-15) le document en entier -----	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2019/051574

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 104099312	B	24-08-2016	AUCUN	
US 3795745	A	05-03-1974	AT 329490 B	10-05-1976
			AU 3543971 A	17-05-1973
			BE 774929 A	01-03-1972
			CA 960980 A	14-01-1975
			CH 537978 A	15-06-1973
			CS 166703 B2	29-03-1976
			DD 95539 A5	12-02-1973
			DE 2158319 A1	28-09-1972
			DK 129858 B	25-11-1974
			ES 397413 A1	16-05-1974
			FI 49837 B	30-06-1975
			FR 2131259 A5	10-11-1972
			GB 1367947 A	25-09-1974
			IT 1053509 B	10-10-1981
			NL 7115489 A	26-09-1972
			OA 4057 A	30-09-1979
			PH 9286 A	13-08-1975
			US 3795745 A	05-03-1974
			ZA 7107423 B	26-07-1972
CN 106754142	A	31-05-2017	AUCUN	
DE 9412374	U1	22-09-1994	AUCUN	
FR 2920156	A1	27-02-2009	FR 2920156 A1	27-02-2009
			WO 2009024582 A1	26-02-2009
WO 02087360	A2	07-11-2002	AR 033199 A1	10-12-2003
			AR 033442 A1	17-12-2003
			AR 033443 A1	17-12-2003
			BR 0208259 A	09-03-2004
			BR 0208277 A	09-03-2004
			BR 0208302 A	09-03-2004
			CA 2441376 A1	07-11-2002
			CA 2441851 A1	03-10-2002
			CA 2441861 A1	03-10-2002
			CN 1529553 A	15-09-2004
			CN 1529554 A	15-09-2004
			CN 1635839 A	06-07-2005
			EP 1377173 A2	07-01-2004
			EP 1377174 A2	07-01-2004
			EP 1377175 A2	07-01-2004
			JP 4181411 B2	12-11-2008
			JP 4188090 B2	26-11-2008
			JP 4405731 B2	27-01-2010
			JP 2004518449 A	24-06-2004
			JP 2004519550 A	02-07-2004
			JP 2004526027 A	26-08-2004
			KR 20030086317 A	07-11-2003
			KR 20030096284 A	24-12-2003
			KR 20040016846 A	25-02-2004
			MX PA03008547 A	08-12-2003
			MX PA03008548 A	08-12-2003
			MX PA03008549 A	08-12-2003
			MY 129402 A	30-03-2007
			MY 129696 A	30-04-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2019/051574

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		MY 135338 A	31-03-2008
		NO 326124 B1	29-09-2008
		NO 326428 B1	08-12-2008
		NO 326884 B1	16-03-2009
		RU 2300902 C2	20-06-2007
		RU 2300903 C2	20-06-2007
		RU 2326550 C2	20-06-2008
		UA 74247 C2	15-11-2005
		UA 74433 C2	15-12-2005
		UA 84670 C2	25-11-2008
		US 2004076737 A1	22-04-2004
		US 2004081736 A1	29-04-2004
		WO 02076237 A2	03-10-2002
		WO 02076239 A2	03-10-2002
		WO 02087360 A2	07-11-2002
		ZA 200308236 B	30-03-2005
		ZA 200308239 B	30-03-2005
		ZA 200308240 B	30-03-2005

WO 2019063936 A1	04-04-2019	FR 3071504 A1	29-03-2019
		WO 2019063936 A1	04-04-2019

US 3711292 A	16-01-1973	AUCUN	

WO 2006061631 A1	15-06-2006	EP 1833306 A1	19-09-2007
		GB 2421890 A	12-07-2006
		US 2009324777 A1	31-12-2009
		WO 2006061631 A1	15-06-2006
