



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 839**

② Número de solicitud: 201030846

⑤ Int. Cl.:

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12G 1/02** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **02.06.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**23.12.2011**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **López de Felipe Toledano, Félix;**  
**Muñoz Moreno, M. Rosario y**  
**Curriel Gámiz, J. Antonio**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Uso de bacterias lácticas para conservar los flavanoles de un producto alimenticio y prevenir el pardeamiento del vino.**

⑤ Resumen:

Uso de bacterias lácticas para conservar los flavanoles de un producto alimenticio y prevenir el pardeamiento del vino.

La presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para conservar mayor cantidad de flavanoles, preferiblemente (+)-catequina y/o (-)-epicatequina, en al menos un producto alimenticio así como también para disminuir el pardeamiento de al menos un tipo de vino, con respecto a un control, donde preferiblemente dicho vino es blanco.

## DESCRIPCIÓN

Uso de bacterias lácticas para conservar los flavanoles de un producto alimenticio y prevenir el pardeamiento del vino.

La presente invención se encuadra dentro del campo del sector alimentario, en concreto, la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio así como también para disminuir el pardeamiento de al menos un vino, con respecto a un control.

**Estado de la técnica anterior**

Los flavanoles (también conocidos como flavan-3-ol) son una clase de flavonoides que tienen la estructura 2-fenil-3,4-dihidro-2H-cromen-3-ol. Estos compuestos incluyen catequina y epicatequina. En la naturaleza se encuentran mayoritariamente las formas (+) catequina y (-) epicatequina. Los flavanoles, al contrario que los flavonoles, no contienen el grupo cetona. Los flavonoides que no contienen el grupo polifenol poli-hidroxi cetona se conocen más específicamente con el término de flavanoide o flavan-3-ol. Los flavanoles son precursores de proantocianidinas. Tienen dos carbonos quirales, es decir, que hay 4 diastereoisómeros para cada uno de ellos.

Los flavonoides (tanto los flavonoles como los flavanoles) son conocidos por su actividad antioxidante. Las catequinas han sido relacionadas con la prevención de cáncer y dichos compuestos se han encontrado en fresas, té verde y té negro. La epicatequina se ha relacionado con la inhibición de la diarrea (Schuier *et al.*, 2005. *J. Nutr.*, 135(10): 2320-5). Además, la epicatequina mejora el flujo sanguíneo y por tanto puede suponer la mejora de pacientes con enfermedades del corazón. La epicatequina se ha encontrado en el cacao, alcanzando casi el doble de concentración que en el vino y más de tres veces que en el té verde (Lee *et al.*, 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (25): 7292-5). Por tanto, en el estado de la técnica se muestra un interés claro en la generación de productos alimenticios con propiedades beneficiosas para la salud, especialmente para la prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, es conocido que la degradación oxidativa de catequina y epicatequina en vinos es responsable del pardeamiento de los mismos. Los métodos utilizados para prevenir el oscurecimiento o pardeamiento del vino, así como de alimentos vegetales, se agrupan en métodos físico-químicos y biológicos. El método más importante y ampliamente utilizado para prevenir el pardeamiento es el uso de sulfitos debido a su capacidad antioxidante. Sin embargo, debido a las objeciones relacionadas con la salud derivadas del uso de sulfitos, la Organización Mundial de la Salud (W.H.O) y la Organización Mundial de la Viña y el Vino (O.I.V) han implementado restricciones regulatorias sobre su uso. Además, los productores de vino han encontrado que el uso extensivo de sulfitos compromete la calidad del vino al proporcionar cualidades organolépticas no deseables al producto. Como sustituto de los sulfitos para prevenir el pardeamiento del vino se ha utilizado ampliamente el ácido ascórbico. No obstante una vez que el ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico, las quinonas se pueden acumular y sufrir pardeamiento. Además estudios recientes están aportando evidencia de que el ácido ascórbico posee actividad prooxidante y puede causar una aceleración del pardeamiento en combinación con los sulfitos. Aparte de estos métodos ampliamente utilizados, para evitar el pardeamiento del vino se han descrito otras prácticas menos frecuentes o caras, como someter el vino al contacto con resinas de intercambio iónico, el uso de carbón activo, el uso de quitosano (un subproducto de la industria pesquera) o el uso de escleroproteínas bovinas. Otro método está basado en la hiperoxidación del mosto para oxidar sus compuestos fenólicos, sin embargo este método es difícil de estandarizar y además destruye los compuestos fenólicos, por lo que el método disminuiría el valor nutritivo del vino.

Es conocida la capacidad de levaduras fermentativas para prevenir el pardeamiento de soluciones vínicas modelo y del vino (López-Toledano *et al.*, 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1631-1635; Chamka *et al.*, 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3179-3184; Shinohara *et al.*, 2000. *J. Biosci. Bioeng.*, 90: 90-97; Fugelsang *et al.*, 2007. *Microbial Ecology During Vinification. In Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures. Second Edition: Fugelsang, K., Edwards, Ch., Eds. Springer US: New York, pp. 90*). El uso de levaduras podría funcionar en vinos del tipo Sherry en los cuales las levaduras están presentes después de la fermentación alcohólica. Esta propiedad ha sido atribuida a la capacidad de las paredes celulares para adsorber polímeros de color marrón (Razmkhab *et al.*, 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 7432-7437; Morata *et al.*, 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4084-4088) o disminuir su producción por adsorción de intermediarios incoloros de la reacción (Mazauric *et al.*, 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5647-5653; Mazauric *et al.*, 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3876-3881). Basándose en estas capacidades de las levaduras varios autores han desarrollado estrategias (Bonilla *et al.*, 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1928-1933) para reducir el pardeamiento del vino. Sin embargo el uso de levaduras para este fin podría alterar las cualidades organolépticas del vino debido a su capacidad para la formación de aromas indeseables.

Por tanto, hay un interés creciente en la búsqueda de productos alimenticios que tengan flavonoides, entre los cuales se encuentran los flavanoles catequina y/o epicatequina para la mejora de la salud de los consumidores. Así mismo, el pardeamiento del vino es un problema que debe ser solucionado con herramientas no perjudiciales para la salud de los consumidores y que no alteren las características organolépticas de los mismos.

## Explicación de la invención

La presente invención provee el uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control. Además también se refiere al uso de dicha bacteria láctica para disminuir el pardeamiento de al menos un vino, con respecto a un control.

En la presente invención se muestra el efecto técnico producido por la adición de un tipo de bacteria láctica a un producto alimentario como por ejemplo el vino. Dicho efecto técnico es la mayor conservación de los flavanoles presentes en dicho producto alimenticio, respecto de un control. Además, otro problema técnico asociado que se soluciona mediante el procedimiento de la presente invención es la disminución del pardeamiento de los vinos a los que se les añade dicha bacteria láctica.

Las ventajas técnicas que presenta conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, como consecuencia de la adición de una bacteria láctica a dicho producto alimenticio son:

- La obtención de productos alimenticios con capacidad antioxidante mayor. La ingestión de estos alimentos supone el refuerzo de la salud del consumidor.

- Prevenir la formación de pigmentos de xantilio ya que se impide la oxidación de dichos flavanoles. Dicha prevención va asociada con la prevención de la aparición de pardeamiento en el vino.

- De esta manera se evita la adición de compuestos tóxicos para la salud como la adición de sulfitos a productos alimenticios como por ejemplo el vino. Esto permite el uso de dichas bacterias lácticas en vinos ecológicos.

- La adición de bacterias lácticas al vino no produce alteraciones organolépticas del producto.

- Mejor aceptación por el consumidor de los productos alimenticios obtenidos por el procedimiento que se describe en la presente invención frente a los obtenidos con los métodos basados en preservativos químicos tradicionales.

Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control. Así mismo, dicha bacteria puede usarse para aumentar la cantidad de proantocianidina, también denominada como procianidina, proantocianidina oligomérica, leukocianidina o leucoantocianina. Las proantocianidinas son dímeros, trímeros, oligómeros o polímeros de flavanoles.

El término GRAS procede de las siglas de la expresión "*Generally Recognized As Safe*". Esta designación GRAS es obra de la FDA (*American Food and Drug Administration*) y significa que la adición del producto químico o la sustancia a la que se refiere, es considerada segura por los expertos de dicha organización.

La bacteria láctica pertenece al orden *Lactobacillales*. Las bacterias lácticas conocidas pertenecen a este orden. La bacteria láctica tiene la siguiente clasificación filogenética:

Dominio: *Bacteria* / Filo: *Firmicutes* / Clase: *Bacilli* / Orden: *Lactobacillales*.

La bacteria láctica del orden *Lactobacillales* produce ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación del azúcar. Estas bacterias se usan de forma habitual en la producción de productos lácteos fermentados, como yogur, queso, manteca, crema de leche, kéfir, koumiss, o vino (para llevar a cabo la fermentación maloláctica).

Este orden está formado por las familias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*.

La familia *Lactobacillae* está formada por los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus*. Se encuentran regularmente en la mucosa del tracto intestinal de humanos y de otros animales, en alimentos y productos lácteos, así como en zumos vegetales fermentados.

Varios trabajos previos han demostrado que tanto la catequina como la epicatequina interaccionan con distintos tipos de bicapas lipídicas que se utilizaron como membranas celulares modelo (Nakayama *et al.*, 2000. *Biofactors* 13: 147-151; Caturla *et al.*, 2003. *Free Radical Biology & Medicine*, 34: 648-662; Sirk *et al.*, 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7750-7758). En uno de estos trabajos (Caturla *et al.*, 2003. *Free Radical Biology & Medicine*, 34: 648-662), entre las diferentes bicapas lipídicas utilizadas, algunas se usaron como membranas bacterianas modelo debido a su composición en fosfolípidos. En todos los casos examinados, y a pesar de que las membranas modelo tenían diferente composición lipídica, catequina y epicatequina se incorporan en la bicapa lipídica. La absorción de catequina y epicatequina en la bicapa lipídica es por tanto un mecanismo general de interacción de estos flavanoles con las membranas celulares y consecuentemente puede ser extendido al grupo de bacterias lácticas.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, donde la bacteria láctica de grado GRAS es una bacteria del género *Lactobacillus*. La especie del género *Lactobacillus* se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus salivarius*. Según una realización más preferida, la bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus mali*.

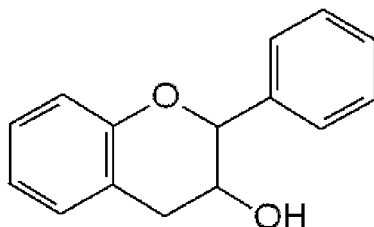
La familia *Leuconostocaceae* está formada por los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* o *Weissella*.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, donde la bacteria láctica de grado GRAS es una bacteria del género *Leuconostoc*. La especie del género *Leuconostoc* se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc durionis*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc fructosum*, *Leuconostoc garlicum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc pseudoficulneum* o *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Según una realización más preferida, la bacteria láctica es *Leuconostoc mesenteroides*.

En cualquier producto alimenticio que contenga flavanoles se produce la oxidación de los mismos, por tanto, como consecuencia, dichos productos pierden flavanoles y, como última consecuencia, el producto alimenticio disminuye su capacidad de actuar como antioxidante por medio de la acción de algunos de sus compuestos. Por tanto, la presente invención se refiere a la conservación de mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control.

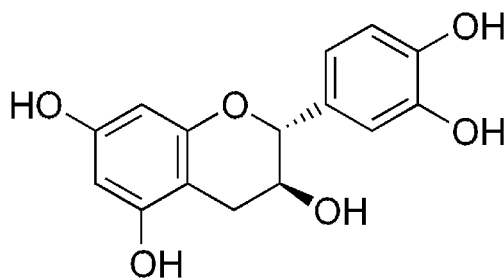
En la presente invención, el término "control" se refiere a un producto alimenticio al que no se añade la bacteria láctica GRAS. El producto alimenticio control es una alícuota del producto alimenticio tratado.

Los flavanoles son compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides, que son compuestos polifenólicos, y que comparten un núcleo común. Dentro de los flavanoles se encuentran los flavan-3-oles, cuya estructura química básica es,



Y dentro de los compuestos flavan-3-oles se encuentran las catequinas, que tienen dos centros quirales pudiendo formar los siguientes cuatro diastereoisómeros:

La (+)-catequina, que tiene la siguiente estructura,



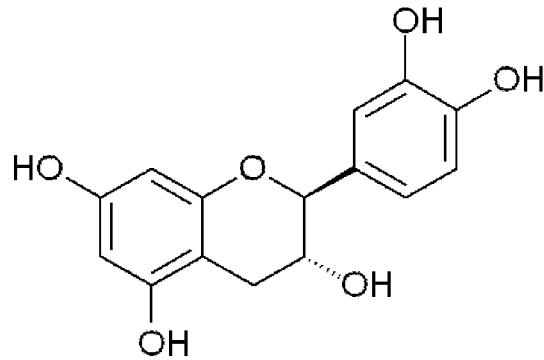
## ES 2 370 839 A1

La (-)-catequina, que tiene la siguiente estructura,

5

10

15



Por "catequina" se denomina e a partir de ahora a (+)-catequina ó (-)-catequina.

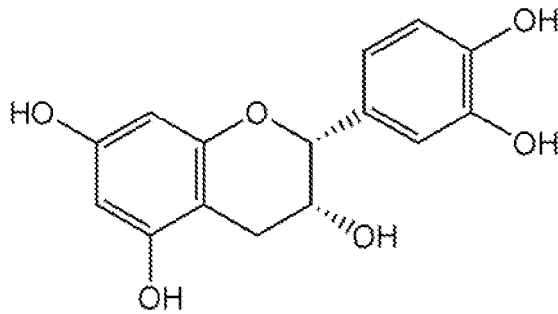
20

La (-)-epicatequina, que tiene la siguiente estructura,

25

30

35



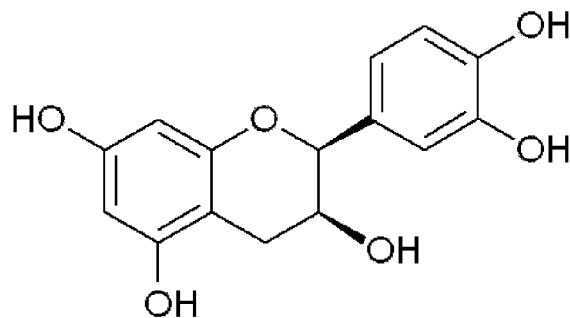
Y la (+)-epicatequina, que tiene la siguiente estructura,

40

45

50

55



Por "epicatequina" se denomina a partir de ahora a (+)-epicatequina ó (-)-epicatequina.

Otra realización preferida se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, donde los flavanoles son catequina y/o epicatequina. Según una realización más preferida, los flavanoles son (+)-catequina y/o (-)-epicatequina. Estos flavanoles son los que se encuentran de forma mayoritaria en la naturaleza.

El término "producto alimenticio" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un alimento como artículo de consumo humano o animal. Preferiblemente el producto alimenticio es para consumo humano. En este sentido conviene diferenciar este término del término "producto alimentario" que se refiere a cualquier materia no nociva, en sentido absoluto o relativo, que, sin valor nutritivo, puedan ser utilizadas en la alimentación, tanto humana como animal, incluyendo por tanto, aditivos, desinfectantes, envases, embalajes o útiles alimentarios.

El producto alimenticio se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, productos alimenticios manufacturados industrialmente por fermentación de bacterias lácticas (por ejemplo, pero sin limitarse, productos derivados de la leche, zumos, vino o cerveza), productos de origen vegetal no fermentados como por ejemplo, pero sin limitarse, zumos o frutas (como por ejemplo, pero sin limitarse, manzana, pera, plátano, berenjena, aguacate o lichi).

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, donde el producto alimenticio comprende al menos un producto de origen vegetal. Es decir, el producto alimenticio contiene un producto de origen vegetal sólo o junto con otros productos de origen vegetal o con otros productos de distinto origen (como por ejemplo, pero sin limitarse, de origen animal) o con otros compuestos. Los compuestos que acompañan al producto de origen vegetal pueden ser de origen natural o artificial y pueden mejorar las condiciones de conservación del producto de origen vegetal.

Una realización más preferida se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, donde el producto alimenticio es vino. Según una realización aún más preferida, el vino es tinto o blanco. Según otra realización aún más preferida, el vino es ecológico.

El vino tinto puede proceder de un vino elaborado con el fruto de cualquiera de las variedades tintas de *vitis vinifera* conocidas por el experto en la materia o de cualquiera de sus combinaciones.

El vino ecológico es aquel vino que procede de uva ecológica. Las uvas ecológicas provienen de viñas manejadas con el método de la agricultura ecológica, como se define también a nivel Europeo, por el Reglamento CE 2092/91. Los vinos elaborados a partir de uva ecológica son aquellos contenidos en el Reglamento CE 1493/1999 (anexos 4 y 5) y 1622/2000, que define las prácticas enológicas y los tratamientos permitidos para vinos en Europa.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un vino, con respecto a un control, donde la bacteria láctica se añade al vino en cualquier momento de la elaboración del mismo. Según una realización más preferida, la bacteria láctica del género *Lactobacillus* se añade cuando el vino tiene al menos un 9% de contenido alcohólico. Tal como se ha demostrado en el estado de la técnica (Sieiro *et al.*, 1990. Appl. Environ. Microb., 56: 2936-2938), las bacterias de este género se encuentran presentes de forma natural en los vinos, después de la fermentación alcohólica, y en dichas condiciones dichas bacterias no son capaces de proliferar, por tanto no se producen cambios en las características organolépticas de los vinos. El fin de la fermentación alcohólica puede ser debido al agotamiento de la fuente de azúcares que la levadura utiliza, o como consecuencia de la adición de inhibidores o supresores de la actividad fermentativa de las levaduras o la lisis de las mismas. Por otra parte, dependiendo del contenido de azúcares, medido generalmente como grados Baumé o grados Brix, se pueden alcanzar diferentes contenidos de alcohol. El porcentaje establecido en esta realización preferida pretende cubrir vinos blancos o tintos con poco contenido alcohólico, como consecuencia, por ejemplo, de proceder de uvas con grados Baumé o Brix bajos por haber sido recolectadas de forma temprana o por la ubicación geográfica del cultivo de las vides, o por otras consecuencias no descritas en la presente invención. Más preferiblemente la bacteria láctica del género *Lactobacillus* se añade cuando el vino tiene al menos un 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ó 20% de contenido alcohólico respecto del volumen del vino. El porcentaje se mide en volumen/volumen, es decir, por ejemplo, un 9% de contenido alcohólico significa que de cada 100 ml de vino, 9 ml son de alcohol (cualquiera de las combinaciones de alcoholes) y 81 ml son agua y otros componentes. Generalmente, un vino con al menos un 16% de contenido alcohólico suele ser un vino al que se ha añadido alcohol de forma artificial, es decir, que dicho alcohol añadido no procede de la actividad fermentativa de las levaduras.

La bacteria láctica puede añadirse al vino durante el proceso de crianza. El proceso de crianza tiene una duración de tiempo variable, pero normalmente comporta meses, y depende de la composición inicial de componentes del vino (principalmente antioxidantes), de la cantidad de oxígeno que difunde en dicho vino (depende del tamaño de poro de la madera con las que están construidas las barricas) así como de otros factores. A modo de síntesis, en dicho proceso de crianza convencional se pueden destacar dos fases: a) la fase oxidativa: en la que tiene lugar la microoxigenación del vino y b) la fase reductora, en la que se evita que el oxígeno esté en contacto con el vino. Lo más común es que la fase oxidativa tenga lugar en barricas de madera, generalmente de madera de roble de uno o de distintos tipos. Dependiendo del tamaño medio de poro de dicha madera este proceso se puede alargar más o menos así como también el aporte de componentes de la madera puede variar dependiendo del tipo de madera empleado. La fase reductora del vino suele llevarse a cabo en botellas, tapadas para evitar la entrada de oxígeno. La adición de bacterias lácticas al vino durante el proceso de crianza puede producir además un producto enológico de interés ya que, además de llevar a cabo la fermentación maloláctica (siempre que no se haya producido antes), estos microorganismos favorecen la presencia de flavanoles (antioxidantes) que actúan tamponando la oxidación, por tanto, los vinos mantenerse por más tiempo en las barricas o en el recipiente empleado para la fase oxidativa de la crianza, sin producirse picado o pardeamiento indeseado. Por tanto, esto permitiría llevar a cabo la fase oxidativa de la crianza en vinos con poco contenido de compuestos antioxidantes como son los vinos blancos y no limitarse exclusivamente a la fase anaerobia.

Tal como se ha mencionado en párrafos precedentes, el propósito del uso de la bacteria láctica de grado GRAS es, tanto conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control, como para disminuir el pardeamiento de dicho vino, con respecto a un control. Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la adición de bacterias lácticas de grado GRAS como por ejemplo, pero sin limitarse, del

género *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, disminuyen el pardeamiento de vinos modelo con respecto a los vinos control a los que no se adiciona el microorganismo correspondiente. Los inventores han demostrado el mecanismo por el cual se disminuye dicho pardeamiento del vino, que consiste esencialmente en la prevención de la formación de sales de xantilio por la prevención de la oxidación de flavanoles como catequina y/o epicatequina.

5 Por tanto, otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un vino, con respecto a un control, donde además dicha bacteria láctica se usa para disminuir el pardeamiento de dicho vino, con respecto a un control. Dicho vino puede ser blanco, tinto, ecológico o la bacteria se puede añadir al vino en cualquier momento de la elaboración del mismo, o la  
10 bacteria del género *Lactobacillus* se añade cuando el vino tiene al menos un 9% de contenido alcohólico (o cualquiera de los porcentajes descritos anteriormente). Una realización preferida se refiere al uso de la bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un vino, con respecto a un control, donde además dicha bacteria láctica se usa para disminuir el pardeamiento de dicho vino, con respecto a un control, donde dicho vino es blanco.

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

### Descripción de las figuras

25 Fig. 1. Muestra el efecto inhibitor de *Lactobacillus plantarum* RM71 sobre el pardeamiento de vinos modelo que contienen (+)-catequina (A) y (-)-epicatequina (B).

Las muestras de vino modelo fueron incubadas durante 42 días a 25°C, en un periodo de 42 días. (◇) Vinos modelo control libres de células, (■) Vinos modelo suplementados con *Lactobacillus plantarum* RM71. Los valores representan la media de triplicados que no presentan diferencias significativas al usar test no-paramétricos (P<0.05).

30 Fig. 2. Muestra cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD registrados a 440 nm.

Dichos cromatogramas corresponden a vinos modelo control que contienen (+)-catequina (A) o (-)-epicatequina (B) y que fueron incubados durante 42 días a 25°C.

35 Fig. 3. Muestra los espectros UV-visible de los productos de degradación de (+)-catequina y (-)-epicatequina.

En la figura se muestran los productos de degradación de la (+)-catequina (picos 1, 3 y 4)(A) y de la (-)-epicatequina (picos a-f) (B) en vinos modelo control libres de células después de la incubación durante 42 días a 25°C.

40 Fig. 4. Muestra los espectros de masa del pico 1 de degradación de la (+)-catequina (A) y del pico b de degradación de la (-)-epicatequina (B).

Dichos espectros se obtienen después de la incubación de los vinos modelo control libres de células durante 42 días a 25°C.

45 Fig. 5. Muestra el efecto inhibitor de *Lactobacillus plantarum* RM71 sobre la formación de pigmentos de xantilio derivados de la (+)-catequina (A) y de la (-)-epicatequina (B) en vinos modelo.

50 (◇) Vinos modelo libres de células, (■) Vinos modelo suplementados con *Lactobacillus plantarum* RM71. Cada punto indica las áreas combinadas (obtenidas por HPLC-DAD 440 nm) de los picos que representan los pigmentos de xantilio formados en los respectivos vinos modelo (picos 1-4 en vinos con (+)-catequina o picos a-f en vinos con (-)-epicatequina) a los tiempos indicados. Se representan las medias y las desviaciones estándar de triplicados que no presentan diferencias significativas al usar test no-paramétricos (P<0.05).

55 Fig. 6. Muestra el efecto preventivo de *Lactobacillus plantarum* RM71 sobre la degradación oxidativa de (+)-catequina (A) y (-)-epicatequina (B) en vinos modelo.

60 Se muestran las variaciones durante 42 días en las concentraciones de ambos flavanoles en vinos control libres de células (◇) y vinos modelo suplementados con *Lactobacillus plantarum* RM71. Se representan las medias y las desviaciones estándar de triplicados que no presentan diferencias significativas al usar test no-paramétricos (P<0.05).

65 Fig. 7. Muestra la comparación del efecto inhibitor de varias bacterias lácticas (BAL) sobre el pardeamiento de vinos modelo que contienen (+)-catequina (A) y (-)-epicatequina (B).

Las muestras de vino modelo fueron incubadas durante 20 días a 30°C en presencia de 20 mg/L de sulfato ferroso. (◆) Vinos modelo control libres de células. Vinos modelo suplementados con: *Lactobacillus brevis* (□); *Lactobacillus mali* (X); *Leuconostoc mesenteroides* (+).

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

### Ejemplo 1

#### 1.1. Efecto de *L. plantarum* RM 71 en el desarrollo del color de vinos modelo

Para mimetizar el proceso de oxidación del vino se utilizaron los vinos modelo, descritos en el apartado de Material y Métodos. Estos vinos fueron suplementados con sulfato ferroso debido a su efectividad para acelerar la oxidación de flavanoles (Oszmianski, *et al.*, 1996. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1712-1715). El pardeamiento de las bebidas habitualmente se examina siguiendo las variaciones de absorbancia a 420 nm ( $A_{420\text{ nm}}$ ) debido a que los pigmentos marrones que se producen como resultado de la oxidación de los fenoles presentes en las bebidas, incrementan el color en la región amarillo-marrón del espectro visible (Iland *et al.*, 2000. White wine spectral measures. In *Techniques for Chemical Analysis and Quality Monitoring during Winemaking*; Patrick Iland Wine Promotions: Campbelltown, Australia, p 100). Por ello, para examinar la influencia de *L. plantarum* RM71 en el pardeamiento, las variaciones en los valores de  $A_{420\text{ nm}}$  mostrados por los vinos modelo que contenían (+)-catequina o (-)-epicatequina fueron examinadas en función de la presencia o ausencia de este microorganismo.

La Fig. 1 muestra cómo se pardean los vinos modelo que contienen bien (+)-catequina o (-)-epicatequina durante la incubación en presencia de sulfato ferroso a 10 mg/l. El valor de  $A_{420\text{ nm}}$  en los vinos control, libres de *L. plantarum* RM71 se incrementó notablemente en el tiempo, revelando la formación de pigmentos coloreados en la región visible del espectro. La incubación de los vinos modelo que contenían bien (+)-catequina o (-)-epicatequina en presencia de *L. plantarum* RM71, produjo una inhibición parcial del proceso de pardeamiento como se puede observar al examinar los valores finales de  $A_{420\text{ nm}}$  y la velocidad de formación de pigmentos marrones (Fig. 1A y 1B). El porcentaje de inhibición del pardeamiento proporcionado por *L. plantarum* RM71 respecto de los controles libres de células es del 21.5% en los vinos modelo que contienen (+)-catequina y del 29.2% en los vinos modelo que contienen (-)-epicatequina. La velocidad de pardeamiento de los vinos modelo fue calculada hasta los 23 días de incubación debido a que posteriormente el pardeamiento de todos los vinos modelo perdía linealidad. La presencia de *L. plantarum* RM71 en los vinos modelo que contenían catequina mostraron una velocidad de pardeamiento más lenta ( $\Delta\text{AU}/\text{día} = 0.036$ ;  $r^2$  de 0.9816) que sus controles ( $\Delta\text{AU}/\text{día} = 0.045$ ;  $r^2$  de 0.9927). Una tendencia similar se observó en los vinos modelo que contenían (-)-epicatequina los cuales mostraron una velocidad de pardeamiento de 0.044 AU/día ( $r^2$  de 0.9881) en presencia de bacteria respecto a una velocidad de 0.060 AU/día ( $r^2$  de 0.9957) de los controles sin bacteria. Una de las rutas de formación de pigmentos coloreados es la oxidación de flavanoles catalizada por trazas de cobre y/o hierro y la subsiguiente polimerización de los productos oxidados. Sin embargo cuando el ácido tartárico está en el medio, como ocurre en nuestros vinos modelo y en vinos no modelo, la oxidación no ocurre directamente en los flavanoles sino en el ácido tartárico el cual se convierte en ácido glioxílico. El ácido glioxílico reacciona con dos unidades de flavanol para dar lugar a dímeros incoloros que sufren posteriormente deshidratación y oxidación para formar pigmentos marrones (Fulcrand *et al.*, 1997. *Phytochemistry*, 46: 223-227).

#### 1.2. Identificación de productos de reacción de pardeamiento en vinos modelo que contienen (+)-catequina

Para tener mas información acerca de los cambios de color observados, se registraron a 280 nm y 440 nm cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de vinos modelo que contenían (+)-catequina o (-)-epicatequina. Después de 42 días de incubación los cromatogramas registrados a 280 nm revelaron la presencia de (+)-catequina y de productos resultantes de su degradación. *L. plantarum* RM71 no determinó el patrón de degradación de la catequina, ya que los picos observados eran los mismos (aunque con diferente intensidad) que los observados en los controles libres de células. La Fig. 2A muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de vinos modelo control libres de células que contienen (+)-catequina. Estos cromatogramas se registraron a 440 nm después de 42 días de incubación. Se observan 4 picos (1 -4) que revelan la formación de compuestos de degradación de la (+)-catequina y que no se observaron al comienzo de la incubación. La presencia de *L. plantarum* RM71 en los vinos modelo no afectó al perfil de los cromatogramas pero si a la intensidad de los picos.

El pardeamiento de los vinos comienza normalmente con la formación de dímeros incoloros compuestos por dos unidades de flavanol. La condensación de estos dímeros puede estar catalizada por acetaldehído o por ácido glioxílico. Asumimos que el ácido glioxílico es el catalizador de la condensación de los dímeros de catequina ya que a pesar de las diferentes condiciones cromatográficas utilizadas, el patrón de elución de los picos 1-4 es prácticamente idéntico al observado en otros trabajos para productos de degradación de la catequina formados en sistemas modelo que utilizan el ácido glioxílico como catalizador. Ha sido previamente establecido que los pigmentos marrones formados en soluciones modelo de (+)-catequina/ácido glioxílico son sales de xantilio (Clark *et al.*, 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6204-6210; Es-Safi *et al.*, 1999. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5211-5217; Es-Safi *et al.*, 1999. *Tetrahedron Lett.*, 40: 5869-5872; Es-Safi *et al.*, 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4233-4240). Estas sales son pigmentos que muestran un espectro UV-visible característico con un máximo de absorbancia a 440 nm, un "hombro" a 310 nm y un pico a 278 nm (Es-Safi *et al.*, 1999. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5211-5217). Para comprobar si los pigmentos formados en los



vinos modelo que contienen catequina son sales de xantilio, se realizaron barridos de cada pico de degradación de la (+)-catequina en el espectro UV-vis. En la Fig. 3A se muestran las características espectrales en el rango UV-visible de los picos 1 y 3 extraídos del cromatograma obtenido por HPLC-DAD y coinciden con las características de las sales de xantilio, esto es, máximo de absorbancia a 440 nm, un “hombro” a 310 nm y un pico a 278 nm. Respecto al pico 4, éste muestra las características espectrales de sales de xantilio esterificadas, máximo de absorbancia a 460 nm en lugar de a 440 nm y un “hombro” a 310 nm, características previamente descritas (Es-Safi *et al.*, 1999. *Tetrahedron Lett*, 40: 5869-5872). Las características espectrales de los productos de degradación de la catequina son una primera evidencia de que son pigmentos de xantilio.

Para identificar más claramente los productos de degradación de la catequina (picos 1 -4) como pigmentos de xantilio derivados de la catequina, se determinaron sus masas correspondientes mediante experimentos de HPLC-MS. Los espectros de masas de los picos 1, 2 y 3 en el modo de ión negativo mostraron señales a valores de  $m/z$  615. Esta señal se fragmentó en dos iones principales: uno con una señal a un valor de  $m/z$  571 (correspondiente a la decarboxilación del ión principal. -44 amu [unidad de masa atómica]) y otro con una señal a un valor de  $m/z$  419 (correspondiente a una fisión del tipo retro Diels-Alder. -152 amu). Estos datos revelan, de acuerdo a estudios precedentes (Clark *et al.*, 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6204-6210; Es-Safi *et al.*, 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4233-4240; Labrousche *et al.*, 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9993-9998), que los productos de degradación de la catequina representados en los picos 1, 2 y 3 de los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD son pigmentos de xantilio. En la Fig. 4A se muestra como ejemplo el espectro de masas del pico 1 de una muestra extraída de un vino modelo que contiene (+)-catequina después de 42 días de incubación. El espectro de masas del pico 4 muestra las características típicas descritas (Labrousche *et al.*, 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9993-9998) de un éster de una sal de xantilio con una señal en el modo de ión negativo a un valor de  $m/z$  643 y un fragmento principal a un valor de  $m/z$  597.

### 1.3. Identificación de productos de reacción de pardeamiento en vinos modelo que contienen (+)-epicatequina

Para comprobar si los pigmentos formados en los vinos modelo que contienen epicatequina son sales de xantilio, se procedió de igual modo que con los vinos modelo suplementados con catequina. La Fig. 2B muestra un cromatograma obtenido por HPLC-DAD registrado a 440 nm de un vino modelo libre de células que contiene epicatequina después de 42 días de incubación. Para obtener una primera evidencia de que los picos resultantes de la degradación de la epicatequina son pigmentos de xantilio se realizó un espectro de cada pico en el rango UV-visible. Los picos a-d extraídos del cromatograma obtenido por HPLC-DAD presentaron propiedades espectrales características de las sales de xantilio,  $\lambda_{max}$  a 440 nm, un “hombro” a 310 nm y un pico a 278 nm. Los picos e-f muestran las características espectrales de sales de xantilio esterificadas, máximo de absorbancia a 460 nm en lugar de a 440 nm y un “hombro” a 310 nm.

Para determinar que los picos a-f representan pigmentos de xantilio formados a partir de la epicatequina, se determinaron las masas correspondientes mediante experimentos de HPLC-MS. Los pigmentos de xantilio en los vinos modelo que contienen epicatequina representados en los picos a-d, son análogos a los representados en los picos 1-3 formados en los vinos modelo que contienen catequina, debido a que mostraron señales a un valor  $m/z$  615. Los pigmentos de xantilio derivados de la epicatequina exhibieron prácticamente el mismo patrón de fragmentación que el mostrado por los pigmentos de xantilio derivados de la catequina con fragmentos principales a valores de  $m/z$  571 y 419. Debido a que la (+)-catequina y la (-)-epicatequina son diastereoisómeros sus derivados de xantilio conservan una relación diastereoisomérica lo que explica que aunque son análogos, ambos tipo de pigmentos muestran diferentes tiempos de retención en sus cromatogramas (Labrousche *et al.*, 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9993-9998). Por otra parte la observación de seis picos correspondientes a productos de degradación de la epicatequina en lugar de los cuatro observados para la catequina puede ser el resultado de la coelución de diferentes isómeros de pigmentos de xantilio o la formación preferente de los mismos. También se observa, por ejemplo, que en el pico b el isómero que se forma preferentemente es el ión decarboxilado ( $m/z$  571) del catión de xantilio, mientras que en el pico c se forma preferentemente el correspondiente a una fisión del tipo retro Diels-Alder del catión decarboxilado ( $m/z$  419). A modo de ejemplo se muestra el espectro de masas del pico c de un vino modelo que contiene (+)-epicatequina después de 42 días de incubación (Fig. 4B). Los espectros de masas de los picos e y f mostraron señales de  $m/z$  de 643 con iones a  $m/z$  de 597 que como se menciona anteriormente para los vinos modelos que contienen catequina, correspondieron a ésteres de pigmentos de xantilio. Estos resultados confirman que los pigmentos de xantilio formados a partir de catequina y epicatequina en sus correspondientes vinos modelo, son análogos.

### 1.4. Efecto inhibitor de *Lactobacillus plantarum* RM71 sobre la formación de pigmentos marrones en los vinos modelo que contienen (+)-catequina y (-)-epicatequina

Para determinar si la reducción de la velocidad de pardeamiento que produce *L. plantarum* RM71 en los vinos modelo que contienen (+)-catequina o (-)-epicatequina (Fig. 1A y B) es causada por inhibición de las reacciones de polimerización que dan lugar a los pigmentos de xantilio identificados, la generación de estos pigmentos se estudió comparativamente en el tiempo en vinos modelo suplementados o libres de *L. plantarum*. Para este objetivo se comprobó la variación de las áreas que representaban los pigmentos de xantilio durante los 42 días de incubación en los cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 440 nm. Las áreas totales de los picos 1-4 se sumaron en una y este valor se examinó durante el periodo de incubación para seguir la formación de pigmentos de xantilio derivados de la catequina (Fig. 5A). El mismo razonamiento se utilizó para seguir la formación de pigmentos de xantilio derivados de la epicatequina, esta vez examinando las áreas totales sumadas de los picos e-f (Fig. 5B). Como se puede observar

al comparar la Fig. 5A y 5B, las áreas totales de los pigmentos de xantilio formados a partir de la epicatequina son aproximadamente el doble que la de los formados a partir de la catequina. Se comprobó, mediante el seguimiento en el tiempo de las áreas de catequina y epicatequina, que la epicatequina (Fig. 6B) se perdía 1.26 veces más rápido que la catequina (Fig. 6A), dato que no explica satisfactoriamente el aumento por un factor de 2 de los pigmentos de xantilio derivados de la epicatequina respecto a los de la catequina. Esta discordancia se debe a que los pigmentos de xantilio derivados de la epicatequina presentan un coeficiente de absorción mayor que los de la catequina (Labrousse *et al.*, 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9993-9998).

Las Fig. 6A y 6B, muestran que la presencia de *L. plantarum* RM71 inhibe la degradación oxidativa de la (+)-catequina y (-)-epicatequina. De acuerdo a ello la generación de pigmentos de xantilio derivados de la catequina (Fig. 5A) y de la (-)-epicatequina (Fig. 5B) se inhibió en vinos modelo suplementados con esta bacteria respecto a los vinos modelo control (libres de células). El incremento de las áreas totales de los picos que representan los pigmentos de xantilio derivados de la catequina o de la epicatequina en los vinos modelo suplementados con *L. plantarum* RM71, fue menor que el de sus respectivos controles y mostraron la misma tendencia que los incrementos en el valor de  $A_{420\text{ nm}}$  observados en la Fig. 1A y 1B. Estos resultados confirman que los pigmentos de xantilio son los responsables del pardeamiento de los vinos modelo y que *L. plantarum* RM71 inhibía su formación. El efecto inhibitorio de *L. plantarum* fue más pronunciado sobre la generación de pigmentos de xantilio derivados de la (-)-epicatequina que de la (+)-catequina. En la muestras extraídas en el día 28, *L. plantarum* inhibió un 35.2% la formación de pigmentos de xantilio derivados de la (-)-epicatequina y un 14.1% los de la (+)-catequina comparado con sus respectivos controles.

La capacidad de *L. plantarum* para prevenir la formación de ambos tipos de pigmentos de xantilio podría ser de utilidad independientemente de la condiciones estacionales, tipo de uva y prácticas en la fabricación del vino las cuales se han demostrado que puede influenciar el contenido de catequina y de epicatequina en el vino (Simpson, 1982. *Vitis*, 21: 233-239).

Las sales de xantilio derivadas de flavanoles son pigmentos que i) ocurren en vinos blancos y tintos (Es-Safi *et al.*, 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4233-4240) y ii) pueden actuar como especies transitorias en la formación de compuestos quinoidales coloreados que contribuyen al cambio de color en alimentos derivados de la uva (Es-Safi *et al.*, 1999. *Tetrahedron Lett.*, 40: 5869-5872). En vista de ello, la inhibición preventiva de las rutas que dan lugar a los pigmentos de xantilio contribuye a la inhibición de los procesos de pardeamiento asociados a estos pigmentos.

La capacidad de otras bacterias lácticas presentes en el vino como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mali* y *Leuconostoc mesenteroides* fue examinada en los mismos vinos modelo que los usados para *L. plantarum*. Con el objeto de acelerar aún más el pardeamiento los vinos se suplementaron con una cantidad más alta de sulfato ferroso (20 mg/l en lugar de 10 mg/l) y fueron incubadas a 30°C en lugar de a 25°C durante un periodo de 20 días en lugar de 42 días. Los vinos se inocularon con una biomasa liofilizada de la bacteria láctica a examinar correspondiente a  $2 \times 10^8$  células/ml. Los resultados se muestran en la Fig. 7. El porcentaje de inhibición del pardeamiento proporcionado por *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mali* y *Leuconostoc mesenteroides* respecto de los vinos control libres de células es, respectivamente, del 15.3, 10.7 y 16.8% en los vinos modelo que contienen (+)-catequina y del 5.2, 3.3 y 8.6% en los vinos modelo que contienen (-)-epicatequina.

#### Materiales y métodos

##### 1. Cepa y medio de cultivo

La cepa *Lactobacillus plantarum* RM71 utilizada en este estudio fue aislada originalmente de vino en el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) (Moreno-Arribas *et al.*, 2003. *Int. J. Food Microb*, 84: 117-123). *Lactobacillus plantarum* RM71 se creció rutinariamente en el medio MRS (19) a 30°C.

##### 2. Preparación de vinos modelo para la simulación del pardeamiento

Dos vinos modelo conteniendo 400 mg/L de (+)-catequina o de (-)-epicatequina se prepararon en un medio similar al vino que contenía 5 g/l de ácido tartárico, 0.6 g/L de ácido acético, 1.75 g/l de ácido málico en de etanol al 12%. Los vinos modelo fueron ajustados a un pH de 3.5 con NaOH. Se añadió sulfato ferroso a los vinos modelo como catalizador de la reacción de oxidación hasta llegar a una concentración final de 10 mg/l.

Colonias de *Lactobacillus plantarum* RM71 crecidas en placas de medio MRS fueron inoculadas en caldo de medio MRS e incubadas 24 horas a 30°C. Diez mililitros de células ya crecidas se centrifugaron y lavaron tres veces con agua destilada para después ser almacenadas a -40°C. La biomasa fue liofilizada y almacenada bajo gas argón a temperatura ambiente. Los vinos modelo fueron inoculados con una cantidad de biomasa liofilizada equivalente a  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Los vinos modelo que contenían bien (+)-catequina o (-)-epicatequina y sus respectivos controles no inoculados fueron incubados sin agitación y en oscuridad a 25°C en un incubador BioRad. Durante 42 días se tomaron muestras periódicamente y se filtraron (filtros con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore) para posteriores determinaciones analíticas y espectrofotométricas. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

### 3. Métodos analíticos

#### 3.1. Medidas espectrofotométricas

5 Las medidas de la absorbancia a 420 nm que mostraban las soluciones vínicas modelo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro modelo Shimadzu UV-Visible 1601 utilizando cubetas de 10 mm de paso.

#### 3.2 Análisis HPLC-DAD

10 Para el análisis por HPLC-DAD, la (+)-catequina, la (-)-epicatequina y sus productos de degradación fueron extraídos dos veces a partir de alícuotas filtradas con un tercio del volumen de reacción de etil acetato. El análisis se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Rodríguez *et al.*, 2008. *Food Chem.*, 107: 1393-1398) en un sistema cromatográfico Thermo (*Thermo Electron Corporation*, Waltham, Massachusetts, USA) equipado con una bomba P400 *SpectraSystem*, un *autosampler* AS3000, y un detector UV6000LP. Un gradiente de solvente A (agua/ácido acético, 15 98:2, v/v) y solvente B (agua/acetonitrilo/ácido acético, 78:20:2, v/v/v) se aplicó a un cartucho de fase reversa Novapack C<sub>18</sub> (25 cm x 4.0 mm i.d.; 4.6 μm tamaño de partícula) a temperatura ambiente. El programa de elución fue el siguiente: 0-55 min, 80% B lineal, 1.1 ml/min; 55-57 min, 90% B lineal; 1.2 ml/min; 57-70 min, 90% B isocrático, 1.2 ml/min; 70-80 min, 95% B lineal, 1.2 ml/min; 80-90 min, 100% lineal, 1.2 ml/min; 100-120 min, lavado a 1.0 ml/min. La detección fue llevada a cabo por barrido desde 220 a 380 nm. Las muestras fueron inyectadas por duplicado en 20 el cartucho después de ser filtradas a través de un filtro de PVDF (0.45 μm). Los cromatogramas se generaron a 280 nm para la cuantificación y a 440 nm para seguir la formación de pigmentos resultantes de los flavanoles durante la oxidación de los vinos modelo.

#### 3.3. Análisis HPLC DAD/ESI-MS

25 Las medidas de masa (MS) se llevaron a cabo en un sistema cromatográfico Hewlett-Packard series 1100 (Palo Alto, CA) equipado con un detector (DAD) y un espectrómetro de masas cuádruple (Hewlett-Packard series 1100 MSD) con un interfaz electrospray. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo con la misma columna y condiciones de solvente usadas en los experimentos de LC-DAD. La detección con DAD se llevó a cabo desde 30 a 500 nm, con un flujo de 0.7 ml/min. Para la masa (MS) se utilizó nitrógeno como gas secante y nebulizante, y los parámetros iónicos fueron: presión de nebulización, 55 psi; gas secante, 11 l/min; y temperatura de secado, 350°C. El voltaje capilar fue de - 4 kV. Se usó un orificio de voltaje a -90 V en los experimentos de investigación de los productos de fragmentación. Los espectros fueron adquiridos en el modo de ión negativo en un rango de 100 a 1,500 *m/z*.

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 370 839 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS para conservar mayor cantidad de flavanoles en al menos un producto alimenticio, con respecto a un control.
2. Uso según la reivindicación 1, donde la bacteria láctica es una bacteria del género *Lactobacillus*.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, donde la bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus mali*.
4. Uso según la reivindicación 1, donde la bacteria láctica es una bacteria del género *Leuconostoc*.
5. Uso según la reivindicación 4, donde la bacteria láctica es *Leuconostoc mesenteroides*.
- 15 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde los flavanoles son catequina y/o epicatequina.
7. Uso según la reivindicación 6, donde los flavanoles son (+)-catequina y/o (-)-epicatequina.
- 20 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el producto alimenticio comprende al menos un producto de origen vegetal.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el producto alimenticio es vino.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9, donde el vino es tinto o blanco.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el vino es ecológico.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde la bacteria láctica se añade al vino en cualquier momento de la elaboración del mismo.
- 30 13. Uso según la reivindicación 12, donde la bacteria láctica del género *Lactobacillus* se añade cuando el vino tiene al menos un 9% de contenido alcohólico.
- 35 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde además dicha bacteria láctica se usa para disminuir el pardeamiento de dicho vino, con respecto a un control.
15. Uso según la reivindicación 14, donde dicho vino es blanco.

40

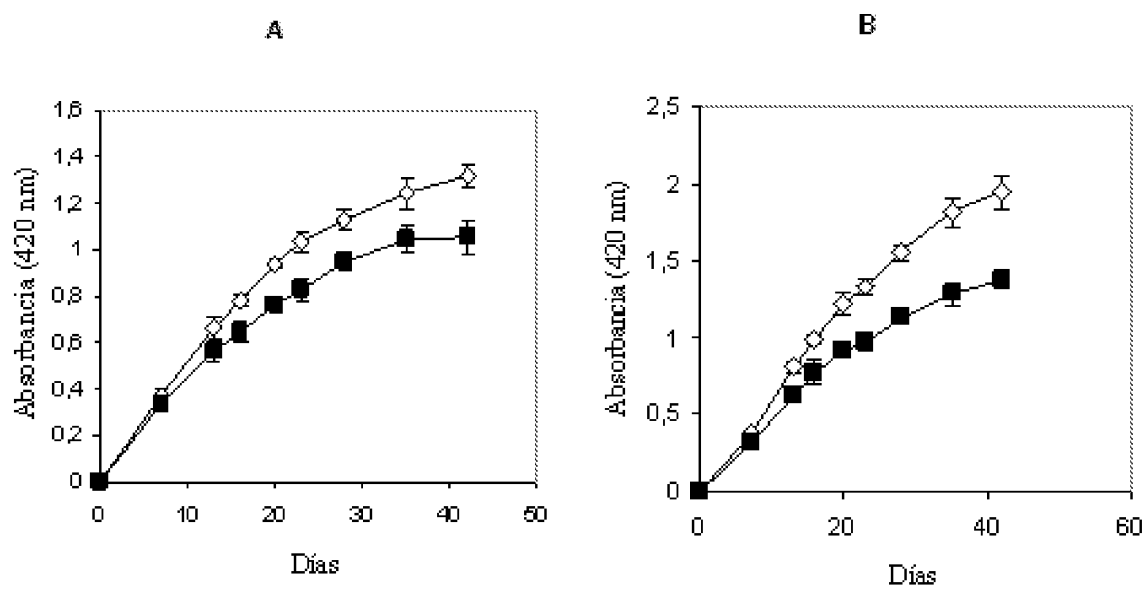
45

50

55

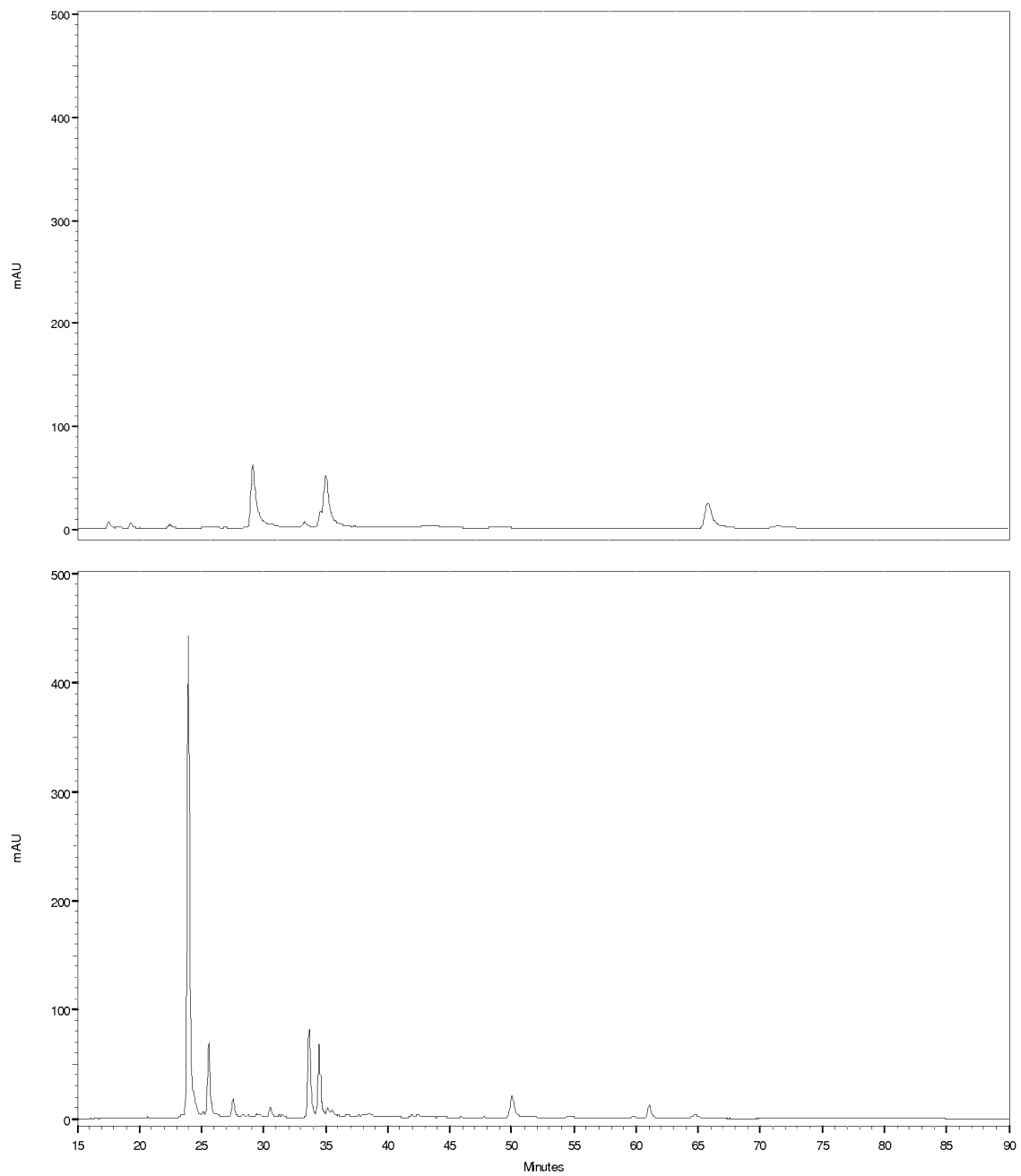
60

65

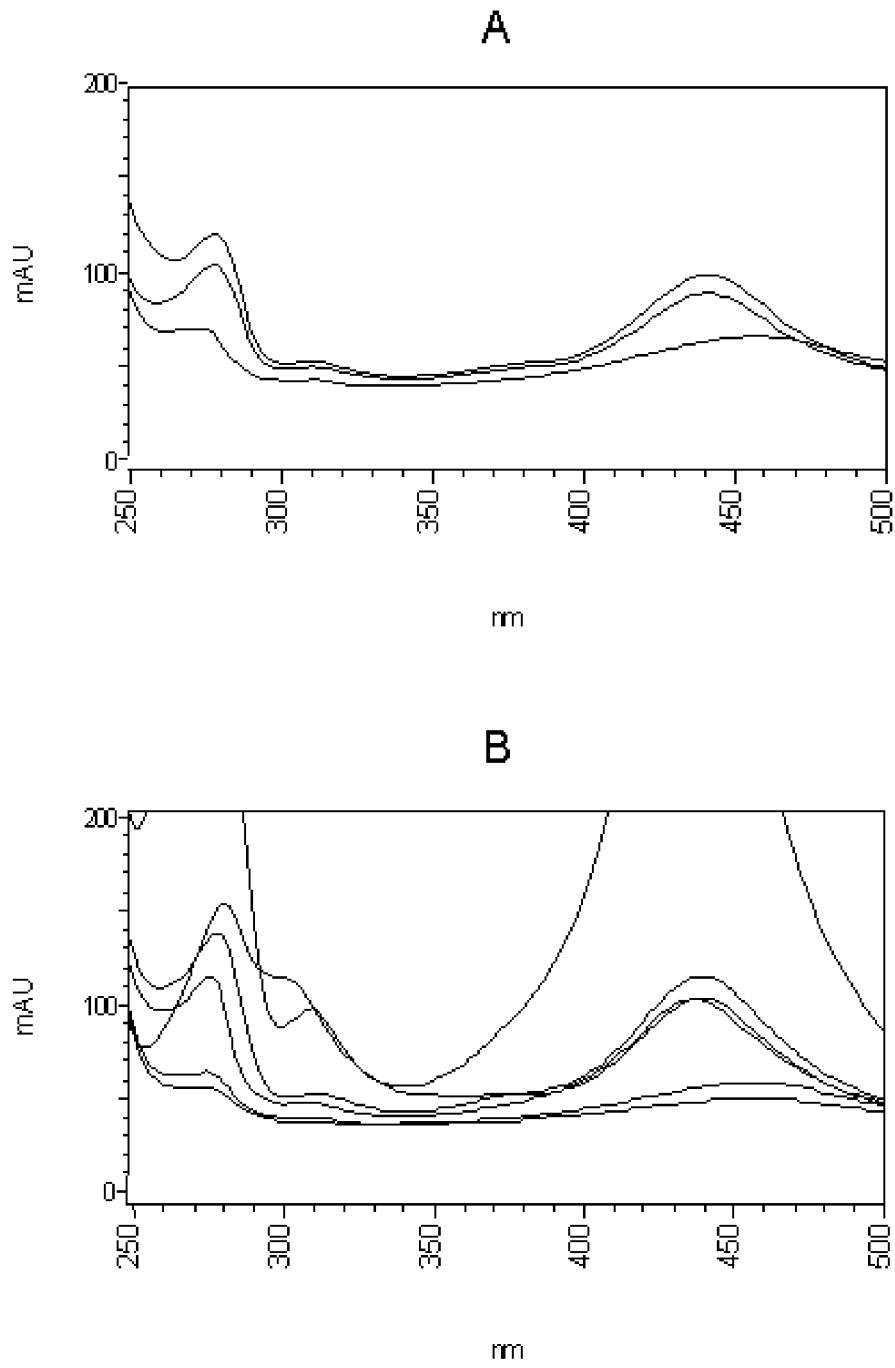


**FIG. 1**

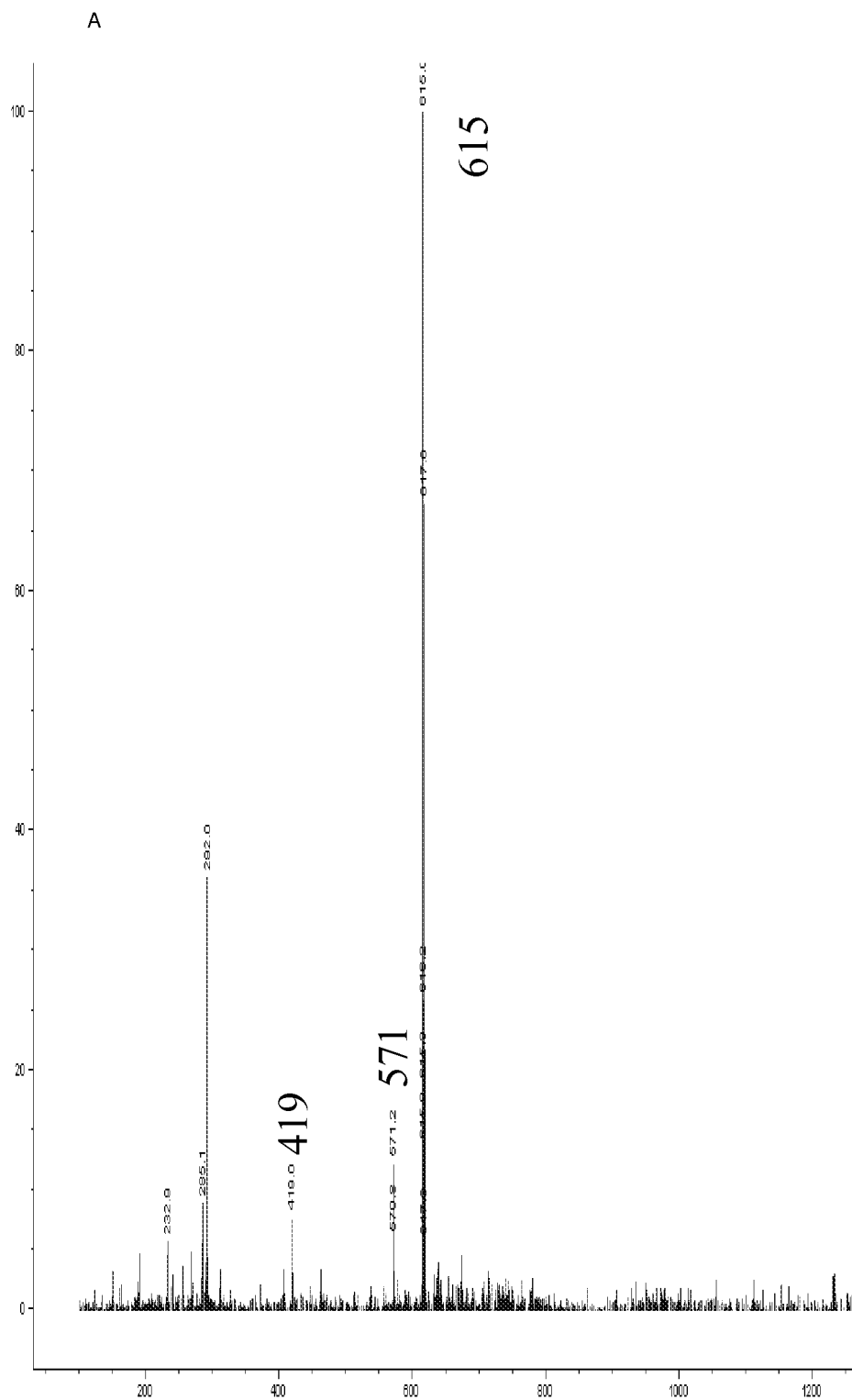
ES 2 370 839 A1



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4A**



B

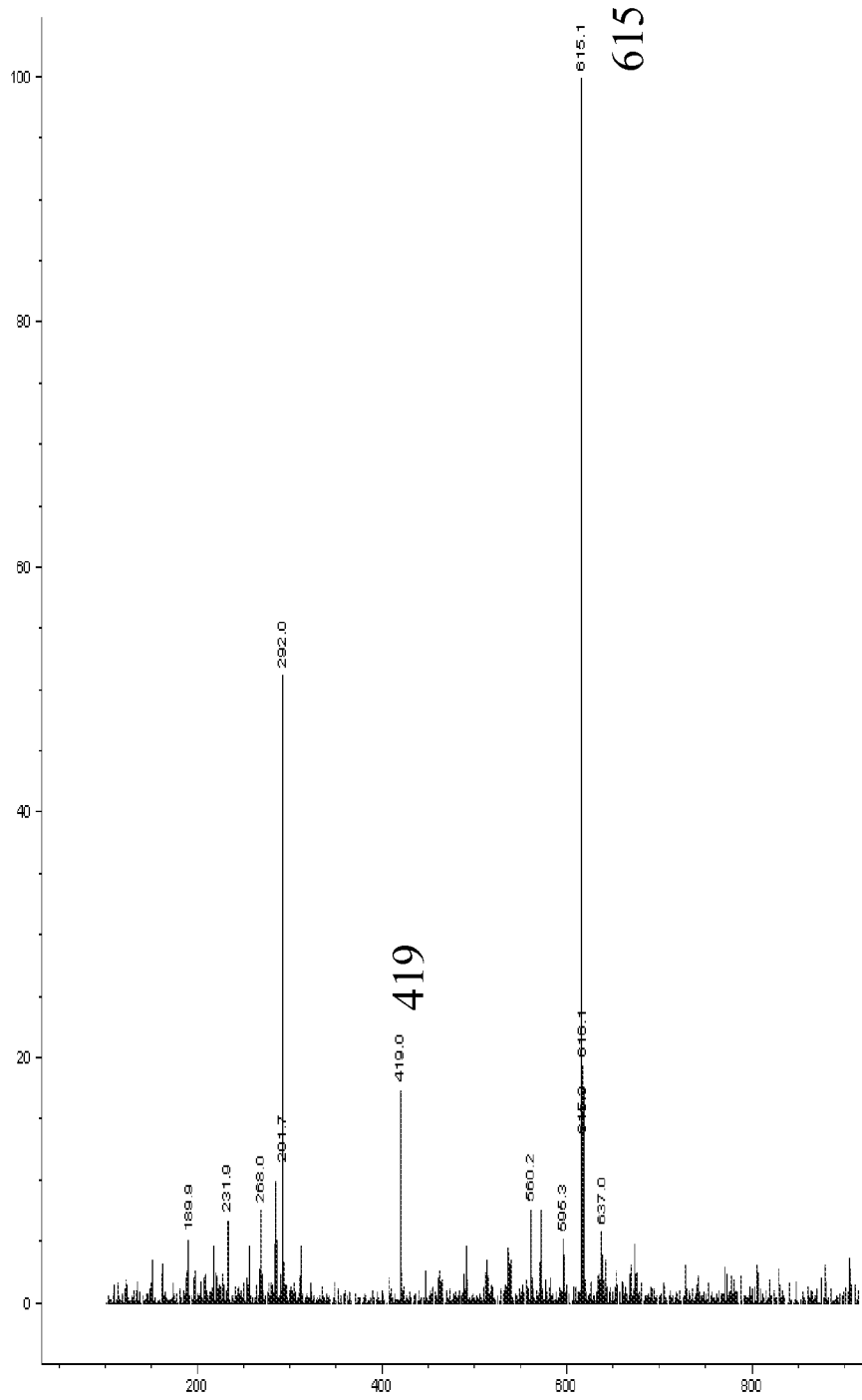
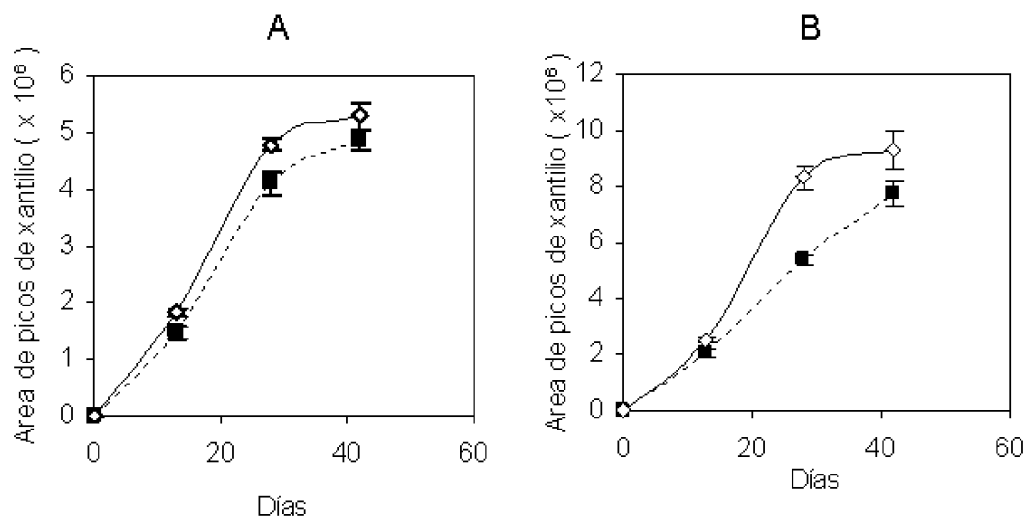
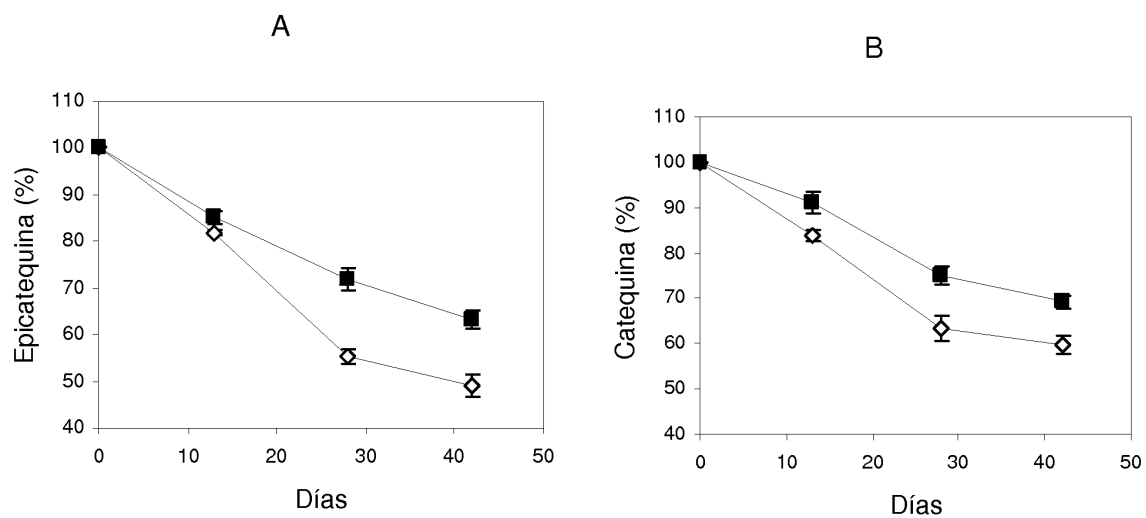


FIG. 4B

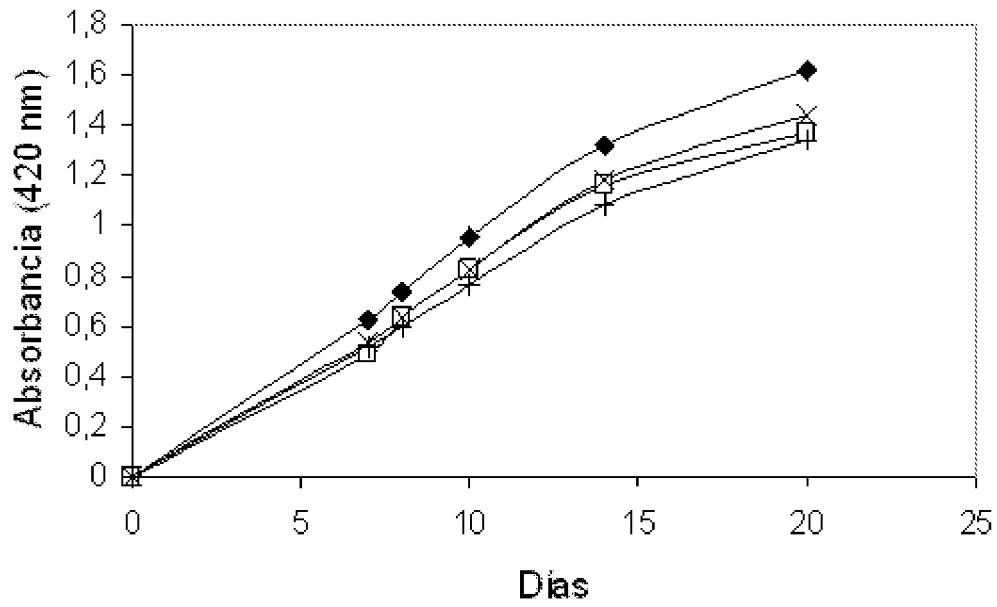


**FIG. 5**



**FIG. 6**

A



B

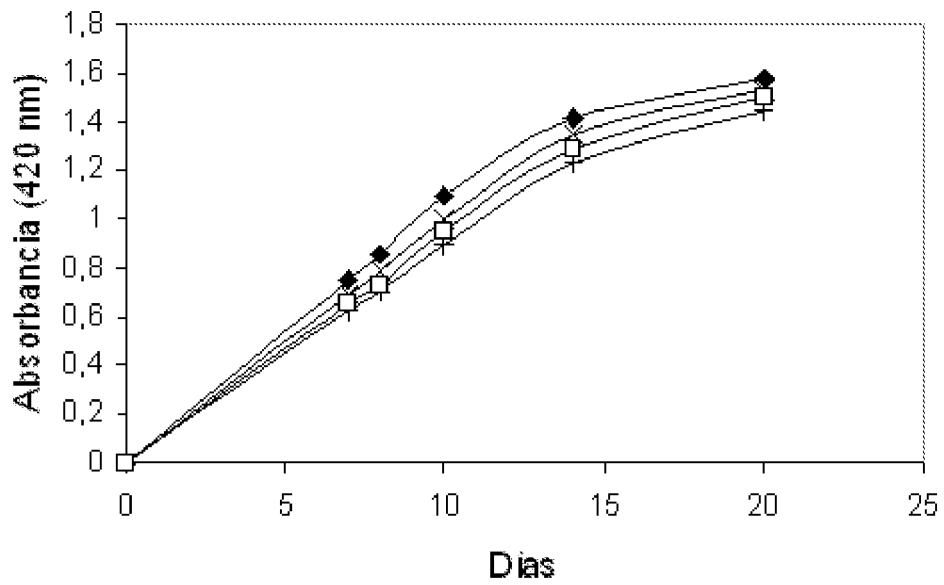


FIG. 7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030846

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LÓPEZ-TOLEDANO A. et al. Yeas-Induced Inhibition of (+) Catechin and (-) Epicatechin degradation in model solutions. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 2002, vol. 50, pág. 1631-1635. Todo el documento.	1,6-15
A	ES 2157155 B1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.08.1999, resumen; columnas 6-10.	1-2,8-9,12
A	FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. 2 Edición. Madrid. Ediciones AMV y Mundi-prensa. 2003. ISBN 84-8476-074-X. Pág. 323-345.	1-5,8-10,12

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
17.02.2011

Examinador  
I. Abad Gurumeta

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12G1/022** (01.01.2006)

**C12G1/02** (01.01.2006)

**C12R1/865** (01.01.2006)

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

C12G, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LÓPEZ-TOLEDANO A. et al. Yeas-Induced Inhibition of (+) Catechin and (-) Epicatechin degradation in model solutions. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY	2002
D02	ES 2157155 B1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)	01.08.1999
D03	FLANZY, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. 2 Edición. Madrid. Ediciones AMV y Mundi-prensa.	2003

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

El objeto de la invención es el uso de una bacteria láctica, *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, para la conservación de flavanoles, catequina y/o epicatequina, en un producto alimenticio (reivindicaciones 1-8). En el caso de que se trate de vino se usar *Lactobacillus* en cualquier momento de la elaboración del mismo para disminuir el pardeamiento de dicho vino con respecto a un control (reivindicaciones 8-15).

El documento D01 publica la inhibición de la degradación de flavanoles, catequina y/o epicatequina, en los productos alimenticios vegetales, en concreto en vino blanco, para evitar el pardeamiento del vino usando *Saccharomyces cerevisiae*. (Ver resumen, introducción, materiales y métodos).

El documento D02 divulga el uso de un microorganismo de la especie *Lactobacillus* en productos alimenticios como fermento láctico o en vinos como fermento maloláctico (ver resumen y columnas 6-10)

El documento D03 publica los efectos de *Lactobacillus* y de *Leuconostoc* en el proceso de preparación del vino (ver págs. 323-345).

**1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)**

El documento D01 se considera el más próximo del estado de la técnica y divulga la inhibición de la degradación de flavanoles, catequina y/o epicatequina, en los productos alimenticios vegetales, en concreto en vino blanco, para evitar el pardeamiento del vino usando *Saccharomyces cerevisiae*. (Ver resumen, introducción, materiales y métodos).

El objeto de la invención es el uso de una bacteria láctica, *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, para la conservación de flavanoles, catequina y/o epicatequina, en un producto alimenticio (reivindicaciones 1-8). En el caso de que se trate de vino se usar *Lactobacillus* en cualquier momento de la elaboración del mismo para disminuir el pardeamiento de dicho vino con respecto a un control (reivindicaciones 8-15).

El objeto de la reivindicación 1, del que dependen las reivindicaciones 2-15, difiere por lo tanto de este conocido en el documento D01 en que usa levaduras para la conservación de flavanoles en los productos alimenticios y para evitar el pardeamiento del vino, en lugar de bacterias como indica la solicitud de la invención.

Ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda, o cualquier combinación relevante de ellos revela el uso de bacterias lácticas en producto alimenticios para la conservación de flavanoles ni para disminuir el pardeamiento del vino.

Por lo tanto, los documentos citados en el informe de búsqueda reflejan únicamente el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva.

En consecuencia se considera que el objeto de la invención descrito en las reivindicaciones 1-15 cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y el de actividad inventiva según el artículo 8.1 de la Ley 11/1986.