

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 229**

51 Int. Cl.:
A23L 3/3571 (2006.01)
A23L 2/44 (2006.01)
C12G 1/00 (2006.01)
C12H 1/00 (2006.01)
C12H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09706714 .4**
96 Fecha de presentación: **22.01.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2247205**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2010**

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA LA ESTABILIZACIÓN DE UN LÍQUIDO ACUOSO ALIMENTICIO
SENSIBLE A LA OXIDACIÓN.**

30 Prioridad:
23.01.2008 FR 0850421

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
**Institut National De La Recherche Agronomique
(INRA)
145, Rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:
SALMON, Jean-Michel

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 371 229 T3

DESCRIPCIÓN

Composición para la estabilización de un líquido acuoso alimenticio sensible a la oxidación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la conservación de los líquidos que pueden ser alterados por unos fenómenos de oxidación.

10 **Técnica anterior**

De manera general, existe una necesidad constante para la puesta a punto de nuevos procedimientos que permitan estabilizar los líquidos acuosos alimenticios sensibles a la oxidación, con el fin de mejorar sus condiciones de conservación o alargar su tiempo de almacenamiento.

15 Los inconvenientes relacionados con la alteración de las propiedades fisicoquímicas o de las propiedades organolépticas de los líquidos acuosos para la alimentación humana o animal son conocidos desde hace mucho tiempo. Ya se han descrito en el estado de la técnica unas soluciones que permiten superar dichos inconvenientes.

20 Los medios conocidos para reducir o bloquear la oxidación de los líquidos acuosos alimenticios a lo largo del tiempo de conservación engloban: (i) los medios físicos, (ii) los medios que utilizan unos agentes químicos con propiedades antioxidantes y (iii) los medios que utilizan unos agentes biológicos, por ejemplo unos microorganismos.

25 Entre los diferentes medios mecánicos, se pueden citar los que permiten la eliminación del oxígeno disuelto en unos líquidos, tales como:

- un procedimiento de puesta bajo presión del líquido, preferentemente un zumo de fruta, mediante la utilización de nitrógeno gaseoso, tal como se ha descrito en la patente JP 2006141319;
- 30 - una película que absorbe el oxígeno que se deposita en la superficie del líquido a proteger, tal como se ha descrito en la solicitud de patente JP 6100044;
- una doble capa de películas para aislar el líquido a proteger, siendo la capa externa impermeable al oxígeno y pudiendo la capa interna absorber el oxígeno, tal como se ha descrito en la solicitud de patente JP 5319459;
- 35 - un procedimiento de aplicación de una capa de gas inerte más densa que el aire compatible con los alimentos en la superficie de líquidos, en particular de bebidas expuestas al oxígeno en un recipiente abierto, tal como se ha descrito en la solicitud de patente EP 0 134 687.

40 Entre los medios de tratamiento químico utilizados para estabilizar contra la oxidación los líquidos con destino alimenticio, en particular las bebidas fermentadas, más particularmente los vinos, se practica la utilización de PVP (polivinilpirrolidona), de ácido ascórbico y/o de sulfito (SO₂). Pero dichos procedimientos de estabilización química contra la oxidación son susceptibles de estar muy reglamentados en el futuro e incluso, por lo menos para algunos de estos procedimientos, prohibidos.

45 Entre los medios biológicos, se conoce la utilización de microorganismos tales como las bacterias de granos de kéfir como aditivos antioxidantes, para bebidas en particular, tal como se ha descrito en la solicitud de patente EP 1 607 476.

50 Según los tipos de líquidos acuosos alimenticios, las reacciones de oxidación de las sustancias que estos líquidos contienen, a lo largo del tiempo de conservación, provocan unas alteraciones de grado variable de sus propiedades fisicoquímicas u organolépticas.

55 Entre los líquidos acuosos alimenticios para los cuales una oxidación provoca unas alteraciones que los hacen impropios para el consumo, se cita en primer lugar los vinos, y por orden de importancia el vino blanco.

Las reacciones de oxidación que tienen lugar en los vinos, en particular en los vinos blancos, los vinos rosados y algunos vinos tintos, provocan una pérdida de los aromas varietales, un perfil organoléptico modificado y una coloración marrón de los vinos. Estas modificaciones indeseables están provocadas, por lo menos en parte, por unas reacciones de oxidación.

60 En particular, se atribuye el oscurecimiento de los vinos blancos a unas reacciones de polimerización oxidativas de ciertos polifenoles. Ciertos polifenoles, reaccionando con el oxígeno, se transforman en quinonas y semi-quinonas. Estos compuestos muy reactivos se complejan con otros compuestos con función sulfanilo, tales como los tioles volátiles, para formar unos pigmentos marrones. Esta complejación con las quinonas y las semi-quinonas destruye las propiedades aromáticas de los tioles volátiles.

Los vinos blancos se elaboran con el objetivo de obtener unos vinos afrutados, frescos, para consumir bastante rápidamente, o bien unos vinos de crianza de tipo "premium" envejecidos durante varios años.

5 Es esencial proteger los vinos, en particular los vinos blancos, de la oxidación y del oscurecimiento que pueden deteriorar su perfil organoléptico. En particular, el deterioro de los aromas y el oscurecimiento aportan un impacto organoléptico negativo que provoca una fuerte depreciación en la venta, y en consecuencia una pérdida económica significativa.

10 A partir del momento en el que los vinos blancos están acondicionados en diferentes recipientes, después de la etapa de filtración que se realiza al final de la fermentación, están expuestos de manera continua al oxígeno del aire. En efecto, con el vino blanco se atrapa oxígeno en el momento del acondicionamiento. Después, como los recipientes no son totalmente herméticos a los gases, el oxígeno penetra en el recipiente a lo largo de la conservación del vino y de su envejecimiento.

15 Se han previsto varias soluciones para prevenir este oscurecimiento y las alteraciones organolépticas asociadas, debidos al contacto del vino con oxígeno a lo largo del tiempo de conservación, tales como:

- limitar la exposición al oxígeno,
- 20 - utilizar unos antioxidantes naturales o sintéticos, o
- eliminar los polifenoles responsables del oscurecimiento.

25 Sin embargo, con las técnicas actuales utilizadas para acondicionar los líquidos acuosos con destino alimenticio, incluyendo los vinos, es muy difícil excluir totalmente cualquier contacto de dichos líquidos con el oxígeno del aire durante su transporte hasta la unidad de acondicionamiento.

Además, después del acondicionamiento en botella de vidrio, el oxígeno se puede difundir a través de un tapón de corcho o proceder del espacio de cabeza gaseoso situado debajo del corcho después del embotellado.

30 En el caso del vino, el contacto con el oxígeno del aire tiene lugar asimismo para otros tipos de acondicionamiento, tales como odre de vino o BIB® (por "Bag-In-Box"). En los BIB®, el vino está acondicionado al vacío en una bolsa de material plástico, siendo dicha bolsa de material plástico dispuesta en el interior de un embalaje de cartón. La bolsa de material plástico está fabricada en un material que actúa como barrera para el oxígeno sobre su cara externa, pero no es totalmente hermética al oxígeno.

35 Para limitar o bloquear las reacciones de oxidación en el vino durante su conservación, la aportación de agentes químicos antioxidantes tales como el sulfito (SO_2) para impedir la oxidación de los compuestos sensibles del vino es muy limitada debido a que está sometido a la reglamentación sobre los productos alimenticios. El dióxido de azufre añadido en exceso puede asimismo alterar la calidad organoléptica del vino.

40 Para eliminar los polifenoles con el fin de corregir el oscurecimiento de los vinos blancos, unos agentes de encolado se utilizan comúnmente, tal como el carbón activado o la PVPP (polivinilpirrolidona) (Fialdes, E., Rev. des oenologues, 1989, 54, 19-22; Baron, R. *et al.*, Z. Lebensm. Unters Forsch, 1997, 205, 474-78). Sin embargo, estas sustancias adolecen del inconveniente de alterar los sabores y los aromas de los vinos (Sims, C. A., *et al.*, Am. J. Enol. Vitic; 1995, 46(2), 155-158). Además, se debe evitar si es posible la eliminación de algunos polifenoles tales como el resveratrol, que tiene unas propiedades fisicoquímicas y organolépticas muy interesantes desde un punto de vista alimenticio y de la salud.

45 Unas investigaciones académicas han mostrado que la adición en el embotellado de 10 mg/l de glutatión a un vino blanco, limita el amarillamiento de su color, la erosión de su aroma y su tendencia a no envejecer bien. El glutatión podría reaccionar durante la crianza del vino o después del embotellado, con las quinonas para formar un complejo incoloro, impidiendo entonces estas mismas quinonas reaccionar con numerosos compuestos con función sulfanilo, entre los cuales los tioles del vino (moléculas aromáticas), lo cual provoca habitualmente un complejo marrón, y que impide la expresión aromática.

50 Estos resultados no son sin embargo susceptibles de ser extrapolados a la práctica de los viticultores, puesto que la adición de glutatión a un vino terminado no está permitida en las prácticas enológicas. Por otra parte, la introducción de glutatión en el mosto plantea el problema de su consumo durante la fermentación alcohólica por las levaduras activas inoculadas.

55 Así, si estos estudios presentan un interés para la comprensión de los fenómenos en juego en el deterioro de los aromas y el oscurecimiento de los vinos blancos, no se propone ninguna solución técnica para permitir librarse en la práctica de estos problemas.

60 Como ya se ha mencionado, se ha previsto asimismo utilizar unos agentes biológicos para limitar los fenómenos de oxidación debidos a la presencia de oxígeno, en particular mediante la utilización de levaduras consumidoras de

oxígeno.

La solicitud de patente europea EP 0 305 005 B1 describe la utilización de levaduras que consumen oxígeno para limitar los fenómenos de oxidación en los productos que contienen agua durante su conservación. Esta solicitud de patente describe en particular una levadura y un procedimiento más particularmente adaptados a la conservación de la cerveza. Las levaduras utilizadas consisten en unas levaduras deshidratadas que ulteriormente son rehidratadas por el agua contenido en la cerveza. Después de su rehidratación, estas levaduras son viables y se reproducen. Para evitar la generación de turbidez en la cerveza debida a la multiplicación de las levaduras consumidoras de oxígeno, estas células de levaduras son inmovilizadas en unos soportes sólidos compatibles con las normas alimentarias, tales como unas ceras o unas gomas. Estos soportes son permeables al agua y al oxígeno. Durante la etapa de pasteurización, realizada para el acondicionamiento de la cerveza, las células de levadura siguen siendo viables, capaces de consumir oxígeno. Este consumo del oxígeno no se realiza mediante una reacción de fermentación. La solicitud EP 1 236 795 describe la utilización de levadura enológica activa después de la fase de fermentación en un procedimiento de vinificación para obtener unos vinos de calidad superior.

Con el fin de evitar los fenómenos de oxidación durante el envejecimiento o la conservación del vino, se ha sugerido tratar el vino con unas células de levaduras de panadería (Bonilla *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2001, 49, 1928-1933). En efecto, las membranas de las levaduras tienen la propiedad de retener ciertos compuestos, y en particular unas sustancias colorantes tales como los antocianos. Los vinos han sido tratados mediante unas dosis de levadura comprendidas entre 0,5 g/l y 5 g/l durante 24 horas, y después han sido filtrados. Se ha observado un efecto sobre la coloración, mientras que las propiedades gustativas estaban conservadas. Esta técnica que pertenece a las "tecnologías verdes" adolece sin embargo del inconveniente de necesitar una esterilización microbiológica subsiguiente con el fin de evitar que las células de levadura residuales se multipliquen y alteren la transparencia así como las propiedades organolépticas del vino tratado.

La solicitud PCT WO 2005/0800543 describe un procedimiento de preparación de un vino que permite prevenir los problemas de oxidación encontrados durante el envejecimiento del vino, preferentemente un vino blanco, gracias a la introducción de levadura enriquecida en glutatión en el mosto antes de la puesta en fermentación, preferentemente al principio o durante la fermentación. Gracias a este procedimiento, es posible obtener, utilizando únicamente unos ingredientes naturales, unos vinos blancos de calidad, que responden a los criterios siguientes: redondez del vino, frescura y afrutado, estabilidad en el tiempo de los aromas, estabilidad en el tiempo del color. No se requiere ninguna adición de sustancias extrañas tales como antioxidantes químicos, y no es necesaria ninguna manipulación compleja.

Según la solicitud PCT WO 2005/080543, se recomienda introducir la levadura enriquecida en glutatión en el mosto al principio de la fermentación.

Los tratamientos post-fermentación del vino para obtener un producto terminado apto para el envejecimiento o para el consumo, en particular las etapas de filtración, permiten la eliminación de las levaduras enriquecidas en glutatión. Durante la conservación del vino blanco en un recipiente, los problemas de oxidación, de oscurecimiento, de alteración de las propiedades gustativas y olorosas siguen estando por lo tanto no resueltos.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procedimientos de estabilización de los líquidos acuosos alimenticios, aptos para proteger dichos líquidos de la oxidación provocada por el oxígeno durante su tiempo de conservación.

Sumario de la invención

La invención tiene por objeto una composición para proteger de la oxidación un líquido alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación durante su conservación que comprende una combinación de dos tipos de células de levaduras: (i) unas células de levaduras no viables y seleccionadas por su aptitud para consumir rápidamente oxígeno y (ii) unas células de levaduras inactivadas producidas de manera que sean ricas en glutatión, tal como se definen en la reivindicación 1.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de estabilización de un líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación durante su conservación, que comprende una etapa de puesta en contacto de dicho líquido con dicha composición de células de levadura.

La invención se refiere asimismo a un tratamiento realizado de manera que disminuya el potencial de oxidorreducción de un líquido acuoso alimenticio de manera que favorezca la expresión óptima de ciertos compuestos en equilibrio de oxidorreducción en dicho líquido, y que tienen un interés organoléptico en su forma reducida.

La presente invención tiene asimismo por objeto una utilización de la composición de células de levaduras anterior para estabilizar, durante la conservación, los líquidos acuosos alimenticios definidos anteriormente frente a la oxidación.

Descripción de las figuras

Con el fin de poner más claramente de manifiesto la invención, se hará referencia ahora a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 representa la evolución del contenido en oxígeno disuelto a lo largo del tiempo para un vino puesto en presencia de lías (Lies), o bien de levaduras OptiWhite® (OW), o bien de la composición según la invención (en este caso en presencia de lías y de levaduras OptiWhite® (L+OW)). La curva A2 representa la curva de evolución en oxígeno de la temperatura a lo largo del tiempo. La abscisa representa los días y la ordenada representa el contenido en O₂ (mg/l) para las curvas A2, lías, OW y L+W o la temperatura en °C dividida por dos para la curva Temp/2.

La figura 2a representa la evolución media del parámetro "L" por modalidad para las lías, las levaduras OptiWhite® y la composición según la invención, siendo el parámetro "L" uno de los parámetros cromáticos de la CIE 1976. La abscisa representa los días y la ordenada representa el valor del parámetro "L".

La figura 2b representa la evolución media del parámetro "a" por modalidad para las lías, las levaduras OptiWhite® y la composición según la invención, siendo el parámetro "a" uno de los parámetros cromáticos de la CIE 1976. La abscisa representa los días y la ordenada representa el valor del parámetro "a".

La figura 2c representa la evolución media del parámetro "b" por modalidad para las lías, las levaduras OptiWhite® y la composición según la invención, siendo el parámetro "b" uno de los parámetros cromáticos de la CIE 1976. La abscisa representa los días y la ordenada representa el valor del parámetro "b".

La figura 3a representa la evolución del contenido en oxígeno disuelto residual de un vino conservado en una botella de vidrio control con tapón y la evolución del contenido en oxígeno disuelto residual de un vino conservado en una botella de vidrio con un tapón puesto en contacto con la composición según la invención. La abscisa representa el tiempo en días y la ordenada representa el contenido en oxígeno disuelto (mg/l).

La figura 3b representa la evolución del potencial de oxidorreducción de un vino conservado en una botella de vidrio control con tapón y la evolución del potencial de oxidorreducción de un vino conservado en una botella de vidrio con tapón puesto en contacto con la composición según la invención. La abscisa representa el tiempo en días y la ordenada representa el potencial de oxidorreducción (mV).

La figura 3c representa la evolución del contenido en glutatión de un vino conservado en una botella de vidrio control con tapón y la evolución del contenido en glutatión de un vino conservado en una botella de vidrio con tapón puesto en contacto con la composición según la invención. La abscisa representa el tiempo en días y la ordenada representa el contenido en glutatión (mg/l).

Las figuras 4a, 4b y 4c representan la evolución de las características cromáticas, respectivamente los parámetros "L", "b" y "a", de un vino conservado en una botella de vidrio control con tapón y la evolución de las características cromáticas de un vino conservado en una botella de vidrio con tapón puesto en contacto con la composición según la invención. La abscisa representa los días a 30°C y la ordenada representa el valor de los parámetros "L", "b" y "a".

Descripción detallada

La presente invención proporciona unas composiciones y unos procedimientos destinados a estabilizar los líquidos acuosos alimenticios contra la oxidación durante su conservación.

La invención tiene por objeto una composición para proteger de la oxidación un líquido alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación durante su conservación que comprende una combinación de dos tipos de células de levaduras:

- (i) unas células de levaduras no viables y aptas para consumir rápidamente el oxígeno, y
- (ii) unas células de levaduras inactivadas enriquecidas en glutatión, tal como se han definido en la reivindicación 1.

La composición anterior ofrece una solución simple y poco costosa para la estabilización contra la oxidación de un líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, muy particularmente durante su periodo de conservación.

El efecto de estabilización contra la oxidación de la composición según la invención se ilustra en particular mediante una estabilización del color, de los aromas varietales sensibles a la oxidación, y más generalmente de las propiedades organolépticas del líquido acuoso alimenticio que se trata con esta composición.

Preferentemente, se entiende por "líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación" unas bebidas destinadas al consumo humano.

Las bebidas destinadas al consumo humano engloban las bebidas del grupo (i) zumos de frutas o de vegetales, (ii) de las bebidas fermentadas, (iii) leche, (iv) composiciones líquidas o semilíquidas preparadas a base de leche, fermentadas o no fermentadas, y (v) té.

Las bebidas fermentadas engloban el vino, la cerveza, la sidra, el sake y el yogur líquido denominado "yogur bebible".

Según la invención, se entiende por "vino" el producto obtenido mediante la fermentación alcohólica, total o parcial, de bayas de uvas frescas, prensadas o no prensadas, o de mostos de uva.

Preferentemente, dichas sustancias sensibles a la oxidación son unos polifenoles.

Preferentemente, se entiende por líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, unas bebidas destinadas al consumo humano que contienen por lo menos 1 mg de polifenoles por litro de dicho líquido.

Dicho líquido que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación se selecciona preferentemente de entre el grupo de las cervezas, de los zumos de frutas, de los vinos muy sensibles al oxígeno y demás bebidas muy sensibles al oxígeno.

Los vinos engloban los vinos blancos, los vinos rosados y los vinos tintos.

Todavía más particularmente, los vinos engloban de manera general todos los vinos blancos, que son conocidos por ser muy sensibles a la oxidación, así como ciertos vinos rosados y tintos.

Así, de manera muy preferida, el líquido acuoso alimenticio consiste en un vino blanco.

Por protección contra la oxidación, o también estabilización, de un líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, se entiende una reducción o un bloqueo de las reacciones de oxidación de ciertos compuestos tales como los polifenoles contenidos en dicho líquido y de dichas reacciones de oxidación sobre las cualidades fisicoquímicas y organolépticas que hacen dicho líquido apropiado para el consumo humano.

Durante su conservación, los vinos blancos pueden sufrir una pérdida de los aromas varietales, una modificación de su perfil organoléptico, así como un oscurecimiento. Se entiende por estabilización de un vino blanco, en particular una protección contra las evoluciones aromáticas y cromáticas indeseables provocadas por la oxidación.

Según la invención, unas células de levaduras no viables o inactivadas tienen en común la pérdida de su capacidad para multiplicarse y para fermentar.

Por células de levaduras no viables aptas para consumir rápidamente el oxígeno, se entienden unas células de levaduras que han perdido su capacidad para multiplicarse y que poseen una velocidad de reacción con el oxígeno y una afinidad para el oxígeno superiores a dichas sustancias sensibles a la oxidación, tal como se ha ilustrado en el ejemplo 1. En un modo de realización privilegiado, estas células de levaduras han sido previamente seleccionadas por su aptitud para consumir rápidamente oxígeno.

La aptitud de las células de levadura no viables para consumir rápidamente el oxígeno se ilustra en particular mediante su velocidad de consumo del oxígeno.

La velocidad de consumo del oxígeno por unas células de levadura introducidas en un medio dado se puede determinar a partir de la cinética de evolución de la cantidad de oxígeno en dicho medio a lo largo del tiempo. La cantidad de oxígeno presente en el medio a lo largo del tiempo se puede determinar mediante los métodos de dosificación del oxígeno bien conocidos por el experto en la materia. En particular, el experto en la materia puede utilizar un oxímetro adaptado a la medición del oxígeno en un medio líquido. En algunos modos de realización, la cantidad de oxígeno se mide a lo largo del tiempo gracias a un oxímetro provisto de una sonda polarográfica o de una sonda galvánica tal como se ha ilustrado en el ejemplo 1.

En todos los casos de medición, la concentración en levaduras en el medio debe ser del orden de 10^8 células por ml para permitir una medición precisa de su consumo en oxígeno.

Preferentemente, el medio utilizado para determinar la velocidad de consumo del oxígeno de las levaduras es un medio hidroalcohólico que comprende eventualmente unas sustancias sensibles a la oxidación.

Se entiende por medio hidroalcohólico un medio procedente de la mezcla de una disolución acuosa y etanol, estando el porcentaje de etanol comprendido preferentemente entre 5% y 20% en volumen con respecto al volumen total del medio.

Los inventores han mostrado que unas células de levaduras no viables que presentan una velocidad de consumo en oxígeno de por lo menos $5 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levaduras en el tampón CMP (medio hidroalcohólico descrito en el ejemplo 1) a una concentración celular del orden de 10^8 células/ml son suficientemente aptas para consumir rápidamente el oxígeno en el sentido de la invención.

En algunos modos de realización preferidos, las levaduras no viables aptas para consumir rápidamente oxígeno consisten en unas células de levaduras que poseen una velocidad de consumo en oxígeno de por lo menos $5 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levadura cuando dichas células de levadura están presentes a una concentración del orden de 10^8 células/ml en un tampón hidroalcohólico.

Se entiende por una velocidad de consumo en oxígeno de por lo menos $5 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levadura, preferentemente una velocidad de consumo en oxígeno de por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\text{ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levadura.

De manera preferida, las células de levaduras no viables aptas para consumir rápidamente oxígeno presentan una velocidad de consumo en oxígeno comprendida entre $5 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ y $40 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levadura.

Se entiende por una concentración del orden de 10^8 células/ml, una concentración comprendida entre 10^7 y 10^9 células/ml.

En algunos modos de realización de la composición, las células de levaduras no viables aptas para consumir rápidamente el oxígeno se pueden seleccionar de entre el grupo constituido por las lías de levadura y las células de levadura inactivadas.

Se entiende por células de levadura inactivadas unas células de levadura que han sufrido un tratamiento que las hacen ineptas para multiplicarse y para fermentar. Dicho tratamiento puede ser, por ejemplo, un tratamiento térmico, químico y/o mediante radiación.

A título ilustrativo y no limitativo, se pueden citar como células de levadura inactivadas apropiadas la cepa EC1118 inactivada térmicamente tal como se ha ilustrado en el ejemplo 8 de la presente solicitud.

En algunos modos de realización, se seleccionan unas lías de levaduras procedentes de la fermentación del vino como células de levaduras no viables y aptas para consumir rápidamente oxígeno. En efecto, las lías representan grandes cantidades de células de levadura no viables al final de la fermentación en el procedimiento de vinificación. Estas células no viables de levadura poseen grandes cantidades de moléculas-sustratos de reacción de oxidación ocultas cuando estas células están vivas en particular durante la multiplicación celular (véase por ejemplo Fornairon *et al.*, 2000, Food Chemistry, Ed Elsevier, p. 519-528).

Durante el proceso de fermentación, durante la vinificación por ejemplo, se ha demostrado que el consumo de oxígeno por las lías podría oponerse a unos fenómenos de oxidación perjudiciales para las cualidades organolépticas del vino tras unas adiciones de oxígeno en el medio, (véase por ejemplo Salmon *et al.*, 2003, Journal of Bioscience and Bioengineering, p. 496-503). De manera sorprendente, la realización de la composición según la invención demuestra que estas propiedades de las lías resultan útiles para proteger los vinos terminados durante la conservación de los fenómenos de oxidación que se han vuelto indeseables.

En algunos modos de realización, las células de levadura no viables son unas lías de levadura obtenidas a partir de un cultivo de levaduras en un medio de fermentación que reproduce las condiciones de los mostos naturales.

A título ilustrativo y no limitativo, se puede citar como medio de fermentación que reproduce las condiciones de los mostos naturales un medio sintético rico en nitrógeno asimilable tal como el medio MS300.

A título ilustrativo y no limitativo, se pueden citar como células de levaduras no viables que poseen un consumo en oxígeno de por lo menos $5 \text{ ng O}_2 \text{ s}^{-1}$ por 10^{10} células de levaduras, la lía de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* K1 obtenida mediante cultivo de dichas levaduras en el medio sintético MS300. La obtención de dicha lía y la determinación de su velocidad de consumo del oxígeno están descritas en el ejemplo 1.

Se puede pensar que las lías de levaduras consumen el oxígeno presente en cualquier tipo de líquido que contiene unas sustancias reactivas al oxígeno. La capacidad de consumo de oxígeno de estas células de levaduras no viables puede ser superior a la de células deshidratadas viables y a la de células inactivadas, tal como se ha ilustrado en el ejemplo 2.

En algunos modos de realización de la composición según la invención, las células de levaduras no viables aptas para consumir rápidamente oxígeno consisten en unas células de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

De manera general, las células de levaduras inactivadas enriquecidas en glutatión consisten en unas células de levadura que han sido producidas específicamente para contener una gran cantidad de glutatión y liberar una gran cantidad de glutatión en el medio exterior.

- 5 En algunos modos de realización de la composición, dichas levaduras inactivadas enriquecidas en glutatión son unas levaduras tales como las descritas en la solicitud PCT WO 2005/080543. Están caracterizadas por la dosificación de su contenido en glutatión según el método del ejemplo 1, página 8 de la solicitud WO 2005/080543.

10 Sin querer estar vinculado a cualquier teoría, el solicitante piensa que el glutatión, que está liberado por las células de levaduras enriquecidas en este compuesto, reacciona durante la crianza o después del embotellado, con las quinonas para formar un complejo incoloro, que impide entonces que estas mismas quinonas reaccionen: (i) con los compuestos químicos con función sulfanilo de los cuales los tiores de vino (moléculas aromáticas), lo cual conduce a una reacción de la expresión aromática, (ii) con otros compuestos fenólicos para formar unos pigmentos complejos de color amarillo a marrón que alteran el color del producto.

15 Las células de levaduras contienen naturalmente una cierta cantidad de glutatión, generalmente de 0,2% en peso a 0,5% en peso, con respecto al peso total de materia seca, es decir 0,2 g a 0,5 g de glutatión por 100 g de materia seca de levadura.

20 La producción de células de levaduras enriquecidas en glutatión es bien conocida por el experto en la materia que sabe prepararla mediante unas técnicas a su disposición (Catalino *et al.*, 1992, Applied Microbiology and Biotechnology, Ed Springer-Verlag, p. 141-146).

25 Se puede enriquecer en glutatión una levadura poniéndola en presencia de cisteína, en unas condiciones óptimas de cultivo, pudiendo dicha levadura difundir en el medio hasta 154,54 mg/l de glutatión después de 72 horas de fermentación, (véase Santos *et al.*, 2007, Applied Microbiology and Biotechnology, Ed. Springer, p. 1211-1216).

30 Las levaduras enriquecidas en glutatión, utilizadas para fabricar la composición según la invención, contienen más de 0,5% en peso de glutatión, en peso con respecto al peso total de materia seca de la levadura. De manera ventajosa, la levadura enriquecida en glutatión contiene por lo menos 1% en peso de glutatión, y preferentemente por lo menos 1,5% en peso de glutatión, en peso con respecto al peso total de materia seca de la levadura. Por ejemplo, para una eficacia óptima, se utiliza una levadura enriquecida al 1,8% en peso de glutatión, con respecto al peso total de las células de levadura.

35 Se pueden inactivar dichas levaduras enriquecidas en glutatión mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, tal como por ejemplo mediante tratamiento térmico, químico y eventualmente mediante exposición a una radiación, incluyendo una radiación radioactiva o una radiación ultravioleta. Dichas levaduras inactivadas son no viables y ya no pueden multiplicarse ni fermentar.

40 En algunos modos de realización ventajosos, las células de levaduras enriquecidas en glutatión según la invención pertenecen a unas especies de levadura de tipo enológico, de las cuales la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Las especies de levaduras de tipo enológico engloban unas *Saccharomyces cerevisiae*.

45 La combinación (i) de las células de levaduras no viables y aptas para consumir rápidamente oxígeno y (ii) de las células de levaduras inactivadas enriquecidas en glutatión, en una composición estabilizante de la invención, conduce a una protección eficaz del vino contra los fenómenos de oxidación, ya sea a nivel del color, de la conservación de aromas varietales sensibles a la oxidación, y más generalmente a nivel de la cualidad organoléptica. Esta sinergia se ilustra en los ejemplos siguientes.

50 La expresión "durante su conservación" se utiliza para designar el momento en el que se utiliza la composición según la invención. Un líquido acuoso alimenticio se considera como "en curso de conservación" a partir del momento de su acondicionamiento en un recipiente de almacenamiento y de su almacenamiento en un lugar en el que se favorece su estabilización. La temperatura de conservación de un líquido acuoso alimenticio puede variar según el tipo de líquido acuoso considerado. Por ejemplo, un zumo de frutas pasteurizado y conservado estérilmente puede ser conservado a temperatura ambiente, es decir a una temperatura de aproximadamente 20°C, incluso a una temperatura de 20°C. La temperatura de conservación de un zumo de frutas no pasteurizado debe ser baja con el fin de evitar la proliferación eventual de microorganismos que dicho zumo es susceptible de contener, estando dicha temperatura comprendida clásicamente entre 1°C y 7°C, preferentemente entre 3°C y 5°C. La temperatura de conservación a largo plazo de un vino está comprendida clásicamente entre 10°C y 17°C, ventajosamente entre 11°C y 15°C y preferentemente es de aproximadamente 12°C. Sin embargo, sea cual sea el líquido acuoso alimenticio considerado, las condiciones de temperatura óptima de conservación no siempre se respetan durante el periodo de tiempo de transporte, pudiendo este periodo de tiempo ser de varios días, incluso más de una semana, por ejemplo para un transporte intercontinental de muy larga distancia realizado por vía marítima.

65 En el caso de un transporte de un líquido acuoso alimenticio en unas condiciones de temperatura significativamente

superior a la temperatura óptima predefinida, estas condiciones de temperatura no controladas pueden provocar una alteración de las cualidades de dicho líquido acuoso alimenticio, por ejemplo provocar una aceleración de las reacciones de oxidación.

Ahora bien, el solicitante ha mostrado que la composición de la invención conserva su actividad de protección de un líquido acuoso alimenticio contra la oxidación hasta unas temperaturas elevadas de por lo menos 30°C. En consecuencia, la composición según la invención es activa sobre la estabilización de los líquidos acuosos alimenticios contra la oxidación durante la totalidad del periodo de conservación de dicho líquido, incluyendo durante el periodo de tiempo de transporte en el que las condiciones óptimas de conservación no siempre se pueden respetar. Además, la composición según la invención es asimismo activa en unas situaciones en las que la temperatura de conservación ya no es óptima, por ejemplo en el caso de un desajuste de los dispositivos de regulación de temperatura, o bien en el caso de un periodo climático de fuerte calor.

En un modo de realización preferido de una composición estabilizante según la invención, las células de levaduras están incluidas juntas en un sistema de inmovilización permeable a los líquidos. Dicho sistema de inmovilización está realizado en unos materiales compatibles con las normativas alimentarias. Dichos materiales pueden ser, de manera no limitativa, unos capilares membranarios, unos tubos de silicona o unos aditivos de tipo texturantes o gelificantes.

El conjunto de dichas células de levaduras y del sistema de inmovilización en el que están incluidas, preferentemente inmovilizadas, constituye una composición según la invención de tipo "biosistema antioxidante inmovilizado".

En un modo de realización de una composición según la invención, los dos tipos de células de levaduras están inmovilizados juntos sobre un soporte a base de alginato, que es al mismo tiempo un aditivo alimenticio texturante y una macromolécula alimenticia con poder reticulante.

A título ilustrativo, se inmovilizan dichas células en un gel preparado a partir de polisacáridos tal como el alginato de calcio (formación ionotrópica del gel) o carragenato de potasio (gel termorreversible).

Unas técnicas de inmovilización de células de levaduras en una matriz de alginato de calcio se describen en particular en Kawaguti *et al.*, 2006, Biochemical Engineering Journal 29, 270-277.; Lu & Wilkins, 1996 Journal of Hazardous Materials 49, 165-179; Podrazky & Kuncova, 2005, Sensors and Actuators B: Chemical 107, 126-134; Riordan *et al.*, 1996, Bioresource Technology 55, 171-173).

Por ejemplo, para preparar una composición estabilizante según la invención, se pueden inmovilizar unas células de levaduras en un soporte de alginato realizando una mezcla de una disolución de alginato de sodio al 3% (p/v) y de una disolución que contiene las células a inmovilizar. Después, la mezcla se vierte gota a gota en una disolución de cloruro de calcio (0,15 M) con el fin de generar unas bolas de alginato en las que están incluidas las células de levadura.

Los ensayos semi industriales sobre el vino blanco descritos en el ejemplo 5 ilustran la eficacia de la combinación de células de levaduras de la invención cuando están inmovilizadas sobre un soporte en alginato.

De manera ventajosa, este modo de realización preferido de una composición según la invención permite controlar la repartición de las levaduras inactivas en el recipiente con el fin de que estén situadas lo más cerca posible de una zona de oxidación. Permite además eliminar fácilmente, mediante cualquier medio mecánico apropiado, las células de levaduras del líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación en un momento elegido por el experto en la materia como el más apropiado, por ejemplo en el momento en el que el efecto reivindicado alcanza su óptimo de eficacia contra la oxidación de dicho líquido acuoso alimenticio.

Un vino blanco se considera en curso de conservación a partir del momento en el que la fermentación ya no tiene lugar y se han eliminado todos los microorganismos presentes en el vino, por filtración por ejemplo. El vino blanco se encuentra entonces almacenado en unos recipientes que pueden ser, de manera no limitativa:

- odres de vino, o BIB® del anglicismo "bag-in-box", que son unas bolsas para vino en el interior de una caja de cartón que se retrae a medida que se vacía sin que el aire penetre en ella;
- botellas de vidrio obturadas por un tapón que pueden ser de 75 cl, garrafa, damajuana, magnum, jéroboam, réhoboam, mathusalem, salmanazar, balthazar, nabuchodonosor, salomon, souverain o primat;
- cubas cerradas (de inoxidable, hormigón, plástico, cerámica, etc.);
- cubitainers;
- botellas de plástico o tetrabrik (o Tetra-brik®);

- recipientes de madera de roble, que pueden ser unos bidones, medios toneles, barriles, barricas o toneles.

Preferentemente, los recipientes en los que se conserva el vino blanco son unos BIB® o unas botellas de vidrio taponadas.

La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de estabilización, durante su conservación, de un líquido que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, que comprende una etapa de puesta en contacto del medio constituido por dicho líquido a estabilizar con una composición de estabilización tal como la definida en la presente invención.

Dicho procedimiento de estabilización tiene como objetivo luchar contra la oxidación progresiva del líquido a estabilizar, con la duración de conservación.

Se pueden distinguir dos tipos de puesta en contacto con dicha composición de células de levaduras.

La selección entre dichos dos tipos de puesta en contacto se efectúa en función del contenido en oxígeno disuelto de dicho líquido que contiene unas sustancias sensibles al oxígeno.

Si el contenido en oxígeno de dicho líquido es de por lo menos 0,1 mg/l, por ejemplo en un vino joven antes del acondicionamiento, es importante desviar el oxígeno hacia las células de levaduras no viables capaces de consumirlo rápidamente con el fin de conservar las sustancias sensibles al oxígeno, por ejemplo los polifenoles. Se debe entonces poner en contacto la totalidad de dicho líquido con dicha composición de células de levaduras. En este modo de realización, los dos tipos de células de levadura, (i) las células capaces de consumir oxígeno rápidamente y (ii) las células ricas en glutatión deben ser repartidas de manera homogénea en dicho líquido, siendo entonces la superficie de contacto entre dicho líquido y dichas levaduras máxima.

Si el contenido en oxígeno disuelto de la bebida es muy bajo, por ejemplo de como máximo 99 µg/l, por ejemplo el caso de un vino en curso de conservación sobre un largo periodo de tiempo, por ejemplo varios meses o incluso varios años, en cuba o en botella u otro recipiente, se debe impedir la disolución del oxígeno en los sitios en los que el líquido está en contacto con el oxígeno que ha podido penetrar en el recipiente después de su cierre, y por lo tanto impedir los fenómenos de oxidación en la interfaz entre el líquido y los lugares de penetración del oxígeno en el interior del recipiente. Para ello, el máximo de superficie de contacto entre el oxígeno y dichas levaduras debe encontrarse en dicha interfaz. Así, la repartición de dichas levaduras en dicho líquido debe ser determinada sobre dichas interfaces, por ejemplo la interfaz entre el líquido y el aire encerrado en su superficie en una cuba, o si no, la interfaz entre un vino y la superficie interna de un odre de vino. Se pueden prever entonces unas formas de soporte de inmovilización de dichas levaduras adaptadas a los diferentes tipos de interfaz a ocupar, por ejemplo una inmovilización de dichas levaduras sobre una película en el caso de las cubas o de los espaguetis de alginatos que se reparten de manera adecuada en la superficie interna en el caso de los odres de vino o BIB®.

Dichos dos modos de realización preferidos de dicho procedimiento están ilustrados por unos ejemplos de ensayos semi industriales sobre el vino blanco que se describen en el ejemplo 5.

De manera ventajosa, dicho procedimiento de estabilización es una alternativa a la adición de sulfito (SO₂) en los vinos.

En efecto, la puesta en contacto de un vino con una composición que comprende unas células de levaduras según el procedimiento de la invención presenta la ventaja, al contrario de la adición de sulfito, de evitar el riesgo de alergia incrementada y no provoca ninguna pérdida de las cualidades organolépticas. Además, se sabe que la presencia de lías de levaduras puede inducir, por medio de fenómenos de lisis celular, la introducción de coloides con la posibilidad de mejorar la estructura aromática del vino.

Por otra parte, algunas sustancias que proceden de la lisis de las células de levaduras protegen el vino contra las precipitaciones de hidrogeno-tartrato de potasio y de proteínas. Además, las paredes celulares de las levaduras pueden absorber diferentes sustancias indeseables, tales como los productos de fermentación y los metales pesados o unas toxinas (ocratoxina A).

Se debe subrayar asimismo la ventaja técnica que confiere la utilización de células de levadura inactivadas o no viables al procedimiento según la invención. El ejemplo 8 describe que incluso en el caso de su inclusión en un sistema de inmovilización, las levaduras viables se multiplican y son liberadas en el vino provocando un aumento notable de la turbidez del vino y en consecuencia, una alteración notable de su calidad final. A la inversa, las células inactivadas no se liberan en el medio y conservan su capacidad para consumir el oxígeno y para conservar los compuestos responsables de las cualidades organolépticas del vino.

Las características cromáticas y las propiedades organolépticas de dicho vino blanco terminado se ilustran en los ejemplos siguientes.

Dicho vino blanco terminado no se oxida durante su conservación gracias a su puesta en contacto con los dos tipos de células de levadura en combinación de la invención. En efecto, dichas células de levadura son capaces de consumir rápidamente oxígeno de dicho vino blanco impidiendo en un primer tiempo que el oxígeno reaccione con unos compuestos sensibles al oxígeno, de los cuales algunos garantizan las cualidades organolépticas del vino terminado, y después en un segundo tiempo por su liberación de glutatión -un antioxidante natural- impidiendo la formación de cascadas de reacciones de oxidación a largo plazo, evitando así la formación de compuestos perjudiciales para dichas cualidades organolépticas que son por ejemplo la ligereza, el afrutado, el sabor, los aromas y el aspecto.

La oxidación de los vinos blancos se traduce al final por un oscurecimiento visible a simple vista que se puede medir en el espacio CIE 1976.

El espacio CIE 1976 es bien conocido por el experto en la materia. (Según Wikipedia) CIE Lab es un modelo de representación de los colores desarrollados por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE), en 1976. La combinación L es la luminancia, que está comprendida entre 0 (negro) y 100% (blanco). La componente a representa la gama del eje rojo (valor positivo) -> verde (negativo) pasando por el blanco (0) si la luminancia vale 100%. La componente b representa la gama del eje amarillo (valor positivo) -> azul (negativo) pasando por el blanco si la luminancia vale 100%. El modelo de color Lab ha sido creado como un modelo absoluto, independiente del material, que se puede utilizar como referencia teórica. Una cosa importante de recordar en este modelo es el hecho de que está por definición parametrado correctamente. Por lo tanto no es necesario ningún espacio colorimétrico específico basado en modelo. En la práctica sin embargo, este modelo está adaptado en función de los periféricos y de los soportes de impresión (Adobe 1998, sRGB, ColorMatch, Pantone, etc.). CIE 1976 L*a*b* se basa directamente en el diagrama CIE XYZ y tiene como objetivo uniformizar la percepción de las diferencias de colores. Las relaciones no lineales para L*, a* y b* tienen como objetivo imitar la respuesta logarítmica del ojo (en el espacio L*a*b el ojo detecta 1 punto de variación de a o b para 5 puntos de L). Las informaciones de colores se refieren a la cromaticidad necesaria comparada con el punto blanco del sistema.

Se observa un aumento del parámetro "a" que hace pasar la dominante verde hacia la dominante roja para los vinos blancos oxidados, véase el ejemplo b sobre los ensayos semi industriales. No se observa este aumento del parámetro "a" para el vino blanco terminado según la invención.

Por último, la invención se refiere asimismo a la utilización de la composición que comprende dos tipos de células de levadura según la invención para proteger un líquido acuoso alimenticio que contiene unas sustancias sensibles al oxígeno contra los efectos de la oxidación de dichas sustancias durante su conservación.

En el caso de los vinos terminados conservados en odre de vino, o BIB®, es muy conocido que incluso si el BIB® está provisto de un tapón hermético, el acondicionamiento se realiza en presencia de un espacio de cabeza importante lleno de aire y la película externa de la envoltente del vino es una película parcialmente permeable al oxígeno. El BIB® presenta así menores propiedades de estanqueidad a los gases frente a la botella de vidrio (véase el informe de ICV, Institut coopératif du vin et du Conseil interprofessionnel des vins du Languedoc, «Conditionnement en caisses-outres (BIB®)», ed. 2006). En tiempo normal, al vino se le añade sulfito (SO₂) compuesto químico reductor de oxígeno. Los sulfitos adolecen del inconveniente de ser potencialmente alergénicos, de uso limitado en cantidad y de comunicar a fuerte dosis un olor "negativo" azufrado.

La utilización de la composición según la invención presenta numerosas ventajas con respecto a la utilización de sulfito (SO₂) para proteger un vino blanco contra los fenómenos de oxidación. En efecto, las levaduras de dicha composición son no viables o están inactivadas, es decir que son incapaces de reproducirse y de fermentar. No existe ningún riesgo de contaminación o de turbidez del vino durante su conservación. Responden a las normativas alimentarias puesto que proceden de la fermentación de dicho vino. La eficacia de la combinación de células de levaduras aptas para consumir oxígeno rápidamente y de células de levaduras enriquecidas con glutatión en la conservación de las cualidades de dicho vino blanco en BIB® se ilustra en los ejemplos siguientes.

La composición, el procedimiento y la utilización según la invención se ilustran mediante unos ejemplos en el campo de la conservación de los vinos blancos. Sin embargo, estos ejemplos se pueden extrapolar a otros tipos de líquidos acuosos alimenticios que contienen unas sustancias sensibles al oxígeno. Por ejemplo, se pueden utilizar asimismo unas lías de levaduras procedentes de las fermentaciones de vinos rosados y de vinos tintos particularmente sensibles a la oxidación para proteger de la oxidación dichos vinos rosados y tintos. Unas levaduras de fermentación de la cerveza que se han hecho no viables y aptas para consumir oxígeno o inactivadas y enriquecidas con glutatión pueden proteger la cerveza contra la oxidación durante su conservación.

El hecho de que cualquier especie de células de levaduras autorizadas para el consumo humano pueda ser hecha no viable y apta para consumir rápidamente oxígeno o puede ser inactivada y enriquecida con glutatión, hace que la composición, el procedimiento y la utilización según la invención sean aplicables a la estabilización de cualquier tipo de líquido acuoso alimenticio, que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, durante su conservación.

Los ejemplos siguientes describen con mayor detalle diferentes aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1: Medición del consumo de oxígeno por las lías de levadura:

5 A. Material y métodos

A.1. Material biológico

1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* K1 marcada

10 La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* K1 marcada ha sido seleccionada por el ICV y el INRA Montpellier y se produce, se seca y se envasa por la compañía Lallemand. Esta cepa se ha utilizado para el conjunto de los experimentos.

15 Se presenta en forma de levaduras secas activas (LSA). Ya que no necesitan ningún precultivo antes de su utilización, estas LSA son previamente rehidratadas: 1 g de estas levaduras secas activas se pone en suspensión en 10 ml de agua glucosada a 50 g/l y entibiada a 37°C. Esta suspensión se dispone al baño maría a 37°C durante 30 minutos con una homogeneización cada 10 minutos. El medio de cultivo se inocula después con la preparación de levaduras rehidratadas. El porcentaje de inoculación es de 5 gramos por hectolitro, es decir 500 µl de la suspensión de levaduras rehidratadas en 1 l de medio de cultivo.

2. Levadura OptiWHITE®

25 OptiWHITE® es una levadura enológica inactivada, seleccionada y preparada específicamente para garantizar una liberación progresiva de los compuestos de las paredes de levaduras así como un alto potencial antioxidante (riqueza en glutatión). Estas levaduras inactivadas se han utilizado de dos maneras:

- en condiciones enológicas: es decir 30 g/hl al inicio o al final de fermentación alcohólica
- en disolución en un medio hidroalcohólico (tampón CMP descrito a continuación).

A.2. Medio de cultivo

El medio de fermentación utilizado es un medio sintético denominado MS300, que simula la composición media de un mosto de uva. Permite así trabajar en unas condiciones estándares y librarse de las variaciones de composición observadas sobre mostos naturales.

El medio MS 300 contiene todos los aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento necesarios para el buen desarrollo de la cepa K1 en anaerobiosis (Bely, 1990; Salmon *et al.*, 2003). La cantidad de nitrógeno asimilable es de aproximadamente 312 mg l⁻¹.

A.3. Medios de análisis

i. Tampón CMP

45 Este medio es un medio hidroalcohólico cuyo pH corresponde al del vino. Comprende:

- Ácido cítrico: 31 mM
- Ácido D,L-málico: 45 mM
- KH₂PO₄: 10 mM
- Etanol: 11,8% (v/v)

El pH se ajusta a 3,3 con potasa KOH (10 N)

ii. Tampón ftalato

55 Este medio fue considerado por (Fornairon-Bonnefond, 2000) como el medio óptimo para el análisis de las velocidades de consumo de oxígeno. Es una disolución 0,1 M de ftalato ajustada a pH 4,5.

iii. Vino blanco Villaray

60 Este vino es un vino blanco seco acondicionado por Vinobag®. Su pH es de 3,3 y contiene 11% de etanol (v/v). Procede de BIB® de 3 litros o de 5 litros, se vuelve a acondicionar en el laboratorio en unas botellas de vidrio puestas bajo atmósfera de argón.

A.4. Utilización tecnológica de las lías

Se han propuesto diferentes soluciones: las lías pueden ser encerradas ("atrapadas") en unos capilares membranarios y tubos o bolas de alginatos.

1. Capilares y tubos

Las membranas utilizadas son las siguientes:

- Membrana de microfiltración CAPFIL MF02 M2 (X-Flow, Enschede, Países Bajos)
- Membrana de microfiltración MD200 CV2N (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania)
- Tubos de silicona Tygon® R-3603 (Saint-Gobain, Akron, Estados Unidos)

Tabla 1: características de los capilares y de los tubos

	MF02 M2	MD200 CV2N	R-3603
Composición	Polietersulfona & polivinilpirrolidona	Polipropileno	Silicona
Carácter hidrófilo	Moderadamente hidrófilo	Hidrófobo	Hidrófilo
Diámetro exterior (m)	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,38 \cdot 10^{-3}$
Diámetro interior (m)	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$3,97 \cdot 10^{-3}$
Diámetro máximo de los poros (m)	$0,2 \cdot 10^{-6}$		
Diámetro medio de los poros (m)	$0,09 \cdot 10^{-6}$		
Tamaño absoluto de los poros (m)		$0,2 \cdot 10^{-6}$	
$Rh0(10^{-11} m^{-1})$	$0,98 \pm 0,14$	$1,16 \pm 0,21$	
Superficie específica (m ² /g)	10,63	15,54	

2. Bolas de alginatos

Una mezcla de disolución de alginato de sodio al 3% (p/v) y de la disolución que contiene las células a inmovilizar se deja caer gota a gota con la ayuda de una bomba peristáltica en una disolución de cloruro de calcio (0,15 M). La cantidad de células inmovilizadas se precisará para cada experimento.

Oxigenación de las muestras

En la mayoría de los casos, las muestras han sido oxigenadas hasta saturación con el oxígeno del aire. Las muestras se agitan manualmente durante un minuto.

A.5. Métodos analíticos

1. Recuento celular

La evaluación de la biomasa de levadura se lleva a cabo mediante numeración con la ayuda de un contador electrónico de partículas Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman-Coulter, Roissy, Francia). Previamente, la muestra a ensayar se diluye gracias a diluidor automático Microlab 500 (Hamilton, Bonaduz, Suiza) con una disolución isotónica de recuento Isoton (Beckman-Coulter, Roissy, Francia) con el fin de obtener entre 4.000 y 80.000 células por ml en la muestra diluida que será finalmente contada. La muestra diluida se pasa por los ultrasonidos durante 30 segundos en el generador Sonifier® S250A (Branson, Danbury, Estados Unidos) con el fin de separar los agregados eventualmente formados. Por último, la numeración celular se realiza sobre el contador de partículas.

2. Masa seca

Tres veces 10 ml de muestra se filtran al vacío a través de un filtro de 0,22 µm de porosidad previamente secado y tarado. La torta de células recuperada con la membrana se seca en el horno a 108°C durante 24 horas. Las muestras se pesan a continuación.

A. 6. Velocidad de consumo del oxígeno

1. Oroboros® Oxygraph-2k

Para medir las velocidades de consumo del oxígeno de las muestras, se ha utilizado el Oxygraph-2k (Oroboros® Instruments, Innsbruck, Austria). Es un aparato de alta resolución que comprende dos cámaras en paralelo que permiten un análisis de dos muestras en unas condiciones idénticas.

Las características del dispositivo son las siguientes:

⇒ Exterior de las cámaras de acero inoxidable y regulación de la temperatura por efecto Peltier → regulación muy precisa de la temperatura.

- 5 ⇒ Volumen de reacción: 2 ml
- ⇒ Registro de los datos cada 2 segundos
- ⇒ Cámaras de vidrio, tapones y cánulas de titanio → minimización de las fugas y de la difusión de oxígeno
- ⇒ Control de la agitación
- ⇒ Sondeas de oxígeno polarográficas: alta sensibilidad de la sonda Orbisphère®

Las sondeas de oxígeno se insertan lateralmente, al bies con respecto a la célula de vidrio. El oxígeno se difunde la muestra hacia la superficie del cátodo a través de una capa no agitada de la muestra situada a nivel exterior de la membrana, y después a través de la membrana y por último a través de la capa de electrolito. Para minimizar esta capa de muestra no agitada, se necesita una agitación constante y fuerte de la muestra: 750 rpm en las presentes condiciones.

Las características de la sonda Orbisphère modelo 2120 son:

- ⇒ Un cátodo de oro con una superficie relativamente importante (diámetro de 2 mm) para obtener una alta sensibilidad y un cero constante
- ⇒ Un ánodo de plata/cloruro de plata cuya superficie es más amplia que la del cátodo
- ⇒ Un electrolito de cloruro de potasio (KCl a 1 M)
- ⇒ Una membrana FEP (fluorinated ethylene-propylene) de 0,25 µm de espesor
- ⇒ Una tensión de polarización de 0,8 V

2. Oxi 197S

Con el fin de determinar la evolución de la concentración en oxígeno a lo largo del tiempo y la cantidad máxima total de consumo de oxígeno, el oxímetro OXI 197S (WTW, Weilheim, Alemania) con electrodo de Clark permite medir la concentración en oxígeno de las muestras.

La sonda utilizada es una CelloX 325 (WTW, Weilheim, Alemania) cuyas características son las siguientes:

- ⇒ Un electrodo de trabajo de oro
- ⇒ Un contra-electrodo de plomo
- ⇒ Un electrolito
- ⇒ Una membrana FEP (fluorinated ethylene-propylene) de 13 µm de espesor

La medición del consumo de oxígeno por las lías de levadura se realiza en un frasco regulado térmicamente mediante circulación de agua en su doble envolvente. Un agitador magnético asegura la homogeneización del medio de reacción durante la medición. Los datos se registran cada 3 segundos. Después de la saturación en oxígeno del aire mediante agitación manual (vigorosa) de la disolución a medir, la medición de la concentración en oxígeno se inicia en el frasco cerrado herméticamente hasta que se alcance una constante. Después, la disolución se re-oxigena con aire, se cierra nuevamente el frasco y se reinicia la medición. Y así sucesivamente. La cantidad total de oxígeno consumido se determina a partir de los datos recuperados y analizados en cúmulo.

A.7 Medición de la concentración en oxígeno a lo largo del tiempo

Cada muestra (vino solo y vino que contiene unas lías resuspendidas) se lleva a saturación en oxígeno del aire mediante agitación y se reparte en unos frascos herméticos de 70 ml. Los frascos son todos mantenidos a 30°C y las muestras que contienen unas lías son bien homogeneizadas mediante agitación magnética o bien no son agitadas. Las curvas obtenidas a partir de las diferentes mediciones son después alisadas mediante el programa Sigmaplot® (SPSS inc., Richmond, Estados Unidos). La velocidad de consumo de oxígeno se obtiene mediante el cálculo de la derivada de la curva alisada.

B. Resultados

Los resultados de la tabla 2 siguiente representan el seguimiento de la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno medida a 30°C en función de la titulación celular de las lías de levaduras resuspendidas en el tampón CMP (medio hidroalcohólico de pH 3,3 a 11,8% (v/v) etanol). Las medias y desviaciones estándares de 4 mediciones se representan en la tabla 2.

Tabla 2

Concentración celular (10 ⁶ células ml ⁻¹)	Velocidad de consumo de oxígeno (ng O ₂ s ⁻¹ ml ⁻¹)	Desviación estándar (ng O ₂ s ⁻¹ ml ⁻¹)
0,0	0,15	0,015
33,6	0,08	0,010
115,2	0,18	0,026
374,0	0,37	0,005

5 Cuando se mide el consumo de oxígeno por las lías de levaduras, se observa que en un primer tiempo la velocidad de consumo para una concentración celular baja es menos importante que la del tampón solo. Una hipótesis es que la medición obtenida con el medio hidroalcohólico (CMP) sin levaduras corresponde al consumo del electrodo en sí y que cuando se añaden las lías, este consumo se vuelve despreciable debido a la afinidad importante de las lías para el oxígeno.

10 Ejemplo 2: Comparación del consumo de oxígeno de diferentes tipos de levaduras

A. Material y métodos:

15 El material y los métodos son los mismos que para el ejemplo 1.

B. Resultados

20 Las velocidades de consumo de oxígeno por las lías (es decir por las levaduras K1 cultivadas en el medio de fermentación MS300 que reproduce las condiciones del mosto natural) han sido medidas con la ayuda de un oxímetro de alta resolución Oxygraph-2k (Oroboros® Instruments, Innsbruck, Austria) y han sido comparadas con las de la levadura seca activa K1 rehidratada según el protocolo del fabricante (Lallemand SAS, Blagnac, Francia) y con la de la levadura inactivada OptiWhite que contiene glutatión (y/o otros péptidos cisteinilados). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 y confirman el interés de las lías por consumir el oxígeno disuelto en el vino.

25 Los resultados de la tabla 3 muestran el consumo de oxígeno medido a 30°C en función de la masa seca de lías, LSA y levaduras inactivadas OptiWhite® en el tampón CMP (medio hidroalcohólico de pH 3,3 a 11,8% (v/v) etanol).

Tabla 3

Masa de lías (g)	Velocidad de consumo de oxígeno (ng O ₂ s ⁻¹ ml ⁻¹)	Masa de LSA (g)	Velocidad de consumo de oxígeno (ng O ₂ s ⁻¹ ml ⁻¹)	Masa de Optiwhite (g)	Velocidad de consumo de oxígeno (ng O ₂ s ⁻¹ ml ⁻¹)
0,0000	0,2590	0,0000	0,2590	0,0000	0,2590
0,0045	0,7636	0,0050	0,3192	0,00018	0,3199
0,0089	0,8946	0,0100	0,5713	0,0016	0,2842
				0,0083	0,2572
				0,0142	0,3316

35 Las levaduras inactivadas OptiWhite® no parecen consumir oxígeno. Esto se podría deber al procedimiento utilizado para su inactivación que afectaría a la membrana (o a los esteroides de la membrana) y por lo tanto las células ya no podrían consumir el oxígeno. Sin embargo, estas levaduras contienen efectivamente glutatión (3 a 4 veces más que las lías) y por lo tanto siguen siendo interesantes desde el punto de vista de la protección de los aromas (particularmente los tioles volátiles). En efecto, en la bibliografía, el efecto protector de las lías frente a la evolución de los vinos se ha explicado de diferente manera (Dubourdieu *et al.*, 2002; Lavigne-Cruége & Dubourdieu, 2004). El glutatión (u otros aminoácidos o péptidos azufrados) podría proteger los aromas azufrados de su deterioro formando unos puentes disulfuro.

40 Ejemplo 3: Cinética de liberación de glutatión a partir de levaduras inactivadas ricas en glutatión

A. Material y métodos.

45 A.1. Productos estudiados

Se han estudiado dos productos que corresponden a unas levaduras ricas en glutatión:

- * Producto SI (producto Lesaffre)
- * Producto OW (producto Lallemand)

A.2. Cinética de liberación.

Se han solubilizado 0,5 g en peso seco de cada uno de los productos ensayados en 30 ml de medio que simula un vino y que contiene (por litro): ácido cítrico: 6 g; ácido DL-málico: 6 g; KH_2PO_4 : 750 mg; K_2SO_4 : 500 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 250 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 155 mg; NaCl : 200 mg; y etanol, 120 ml. El medio se tampona a pH 3,3 mediante adición de KOH 10N.

La cinética de liberación se ha medido durante 10 horas a 28°C bajo agitación. Las muestras (1 ml) se han extraído y después centrifugado a 14.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante ha sido desproteinizado mediante tratamiento volumen a volumen con el ácido sulfosalicílico al 5% y centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos. Esto conduce a una dilución de la muestra por 2.

A.3 Análisis del glutatión liberado

La dosificación de glutatión liberado se ha llevado a cabo con el kit de dosificación del glutatión vendido por la compañía Sigma (Ref: CS0260-1KT). Este kit dosifica el conjunto de las formas reducidas y oxidadas del glutatión. Una gama patrón de glutatión reducido entre 0 y 25 μM se utiliza para el calibrado del kit.

B. Resultados

Los resultados que corresponden a las muestras dosificadas son los siguientes:

Tabla 4: Cinética de liberación del glutatión

Muestras	Tiempo de extracción (horas)	[GSH] en 10 μl de muestra pura (μM)
SI	0	2,0
SI	1	242,0
SI	3	228,0
SI	5	234,0
SI	5	216,0
SI	10	230,0
OW	0	2,0
OW	1	284,0
OW	3	298,0
OW	5	256,0
OW	5	240,0
OW	10	242,0

Los dos productos SI y WO liberan glutatión en el medio de manera rápida y casi idéntica para alcanzar una concentración de aproximadamente 250 μM cuando se resuspenden a una concentración de 16,7 g (d.w.) l^{-1} .

En términos de contenido en glutatión de los productos ensayados, se pueden deducir los valores siguientes:

Tabla 5: Contenido en glutatión

Producto	Contenido en GSH (mg/g (d.w.))
SI	4,5
OW	5,5

Ejemplo 4: Demostración de las sinergias de acción de la combinación de dos tipos de células de levaduras, respectivamente (i) unas células de levadura no viables y aptas para consumir rápidamente oxígeno y (ii) unas células de levadura inactivadas enriquecidas en glutatión, sobre la conservación de un líquido acuoso alimenticio sensible a la oxidación, en este caso un vino blanco.

A. Material y métodos

Se han definido cuatro modalidades (véase la tabla 6 siguiente) con 5 repeticiones, es decir 5 frascos de 50 ml por modalidad.

Tabla 6: Modalidades comparadas

Modalidad	Código
Control	T
Lías frescas solas	L
Optiwhite [®] solo	OW
Lías frescas + Optiwhite [®]	L+OW
A.1. Preparación: * lías: total de células = $4,3 \cdot 10^{11}$ divididas en $2 \times 5 = 10$ frascos, es decir $4,3 \cdot 10^{10}$ células por 50 ml o $8,6 \cdot 10^{11}$ células/litro. * OW: 250 mg divididos por 5 frascos, es decir 50 mg/frasco o 1 g/l. * Alginato: 1.500 mg divididos por 5 frascos, es decir 300 mg/frasco o 6 g/l. Salvo los frascos control, todos los demás frascos contenían 6 g de bolas de alginatos.	

A.2 Vino utilizado

Se ha utilizado un vino de Sauvignon blanco del Gers, tratado en la bodega experimental del INRA-Pech Rouge. Este vino muy sensible a la oxidación presenta unas notas aromáticas muy fuertes que se deben a una cantidad importante de tioles azufrados varietales. Este vino comprende al principio del experimento una concentración de SO_2 libre de 15 mg/l.

A.3. Mediciones de oxígeno disuelto

Se ha utilizado el sistema PRESENS modelo Fibox3 Trace-V3 basado en la fluorescencia. Dos pastillas de referencia SB3 de 5 mm de diámetro aproximadamente se pegan en el interior de 2 frascos por modalidad (es decir un total de 8 frascos y 16 pastillas). Otras dos pastillas se colocan en una botella llena de agua. La medición de oxígeno se lleva a cabo directamente con la ayuda de una fibra óptica a través del vidrio. No se ha calibrado el aparato previamente, pero por el contrario, se ha registrado diariamente el valor de oxígeno disuelto en la botella de agua hasta saturación y se ha verificado que correspondía a los valores teóricos dados por las tablas.

A.4. Mediciones de luminosidad y color

El color se mide con un cromámetro MINOLTA equipado con una sonda SPR200 para objetos sólidos, que da directamente L, a y b (CIE 1976). La sonda se aplica sobre el frasco, se dispone por el otro lado una placa blanca en contacto con el vidrio y se realiza la medición. El aparato no está calibrado previamente, pero se toma una referencia sobre la placa blanca antes y después de cada serie de mediciones, y se verifica que es estable a lo largo del tiempo.

A.5. Compuestos aromáticos

El análisis ha sido realizado por Laurent DAGAN (compañía NYSEOS SARL, Montpellier, Francia).

B. Resultados

B.1. Oxígeno disuelto

Los resultados de las mediciones de la cantidad de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo de conservación se representan en la figura 1.

Durante los dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente, el frasco control (sin tratamiento) presenta un nivel en oxígeno disuelto claramente más elevado que las otras tres modalidades. Una perturbación que afecta a todos los frascos tratados aparece entre 15 y 20 días de tratamiento, pero a partir de este momento y hasta el final del ensayo, los contenidos en oxígeno de las modalidades lías, OW y lías+OW disminuyen lentamente y de manera continua sin parar.

En lo que se refiere a la perturbación observada sobre los frascos con tratamiento, se puede adelantar la explicación siguiente: durante los 14 primeros días, las lías y el OW contenidos en las tres modalidades lías, OW y lías+OW consumen rápidamente el oxígeno presente del vino, dando como resultado el descenso rápido observado de tensión en oxígeno. Esta capacidad de consumo rápido del oxígeno parece ralentizarse al cabo de 14 días, y el oxígeno disuelto sube en estas tres modalidades. Se establece entonces un nuevo equilibrio entre el oxígeno consumido y el oxígeno que penetra en los frascos a nivel de los tapones de rosca.

Con más de 4 mg/l, los niveles de oxígeno disuelto después de 50 días son muy elevados y atestiguan el mantenimiento en el vino de una fuerte capacidad de oxidación para todas las modalidades.

B.2. Luminosidad y color

Los resultados de mediciones de cada uno de los parámetros "L", "a" y "b" están representados en la tabla 7 siguiente.

5

Tabla 7: Medición de los parámetros L, a y b durante el tiempo de conservación

Tiempo (días)	Control			Lías			OW			Lías + OW		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
0	35,40	-0,37	5,10	35,39	-0,39	5,07	35,45	-0,44	5,11	34,80	-0,31	5,01
5	35,47	0,26	5,46	33,60	0,23	4,02	36,45	0,18	5,27	35,55	0,23	4,93
8	35,94	0,50	5,30	36,31	0,24	4,65	36,55	0,21	4,90	35,25	0,33	4,60
12	35,51	0,67	5,03	37,10	-0,23	4,41	35,67	-0,05	4,43	36,26	0,15	4,65
15	35,67	0,75	5,19	36,64	-0,51	4,16	36,20	-0,18	4,61	36,84	-0,30	4,73
19	35,41	0,79	5,27	36,85	-0,70	4,03	36,27	-0,20	4,65	37,02	-0,70	4,22
22	35,46	0,93	5,21	37,59	-0,75	4,06	36,51	-0,19	4,61	37,41	-0,78	4,21
26	34,77	0,91	4,97	37,57	-0,82	3,94	36,46	-0,22	4,56	37,55	-0,83	4,21
29	35,07	1,03	5,32	37,36	-0,62	4,16	35,67	-0,01	4,42	36,46	-0,60	4,01
33	35,25	1,12	5,22	37,07	-0,59	3,92	36,10	0,02	4,57	37,60	-0,70	4,20
37	35,05	1,18	5,19	37,55	-0,57	4,29	36,23	0,01	4,88	36,70	-0,52	4,13
41	35,42	1,19	5,65	37,03	-0,49	4,19	35,61	0,10	4,64	37,20	-0,53	4,32
44	34,96	1,16	5,45	36,73	-0,49	4,46	35,66	0,12	4,82	36,55	-0,49	4,27
47	35,43	1,15	5,89	37,17	-0,50	4,40	36,05	0,11	5,02	36,72	-0,48	4,28
50	34,92	1,19	5,69	37,38	-0,42	4,57	35,37	0,25	4,84	37,20	-0,41	4,56
54	34,64	1,17	5,84	36,49	-0,40	4,36	36,07	0,12	5,34	36,23	-0,36	4,39

* Evolución del parámetro cromático "L".

10

Los resultados están representados asimismo en la figura 2a. La luminosidad corresponde al porcentaje de luz blanca en el color del vino. Cuanto más aumenta "L", menos oscura es la muestra. "L" está comprendido entre 0 y 100.

15 La evolución durante la conservación es caótica en primer lugar, y después la luminosidad de las muestras se estabiliza al cabo de 2 semanas y las modalidades están siempre clasificadas en el mismo orden de luminosidad creciente:

$$\text{Control} < \text{OW} < \text{lías} = \text{lías} + \text{OW}$$

20

* Evolución del parámetro cromático "a". Los resultados están representados asimismo en la figura 2b.

"a" evoluciona del verde al rojo. En los vinos, el aumento de "a" traduce una evolución oxidativa del color. El parámetro "a" aumenta a partir de la primera semana de almacenamiento. Después, aparece una separación muy clara entre los frascos "control" para los cuales el parámetro "a" sigue aumentado, y las otras tres modalidades para las cuales este parámetro disminuye claramente entre 7 y 20-25 días antes de volver a subir lentamente, a la misma velocidad que el control.

25

Al final del ensayo, las 4 modalidades están claramente diferenciadas.

30

Según "a" creciente: lías = lías+Ow < OW < control

* Evolución del parámetro cromático "b". Los resultados están representados asimismo en la figura 2c.

35 El parámetro "b" mide las proporciones de azul (valores negativos) o de amarillo (valores positivos) del color del vino.

El parámetro cromático "b" evoluciona poco a lo largo del tiempo, pero significativamente. A partir de 2 a 3 semanas, las 4 modalidades están así discriminadas, según un parámetro "b" creciente:

40

$$\text{Lías} = \text{lías} + \text{OW} < \text{OW} < \text{control}$$

B.3. Compuestos aromáticos

45 El 3-mercapto-hexanol (3MH) y su acetato (3MHA) son dos moléculas típicas de los aromas específicos de la cepa Sauvignon blanco. Estas dos moléculas comprenden una función tiol y son por lo tanto particularmente sensibles a la oxidación. Los resultados de las mediciones del contenido de estos dos compuestos después de un tiempo de conservación de 60 días están representados en la tabla 8 siguiente.

Tabla 8

	3-mercapto-hexanol (ng/l)	Acetato de 3-mercapto-hexanol (ng/l)
Lías	403	221
OW	892	256
Lías+OW	945	379
Umbral de percepción olfativa humana	60	8

5 La pérdida en tioles varietales es más importante para la modalidad lías, y menos importante para las modalidades lías+OW y OW.

10 La evolución de las concentraciones es coherente para las tres modalidades que han contenido unas bolas de alginato. El OW sería más eficaz que las lías solas, añadiéndose los efectos de protección de los tioles en la modalidad lías+OW.

Control < lías < OW < lías+OW

B.4. Análisis sensorial

15 Las muestras han sido degustadas al final del ensayo, el 24 de mayo de 2007, por dos enólogos: los enólogos O1 y O2.

* *Comentarios del enólogo O1*

20 Los vinos más intensos en aroma son las modalidades lías y lías+OW de manera equivalente, OW es el menos intenso.

* *Comentarios del enólogo O2*

25 Colores muy diferentes:

Control = amarillo tirando a marrón/rosa

Lías = amarillo/muy poco rosa

OW = amarillo/un poco rosa

30 Lías+OW = amarillo verdadero

Aromas:

Control = potente, mitad componente "tiol", mitad aromas de oxidación

35 Lías+OW = el más fino: aromas "tioles" discretos pero presentes, ausencia de aromas de oxidación

Lías y OW: intermedios

En boca:

40 Control = mucho más pesado, oxidado

Lías+OW = el más agradable y mejor equilibrado en la boca

Lías y OW = intermedios

Balance:

45 Control < lías = OW < lías+OW

No se percibe ningún sabor a levadura.

50 Por último, la modalidad lías+OW da el vino más cualitativo sobre los 3 descriptores sensoriales: color, aroma, y percepción en boca. El control es irrefutablemente el peor juzgado sobre sus propiedades sensoriales.

Conclusiones

55 Todos los frascos han sido conservados a más de 20°C con unos contenidos en oxígeno disuelto superiores a 4 mg/l. Estas condiciones son muy favorables para las oxidaciones.

* D0 a D5.

60 Las 4 modalidades tienen el mismo comportamiento: disminución del oxígeno disuelto relacionada con el vino o con

sus aditivos (SO₂), y aumento del parámetro cromático "a" en las mismas proporciones.

* D5 a D14.

5 Para las 3 modalidades lías, OW y lías+OW, existe una disminución del parámetro cromático "a". Como todavía hay mucho oxígeno disuelto en todos los frascos, esta evolución diferente muestra que existe realmente una interacción procedente de las bolas de alginatos, puesto que la oxidación de los polifenoles sigue siendo limitada. Por el contrario, los tioles se han oxidado tal como lo muestran los análisis de aromas.

10 Por el contrario, en el control, el parámetro "a" aumenta, por lo tanto la oxidación de los polifenoles continúa. Esto provoca un oscurecimiento real del vino.

15 Una disminución más fuerte del oxígeno disuelto se observa bien en las modalidades lías, OW y lías+OW. El alginato en sí podría haber atrapado una parte del oxígeno, pero entonces sería este oxígeno el que sería consumido por las lías o OW; no sería redifundido en el vino después. Es más probable que la capacidad de consumo en O₂ de las lías y de OW sea nula al cabo de 14 días por saturación de los sistemas implicados.

* D14 a D20.

20 El oxígeno disuelto sube en las 3 modalidades: lías, OW, lías+OW. Es probable que esto traduzca la diferencia entre la penetración de oxígeno por el tapón de rosca, y su consumo por el vino, las lías y/o OW. Esta hipótesis está reforzada por los resultados de la modalidad control, que alcanza un nivel estable de oxígeno disuelto muy superior a todos los demás frascos, a falta de un sistema consumidor de oxígeno.

25 * D20 a D25.

30 El oxígeno disuelto se estabiliza y vuelve a disminuir regularmente y a la misma velocidad para todas las modalidades. Desde el D5 hasta el D25, el parámetro cromático "a" sigue disminuyendo y alcanza su valor mínimo para las modalidades lías, OW y lías+OW.

* D25 a D54.

35 Todas las modalidades siguen la misma evolución: subida moderada del parámetro cromático "a" y bajada moderada del oxígeno disuelto.

40 En conclusión, incluso con un efecto negativo sobre las concentraciones en 3MH y su éster, las modalidades con lías, OW y sobre todo lías+OW dan un vino cualitativamente mejor que el control. Esto muestra todo el interés de este enfoque, las posibilidades que ofrece para proteger al mismo tiempo el color y los aromas de tipo tioles volátiles.

En lo que se refiere a los aspectos sinérgicos o antagonistas de los dos sistemas antioxidativos puestos en presencia, utilizando una escala de nota de 1 (menos eficaz) a 3 (muy eficaz), se puede construir la tabla 9 recapitulativa siguiente:

45 Tabla 9

Caracteres ensayados	Control	Lías	OW	Lías + OW
Consumo de oxígeno	1	3	2	2
Aumento del parámetro «L»	1	3	2	3
Disminución del parámetro «a»	1	3	2	3
Disminución del parámetro «b»	1	3	2	3
Mantenimiento de los tioles varietales	1	2	3	3
Nota organoléptica	1	2	2	3
Nota total = suma de las notas	6/18	6/18	13/18	17/18

50 El efecto antioxidante que resulta de los dos sistemas antioxidativos utilizados no es por lo tanto la simple juxtaposición de los efectos antioxidantes de los dos sistemas considerados separadamente. Éstos se complementan en sus acciones respectivas y conducen a una protección del vino en conservación contra los fenómenos de oxidación, ya sea a nivel del color, de la conservación de aromas varietales sensibles a la oxidación, y más generalmente a nivel de la calidad organoléptica.

Ejemplo 5: Ensayos semi industriales sobre vino blanco: Ensayos en botellones sobre vinoA. Material y métodos

- 5 Se ha acondicionado un vino blanco de Villaray, previamente saturado en oxígeno, en botellón de vidrio cerrado de manera hermética bajo argón mediante un tapón Sovirel con junta de Teflón.

10 Se han introducido unas bolas de alginato que contienen al mismo tiempo unas lías de levaduras K1 (levaduras que presentan un consumo rápido de oxígeno) a una concentración final equivalente de $2,3 \cdot 10^6$ células/ml y unas levaduras inactivadas OptiWhite® (levaduras muertas que sueltan glutatión) a una concentración final equivalente de 0,35 mg/ml en unos lotes de botellones "ensayos", siendo los demás botellones "controles" conservados en ausencia de bolas.

15 Los botellones han sido conservados durante 15 días a temperatura ambiente (simulación de conservación del vino), y después sacrificados a lo largo del tiempo para medir: 1) el contenido en oxígeno disuelto residual, 2) el potencial de oxidorreducción del vino, 3) el contenido en glutatión del vino, y 4) las características cromáticas del vino.

B. Resultados

- 20 Se han realizado las mediciones (i) del contenido en oxígeno disuelto, (ii) del potencial de oxidorreducción y (iii) del contenido en glutatión del vino. Los resultados se indican en la tabla 10 siguiente.

Tabla 10: Medición del oxígeno disuelto

Tiempo (días)	Control			Ensayo		
	Oxígeno disuelto (mg/l)	Potencial Redox (mV)	Glutatión (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)	Potencial Redox (mV)	Glutatión mg/l)
0	7,1	191	0,39	7,1	191	0,39
1,8	3,7	185	-	2,4	155	
2,8	2,53	177	0,39	1,5	130	20,8
3,8	2,2	185	0,38	0,98	129	20,1
4,8	1,87	187	0,47	0,21	105	17,0
5,8	2	186	0,48	0,24	91	16,3
11,7	0	168	0,49	0	68	14,1

5.1. Contenido en oxígeno disuelto residual

Los resultados de las mediciones del oxígeno disuelto residual están representados en la tabla 10 anterior así como en la figura 3a.

5.2. Potencial de oxidorreducción

Los resultados de las mediciones del potencial de oxidorreducción están representados en la tabla 10 anterior así como en la figura 3b.

5.3. Contenido en glutatión del vino

Los resultados del contenido en glutatión están representados en la tabla 10 anterior así como en la figura 3c.

5.4. Características cromáticas del vino

Los resultados de las mediciones de las características cromáticas del vino están indicados en la tabla 11 siguiente así como en las figuras 4a (parámetro "L"), 4b (parámetro "a") y 4c (parámetro "b").

Tabla 11

Tiempo (días)	Control			Ensayo		
	L	a	b	L	a	b
0	98,75	-0,66	4,29	98,75	-0,66	4,29
2,8	98,75	-0,66	4,29	98,34	-0,74	3,98
3,8	98,05	-0,63	5,15	98,8	-0,79	4,1
4,8	97,75	-0,65	5,26	99,13	-0,79	3,93
5,8	97,78	-0,62	5,06	99,111	-0,77	3,72
11,7	97,78	-0,71	6,15	99,12	-0,83	3,85

La presencia de bolas de alginato que contienen las lías y el OptiWhite permite una caída mucho más precoz y rápida del oxígeno disuelto en el vino. A la vista de las características cromáticas de los vinos, este consumo de oxígeno por las lías ha permitido conservar los constituyentes polifenólicos del vino de una oxidación prejudicial por el oxígeno (mantenimiento de los parámetros L y b*, que corresponden respectivamente a la claridad y al color amarillo del vino). La liberación de glutatión por las bolas ha permitido disminuir sustancialmente el potencial de oxidorreducción del vino, garantía de un mantenimiento potencial de compuestos volátiles sensibles a la oxidación (tíoles varietales por ejemplo).

Ejemplo 6: Ensayos semi industriales sobre vino blanco: Ensayos en BIB® sobre vino

A. Material y métodos

En una cadena de embotellado en BIB® de vino blanco de Sauvignon (compañía Skalli SARL Fortant de Francia, Sète), se han añadido unos espaguetis de alginato que contienen unas lías de levaduras K1 antes del llenado en la cadena a una concentración equivalente de $2,3 \cdot 10^6$ células/ml. Se han acondicionado 30 BIB® de 3 litros, de los cuales 15 lotes "control" y 15 lotes de "ensayo". Los BIB® se conservan desde su llenado (5/10/2006) a 21°C. Se prevén unas extracciones regulares en un periodo que cubre 6 meses a un año.

B. Resultados

Los resultados presentados se refieren sólo a las primeras muestras recogidas y analizadas.

A pesar de los contenidos iniciales tan diferentes entre los lotes controles y de ensayo (debido a las manipulaciones iniciales de los recipientes: apertura, introducción manual de los espaguetis), se puede constatar una caída muy visible del contenido en oxígeno del vino en presencia de las lías.

Los resultados de las mediciones del contenido en oxígeno disuelto se presentan en la tabla 12 siguiente. La tabla 12 representa la evolución del contenido en oxígeno disuelto de un vino conservado en BIB® control sin puesta en contacto con la composición según la invención.

Tabla 12

Tiempo (días)	Oxígeno disuelto (mg/l)			
	Control 1	Control 2	Ensayo 1	Ensayo 2
0,00				
19,00	0,66	0,89	2,78	3,44
36,00	0,70	1,28	2,19	2,80
54,00	0,86	1,12	1,58	1,67

Los resultados de medición de las características cromáticas del vino están representados en la tabla 13 siguiente. La tabla 13 representa la evolución de las características cromatográficas "L" y "b" de la CIE 1976 de un vino conservado en BIB® control ("control" y la evolución de las características cromatográficas "L" y "b" de la CIE 1976 de un vino conservado en BIB® puesto en contacto con la composición según la invención ("ensayo"). Los resultados están representados en función del número de días de conservación a 30°C.

Tabla 13

Tiempo (días)	Control				Ensayo			
	L	b	L	b	L	b	L	b
36,00	49,61	9,69	50,5	9,48	51,46	10,04	49,77	10,01
54,00	50,35	10,43	52,08	10,81	49,8	11,64	49,68	11,06

Los parámetros cromáticos del vino evolucionan hacia una disminución (o mantenimiento) del parámetro L en presencia de las lías inmovilizadas (mientras que presenta una tendencia al aumento en los lotes controles). Se encuentra así como en el ensayo anterior, un aumento más fuerte del parámetro b* en los lotes de ensayo, lo cual va hacia un aumento más fuerte del carácter amarillo de los vinos.

Ejemplo 7: Superficies de contacto entre las levaduras enriquecidas en glutatión y el oxígeno disuelto

Unos ejemplos de superficie de contacto entre las células de levaduras y el oxígeno disuelto se proporcionan a continuación, a título indicativo:

Ejemplo: $2,3 \cdot 10^9$ levaduras/l y 350 mg/l de Opti-White ($1,17 \cdot 10^{10}$ células/l)
Ejemplo: $8,6 \cdot 10^{11}$ levaduras/l y 1 g/l de Opti-White ($3,33 \cdot 10^{10}$ células/l)

Una levadura de vinificación presenta una superficie equivalente mediana de aproximadamente $80 \mu\text{m}^2$ (SALMON, 1997 - Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. Journal of Fermentation and Bioengineering, 83 (3), 253-260).

- 5 La superficie de contacto entre levaduras y vino ha estado comprendida por lo tanto entre $1,4 \cdot 10^{10} \cdot 80$ y $8,9 \cdot 10^{11} \cdot 80$, es decir $1 \cdot 10^{12}$ y $7 \cdot 10^{13} \mu\text{m}^2/\text{l}$, en los presentes ensayos ilustrativos.

Ejemplo 8: Evaluación de levaduras no viables aptas para consumir rápidamente el oxígeno diferentes de las lías y comparación de la utilización de levaduras no viables (inactivadas por tratamiento químico) o de levaduras viables

A. Material y métodos

A.1. Preparación:

Un mismo lote de levaduras secas activas (cepa EC1118, Lallemand, Blagnac) se incorpora en alginato en forma viable o no viable (inactivación térmica de 5 minutos a 74°C , es decir un log UP de 2,48) y recubierto alrededor de bolas de látex natural. Estas bolas de látex se depositan en unas botellas blancas de 1 litro, llenadas hasta la mitad de vino. El vino blanco utilizado es un vino Sauvignon no sulfitado.

La concentración en células de levadura por botella es de aproximadamente $2 \cdot 10^{10}$ células, repartidas en la superficie de una veintena de bolas de látex. Las botellas se cierran mediante unos tapones herméticos de polietileno y se incuban a 20°C durante 500 horas.

A.2. Mediciones de oxígeno disuelto:

Se ha utilizado el sistema PRESENS modelo 5 Fibox3 Trace-V3 basado en la fluorescencia. Se pegan dos pastillas de referencia SB3 de 5 mm de diámetro aproximadamente en el interior de cada botella utilizada (una en la fase gaseosa, la otra en la fase líquida). La medición de oxígeno se lleva a cabo directamente con la ayuda de una fibra óptica a través del vidrio. Se utiliza el valor de oxígeno disuelto en una botella de agua hasta saturación para la calibración diaria.

A.3. Mediciones de la turbidez:

La turbidez final de los vinos se mide gracias a un turbidímetro HACH (modelo 58357-00).

B. Resultados

B.1. Consumo de oxígeno y turbidez

Aunque las levaduras viables presentan unas actividades de consumo de oxígeno sustancialmente iguales a las observadas con las células inactivadas térmicamente, aparece claramente (tabla 1) que la encapsulación en el alginato de levaduras viables conduce a una liberación no despreciable de levaduras en el medio (aumento notable de la turbidez del vino), lo cual no se produce con unas levaduras inactivadas. Esta liberación en el medio corresponde a un bajo crecimiento de las levaduras viables en unas capas de alginato y a una diseminación de estas cepas en el vino. Este fenómeno es perjudicial para la calidad final del producto terminado.

Tabla 14: Valores de las poblaciones iniciales y finales inoculadas por botella, de la turbidez del medio y del oxígeno disuelto consumido después de 500 horas de incubación a 20°C .

	Población inicial (células/ml)	Población final (células /ml)	Turbidez (NTU)	Oxígeno disuelto total consumido (mg/l)
Levaduras viables	$3,4 \cdot 10^7$	$10,54 \cdot 10^7$	18	1,24
Levaduras inactivadas térmicamente	$5,8 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	7	1,61
Vino solo	0	0	5	0,86

REIVINDICACIONES

1. Composición para proteger de la oxidación un líquido alimenticio que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación durante su conservación que comprende una combinación de dos tipos de células de levaduras:
 - (i) unas células de levadura no viables y aptas para consumir rápidamente el oxígeno, presentando dichas células de levadura una velocidad de consumo en oxígeno de por lo menos $5 \text{ ng O}_2 \cdot \text{s}^{-1}$ por 10^{10} células de levaduras cuando están presentes a una concentración del orden de 10^8 células/ml en un tampón hidroalcohólico, y
 - (ii) unas células de levadura inactivadas enriquecidas en glutatión.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho líquido acuoso alimenticio es una bebida fermentada.
3. Composición según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque dicho líquido acuoso alimenticio es un vino.
4. Composición según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque dicho líquido es un vino blanco.
5. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dichas células de levadura no viables y aptas para consumir rápidamente oxígeno consisten en unas lías de levaduras procedentes de la fermentación.
6. Composición según las reivindicaciones 1 y 5, caracterizada porque dichas células de levadura no viables y aptas para consumir rápidamente oxígeno son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque las células de levaduras inactivadas ricas en glutatión son unas levaduras de tipo enológico.
8. Composición según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizada porque las células de levadura inactivadas enriquecidas en glutatión son unas levaduras de la familia de los *Saccharomyces*.
9. Composición según las reivindicaciones 1, 7 u 8, caracterizada porque las células de levadura inactivadas ricas en glutatión son capaces de liberar en el medio en el que se encuentran una cantidad de glutatión de por lo menos 1% de glutatión en peso con respecto al peso total de materia seca de la levadura.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque dichas células de levadura están incluidas en un sistema de inmovilización permeable a dicho líquido realizado en un material compatible con las normas alimentarias.
11. Composición según la reivindicación 10, caracterizada porque dicho recipiente se selecciona de entre el grupo de los capilares membranarios, de los tubos de silicona o del alginato en forma de bolas o de espaguetis.
12. Composición según las reivindicaciones 10 y 11, caracterizada porque dicho sistema de inmovilización es alginato en forma de bolas o de espaguetis.
13. Procedimiento de estabilización, durante su conservación, de un líquido acuoso alimenticio, que contiene unas sustancias sensibles a la oxidación, en curso de conservación que comprende la puesta en contacto del medio constituido por dicho líquido con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la superficie de contacto entre las levaduras utilizadas en el sistema de inmovilización y dicho líquido acuoso alimenticio es de por lo menos $10^{12} \mu\text{m}^2/\text{l}$ y está repartida de manera homogénea en la totalidad de dicho líquido, cuando el porcentaje de oxígeno disuelto en dicho líquido acuoso alimenticio es de por lo menos 0,1 mg/l de dicho líquido.
15. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la superficie de contacto entre las levaduras utilizadas en el sistema de inmovilización y dicho líquido acuoso alimenticio es de por lo menos $10^{12} \mu\text{m}^2/\text{l}$ y es más importante en los puntos de contacto entre dicho líquido y los puntos de penetración del oxígeno en el recipiente, cuando el porcentaje de oxígeno disuelto en dicho líquido acuoso alimenticio es de como máximo 99 $\mu\text{g/l}$ de dicho líquido.
16. Utilización de la composición según la reivindicación 1, para la preservación contra los efectos de la oxidación de líquidos que contienen unas sustancias sensibles al oxígeno durante su conservación.

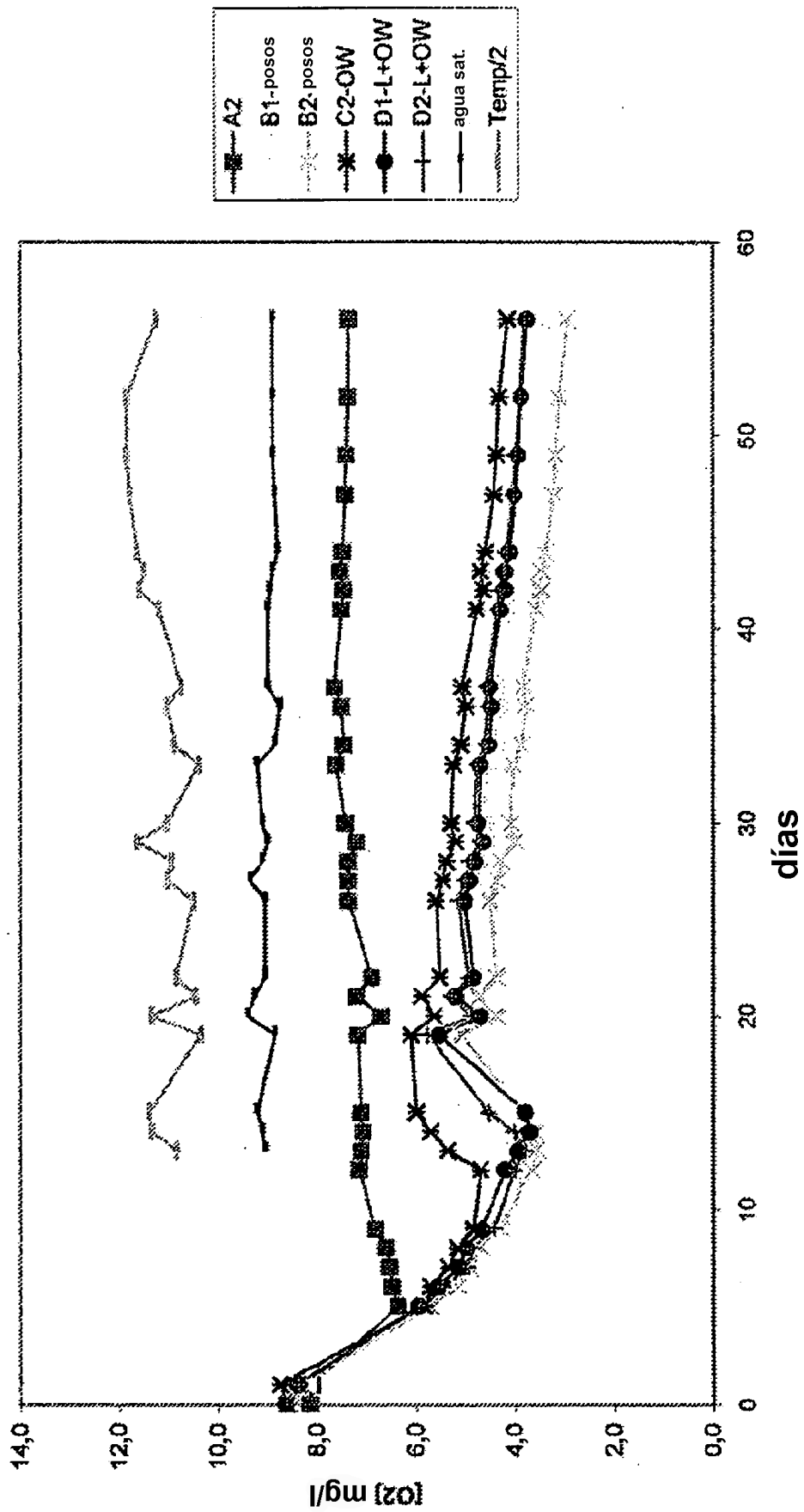
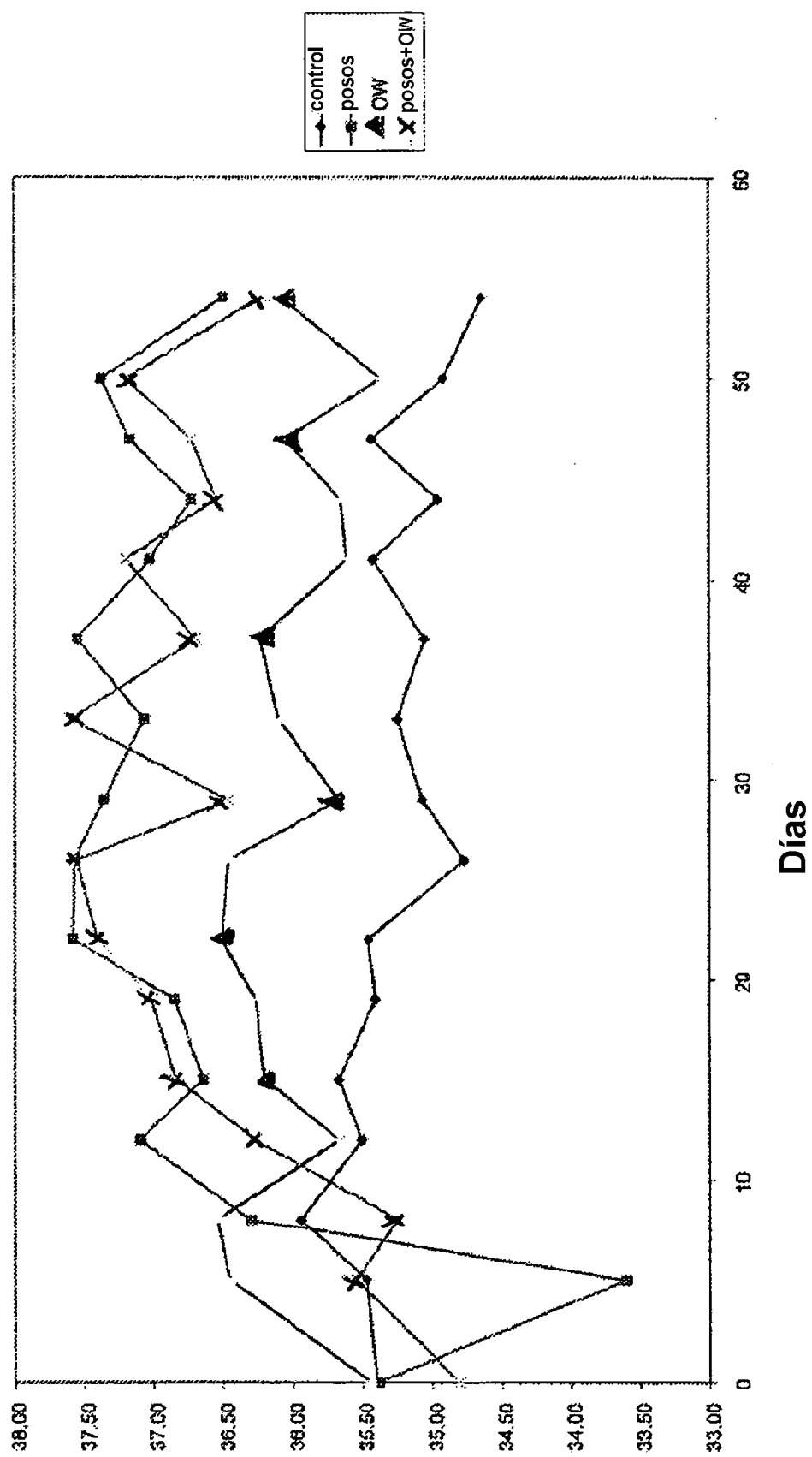


Figura 1

Figura 2a



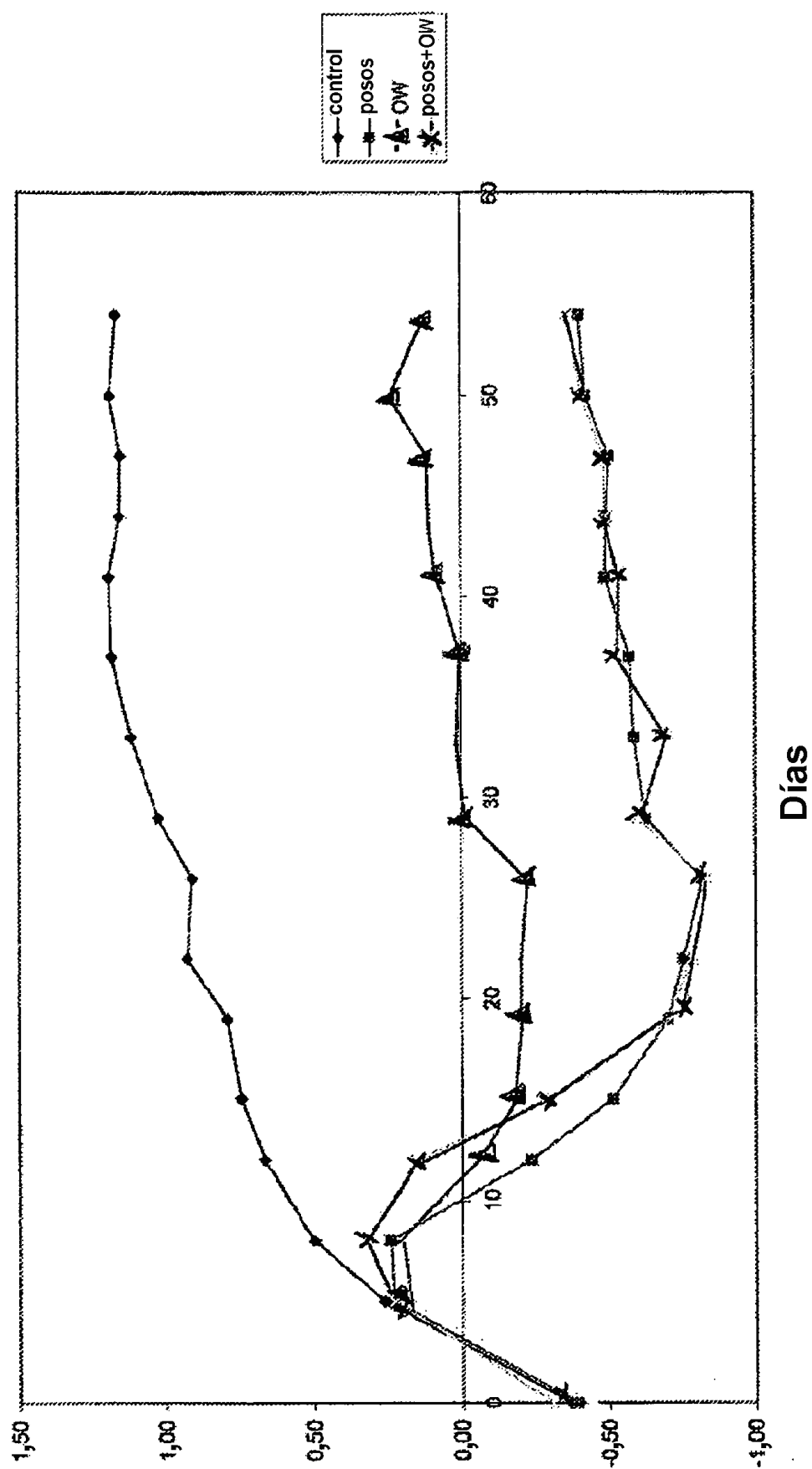


Figura 2b

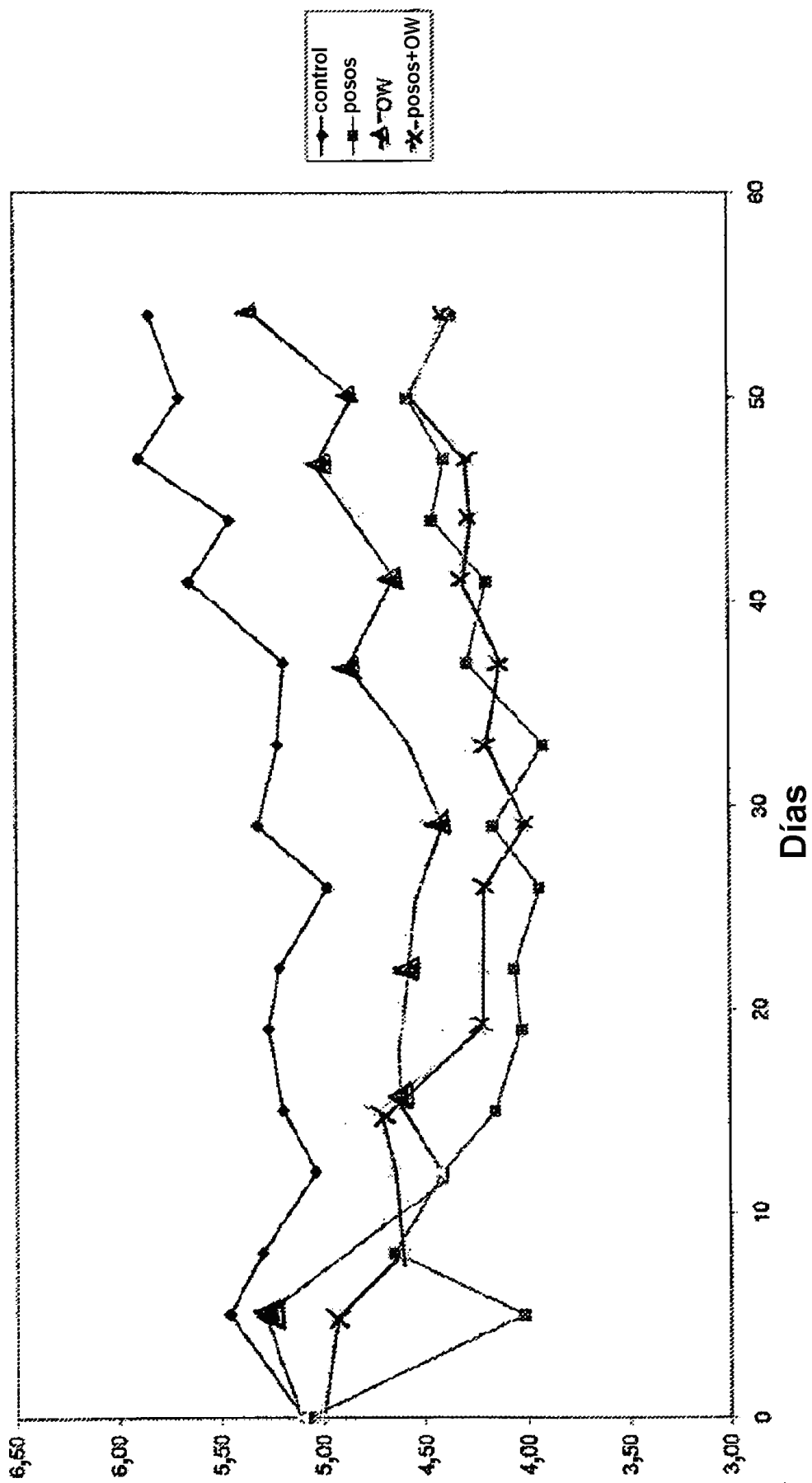


Figura 2c

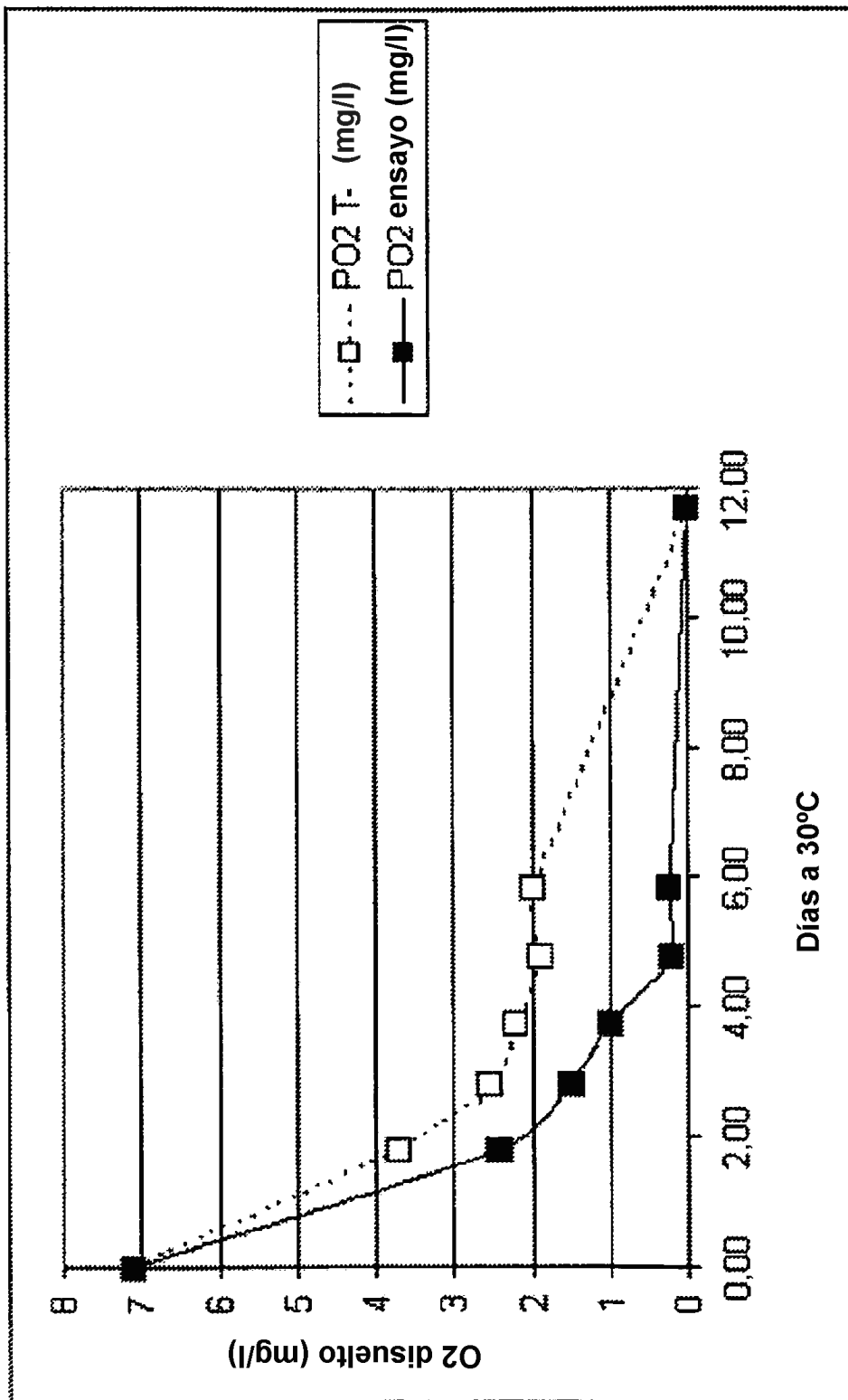


Figura 3a

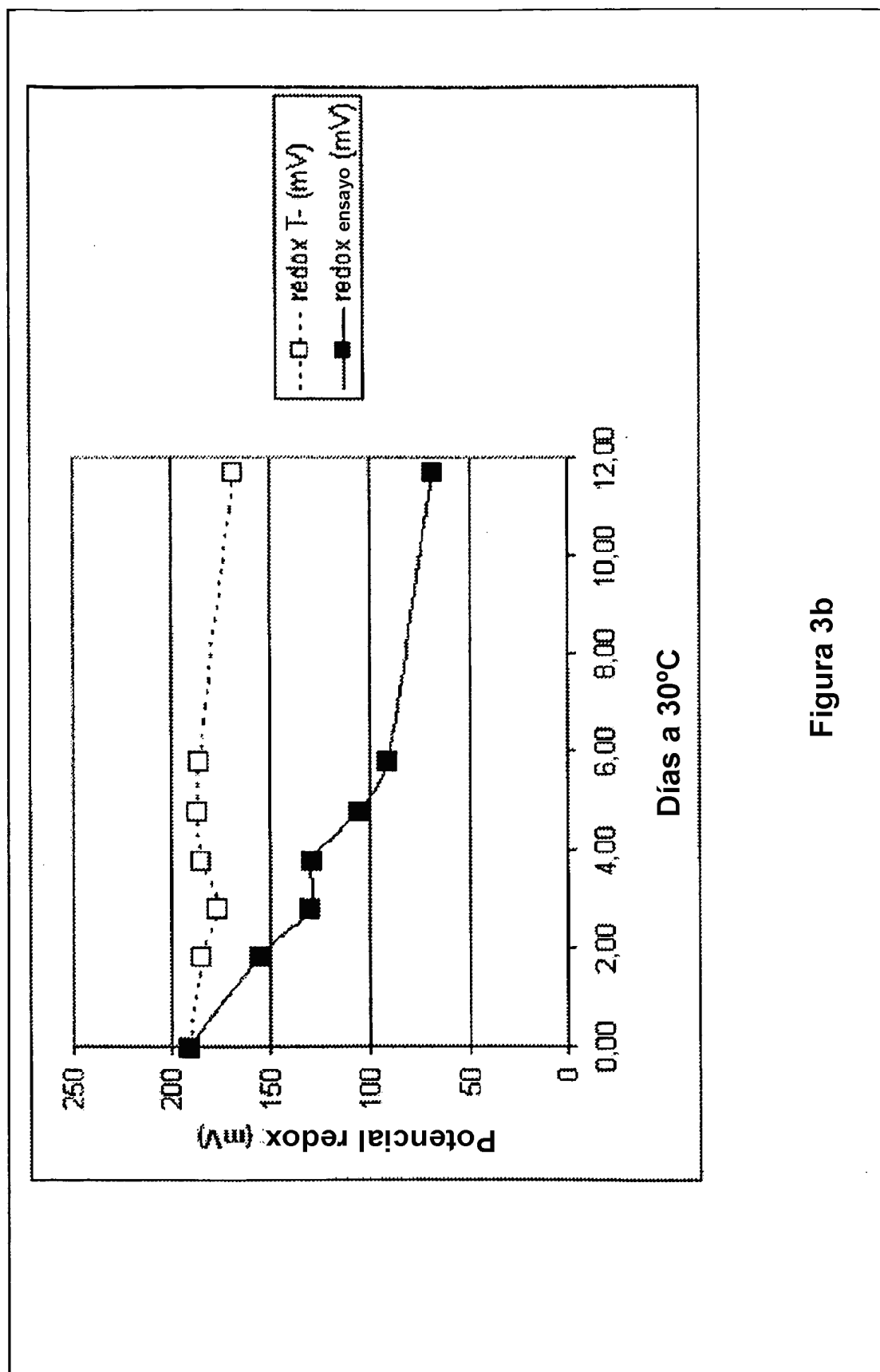


Figura 3b

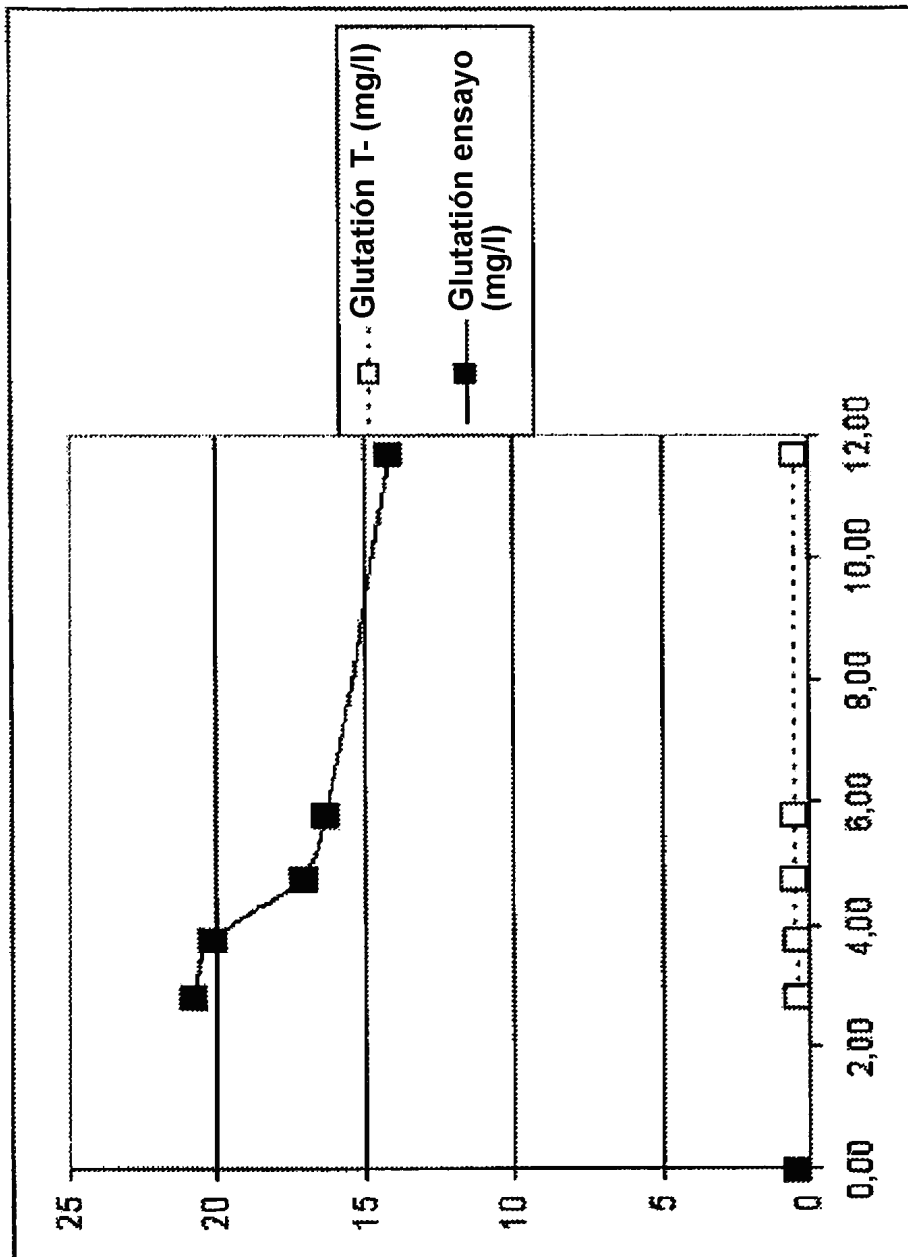


Figura 3c

Fig. 4a

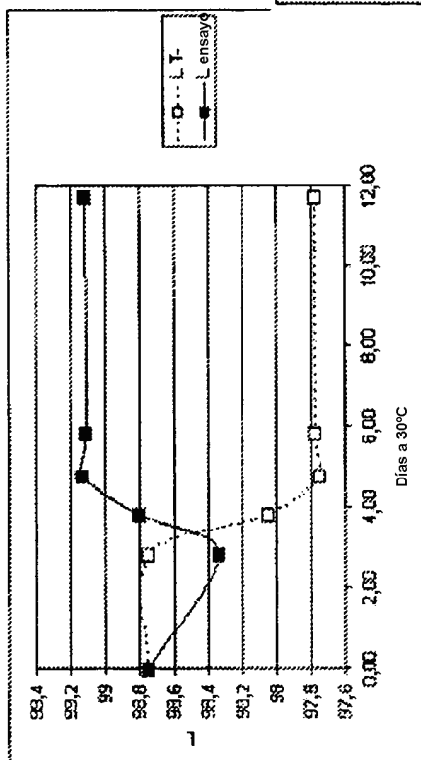


Fig. 4c

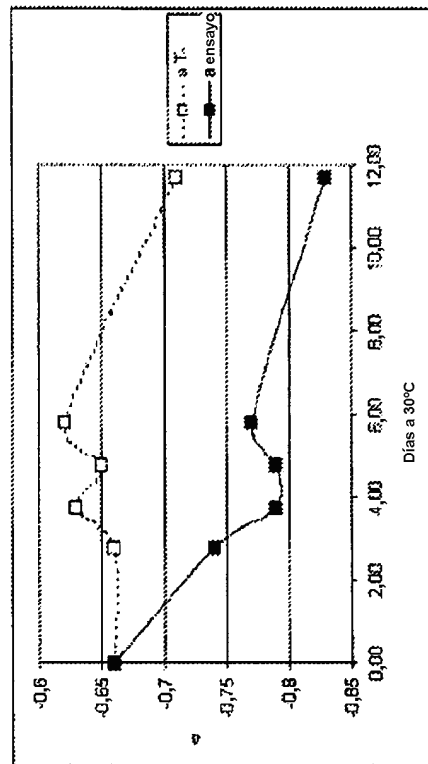


Fig. 4b

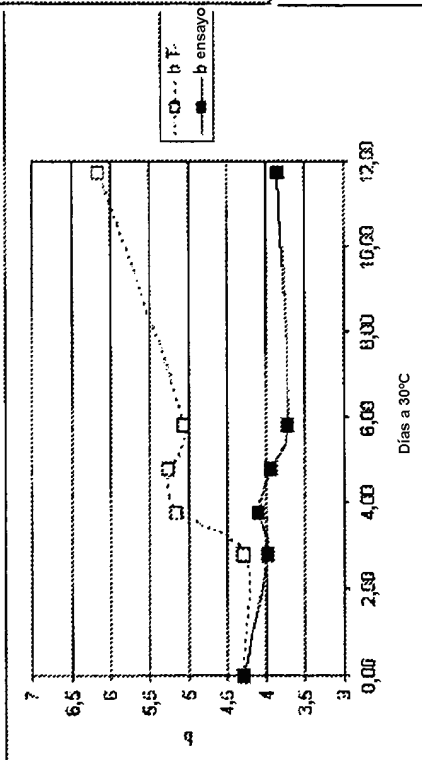


Figura 4a, 4b y 4c