

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 788**

21 Número de solicitud: 201230589

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12G 1/022** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.04.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.11.2013**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070246**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**SERRANO, 117**

**28006 MADRID ES y**

**CONSIGLIO PER LA RICERCA E LA**

**SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CARRASCOSA SANTIAGO, Alfonso Vicente;**

**MARTINEZ RODRIGUEZ, Adolfo José;**

**JUEGA RIVERA, Marta;**

**GARCIA MORUNO, Emilia;**

**COSTANTINI, Antonella;**

**BONELLO, Federica y**

**CRAVERO, María Carla**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **CEPA Y COMPOSICIÓN DE PEDIOCOCCUS DAMNOSUS, USOS Y MÉTODO PARA LA REALIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a dos cepas seleccionadas de *Pediococcus damnosus* aisladas de vino blanco elaborado a partir de la variedad de uva Caiño blanco, así como una combinación de dichas cepas, capaces de fermentar malolácticamente un producto, preferentemente un vino o un zumo de fruta. Además, también hace referencia a un método para fermentar malolácticamente un vino o un zumo de fruta.

Es asimismo objeto de la invención, el uso tanto de una cepa como la combinación de ambas cepas, así como el uso del método, para la fabricación de un vino.

**ES 2 430 788 A1**

## CEPA Y COMPOSICIÓN DE *PEDIOCOCCUS DAMNOSUS*, USOS Y MÉTODO PARA LA REALIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

### DESCRIPCIÓN

5

#### Sector de la técnica

10 La invención que se reivindica en la presente solicitud consiste en el uso de las bacterias *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075, aisladas de vinos obtenidos a partir de uvas de *Vitis vinifera* de la variedad *Caiño blanco*, para la elaboración de nuevos tipos de vinos de *Albariño* y *Caiño blanco* con su calidad sensorial modificada por haber sufrido la fermentación maloláctica gracias a la inoculación de dichas bacterias.

15 La invención se encuadra dentro del Área Agroalimentaria, en el Sector Enológico. El uso de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075 que reivindicamos en esta invención, puede afectar a los subsectores de vinos y cultivos microbianos.

#### Estado de la técnica

20 La fermentación maloláctica es un fenómeno de naturaleza microbiológica que consiste en la transformación total o parcial del ácido málico del vino, en ácido láctico. Dicha conversión es llevada a cabo principalmente por cepas de la especie bacteriana *Oenococcus oeni*, existiendo en el mercado actual la posibilidad de adquirirlas comercialmente. También se puede realizar con otras cepas de bacterias lácticas pertenecientes a la especie *Pediococcus damnosus*, especialmente recomendada para vinos con un pH superior al habitual. No obstante, en la mayoría de los casos cuando es de interés que dicha fermentación se lleve a cabo, se realiza en la bodega de forma espontánea, creando las condiciones ambientales necesarias para que las cepas capaces de desarrollarla, y que pueden estar de manera natural en el vino como contaminantes, la lleven a efecto ["MOLECULAR WINE MICROBIOLOGY" Eds. A.V. CARRASCOSA, R. MUÑOZ Y R. GONZÁLEZ. ACADEMIC PRESS, LONDRES. 2011].

30 El vino elaborado con mosto de uva de la variedad *Albariño* de *Vitis vinifera* es un vino blanco, joven, caracterizado por su frescor y su estructura en boca, que lo hace diferente del resto de los vinos blancos jóvenes de España. La variedad *Albariño* de *Vitis vinifera* es el cultivar de mayor importancia económica en Galicia (noroeste de España), y se cultiva también en el norte de Portugal. Su despegue y paso de consumo familiar a producción industrial se realizó a partir de la constitución de la Denominación de Origen (en adelante D.O.) Rías Baixas (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Rías Baixas, 2004. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Rías Baixas, 2004. Memoria del ejercicio 2003. Consello Regulador de la D.O. Rías Baixas, Vigo), de ahí la importancia para el sector de cualquier avance científico-tecnológico como la presente invención. Desde el punto de vista aromático se caracteriza por tener aromas frutales y florales [CARBALLEIRA, L.; CORTÉS, S.; GIL, M.L.; FERNÁNDEZ, E. (2001). Determination of aromatic compounds, during ripening, in two white grape varieties, by SPE-GC Chromatographia 53 (Suppl.): S350-S355 ; DIEGUEZ, S.C.; LOIS, L.C.; GÓMEZ, E.F.; DE LA PEÑA, M.L. (2003). Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape *Albariño*. LWT-Food Science and Technology 36: 585-590], siendo su área de producción fundamental en España la Denominación de Origen Rías Baixas, en cuyo reglamento la establece como variedad preferente.

45 Hasta la fecha son escasos y preliminares los estudios que se han realizado sobre la fermentación maloláctica de vinos *Albariño* y *Caiño blanco* [Estudio analítico y organoléptico de la fermentación maloláctica en vinos de la variedad *Albariño*. Autores: Monserrat Añiguez Crespo, A. Losada Quiroga, A. Fernández Piñeiro. Localización: XVI Jornadas de viticultura y enología de Tierra de Barros : Almendralejo, 9-13 de mayo de 1994, 1995, ISBN 84-7930-060-4 , págs. 529-562; Ensayo a escala industrial de la fermentación maloláctica en el aroma varietal y fermentativo de un vino *Albariño*, Autores: S. María Cortés Diéguez, Esperanza Fernández Gómez, María L. Gil de la Peña, M. Castro González, Localización: Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos, ISSN 0300-5755, Nº 317, 2000 , págs. 155-160]. En dichos estudios, la mencionada fermentación se ha realizado de manera natural o espontánea, aprovechando la contaminación de bacterias lácticas capaces de llevarla a cabo, no habiéndose empleado la inoculación de cepa alguna de la especie *Pediococcus damnosus*, ni por supuesto las cepas que aquí se reivindican, ni habiéndose demostrado tampoco los cambios en la calidad sensorial que en esta invención se comentan.

60 *Caiño blanco* es la variedad de *Vitis vinifera* considerada más vieja de Galicia, y desde 1957 la más recomendada para la obtención del vino en la Denominación de Origen Ribeiro, por su potencial para producir vinos de calidad (BOE 1976: Orden Ministerial 2/11/76, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Reglamento de la Denominación de Origen Ribeiro y su Consejo Regulador). *Caiño blanco*, al igual que el *Albariño*, se cultiva en la comarca gallega de O Rosal, adscrita a la D.O. Rías Baixas. No obstante, hay muy poca información sobre esta variedad, y se carece de antecedentes relacionados con la presente invención (Santiago J. L., Boso S., Gago P., Alonso-Villaverde V. and Martínez M. C. 2007. Molecular and ampelographic characterisation of *Vitis vinifera* L. 'Albariño', 'Savagnin Blanc' and 'Caiño Blanco' shows that they are different cultivars. Spanish Journal of Agricultural Research 5(3), 333-340).

Por otra parte, se sabe que las bacterias lácticas influyen en las características sensoriales del vino en el cual se desarrollan. Compuestos como el diacetilo, 1-hexanol, etil acetato, etil lactato, dietil succinato, butirólactona, glicolaldehído, glioxal, 2,3-butanediol, ácido caprílico, pueden ver modificada su concentración como consecuencia de su crecimiento, y su capacidad glicosidasa actuando sobre terpenos y norisoprenoides, liberar compuestos aromáticos al vino (P. Hernandez-Orte, M. Cersosimo, N. Loscos, J. Cacho, E. Garcia-Moruno, V. Ferreira. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. Food Research International, Volume 42, Issue 7, August 2009, Pages 773-781). La presente invención muestra una realización concreta en el contexto teórico que indica la bibliografía comentada.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención consiste en el empleo de las cepas *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075, para la realización de la fermentación maloláctica (en adelante FML) de vinos elaborados a partir de uvas de las variedades *Albariño* y *Caiño blanco* de *Vitis vinifera*. Con ello se pretende asegurar la realización de la FML, que permitirá obtener vinos con características originales debidas fundamentalmente a la acción directa de las mencionadas cepas de bacterias lácticas del vino. La inoculación de vinos con cultivos previamente preparados de las cepas microbianas obtenidas permitirá asegurar su abundancia y, por tanto, el efecto esperado, consecuencia directa de su presencia en el vino y de su metabolismo ejercido en el mismo. Las características organolépticas o sensoriales se ven influenciadas favorablemente por la acción de los cultivos microbianos preparados e inoculados, lo que confiere a los vinos producidos una tipicidad y singularidad que no ocurre de manera espontánea.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención consiste en un procedimiento nuevo para elaborar vinos a partir de las variedades de uva blanca *Albariño* y *Caiño Blanco* de *Vitis vinifera*. Después de haberse obtenido el vino, como consecuencia de la fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces*, puede suceder de manera espontánea la FML, más común en vinos tintos que en blancos. En dicha fermentación el ácido málico presente en el vino, es transformado a ácido láctico por bacterias lácticas tales como *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075. El utilizar dichas cepas hace reproducible el fenómeno, que puede no ocurrir de manera espontánea simplemente por no hallarse los microbios en la concentración adecuada. Si la FML aporta transformaciones deseables para el elaborador, poder contar con cultivos de las cepas mencionadas permitirá la posibilidad de su empleo. Dichas cepas, por ser ecotípicas, es decir, aisladas de vinos de las mencionadas variedades, son además capaces de realizar la FML, y por tanto, idóneas a tal fin. El formato de cultivo viable permite contar con la posibilidad de realizar la FML de manera segura y reproducible.

La novedad fundamental de la invención consiste en el empleo de dichas cepas para llevar a cabo la FML en vinos elaborados a partir de las variedades de uva blanca *Albariño* y *Caiño Blanco* de *Vitis vinifera*. Lo habitual es no realizar la FML en vinos de estas variedades, por lo que este tipo de intervenciones y procedimientos tales como el recogido en la presente solicitud, son de todo punto novedosos. Además, aspectos de la degustación de los vinos como el aroma, de enorme importancia en vinos de estas variedades, se ve afectado por la realización de la FML, lo que puede ocasionar variaciones exclusivas en los perfiles sensoriales de los vinos elaborados empleando estos microbios, lo cual puede ser de interés para los fabricantes del sector enológico.

En este sentido, la elaboración del vino experimenta una mejora, si es que se quiere realizar la FML, ya que las cepas de la bacteria láctica enológica *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075, como consecuencia de su metabolismo natural, una vez producidas en cantidad suficiente fuera del vino, en las adecuadas instalaciones, e inoculadas a la debida concentración en el vino a transformar, desarrollan las actividades requeridas confiriendo así al vino final las características sensoriales perseguidas. Tanto las cepas *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075, como el vino resultante, han de ser tenidos como de grado alimentario, es decir, listos para el consumo. Además, las cepas *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075 son naturales, y en absoluto poseen su material genético modificado, por lo que no ha de ser etiquetado el vino resultante como alimento transgénico.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* que es malolácticamente activa en un producto, aislada de vino blanco con Denominación de Origen Rías Baixas elaborado a partir de uva de variedad *Caiño Blanco*, y que cuando dicha cepa se añade a dicho producto:

- 5 a. transforma totalmente a ácido láctico un contenido de ácido málico en el producto sin producir aminos biógenas,
- b. induce un efecto en las propiedades organolépticas del producto, que puede ser medido o determinado por análisis sensorial.

10 En la presente invención la expresión “cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus*” se refiere a una cepa aislada de un vino elaborado con la variedad *Caiño blanco* de *Vitis vinifera*, capaz de producir una fermentación maloláctica en un producto que comprende ácido málico. Preferentemente, dicha cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* es una cepa seleccionada entre DSM 25074 y DSM 25075.

15 **Cepa *Pediococcus damnosus* DSM 25074**

20 La siguientes cepa ha sido depositada el 27 de octubre de 2011, en **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH** (DSMZ, Colección alemana de microorganismos y cultivos de células), Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, ALEMANIA, por Dr. Alfonso V. Carrascosa Santiago INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CIAL), UAM-CSIC, C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid SPAIN.

25 El depósito de la cepa de *Pediococcus damnosus* depositada, fue recibido por la DSMZ con el número de acceso **DSM 25074** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

30 **Cepa *Pediococcus damnosus* DSM 25075**

35 La siguientes cepa ha sido depositada el 27 de octubre de 2011, en **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH** (DSMZ, Colección alemana de microorganismos y cultivos de células), Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, ALEMANIA, por Dr. Alfonso V. Carrascosa Santiago INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CIAL), UAM-CSIC, C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid SPAIN.

40 El depósito de la cepa de *Pediococcus damnosus* depositada, fue recibido por la DSMZ con el número de acceso **DSM 25075** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

45 En el ámbito de la presente memoria, el término “producto” se refiere a un producto que presenta en su composición ácido málico, como por ejemplo un vino, un zumo de fruta, cualquier jugo vegetal que tenga ácido málico y sea susceptible de crecimiento por parte de las cepas, como la sidra o zumo de manzana donde tales fenómenos se llevan a cabo, o una combinación de los mismos.

50 En la presente memoria, el término “vino” se usa para describir un producto resultante de una fermentación alcohólica de zumo o mosto de uva, o zumo de cualquier otra fruta o baya, tanto si la fermentación ocurre de manera espontánea o si se obtiene por adición de un cultivo de levadura. Dicho vino puede ser un vino blanco, un vino rosado, un vino tinto, pudiendo estar todos ellos en forma de vinos espumosos.

55 Cuando la cepa de *Pediococcus damnosus* de la invención se añade o inocular a un producto, es capaz de transformar totalmente a ácido láctico (mediante fermentación maloláctica) el contenido de ácido málico presente en dicho producto (vino, zumo o jugo vegetal), comprendido entre 0.5 y 5 g por litro de producto (incluidos ambos límites) en un periodo máximo de 30 días, si el mencionado producto inoculado se mantiene en condiciones que permitan que se lleve a cabo dicha transformación, o fermentación maloláctica.

60 En la presente invención, el término “análisis sensorial” se refiere a un tipo de análisis realizado por personas a través de sus sentidos que, en definitiva, es imprescindible para conocer la aceptabilidad final de un producto obtenido. Dicho análisis se realiza con un panel de cata entrenado de catadores que degustan los productos, como puede ser por ejemplo un tipo de vino, antes y después de la realización de la fermentación maloláctica del producto. A modo de ejemplo, los descriptores utilizados por ejemplo en la evaluación sensorial de un vino pueden ser olor, aroma, sabor, y sensación en boca en dicho vino, calificando de 0 a 100 los descriptores. La degustación se realiza sobre un volumen de vino a una determinada temperatura (por ejemplo 30-40 mL a 14-20°C), en copas de cata, vertiendo inmediatamente antes del análisis, contrastando todos los datos con análisis estadístico de varianza con un programa como XL Stat o similar, para comparar los descriptores comunes del

aroma antes y después de la FML, ya que los mismos cambian como consecuencia de la acción de las cepas inoculadas.

5 En la presente invención, el término "propiedades organolépticas" se refiere al conjunto de descripciones de las características físicas que tiene un producto según las pueden percibir nuestros sentidos, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color. Su estudio es importante en aquellas ramas de la ciencia en que es habitual evaluar inicialmente las características de la materia sin instrumentos científicos, como en ciencia de los alimentos, especialmente en la cata de productos como vino, aceite, etc. En el caso de las catas de vino, dichas propiedades organolépticas son el resultado de un complejo análisis mediante la vista, olfato y el gusto, valorándose la coloración (como por ejemplo la presencia de tonos amarillos, tonos amarillos-resalte,...), los aromas que presenta (como aroma a miel, aroma a hierbas, aromas floral, aroma cítrico, aroma a piña,...), así como la sensación en boca que produce (mediante el empleo por ejemplo de descriptores de suavidad y estructura).

15 Dicho efecto inducido por la cepa de *Pediococcus damnosus* en las propiedades organolépticas del producto, determinado por análisis sensorial, comprende:

- 20 – un aumento de aroma a miel comprendido entre 1 y 25 (más preferentemente entre 5 y 15), incluidos ambos límites, en una escala numérica de 0 a 100 del descriptor aroma a miel, y
- una disminución de acidez comprendida entre 1 y 50 (más preferentemente entre 5 y 15), incluidos ambos límites, en una escala numérica de 0 a 100 del descriptor acidez,

25 respecto al valor de las mismas propiedades del producto medidas antes de añadir la cepa bacteriana de la invención.

30 En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las cepas bacterianas de la especie *Pediococcus damnosus* descritas en el aspecto y realizaciones preferidas anteriores como la "cepa de la presente invención" o la "cepa bacteriana de la invención".

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición bacteriana malolácticamente activa en un producto que comprende al menos una cepa bacteriana de la invención.

35 La composición bacteriana, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado por al menos una cepa bacteriana de la invención en cualquier concentración, y pudiendo comprender combinaciones de al menos una cepa bacteriana de la invención con otras cepas distintas compatibles.

40 En una realización preferida, dicha composición bacteriana comprende una cepa bacteriana seleccionada entre: DSM 25074, DSM 25075 y una combinación de las mismas.

En una realización más preferida de la anterior, dicha composición comprende las cepas bacterianas DSM 25074 y DSM 25075.

45 La composición se puede aplicar en forma sólida o líquida incluyendo ingredientes adicionales tales como agentes emulsionantes, agentes de resuspensión, agentes para aumentar el volumen, nutrientes bacterianos y agentes crioprotectores (como por ejemplo gelatina), siguiendo los protocolos habitualmente empleados en el estado de la técnica para la aplicación o inoculación de composiciones bacterianas.

50 Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, gránulos o polvo humectable, mientras que las composiciones líquidas pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, dispersiones, o formulaciones concentradas acuosas o no acuosas, que pueden ser preparadas según cualquiera de los procedimientos sobradamente conocidos en el estado de la técnica actual.

55 En adelante, dicha composición bacteriana descrita en este aspecto de la invención, así como cualquiera de sus realizaciones preferidas anteriores, puede ser referida en la presente memoria como "composición bacteriana de la invención" o "composición de la invención".

60 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método o procedimiento para fermentar malolácticamente un producto que comprende la utilización de al menos una cepa bacteriana de la invención o de una composición de la presente invención.

En concreto, la presente invención describe un método de conversión de ácido málico existente en un producto a ácido láctico, que comprende:

- I. añadir a dicho producto (o inocular) al menos una cepa bacteriana de la invención o una composición bacteriana de la invención,
- II. mantener dicho producto en condiciones que permitan la conversión del ácido málico, para obtener un producto malolácticamente fermentado con propiedades organolépticas modificadas.

Las condiciones que permiten la conversión del ácido málico son las condiciones habituales de fermentación maloláctica. En particular, dicho producto se mantiene a una temperatura en la que la cepa añadida o inoculada sea malolácticamente activa. Una temperatura típica a la que mantener el producto que sufre fermentación maloláctica estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 0 °C y 40 °C. La mayoría de las bacterias malolácticas se activarán a temperaturas comprendidas en el intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C. Una temperatura típica para realizar la fermentación maloláctica en un producto, preferentemente un vino (más preferentemente seleccionado entre un vino *Albariño* o un vino *Caiño blanco*), estará comprendida en el intervalo de temperatura aproximado entre 15 a 30 °C, incluidos ambos límites.

El contenido de ácido málico en el producto puede variar. Típicamente, el contenido de ácido málico estará comprendido en el intervalo de 0,5 a 10 gramos por litro (incluidos ambos límites). En realizaciones preferidas, cuando el producto que va a ser fermentado como se define en esta memoria es un vino o un zumo de frutas, dicho producto presenta un contenido de ácido málico 0,5 y 5 gramos por litro de producto (incluidos ambos límites).

Dicha modificación de las propiedades organolépticas del producto malolácticamente fermentado, determinada o medida por análisis sensorial, comprende:

- i. un aumento de aroma a miel comprendido entre 1 y 25, incluidos ambos límites (y más preferentemente entre 5 y 15), en una escala numérica de 0 a 100 del descriptor aroma a miel,
- ii. una disminución de acidez comprendida entre 1 y 50, incluidos ambos límites (y más preferentemente entre 5 y 15), en una escala numérica de 0 a 100 del descriptor acidez,

respecto al valor de dichas propiedades medidas en el producto no fermentado previamente a la conversión de ácido málico.

La cepa bacteriana o la composición bacteriana de la invención se añade o inocula al producto a una concentración que puede estar comprendida entre  $10^4$  y  $10^9$  bacterias o células (también referidas en la memoria como unidades formadoras de colonias, o por sus siglas UFC) por mL de producto, incluidos ambos límites. Un intervalo de concentración para inocular más preferido es  $10^5$  y  $10^6$  UFC por mL de producto.

En una realización preferida, en la etapa I del método de este aspecto de la invención, la cepa de la invención de la etapa I es una cepa de *Pediococcus damnosus* malolácticamente activa que se selecciona entre: DSM 25074, DSM 25075 y una combinación de ambas. Más preferiblemente, la cepa de *Pediococcus damnosus* seleccionada es una combinación de DSM 25074 y DSM 25075.

En otra realización preferida, la cepa de la invención de la etapa I comprende DSM 25074 y DSM 25075.

Según la invención, y como se menciona anteriormente, dicho producto del método de conversión presenta en su composición ácido málico, como por ejemplo un vino, un zumo de fruta, cualquier jugo vegetal que tenga ácido málico y sea susceptible de crecimiento por parte de las cepas, como la sidra o zumo de manzana donde tales fenómenos se llevan a cabo, o cualquier combinación de los mismos. Es decir, el producto que contiene ácido málico para convertir con el método de conversión puede ser un vino, un zumo de fruta, o cualquier combinación de los mismos, entendiéndose que dicha combinación puede ser una combinación de distintos vinos, una combinación de distintos zumos de frutas o una combinación de al menos un vino y al menos un zumo de fruta.

De manera preferida, dicho producto es un vino blanco, rosado o tinto, que puede ser espumoso o no espumoso, o puede ser una combinación cualquiera de estos tipos de vinos. Y aún más preferidamente, dicho producto es un vino blanco.

Preferiblemente, cualquiera de los productos según se han descrito anteriormente (vino, zumo de fruta o combinaciones de los mismos) son previamente elaborados a partir de zumo de una variedad de uva seleccionada del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de ambas.

En una realización preferida de cualquiera de las anteriores, el producto es un vino previamente elaborado a partir de zumo de uva de variedad *Albariño*.

5 En un ejemplo más preferido de la realización anterior, la cepa de la invención de la etapa I seleccionada comprende DSM 25074 y DSM 25075. Según esta realización preferida, con dicho método, la modificación de las propiedades organolépticas del producto fermentado obtenido, determinada por análisis sensorial según se recoge en las figuras 1 y 2, además comprende:

- 10
- iii. un aumento del tono amarillo-dorado,
  - iv. un aumento del aroma herbáceo,
  - v. una disminución del aroma a piña,
  - 15 vi. un aumento de la estructura,
  - vii. un aumento de la suavidad,

20 respecto al valor de las mismas propiedades medidas en el producto no fermentado.

En otra realización preferida distinta de las dos anteriores, el producto es un vino previamente elaborado a partir de zumo de uva de variedad *Caiño blanco*.

25 En un ejemplo más preferido de la realización anterior, la cepa de la invención de la etapa I seleccionada comprende DSM 25074 y DSM 25075. Según esta realización preferida, con dicho método, la modificación de las propiedades organolépticas del producto fermentado obtenido, determinada por análisis sensorial según se recoge en las figuras 1 y 2, además comprende:

- 30
- viii. una disminución del aroma herbáceo,
  - ix. una disminución del amargor,

respecto al valor de las mismas propiedades medidas en el producto no fermentado.

35 En adelante se podrá hacer referencia al método según se ha descrito en este aspecto de la invención, así como a cualquiera de sus realizaciones preferidas anteriores como "método de la presente invención".

40 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de una cualquiera de las cepas bacterianas de la invención o de una cualquiera de las composiciones bacterianas de la invención para la fabricación de un vino, preferentemente un vino elaborado a partir de al menos una variedad de uva que se selecciona del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de las mismas.

45 En un aspecto adicional, la presente invención hace referencia al uso del método de la invención para la fabricación de un vino, preferentemente un vino elaborado a partir de al menos una variedad de uva que se selecciona del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de las mismas.

### **Breve descripción de las figuras**

50 **Figura 1.** Comparación del perfil sensorial de los vinos de *Caiño blanco* antes y después de la FML con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

**Figura 2.** Comparación del perfil sensorial de los vinos de *Albariño* antes y después de la FML con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

### 55 **Ejemplos**

Las descripciones que a continuación se detallan no tienen en absoluto carácter limitante, si no que han de ser consideradas más bien ejemplos de realización de la invención.

60

**Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de cepas de *Pediococcus damnosus* de referencia DSM 25074 y DSM 25075.**

Las cepas de *Pediococcus damnosus*, depositadas el 27 de octubre de 2011 en DSMZ (colección alemana de microorganismos y cultivos de células), cuyas referencias son DSM 25074 y DSM 25075, son bacterias lácticas del vino, más en concreto, aislados naturales de vinos elaborados con la variedad *Caiño Blanco* de *Vitis vinifera*. Antes de poder disponer de ellas estaban en los vinos a transformar, de manera espontánea y natural, en estado que podríamos definir como salvaje. Al igual que cualquier ser vivo, para ser empleado biotecnológicamente, ha de ser aislado de su entorno natural y confinado en unas instalaciones en las que ha de permanecer para poder así ejercer la función que le encomendamos. Algo similar ocurre con los microbios: inicialmente han de ser aislados, y después cultivados y mantenidos en las debidas condiciones mediante el empleo de técnicas microbiológicas. Para disponer de las cepas cuyo uso reivindicamos lo primero que ha de llevarse a cabo es la operación de aislamiento. Para realizar el aislamiento de dichas cepas se ha de emplear la adecuada técnica microbiológica, consistente fundamentalmente en el cultivo en medio sólido, conocido sobradamente por cualquier persona mínimamente versada en la materia. Para ello, ha de realizarse en condiciones asépticas, un denominado banco de diluciones decimales en el que se lleva a cabo la mezcla de 1 mL del vino a partir del cual ha de aislarse la cepa de interés, con 9 mL de suero salino estéril para conseguir la dilución (-1), a partir de la cual se consiguen todas las demás necesarias, extrayendo de la primera, y de manera consecutiva, 1 mL que se mezcla con otros 9 mL de suero salino estéril (cloruro sódico al 0,9%). Una vez realizado el banco de diluciones, se toman de varias de ellas una alícuota de 1 mL, que es vertida en una placa petri, sobre la cual se añaden aprox. 20 mL de medio de cultivo atemperado MRS agar entre 45 y 50°C, suplementado con 0.1 mg/mL de cicloheximida, para evitar el desarrollo de levaduras que pueden estar presentes de manera residual en el vino. Tras mezclar y dejar solidificar, las placas se incuban anaeróticamente a 30°C el tiempo necesario para observar en ellas crecimiento, tras lo cual, se toman de manera aséptica colonias que se inoculan en caldo o medio de cultivo MRS a pH 4,8, suplementado con 10% (v/v) de jugo de tomate y, tras incubar a 30°C entre 48 y 72 hr, se añade glicerol al 50% (mezcla de glicerol y agua en la misma proporción de volúmenes). De este modo se obtienen una serie de cultivos con distintas cepas aisladas, que se congelan a -80°C para su conservación como cultivos stock o para su estudio posterior.

Sobre estos cultivos congelados puede realizarse la extracción de ácido desoxirribonucleico (en adelante referido en la presente memoria como ADN o DNA) que constituye el material genético de dicho cultivos necesaria para determinar su caracterización molecular. El tipado molecular sirve para conocer la especie a la cual el microbio pertenece basándose en su ADN, así como para hacerle un carnet de identidad o huella digital con la que se pueda identificar de manera inequívoca la cepa, y así pueda trazarse su desarrollo para poder atribuirle los efectos beneficiosos que la presente invención reivindica. Para el aislamiento del ADN de dichos cultivos, puede utilizarse un kit comercial tal como "Archive pure DNA, Yeast and Gram + kit" comercializado por "5-PRIME" (Hamburgo, Alemania). Los cultivos se descongelan y son centrifugados a 14,000 rpm, 1 min, tratando el depósito según las indicaciones del fabricante, obteniéndose distintas suspensiones de ADN correspondientes a cada uno de los cultivos congelados de partida. Después se miden las muestras de ADN mediante el empleo de un espectrofotómetro BECKMAN COULTER DU@730 (Life Science UV/VIS, espectrofotómetro, California, USA), o similar, realizándose la lectura a 260-280nm.

Sobre el ADN se hacen dos tipos de estudios. El primero de dichos estudios, permite elucidar la especie de bacteria láctica a la que pertenecen los aislados. Ha de hacerse utilizando técnicas contrastadas de PCR (técnicas de amplificación de ADN basada en la reacción en cadena de la polimerasa) descritas en la bibliografía (Zapparoli, G., Torriani, S. & Pesente, P. 1998 Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. Letters in Applied Microbiology 27, 243-246), utilizando el cebador On1 (5'-TAATGTTGGTTCTTGAGGAGAAAAT-3') y On2 (5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3'), según se definen en la mencionada referencia bibliográfica. Un volumen de 50 ng de dicha suspensión de ADN bacteriano se amplifica en 20µl de volumen final, utilizando una máquina de PCR MyCycler (BioRad Laboratories, USA) o similar, y un programa de ciclos con 30 ciclos (94°C durante 45 segundos, 64°C durante 2 min y 72°C durante 2 min). Los amplicones se estudiaron con electroforesis en geles de 1,2% de agarosa gel en tampón 1× TAE (Tris, EDTA y ácido acético), tiñendo los geles con bromuro de etidio y visualizándolos con una lámpara de luz ultravioleta Gel Doc 2000 (BioRad, Milan, Italy) o similar.

Tras realizar la tipificación a nivel especie, gracias a la cual sabemos que las cepas pertenecen a la especie *Pediococcus damnosus*, es imprescindible caracterizar los detalles que hacen a estas cepas distintas de otras de la misma especie, para lo cual se lleva a cabo la tipificación a nivel cepa. Para ello se emplea la técnica denominada de Multiplex RAPD-PCR utilizando los cebadores denominados Coc (con secuencia 5'-AGCAGCGTGG-3'), y On2, con secuencia recogida con anterioridad, aplicados con éxito para estos menesteres con anterioridad (Reguant C, A Bordons (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. Journal of Applied Microbiology 95 (2), 344.353). El programa de PCR fue de 95°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 40°C durante 1 min y 72°C durante 2 min, seguido de una extensión final de 10 min, visualizando como anteriormente se ha explicado para tipificación de especie y comparando el patrón de bandas mediante el empleo de un programa informático



de caracterización como Bionumerics (Applied Maths, Belgium), calculando los coeficientes de similitud de Dice, y agrupando cepas mediante el empleo de grupos de parejas con medias aritméticas (UPGMA).

5 Es conveniente del mismo modo, y para asegurar la originalidad de la invención en lo relacionado con la cepa o cepas a emplear, así como para realizar de modo conveniente el seguimiento de las experiencias útiles como ejemplo, poder caracterizar a nivel molecular las colonias no pertenecientes a la especie *Pediococcus damnosus*, para lo cual el ADN extraído es amplificado con el cebador M13 (5'-GAGGGTGGCGGT-CT-3') según metodología descrita previamente (G. Giraffa, C. Andrighetto, C. Antonello, M. Gatti, C. Lazzi, G. Marcazzan, A. Lombardi and E. Neviani, Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin, Int. J. Food Microbiol. 91 (2004), pp. 129–139). La amplificación se realiza en una máquina PCR con un perfil de 94°C durante 1 min, 40°C durante 1 min y 72°C durante 2 min, repetido 45 ciclos, incluyendo una preincubación de 94°C durante 5 min y una extensión final de 72°C durante 10 min. Los geles de agarosa se tiñen con bromuro de etidio o similar y las imágenes se toman con un equipo Gel Doc 2000 (Bio Rad, Milan, Italy) o similar, comparando los perfiles con el programa Bionumerics o similar. Después el ADN se amplifica con los cebadores universales 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'), descritos con anterioridad (Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D. and Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64, 795-799.), y los productos de PCR fueron secuenciados para verificar la identidad de las cepas encontradas en los vinos ensayados, y poder así comprobar que las cepas inoculadas eran las que llevaban a cabo la fermentación maloláctica, y no otras. El estudio de la similaridad de secuencias fue efectuado mediante el cálculo del algoritmo de *Blast* (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215(3):403-10) en la NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) empleando la base de datos GeneBank y con el "Ribosomal Database Project" (J. R. Cole, Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, y J. M. Tiedje 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 2009 January; 37, Database issue: D141–D145).

### Ejemplo 2: Evaluación de la producción de aminas biógenas en cepas de *Pediococcus damnosus* de referencia DSM 25074 y DSM 25075.

30 Como parte integrante de la invención, se propone el empleo de las cepas de *Pediococcus damnosus*, depositadas el 27 de octubre de 2011 en DSMZ (colección alemana de microorganismos y cultivos de células), cuyas referencias son DSM 25074 y DSM 25075, en base a que además no reducen la seguridad de los vinos elaborados con ellas, y para ello se hace necesario un seguimiento de la no formación de aminas biógenas, metabolitos que ciertos microbios originan a partir de aminoácidos por la acción de aminoácido descarboxilasas, como consecuencia de su metabolismo, para lo cual se testa o comprueba la capacidad de producción de dichas sustancias mediante un test de cromatografía en capa fina (abreviado en la presente memoria como CCP o por su acrónimo en inglés TLC -Thin Layer Chromatography-) de acuerdo a metodología previamente descrita (E. García-Moruno, A.V. Carrascosa y R. Muñoz, 2005. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography, Journal of Food Protection 68 (2005), pp. 625–629), haciendo crecer a las cepas a testar en caldo MRS pH4.8 suplementado con el precursor aminoácido histidina, ornitina y tiramina, tomando muestras después de 9 días de crecimiento y analizando por TLC el sobrenadante final del cultivo, donde de existir la capacidad de producir aminas biógenas, han de encontrarse las mismas gracias a la capacidad de las aminoácido descarboxilasas correspondientes. Los vinos además fueron analizados antes de la realización de la FML para conocer la concentración de alcohol, el extracto seco total, el pH, el dióxido de azufre libre y total, con metodología descrita (G.U. C.E. n. 272 3/10/1990). El color del vino se analiza con los parámetros CIE-CIELAB, sistema de medición de color internacionalmente aceptado. Los ácidos orgánicos (málico, láctico, etc.) mediante HPLC o cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés "High Performance Liquid Chromatography" [Cane (1990) Il controllo della qualità dei vini mediante HPLC: determinazione degli acidi organici. L'Enotecnico, XXVI 1–2:69–72], los fenoles (totales y flavonoides mediante reacción a p-DACA o p-dimetilaminocinamaldehído), también con metodología descrita [Di Stefano, R.; Cravero, M. 1991. Metodi per lo studio dei polifenoli dell' uva. Riv. Vitic. Enol. 2: 37-45; Di Stefano, R.; Cravero, M.C. and Gentilini, N. 1989: Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. L'Enotecnico, 25: 83-89]. Las medidas mencionadas se recogen en la Tabla 1 y sirven para ilustrar la incidencia atribuible a las cepas utilizadas para realizar la fermentación maloláctica en los parámetros enológicos habituales.

### Ejemplo 3: Fermentación de vinos mediante el uso cepas de *Pediococcus damnosus* de referencia DSM 25074 y DSM 25075.

60 El ejemplo de desarrollo de la invención se completa con la realización de la fermentación maloláctica, tanto en vinos *Albariño* como *Caiño blanco* que, una vez inoculados, se mantiene a 25°C hasta el consumo total de ácido málico, sustancia cuya concentración se mide semanalmente con la metodología señalada anteriormente u otra semejante en un equipo de HPLC (Waters Binary HPLC 1525 pump, Torino, Italy) utilizando una columna RP 18 5µm (LiChrospher® 100, Merk KGaA, Darmstadt, Germany) [Cane (1990) Il controllo della qualità dei vini mediante HPLC: determinazione degli acidi organici. L'Enotecnico, XXVI 1–2:69–72], empleando patrones

comerciales de los compuestos a estudio de la marca VWR (Milan, Italy) o similar. Para conocer la idoneidad de las cepas ecotípicas autóctonas aisladas de los vinos de la tierra frente a la posibilidad de realizar la fermentación maloláctica con cepas comerciales, se puede llevar a cabo el desarrollo del ejemplo con la cepa comercial *Oenococcus oeni*, (Lallemand, S.A, St- Simon- France), inoculada en una concentración de 25g/25hl, rehidratada antes de uso 20 minutos en agua destilada a 30°C, según indicación del fabricante. La mezcla de cepas aisladas de vino *Caiño blanco* fueron desarrolladas para ser inoculadas en una concentración 10<sup>6</sup> células/ml (o lo que es lo mismo unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro) en vinos de *Albariño*.

Los vinos producidos fueron sometidos a análisis sensorial, que es aquel tipo de análisis realizado por personas a través de sus sentidos que, en definitiva, es imprescindible para conocer la aceptabilidad final del vino producido. Se realiza con un panel de cata entrenado de estudiantes y profesores de el CRA-Centro di Ricerca per Enologia, Asti (Italia) o similar, compuesto de 14 miembros de 25 a 60, que degustan los vinos antes y después de la realización de la fermentación maloláctica de los vinos de *Albariño* and *Caiño blanco*. Los descriptores utilizados en la realización del ejemplo han sido olor, aroma, sabor, y sensación en boca en todos los vinos, calificando de 0 a 100 los descriptores. La degustación se realiza sobre un volumen de vino de 30-40 mL a 14-20°C, en copas de cata, vertiendo inmediatamente antes del análisis, contrastando todos los datos con análisis estadístico de varianza con el programa XL Stat o similar, para comparar los descriptores comunes del aroma antes y después de la FML, ya que los mismos cambian como consecuencia de la acción de las cepas inoculadas.

En la Tabla 1 se recogen las características de los vinos utilizados en la realización del ejemplo. Los vinos diferían en pH y ácido málico, con un grado alcohólico ligeramente más bajo en *Caiño blanco*, un más intenso amarillo (parámetro b de color) en *Albariño*, algo también en línea con el contenido fenólico.

En *Caiño blanco* las pruebas moleculares permitieron comprobar que las cepas *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075 fueron las que realizaron la FML en 30 días, algo comprobado mediante multiplex-RAPD, incluso inoculando con el cultivo comercial que, evidentemente no estaba adaptado en absoluto a las características del vino. Tampoco realizó la FML en *Albariño* el cultivo comercial, y sí la mezcla de cepas *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075. Por tanto, los resultados muestran que las cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075 son capaces de realizar la FML en vinos *Albariño* y *Caiño blanco*, en los cuales no se realiza dicho proceso de fermentación con otras cepas comerciales malolácticamente activas, como por ejemplo la anteriormente mencionada de *Oenococcus oeni* (Lallemand, S.A, St- Simon-France). La realización del ejemplo en cuanto a transformación de ácido málico en láctico hasta el agotamiento de aquel, se recoge en las tablas 2 y 3 para vinos de *Caiño blanco* y *Albariño*, respectivamente.

El análisis sensorial permite la descripción de los vinos antes y después de realizar la FML. Así el vino *Albariño* se caracteriza por los descriptores aromáticos flor de acacia, miel, hierba y afrutado (naranja, piña, banana, pera y manzana), y de color amarillo y amarillo pajizo, suave y estructurado. El *Caiño blanco* presenta color amarillo pajizo y aroma fresco y herbáceo, flor de acacia, miel y afrutado (cítrico y banana), al igual que el *Albariño* es un vino suave y estructurado. Los vinos se consideran por el panel de cata como buenos y de alta aceptabilidad, siendo el *Albariño* considerado más afrutado y floral que el *Caiño blanco*.

Después de la FML en el *Caiño* las notas de frescor y banana desaparecieron, con significación estadística diferencias en acidez, aromas herbáceos y miel son detectadas (Tabla 4, Figura 1). La acidez desciende tras la FML.

**Tabla 1:** Composición físico-química de los vinos.

	<i>Albariño</i>	<i>Caiño blanco</i>
<b><u>Determinaciones generales</u></b>		
Alcohol (%)	12,98 ± 0.04	12.46 ± 0.02
Extracto seco total (g/L)	26.2 ± 0.14	27.5 ± 0.56
pH	3.51 ± 0.00	3.71 ± 0.00
Acidez Total (g/L)	7.4 ± 0.00	6.65 ± 0.07
Acidez Volatil (g/L)	0.49 ± 0.03	0.36 ± 0.01
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	6.40 ± 0.00	6.24 ± 0.22
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	142.0 ± 4.24	140.0 ± 1.41
<b><u>Acidez Estable (g/L)</u></b>		
Acido Tartárico	1.58 ± 0.15	1.01 ± 0.00
Ácido Málico	2.91 ± 0.45	2.78 ± 0.04
Ácido Láctico	0.63 ± 0.14	1.63 ± 0.05

**Tabla 1 (cont.):** Composición físico-química de los vinos.

	<i>Albariño</i>	<i>Caiño blanco</i>
<b>Color</b>		
E 420nm	$0.17 \pm 4.1 \cdot 10^{-3}$	$0.11 \pm 7.07 \cdot 10^{-5}$
Luminosidad %	$0.94 \pm 4.36 \cdot 10^{-3}$	$0.96 \pm 1.5 \cdot 10^{-3}$
Saturación %	$11.71 \pm 0.16$	$7.74 \pm 0.06$
L*	$97.66 \pm 0.17$	$98.56 \pm 0.06$
a*	$-2.75 \pm 3.04 \cdot 10^{-3}$	$-2.15 \pm 0.03$
b*	$12.71 \pm 0.15$	$8.57 \pm 0.07$
h*	$-1.36 \pm 2.23 \cdot 10^{-3}$	$-1.33 \pm 1.9 \cdot 10^{-3}$
C*	$13.00 \pm 0.14$	$8.83 \pm 0.08$
<b>Composicion fenólica (mg/L)</b>		
Fenoles Totales	$107.00 \pm 5.65$	$97.50 \pm 0.70$
Reacción Flavanoica a p-DACA	$65.00 \pm 1.41$	$54.50 \pm 0.70$

El descriptor miel aumenta tras la FML, lo que aporta notas maduras y disminuye aquellas de frescor, herbáceas, juveniles, debidas en todo caso al desarrollo microbiano de las cepas inoculadas. También decrece tras la FML el amargor, aunque no con significación estadística, al menos en la realización del ejemplo.

5

En *Albariño* (Tabla 5, Figura 2) aumenta significativamente los tonos amarillo-dorados tras la FML. También se detecta incremento en aromas herbáceos y a miel, y decrecimiento en piña. En general tras la FML cuerpo y la suavidad del vino aumenta y acidez disminuye.

10 **Tabla 2:** Variación de los ácidos málico y láctico (g/L) durante la FML del vino de *Caiño blanco* con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

	<b>INICIO</b>	<b>4 días</b>	<b>7 días</b>	<b>16 días</b>	<b>24 días</b>	<b>30 días</b>
<b>Ácido málico</b>	2,80	1,70	1,40	1,08	0,80	0,00
<b>Acido láctico</b>	0,60	1,30	1,50	1,70	1,89	2,40

15 **Tabla 3:** Variación de los ácidos málico y láctico (g/L) durante la FML del vino de *Albariño* con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

	<b>INICIO</b>	<b>24 días</b>	<b>30 días</b>
<b>Ácido málico</b>	3,1	0,39	0
<b>Acido láctico</b>	0,867	2,6	2,8

20 **Tabla 4:** Comparación del perfil sensorial de los vinos de *Caiño blanco* antes y después de la FML con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

	<b>Caiño</b>	<b>Caiño FML</b>
<b>Amarillo</b>	61,2	64,2
<b>Amarillo resalte</b>	57,1	59,95
<b>Flores (acacia, azahar)</b>	58,45	57,1
<b>Miel</b>	48,25	60,95
<b>Hierbas</b>	49,35	38,35
<b>Acidez</b>	46,55	34,95
<b>Amargor</b>	41	36,15
<b>Suavidad</b>	57,05	61,7
<b>Estructura</b>	60,5	56,75

**Tabla 5:** Comparación del perfil sensorial de los vinos de *Albariño* antes y después de la FML con la mezcla de cepas de *Pediococcus damnosus* DSM 25074 y DSM 25075.

	<i>Albariño</i>	<i>Albariño</i> FML
<b>Amarillo</b>	64,30769	66,07692
<b>Amarillo resalte</b>	61,69231	68,07692
<b>Flores (acacia , azahar)</b>	60,69231	57,46154
<b>Cítricos</b>	56,15385	58,92308
<b>Piña</b>	57,30769	50,61538
<b>Miel</b>	46,46154	54
<b>Hierbas</b>	43,38462	52,84615
<b>Acidez</b>	52,30769	45,30769
<b>Amargo</b>	37,92308	35,23077
<b>Suavidad</b>	52	56,92308
<b>Estructura</b>	55,61538	60,76923

5

10

15

20

25

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* que es malolácticamente activa en un producto, caracterizada porque se aísla de vino blanco con Denominación de Origen Rías Baixas elaborado a partir de uva de variedad *Caiño Blanco*, y porque cuando dicha cepa se añade a dicho producto:
- 10 a. transforma totalmente a ácido láctico un contenido de ácido málico en el producto sin producir aminos biógenas,
- b. induce un efecto en las propiedades organolépticas del producto.
- 15 2. Una cepa según la reivindicación 1, caracterizada porque la cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* se selecciona entre DSM 25074 y DSM 25075.
3. Una composición bacteriana malolácticamente activa en un producto que comprende al menos una cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* como se define en la reivindicación 1.
- 20 4. Una composición bacteriana según la reivindicación 3, caracterizada porque la cepa bacteriana de *Pediococcus damnosus* se selecciona entre: DSM 25074, DSM 25075 y una combinación de las mismas.
5. Una composición bacteriana según la reivindicación 4, caracterizada porque la cepa bacteriana comprende DSM 25074 y DSM 25075.
- 25 6. Un método de conversión de ácido málico existente en un producto a ácido láctico, que comprende:
- I. añadir directamente a dicho producto al menos una cepa bacteriana definida en una de las reivindicaciones 1 ó 2, o una composición bacteriana definida en una de las reivindicaciones 3 a 5,
- 30 II. mantener dicho producto en condiciones de fermentación maloláctica.
7. Un método según la reivindicación 6, caracterizado porque la cepa o la composición bacteriana se añade al producto en una concentración bacteriana comprendida entre  $10^4$  y  $10^9$  UFC por mL de producto.
- 35 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque la cepa de *Pediococcus damnosus* malolácticamente activa se selecciona entre DSM 25074, DSM 25075 y una combinación de ambas.
- 40 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque la cepa de *Pediococcus damnosus* malolácticamente activa comprende DSM 25074 y DSM 25075.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque dicho producto se selecciona del grupo compuesto por: un vino, un zumo de fruta, y cualquier combinación de los mismos.
- 45 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado porque dicho producto se selecciona del grupo compuesto por: vino blanco, vino rosado, vino tinto y una combinación de los mismos.
- 50 12. Un método según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho producto es un vino blanco.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado porque dicho producto ha sido previamente elaborado a partir de zumo de una variedad de uva seleccionada del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de ambas.
- 55 14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado porque dicho producto es un vino previamente elaborado a partir de zumo de uva de variedad *Albariño*.
15. Un método según una de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado porque dicho producto es un vino previamente elaborado a partir de zumo de uva de variedad *Caiño blanco*.
- 60 16. Uso de una cepa bacteriana definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una composición bacteriana definida en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para la fabricación de un vino.

17. Uso de una cepa bacteriana definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una composición bacteriana definida en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para la fabricación de un vino que se elabora con al menos una variedad de uva seleccionada del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de ambas variedades.
- 5
18. Uso de un método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15 para la fabricación de un vino.
19. Uso de un método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15 para la fabricación de un vino que se elabora con al menos una variedad de uva seleccionada del grupo compuesto por: *Albariño*, *Caiño blanco* y una combinación de ambas variedades.
- 10

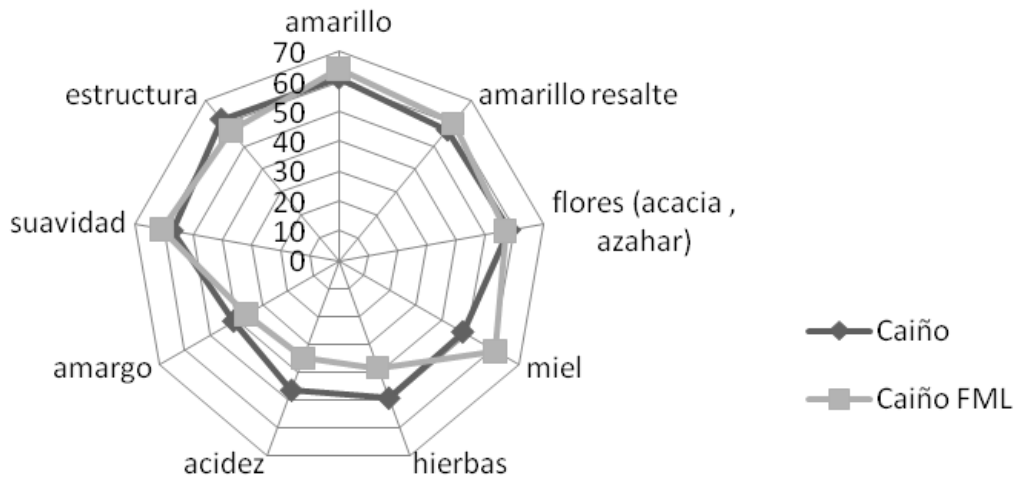


Figura 1



Figura 2