

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 390**

21 Número de solicitud: 201330219

51 Int. Cl.:

**C12N 1/16** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

**C12P 1/02** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**19.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.09.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)  
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e  
Innovación - Avda. de Elvas, s/n  
06006 Badajoz ES**

72 Inventor/es:

**RAMÍREZ FERNÁNDEZ, Manuel;  
MAQUEDA GIL, Matilde;  
VELÁZQUEZ MOLINERO, Rocío;  
ÁLVAREZ FRANCO, María De La Luz y  
ZAMORA DE ALBA, Emiliano**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

54 Título: **Levadura Torulaspora y su uso para la elaboración de productos fermentados**

57 Resumen:

Levadura Torulaspora y su uso para la elaboración de productos fermentados.

La presente invención pertenece al campo técnico de las fermentaciones industriales, más concretamente, la presente invención se refiere a una levadura del género Toluraspora que pertenece a la especie T. delbrueckii o T. pretoriensis, con capacidad para degradar ácido L-málico y producir ácido L-láctico, caracterizada por los números de depósito CECT13083 y CECT13082, y a su uso para elaborar productos fermentados. Asimismo, se refiere a un procedimiento para elaborar productos fermentados que comprende la fermentación de una materia prima de partida con dicha levadura Toluraspora.

ES 2 489 390 A1

## DESCRIPCIÓN

Levadura *Torulaspota* y su uso para la elaboración de productos fermentados.

### 5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo técnico de las fermentaciones industriales, tales como elaboración de vinos, cerveza, alcohol para consumo humano, masa de pan, bollería, etc. Más concretamente, la presente invención se refiere a una levadura del género *Toluraspora* y a su uso para elaborar productos fermentados.

### Antecedentes de la invención

Las vinificaciones industriales se realizan en la mayoría de las regiones vinícolas del mundo con inóculos de levaduras vínicas seleccionadas del genero *Saccharomyces*. No obstante, estudios recientes sugieren que algunas levaduras no-*Saccharomyces* pueden ser utilizadas para corregir ciertos defectos del vino o para intensificar o mejorar sus propiedades organolépticas, y conseguir así productos más originales y diferenciados. La evaluación de la utilidad industrial de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vino se realiza normalmente mediante co-inoculación (secuencial o simultánea) con levaduras *Saccharomyces* en fermentaciones controladas. Sin embargo, dicho uso combinado de diferentes especies de levaduras conlleva el problema de que los resultados de la fermentación son imprevisibles y pueden afectar de forma indeseada a la composición química y aromática del vino. Además, se ha descrito que en presencia de altas concentraciones de células de *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe el crecimiento de otras levaduras como *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*. A pesar de esto, tanto *Torulaspota delbrueckii* como *Kluyveromyces thermotolerans* se pueden adquirir en el mercado (marcas Hansen o Lallemand) para elaborar vino; aunque su utilidad práctica en bodegas comerciales está por confirmar y aún no son levaduras vínicas de uso generalizado. La casa Hansen vende una mezcla de levaduras, llamada MELODY.nsac, compuesta por una estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, para conseguir una fermentación alcohólica segura y fiable, y dos estirpes no-*Saccharomyces* (*Kluyveromyces thermotolerans* y *Torulaspota delbrueckii*) para mejorar el impacto organoléptico del aroma y la sensación en boca del vino. Por su parte, la casa Lallemand asume que la inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* en monocultivo no permite concluir la fermentación (azúcares residuales < 2 g/L) en un tiempo razonable compatible con las exigencias de las actuales técnicas de vinificación, y al mismo tiempo no garantiza la ausencia de defectos sensoriales. En consecuencia, Lallemand comercializa por separado una estirpe de *Torulaspota delbrueckii* y otra de *Saccharomyces cerevisiae* en el kit LEVEL2™ TD, y propone una inoculación del mosto secuencial, primero *Torulaspota delbrueckii* y 48 horas después *Saccharomyces cerevisiae* con la adicción de activador de fermentación para asegurar la disponibilidad de nutrientes y el correcto final de fermentación. Ambas casas aseguran resultados positivos y fermentaciones correctas, sin embargo con mostos de graduación probable superior a 13 °Bé la fermentación es muy lenta, comprometiendo así la calidad del vino elaborado.

En las estrategias de fermentación de Hansen y Lallemand, las levaduras *Torulaspota delbrueckii* actúan al principio de la fermentación alcohólica en clara competencia por los nutrientes con las levaduras *Saccharomyces* del mosto en la inoculación secuencial (según la propuesta de Lallemand), o con las levaduras *Saccharomyces* silvestres del mosto más las inoculadas (según la propuesta de Hansen), y son remplazadas progresivamente por la estirpe inoculada de *Saccharomyces cerevisiae* que supuestamente dominará la fermentación. En ningún caso *Torulaspota delbrueckii* llega a ser la levadura dominante de la fermentación, debido fundamentalmente a su menor capacidad de multiplicación y a sus necesidades específicas de micronutrientes y oxígeno. Su aportación a la calidad del vino se limita por tanto

al principio de fermentación, y esta aportación puede ser fácilmente modificada por las levaduras dominantes en el proceso a partir de la fermentación tumultuosa hasta el final. La cantidad de estas levaduras no-*Saccharomyces* al final de la fermentación es muy pequeña, y la mayoría no son viables debido a su sensibilidad a concentraciones de alcohol superiores 10°. Por otra parte, es pertinente considerar que la inoculación secuencial de levaduras en bodegas comerciales es menos operativa que la inoculación inicial de una mezcla de levaduras.

Otro aspecto interesante a considerar en la elaboración de vino es la eliminación de cantidades excesivas de ácido L-málico procedentes de las uvas. Las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* casi no metabolizan el L-málico de la uva, debido a la baja afinidad por el sustrato de su enzima málico dependiente de NAD, que además está sometido a represión catabólica; y a que carecen de un transportador activo de L-málico. El resultado es que los cambios en la acidez total del vino durante la fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* son mínimos. Esto requiere la reducción posterior controlada del ácido málico cuando está en exceso para elaborar vinos equilibrados, particularmente con uvas de viñedos ubicados en regiones frías o en zonas cálidas con riego controlado. Una opción es la desacidificación química precipitando el ácido málico mediante adición de calcio, potasio u otros cationes produciendo una sal insoluble; y otra, añadir zumo de uva o azúcar al vino para enmascarar el sabor del ácido málico. El problema es que ambas alternativas alteran las características y calidad del vino, y aún quedan cantidades residuales de ácido málico que pueden soportar el crecimiento de bacterias contaminantes a menos que se añadan dosis elevadas de sulfitos.

De forma natural, la desacidificación del vino se suele realizar biológicamente mediante fermentación maloláctica, que consiste en la conversión del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO<sub>2</sub> normalmente por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus*. Estas bacterias se suelen encontrar en la piel de las uvas maduras o residentes en las bodegas, y también se pueden inocular en los mostos y vinos a partir de cultivos comerciales congelados o crio-desechados. Aunque esta es la técnica más extendida en las regiones vinícolas de todo el mundo, presenta una serie de desventajas tales como que: las bacterias lácticas degradan terpenos y alteran el aroma del vino, el control de la fermentación maloláctica suele ser difícil y preocupante para el enólogo, la fermentación maloláctica puede ser incompleta, con lo que permanece el riesgo de posteriores fermentaciones en botella, y se forman aminas biógenas potencialmente perjudiciales para la salud.

Otra alternativa biológica aún en desarrollo es inocular el mosto con levaduras fermentativas capaces de degradar el ácido L-málico. Se puede utilizar *Schizosaccharomyces pombe*, que degrada completamente el L-málico y produce etanol mediante fermentación malo-alcohólica, o *Saccharomyces malidevorans*, capaz de degradar parcialmente el L-málico durante la elaboración del vino (US 4.830.968). El problema es que estas dos levaduras producen sabores desagradables y originan vinos de mala calidad. Por otro lado, se han obtenido levaduras transgénicas *Saccharomyces cerevisiae* capaces de realizar simultáneamente la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica o la malo-alcohólica (US 5.330.774), sin embargo su uso no está generalizado por las restricciones legales de cada país y por el rechazo de los consumidores y activistas al uso de microorganismos transgénicos en la industria alimentaria.

Teniendo todo esto en cuenta, sigue existiendo en el estado de la técnica la necesidad de conseguir un procedimiento para el uso industrial de estirpes de levaduras no-*Saccharomyces*, que fermenten mosto de uva y soporten vivas hasta 14° de alcohol, que no requieran una inoculación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae*, que sean capaces de originar la degradación de ácido málico y la producción de ácido láctico, y que sean adecuadas para elaborar, entre otros, vinos de carácter original y de excelente calidad organoléptica.

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere en un aspecto a una levadura del género *Torulaspota* (levadura de la invención), caracterizada porque secreta toxinas que matan todos los tipos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, degrada ácido L-málico, produce ácido L-láctico, contiene en su interior moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) vírico de entre 1 y 2 Kpb, y soporta viva y activa hasta 14<sup>o</sup> de alcohol.

En otro aspecto, se refiere al uso de la levadura de la invención para la elaboración de un producto fermentado.

Se refiere también en otro aspecto a un procedimiento para la elaboración de un producto fermentado que comprende la fermentación de la materia prima de partida con la levadura de la invención.

Por último, se refiere a un kit que comprende una o varias levaduras de la invención para la elaboración de un producto fermentado.

**Breve descripción de las figuras**

**Figura 1.-** Fenotipo asesino (*killer*) de las levaduras *Torulaspota* EX1180 y EX1257. El test se realizó frente a céspedes de estirpes de levaduras *S. cerevisiae killer-sensitive* (EX33) o *killer* K2 (EX73), K1 (F166), K28 (F182), y *Klus* (EX198). Las condiciones de ensayo (pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

**Figura 2.-** Cinética de fermentación de pasta de uva Cabernet-Sauvignon y frecuencia de las levaduras inoculadas *Torulaspota* y *S. cerevisiae* durante la vinificación. Claves: ■, *Torulaspota* (EX1257); ●, *Torulaspota* (EX1180); ◆, *S. cerevisiae* (E7AR1); (—), evolución de la densidad del mosto-vino; (----), evolución del porcentaje de células viables de la levadura inoculada durante la vinificación.

**Figura 3.-** Cinética de fermentación de pasta de uva Cabernet-Sauvignon y degradación de ácido L-málico. Clave: ■, *Torulaspota* (EX1257); ●, *Torulaspota* (EX1180); ◆, *S. cerevisiae* (E7AR1), (—), evolución de la densidad del mosto; (----), evolución del contenido (g/L) del ácido L-málico durante la vinificación.

**Figura 4.-** Cinética de fermentación de pasta de uva Cabernet-Sauvignon y producción de ácido L-láctico. Clave: ■, *Torulaspota* (EX1257); ●, *Torulaspota* (EX1180); ◆, *S. cerevisiae* (E7AR1), (—), evolución de la densidad del mosto; (----), evolución del contenido (g/L) del ácido L-láctico durante la vinificación.

**Figura 5.-** Presencia de genomas de dsRNA de virus L y M en las levaduras *Torulaspota* EX1180 y EX1257 y en levaduras de referencia *S. cerevisiae killer-sensitive* (EX33) y *killer* K1 (F166), K2 (EX73), K28 (F182), y *Klus* (EX198). **(A)** La extracción y purificación de ARN de doble cadena (dsARN) fue realizada como se describe en Fried, H.M. and G.R. Fink (*Electron microscopic heteroduplex analysis of killer double-stranded RNA species from yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978. 75: 4224-4228). Los ácidos nucleicos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 1-15 Kb Molecular Ruler de BioRad. **(B)** Las muestras sin digerir y tras su digestión con nucleasas: DNAsa I, o RNAsa A en presencia de baja y alta concentración de sal (NaCl), fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 500 pb Molecular Ruler de BioRad.

**Figura 6.-** Análisis de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs) mitocondrial con la endonucleasa *RsaI* de estirpes de levaduras *Torulaspota* y *S. cerevisiae*. Los perfiles de bandas de las levaduras *Torulaspota* son claramente diferenciables de los perfiles de las levaduras *S. cerevisiae*. Las levaduras *Torulaspota* carecen de las bandas de mayor peso molecular (entorno a los 10.000 bp), que sí están presentes en las levaduras *S. cerevisiae*.

**Figura 7.-** Análisis electroforético de los RFLPs de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS de las levaduras *Torulaspota* de la invención en comparación con una cepa de referencia de *Torulaspota delbrueckii*. Los productos de PCR de los espaciadores ITS se trataron con los enzimas de restricción *Hae III* y *Cfo I* antes de realizar la electroforesis en gel de 1% agarosa.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en un aspecto a una levadura del género *Toluraspora* (en adelante levadura de la invención), caracterizada porque secreta toxinas que matan todos los tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, degrada ácido L-málico, produce ácido L-láctico, contiene en su interior moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) vírico de entre 1 y 2 Kpb, y soporta viva y activa hasta 14<sup>o</sup> de alcohol.

La levadura de la invención tiene por tanto fenotipo *killer* (asesino) ya que secreta toxinas activas frente a todos los tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* conocidas, bien sean *killer* de cualquiera de los tipos conocidos, o bien sensibles a las toxinas *killer* de cualquiera de los tipos conocidos hasta ahora, K1, K2, K28 y/o *Klus* (Fig. 1).

En una realización particular la levadura de la invención es capaz de llevar a cabo la producción de más de 0,5 g/L de ácido L-láctico y la degradación de entre 1 y 1,8 g/L de ácido L-málico, por lo tanto en la fermentación inoculada con la levadura de la invención, la cantidad de ácido L-láctico aumenta más de 0,5 g/L y la cantidad de ácido L-málico disminuye entre 1 y 1,8 g/L, mientras que estas cantidades permanecen prácticamente invariables en fermentaciones control sin inocular o en fermentaciones inoculadas con levaduras vínicas *Saccharomyces*. La levadura de la invención, inoculada en mosto fresco domina la fermentación del mosto hasta densidad de 1,000-1,005 g/L, permaneciendo viva hasta concentraciones de alcohol en el entorno del 14% (Fig. 2). Además, la levadura de la invención es capaz de fermentar mosto con un contenido en azúcar inferior o igual a 14 <sup>o</sup>Bé hasta menos de 5 g/L de azúcar (Fig. 2). Asimismo, la levadura de la invención origina la degradación del ácido L-málico del mosto y la producción de ácido láctico (fermentación maloláctica) a lo largo de la fermentación alcohólica, y especialmente en las etapas finales a partir de densidad 1,005 g/L (Fig. 3 y Fig. 4). En el contexto de la presente invención un <sup>o</sup>Bé se refiere a 17 g de azúcar disueltos en 1 L de agua.

La levadura de la invención contiene en su interior moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) vírico L (tamaño grande) y M (tamaño mediano) que permiten diferenciar distintas levaduras *Torulaspota* entre sí, en particular contiene moléculas de dsRNA vírico de entre 1 y 2 Kpb (Fig. 5). Además, la levadura de la invención tiene un patrón de restricción del ADN mitocondrial (con el enzima *Rsa I*) sin las bandas de ADN de alto peso molecular características de las levaduras *S. cerevisiae* (Fig. 6), lo que permite monitorizar la levadura de la invención durante la fermentación y determinar su grado de participación respecto a las levaduras *S. cerevisiae*.

En cuanto a la taxonomía de las levaduras *Toluraspora* existe cierta controversia en el campo ya que una levadura *Toluraspora* puede ser clasificada como perteneciente a una especie u otra dependiendo del método de análisis que se utilice. Así, las levaduras de la invención pertenecen a la especie *T. pretoriensis* según sus características fisiológicas, determinadas

según Kurtzman 2011 (*Torulaspora* Lindner (1904). in *The Yeasts: A Taxonomic Study Fifth Edition* (ed. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, and T. Boekhout), pp. 867-874. Elsevier, London) (Tabla 1) y a *T. delbrueckii* según el análisis de los RFLPs de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS según Esteve-Zarzoso *et al.* (*Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology 1999, 49: 329-337) (Figura 7).

Tabla 1.- Identificación de la levadura de la invención en base a sus características fisiológicas determinadas según Kurtzman 2011.

Característica fisiológica	<i>T.delbrueckii</i>	<i>T.pretoriensis</i>	EX1257	EX1180
Crecimiento con galactosa	v	+	+	+
Crecimiento con maltosa	v	+	+	+
Crecimiento con melezitosa	v	v	v	v
Crecimiento con etanol	+	+/w	+	+
Crecimiento con 2-ceto-D-gluconato	+	+	+	+
Crecimiento en cicloheximida 0,01%	-	-	-	-
Crecimiento en 10%NaCl-5%glucosa	+	w/-	-	-

+, crecimiento; -, no crecimiento; v, crecimiento variable; w, crecimiento débil.

Así, en una realización particular, la levadura de la invención pertenece a la especie *T. delbrueckii* o *T. pretoriensis*. En otra realización particular, la levadura de la invención es aquella depositada según el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT13083. En otra realización particular, la levadura de la invención es aquella depositada en el la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT13082.

En una realización particular, la levadura de la invención es resistente a cicloheximida (CYH<sup>R</sup>), lo que permite monitorizar fácilmente dicha levadura durante la fermentación. La levadura puede hacerse resistente a cicloheximida por distintos métodos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo, tal y como se describe en Pérez *et al.* (*Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations*. Food Microbiol., 2000. 17: p. 119-128).

En una realización particular, la levadura de la invención está congelada o liofilizada. En otra realización particular, la levadura CECT13083 está congelada o liofilizada. En otra realización particular, la levadura CECT13082 está congelada o liofilizada.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una o varias levaduras de la invención según se ha definido anteriormente, para la elaboración de un producto fermentado. En el contexto de la presente invención, un producto fermentado se refiere a un producto obtenido a partir de la fermentación de una materia prima de partida. La materia prima de partida se refiere a la materia extraída de la naturaleza y que se transforma para elaborar materiales que más tarde se convertirán en bienes de consumo. El producto fermentado se selecciona del grupo formado por bebida alcohólica, masa de panadería (dulce o salada), y bollería. Dicha bebida alcohólica se selecciona del grupo formado por vino, cerveza y sidra. El vino puede ser vino blanco, tinto y rosado, ya sea dulce o seco, y vino espumoso (cava, champán, etc.). En el contexto de la presente invención, vino dulce se refiere a aquel vino que tiene un contenido de azúcar mayor o igual a 5 g/L y vino seco se refiere a aquel vino que tiene un contenido de azúcar inferior a 5 g/L.

Es ampliamente conocido por el experto en la materia la materia prima de partida a utilizar en cada caso. Así, por ejemplo, la materia prima para la elaboración de vino es la uva, para la elaboración de cerveza es la cebada, para la elaboración de sidra es la manzana, etc., así como los métodos para llevar a cabo su obtención y procesamiento (vendimiado, estrujamiento y

desoalillado, etc).

5 En una realización particular, la presente invención se refiere al uso de una o varias levaduras de la invención para la elaboración de una bebida alcohólica, seleccionada del grupo formado por vino (vino blanco, tinto, rosado, espumoso), cerveza y sidra. En otra realización particular, la levadura utilizada para la elaboración de dicha bebida alcohólica es la levadura de número de depósito CECT13083 y/o CECT13082.

10 La presente invención se refiere en otro aspecto a un procedimiento para la elaboración de un producto fermentado (en adelante procedimiento de la invención), caracterizado porque comprende la fermentación de una materia prima de partida con una o varias levaduras de la invención. En una realización particular, dicho procedimiento se lleva a cabo con la levadura CECT13083 y/o CECT13082. En una realización particular, dicho producto fermentado es una  
15 bebida alcohólica, en particular dicha bebida alcohólica se selecciona del grupo formado por vino, cerveza y sidra. El vino puede ser vino blanco, tinto y rosado, ya sea dulce o seco. En otra realización particular, dicho producto fermentado se selecciona del grupo formado por masa de panadería, dulce o salada, y bollería.

20 En una realización particular del procedimiento de la invención, el producto fermentado es una bebida alcohólica y la fermentación se lleva a cabo a una temperatura menor o igual a 22 °C. En otra realización particular, la bebida alcohólica producida es vino y la materia prima es pasta de uva o mosto. En otra realización particular, dicha pasta de uva o mosto tiene un contenido de levaduras fermentativas silvestres menor de 10<sup>6</sup> CFU/mL, se encuba a una temperatura no superior a 22°C, se mezcla con una o varias levaduras de la invención en una concentración de  
25 1x10<sup>7</sup> a 4x10<sup>7</sup> CFU/mL, y se fermenta a una temperatura menor o igual a 22 °C. En el contexto de la presente invención, las levaduras fermentativas silvestres se refieren a las levaduras de la flora natural de la materia prima de partida.

30 En el procedimiento de la invención, la fermentación se realiza a una temperatura menor o igual a 22°C para garantizar la supervivencia de las levaduras de la invención cuando la concentración de alcohol se incrementa hasta los 14°. Es ampliamente conocido por el experto en la materia que dependiendo del vino que se esté elaborando (blanco, tinto, rosado) se utiliza una temperatura de fermentación u otra, preferentemente siempre inferior o igual a 22°C. Por ejemplo, en el caso del vino blanco, normalmente se utiliza una temperatura de 15-18°C.

35 En una realización particular del procedimiento de la invención se produce vino blanco, tinto o rosado, ya sea seco o dulce. Para la elaboración de vino seco, la pasta de uva o el mosto se obtiene de uva vendimiada con menos de 14 °Bé. En otra realización particular, para la elaboración de vino dulce, la pasta de uva o el mosto se obtiene de uva vendimiada con un  
40 contenido en azúcar mayor o igual a 14 °Bé.

45 La presente invención se refiere en otro aspecto al producto fermentado producido siguiendo el procedimiento de la invención según se ha definido anteriormente. En una realización particular, dicho producto fermentado es una bebida alcohólica, en particular dicha bebida alcohólica se selecciona del grupo formado por vino, cerveza y sidra, donde el vino puede ser vino blanco, tinto y rosado, ya sea dulce o seco. En otra realización particular, dicho producto fermentado se selecciona del grupo formado por masa de panadería, dulce o salada, y bollería.

50 La presente invención se refiere en otro aspecto a un kit (kit de la invención) que comprende una o varias levaduras de la invención, para la elaboración de un producto fermentado. En una realización particular el kit de la invención comprende la levadura CECT13083. En otra realización particular, el kit de la invención comprende la levadura CECT13082. En otra realización particular, el kit de la invención comprende la levadura CECT13083 y la levadura CECT13082. En otra realización particular, el kit de la invención comprende la levadura

CECT13083 y/o CECT13082 liofilizada o congelada. En otra realización particular, el kit de la invención es para elaborar una bebida alcohólica seleccionada del grupo formado por vino, cerveza y sidra, donde el vino puede ser vino blanco, tinto y rosado, ya sea dulce o seco. En otra realización particular, el kit de la invención es para elaborar un producto fermentado seleccionado del grupo formado por masa de panadería, dulce o salada, y bollería.

## DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA

La levadura *Toluraspora* EX1180 ha sido depositada el 17 de julio de 2012, de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) ubicada en el Edificio 3 CUE, Parque Científico de la Universidad de Valencia, c/ Catedrático Agustín Escardino, 9. 46980-Paterna, Valencia, con el número de depósito CECT13082. Asimismo, la levadura *Toluraspora* EX1257 ha sido también depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), el 17 de julio de 2012, con el número de depósito CECT13083.

### Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

#### **Ejemplo 1: Elaboración de vino tinto seco**

Mediante técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia la uva tinta (Cabernet-Sauvignon, 22 °Brix, pH3,3) se vendimió con menos de 14 °Bé y en buenas condiciones sanitarias para que la pasta de uva estrujada y despalillada contuviese menos de  $10^6$  CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. La pasta de uva recién estrujada se encubó entre 18 y 22°C. Tras 1-2 horas, se añadieron las levaduras *Torulaspora* en una concentración de  $1 \times 10^7$  a  $4 \times 10^7$  CFU/mL, y se dejó fermentar asegurando una temperatura igual o menor a 22°C. Cada día se agitó suavemente o remontó la pasta en fermentación una o dos veces para asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras y preservar su viabilidad. Se realizó el descube (separación de pepitas y pieles de uva) a una densidad entre 1,005 y 1,000 g/L. Se continuó con el proceso en las mismas condiciones unos 10 días después de alcanzar la densidad 1,000 g/L para que las levaduras *Torulaspora* potencien la degradación de ácido L-málico ya en ausencia de alta concentración de glucosa y fructosa. Posteriormente se realizó el trasiego para clarificar el vino y corregirlo de sulfuroso y acidez para su almacenamiento y posterior comercialización.

En la Tabla 2 se muestran las características físico-químicas y el análisis organoléptico del vino obtenido. Las determinaciones de densidad, pH, acidez total, acidez volátil, azúcares residuales, grado alcohólico, ácido málico, etc. se realizaron según los métodos oficiales de la CE (CE, R., nº 761, *Modificación del Reglamento (CEE) nº 2676/90*. 1999. p. 10). El ácido láctico se determinó según método oficial de la CEE (CEE, R., Nº 2676, *Métodos de análisis comunitarios aplicables al sector del vino*. 1990. p. 191). Para cada fermentación se calculó el tiempo necesario para consumir el 15% del azúcar inicial del mosto (T15) y el tiempo necesario para consumir todos los azúcares (T100) (Ramírez, M., et al., *Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles*. Biotechnol. Bioeng., 1999. 65(2): p. 212-218). El análisis organoléptico del vino se realizó 10 y 40 días después del embotellado (Calidad organoléptica-1ª y -2ª respectivamente) por miembros del Comité de Cata de la D.O. Ribera del Guadiana, utilizando el procedimiento y la ficha de cata oficial del Consejo Regulador. La aceptación se calculó restándole a 100 la puntuación de las fichas de cata penalizadoras.

Tabla 2.- Vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon

	Parámetro	E7AR1	EX1257	EX1180
5	T15 (días)	0,904	1,667	1,381
	T100 (días)	7	8	8
	Grado alcohólico (% v/v)	13,5	13,3	13,3
	Azúcares residuales (g/L)	2,2	4,8	4,9
	Acidez total (g/L)	8,8	7,6	7,3
	Acidez volátil (g/L)	0,38	0,42	0,63
10	Densidad (g/mL)	0,9924	0,9943	0,994
	pH	3,32	3,37	3,41
	Acido málico (g/L)	1,48	0,48	0,15
	Acido láctico (g/L)	0,11	0,64	0,76
	Glucosa + Fructosa (g/L)	0,01	1,85	2,21
	Calidad organoléptica-1 <sup>a</sup>	70	75	87
15	Calidad organoléptica-2 <sup>a</sup>	65	80	87

**Ejemplo 2: Elaboración de vino blanco seco**

La uva se vendimió con menos de 14<sup>o</sup>Bé, y en buenas condiciones sanitarias para que el mosto contuviese menos de 10<sup>6</sup> CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. Posteriormente, la uva se despalilló, se estrujó y se prensó para obtener el mosto. El mosto se clarificó (desfangado, flotación, centrifugado, etc.) a menos de 12 °C (preferiblemente), y posteriormente se encubó a entre 16 y 18 °C. Tras 1-2 horas, se añadieron las levaduras *Torulaspora* en una concentración de 1x10<sup>7</sup> a 4x10<sup>7</sup> CFU/mL, y se dejó fermentar asegurando que la temperatura fuese menor a 18 °C para garantizar la supervivencia de las levaduras cuando la concentración de alcohol se incremente hasta los 14 °Bé. Cada día se agitó suavemente o remontó el mosto en fermentación una o dos veces para asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras y preservar su viabilidad. Se realizó el descube (separación de pepitas y pieles) a las 6-24 horas del inicio de fermentación. Se continuó con el proceso de fermentación en las mismas condiciones hasta una densidad de 1,000 g/L, y posteriormente se realizó el desfangado.

**Ejemplo 3: Elaboración de vino rosado seco**

La uva se vendimió con menos de 14<sup>o</sup>Bé, y en buenas condiciones sanitarias para que el mosto contuviese menos de 10<sup>6</sup> CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. Posteriormente, la uva se despalilla, se estruja y se encuba la pasta directamente. Tras 1-2 horas, se añadieron las levaduras *Torulaspora* en una concentración de 1x10<sup>7</sup> a 4 x 10<sup>7</sup> CFU/mL, y se dejó fermentar asegurando que la temperatura fuese menor a 18 °C para garantizar la supervivencia de las levaduras cuando la concentración de alcohol se incremente hasta los 14 °Bé. Cada día se agitó suavemente o remontó el mosto en fermentación una o dos veces para asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras y preservar su viabilidad. Se realizó el descube (separación de pepitas y pieles) a las 6-24 horas del inicio de fermentación. Se continuó con el proceso de fermentación en las mismas condiciones hasta una densidad de 0,992 g/L, y posteriormente se realizó el desfangado.

**Ejemplo 4: Elaboración de vino dulce (blanco o tinto)**

La uva se vendimió con más de 14 °Bé, y en buenas condiciones sanitarias para que el mosto contenga menos de 10<sup>6</sup> CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. La uva despalillada y estrujada (para vino tinto) o el mosto clarificado (para vino blanco) se encubó entre 15 y 22°C. No se añade activador de fermentación para que se pare la fermentación y quede el vino dulce. Tras 1-2 horas, se añadieron las levaduras *Torulaspora* en una concentración de 1x10<sup>7</sup> a 4x10<sup>7</sup> CFU/mL, y se dejó fermentar asegurando que la temperatura no sea mayor de 22 °C para vino

tinto y no sea mayor de 18 °C para vino blanco con el fin de garantizar la supervivencia de las levaduras cuando la concentración de alcohol se incrementa. Cada día se agitó suavemente o remontó el mosto en fermentación una o dos veces para asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras y preservar su viabilidad. Se paró la aireación cuando se alcanzó una densidad entre 1,005 y 1,010 g/mL, y se realizó el trasiego para eliminar levaduras y parar así la fermentación. Las levaduras *Saccharomyces* silvestres no suelen continuar la fermentación en estas condiciones, debido fundamentalmente al efecto de la toxina *killer* de las levaduras *Torulaspota* y a la carencia de nutrientes que son esenciales para que las levaduras *Saccharomyces* silvestres se desarrollen, ya que estos nutrientes esenciales han sido previamente utilizados por las levaduras *Torulaspota* inoculadas. La parada de fermentación se puede completar con procedimientos físicos (filtración y bajada de temperatura) y/o adición de productos químicos (sulfuroso).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Levadura del género *Torulaspora* que pertenece a la especie *T. delbrueckii* o *T. pretoriensis*, con capacidad para degradar ácido L-málico y producir ácido L-láctico caracterizada por los números de depósito CECT13083 y CECT13082.
- 10 2. Levadura según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la capacidad para secretar toxinas que matan a todos los tipos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y soportar viva y activa hasta 14° de alcohol.
- 15 3. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 congelada o liofilizada.
- 20 4. Uso de una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la elaboración de un producto fermentado.
- 25 5. Uso según la reivindicación 4 donde dicho producto fermentado es una bebida alcohólica.
- 30 6. Uso según la reivindicación anterior donde dicha bebida alcohólica se selecciona del grupo formado por vino, cerveza y sidra.
- 35 7. Uso según la reivindicación anterior donde dicho vino se selecciona del grupo formado por vino blanco, tinto y rosado, ya sea dulce o seco.
- 40 8. Uso según la reivindicación 4 donde dicho producto fermentado se selecciona del grupo formado por masa de panadería, dulce o salada, y bollería.
- 45 9. Procedimiento para la elaboración de un producto fermentado caracterizado porque comprende la fermentación de una materia prima de partida con una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la bebida alcohólica es vino y la materia prima es pasta de uva o mosto.
11. Procedimiento según la reivindicación anterior en el que la pasta de uva o mosto tiene un contenido de levaduras fermentativas silvestres menor de 10<sup>6</sup> CFU/mL, se encuba a una temperatura menor o igual a 22°C, se mezcla con una o varias levaduras según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una concentración de 1x10<sup>7</sup> a 4x10<sup>7</sup> CFU/mL, y se fermenta a una temperatura menor o igual a 22°C.
12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde el vino es vino seco y la pasta de uva o el mosto se obtiene de uva vendimiada con un contenido en azúcar menor de 14°Bé.
13. Procedimiento según la reivindicación 11 donde el vino es vino dulce y la pasta de uva o el mosto se obtiene de uva vendimiada con un contenido en azúcar mayor o igual a 14°Bé.
14. Producto fermentado obtenido siguiendo un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.
15. Kit que comprende una o varias levaduras según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la elaboración de un producto fermentado.
16. Kit según la reivindicación anterior donde la levadura es CECT13083 y/o CECT13082.

17. Kit según la reivindicación 15 ó 16 donde dicho producto fermentado es una bebida alcohólica seleccionada del grupo formado por vino, cerveza y sidra.

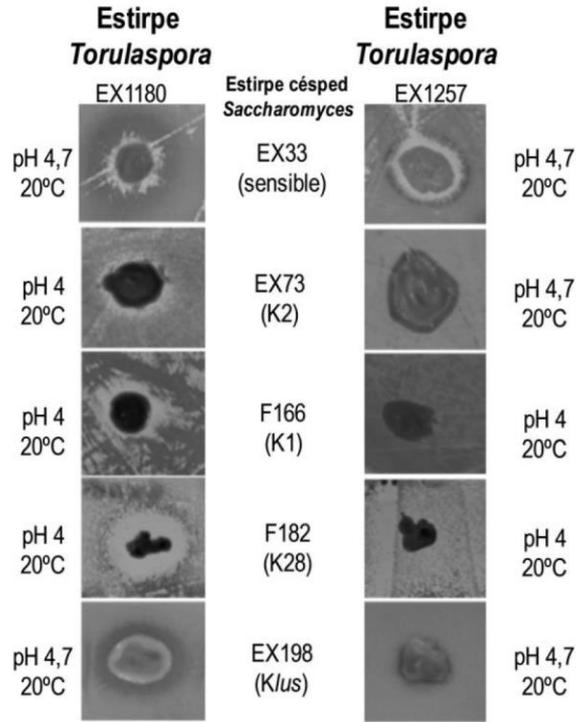


Fig. 1

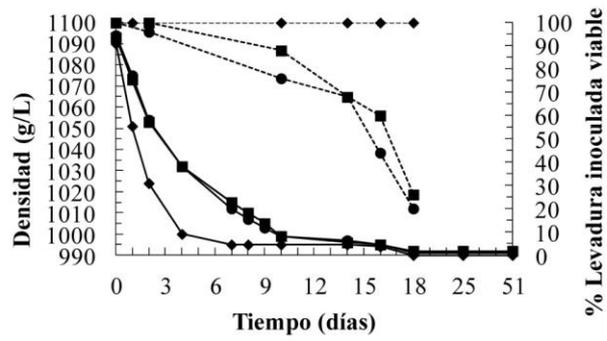


Fig. 2

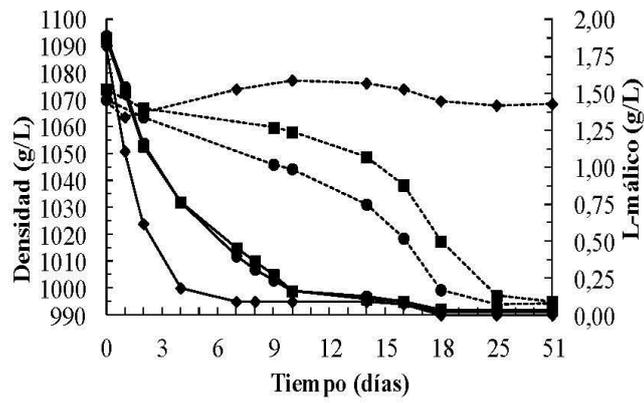


Fig. 3

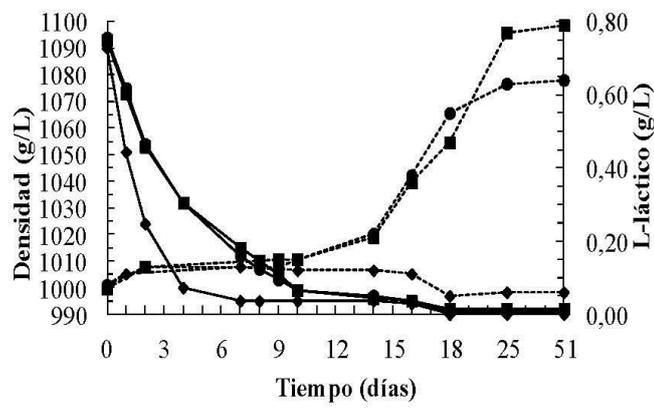


Fig. 4

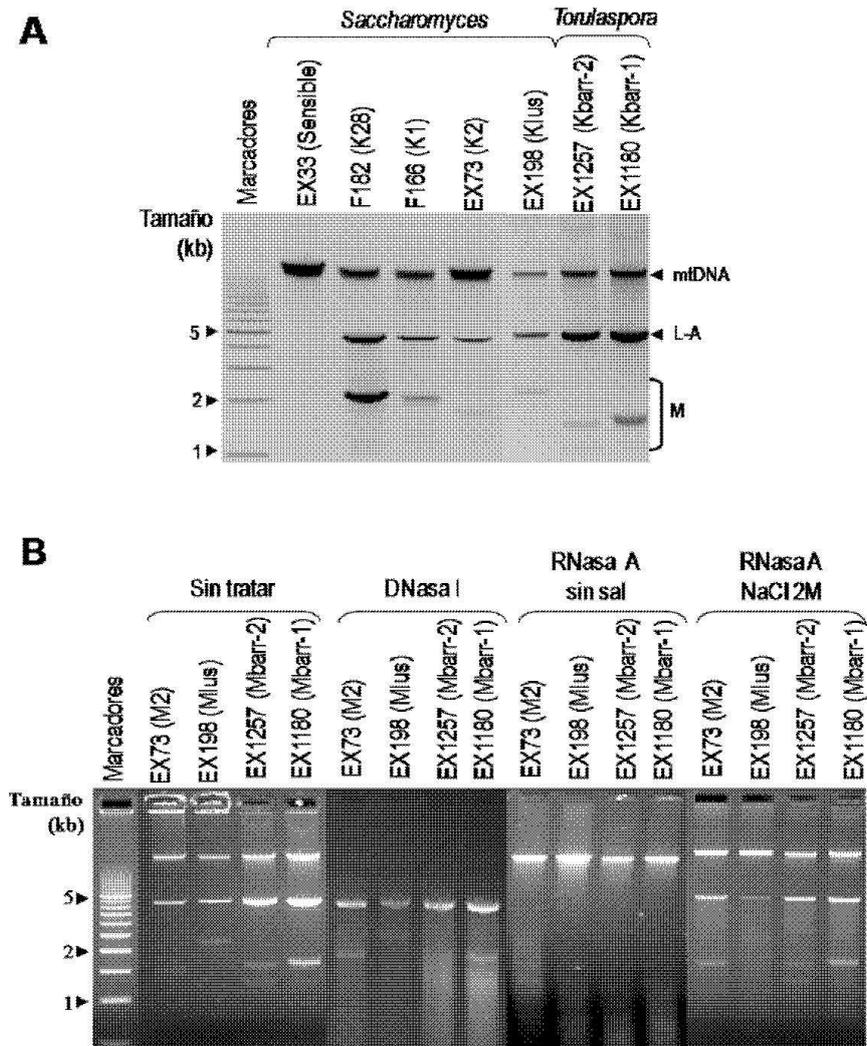


Fig. 5

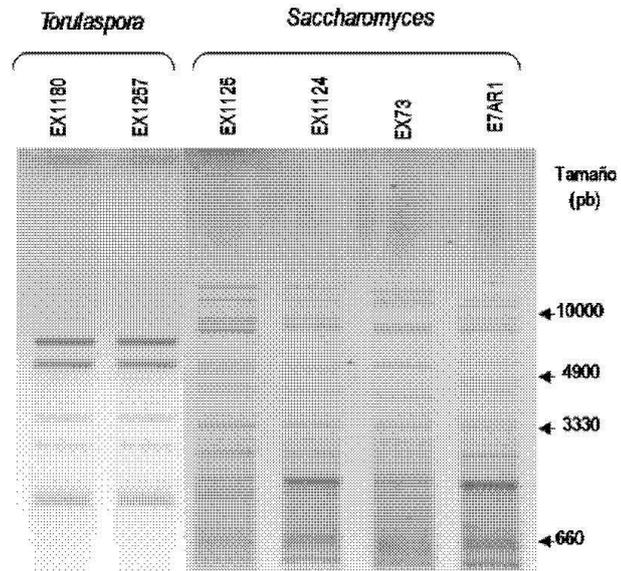


Fig. 6

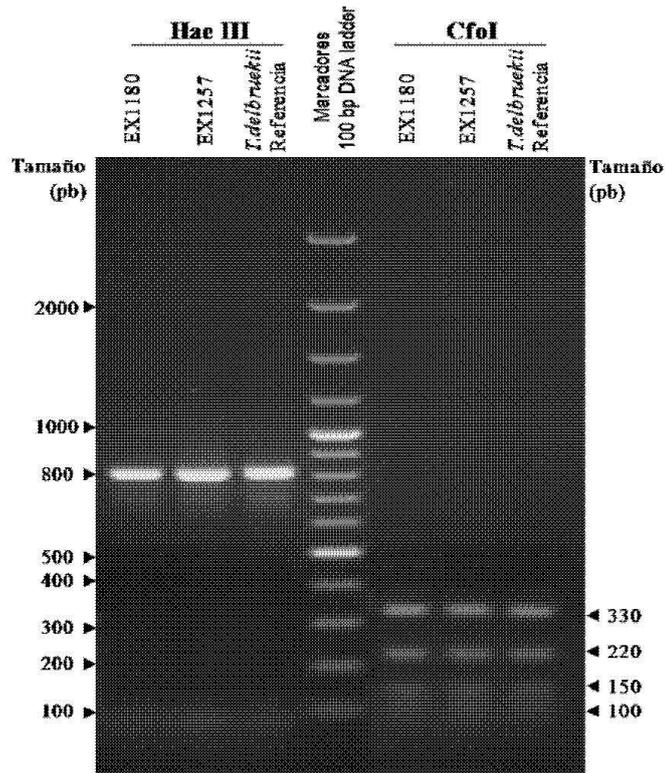


Fig. 7



- ②① N.º solicitud: 201330219  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.02.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03026431 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.) 03.04.2003, reivindicaciones.	1-17
A	EP 0268012 A1 (UNIVERSAL FOODS CORP) 25.05.1988, reivindicaciones.	1-17
A	US 4374859 A (KUNKEE RALPH E et al.) 22.02.1983, reivindicaciones.	1-17
A	RENAULT P et al. Genetic characterization and phenotypic variability in <i>Torulaspota delbrueckii</i> species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 20090915 Elsevier BV, NL 15.09.2009 VOL: 134 No: 3 Págs: 201-210 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008.	1-17
A	HERNANDEZ-LOPEZ et al. Characterization of a <i>Torulaspota delbrueckii</i> diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. International Journal of Food Microbiology, 20070329 Elsevier BV, NL 29.03.2007 VOL: 116 No: 1 Págs: 103-110 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.006.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
14.02.2014

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/16** (2006.01)  
**A21D8/04** (2006.01)  
**C12P1/02** (2006.01)  
C12R1/645 (2006.01)

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

C12N, A21D, C12P, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.02.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 03026431 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.)	03.04.2003
D02	EP 0268012 A1 (UNIVERSAL FOODS CORP)	25.05.1988
D03	US 4374859 A (KUNKEE RALPH E et al.)	22.02.1983
D04	RENAULT P et al. Genetic characterization and phenotypic variability in <i>Torulaspora delbrueckii</i> species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 20090915 Elsevier BV, NL 15.09.2009 VOL: 134 No: 3 Págs: 201-210 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008.	15.09.2009
D05	HERNANDEZ-LOPEZ et al. Characterization of a <i>Torulaspora delbrueckii</i> diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. International Journal of Food Microbiology, 20070329 Elsevier BV, NL 29.03.2007 VOL: 116 No: 1 Págs: 103-110 ISSN 0168-1605 Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.006.	29.03.2007

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

La presente solicitud divulga dos levaduras del género *Torulaspora* con los números de depósito CECT13083 y CECT13082. Estas levaduras tienen capacidad para degradar ácido L-málico y láctico y secretan toxinas que matan a todos los tipos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las reivindicaciones 1-3 caracterizan la levadura, las reivindicaciones 4-8 se refieren al uso de las mismas para la elaboración de una bebida alcohólica o una masa de panadería. Las reivindicaciones 9-14 se refieren a las condiciones para llevar a cabo las anteriores fermentaciones, y las reivindicaciones 15-17 se refieren a un Kit que contenga las levaduras objeto de la invención.

D01 divulga la utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces y en la producción de masas dulces congeladas. Estas cepas presentan un crecimiento rápido y alto rendimiento de biomasa en medios de melaza acoplado a una buena capacidad fermentativa en masas dulces y saladas, tanto frescas como congeladas. Además, la utilización de estas cepas tiene ventajas adicionales, ya que una sola cepa puede ser utilizada en diferentes tipos de formulaciones panarias, incluidas aquéllas que contienen sal.

D02 divulga una levadura congelada y una composición de masa que incorpora en la masa de la mezcla la levadura *Torulaspora delbrueckii* NRRL Y-18137 (Código 1931).

D03 divulga un método y un microorganismo para la producción de un producto de fermentación que contiene etanol. El microorganismo mutante es del género *Saccharomyces* o *Torulaspora*.

D04 divulga varias cepas de especies de levadura de *Torulaspora delbrueckii* que se evaluaron en el laboratorio por sus propiedades enológicas. En un paso preliminar, se comparó la capacidad de diferentes métodos moleculares de PCR para discriminar entre las cepas de *T. delbrueckii*. Las cepas de *T. delbrueckii* utilizadas presentan una amplia variabilidad fenotípica en el comportamiento de la fermentación.

D05 divulga la cepa de la construcción de una cepa diploide estable de *T. delbrueckii* PYCC5321, denominada TD21-2n. La nueva cepa fue más de 2,7 veces más grande que su contraparte haploides, mientras que la producción de biomasa, la resistencia a la tensión y masas dulces capacidad de fermentación se encontraron a ser similar en ambas cepas. Por otra parte, el poder de gasificación de la diploide después de la congelación masa también permaneció inalterado.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga las cepas, usos y procedimientos que integran la invención, ni se puede derivar de una manera obvia tomando los documentos solos o en combinación. Por tanto, las reivindicaciones 1-17 parecerían cumplir con los requisitos de novedad y actividad inventiva, tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la ley 11/1986.