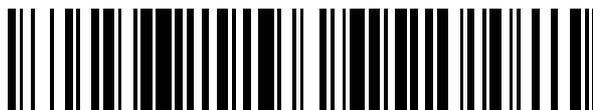


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 730**

51 Int. Cl.:

C12G 1/022 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10793135 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2501793**

54 Título: **Uso de al menos un microorganismo perteneciente al género Aureobasidium pullulans como agente de fermentación para frutos**

30 Prioridad:

20.11.2009 AT 18472009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.09.2014

73 Titular/es:

**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Industriestrasse 21
3130 Herzogenburg, AT**

72 Inventor/es:

**BINDER, EVA MARIA;
DANNER, HERBERT y
DONAT, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 498 730 T3

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

DESCRIPCIÓN

5 Uso de al menos un microorganismo perteneciente al género *Aureobasidium pullulans* como agente de fermentación para frutos

 La presente invención se refiere al uso de al menos un microorganismo perteneciente al género *Aureobasidium pullulans*.

10 Microorganismos del género *Aureobasidium pullulans* pertenecen a los hongos a modo de levadura que se presentan a menudo en suelos, tierra para plantas, partes de plantas, compost, aguas residuales, frutos, productos de frutos y en semillas, al igual que en diferentes materiales de construcción. Cepas individuales de *Aureobasidium pullulans* son, por una parte, temidos destructores de materiales, que son capaces de degradar celulosa en fibras vegetales de cualquier tipo e incluso pueden atacar a la madera y, por otra parte, sin embargo, otras cepas de *Aureobasidium pullulans* son importantes organismos en la biotecnología. Así, por ejemplo, cepas de *Aureobasidium pullulans* sirven como productores de pululano que encuentra uso como agente espesante y como aditivo a alimentos energéticos reducidos, al igual que como agentes deslizantes en la obtención de fibras artificiales.

20 También para la preparación o bien utilización en agentes fitoprotectores o fitotónicos para combatir enfermedades bacterianas y/o de tipo hongo de las plantas, en particular para combatir el fuego bacteriano, en los últimos tiempos se emplean cepas de *Aureobasidium pullulans* como agentes de pulverización (aerosoles) en un medio de carácter ácido. El uso de agentes de pulverización de este tipo, basados en estructuras fungoides susceptibles de reproducirse tienen la ventaja, frente a agentes de pulverización habituales, de que en los frutos o bien árboles frutales tratados con los mismos no pueden detectarse ya restos tóxicos del agente de pulverización. En particular, en el caso de utilizar agentes de pulverización basados en antibióticos resulta la problemática de la formación de resistencia, lo cual no ha de temerse en el caso de los agentes de pulverización fungoides y, por lo tanto, ofrece una ventaja esencial. Por consiguiente, en el caso de utilizar agentes de pulverización basados en *Aureobasidium pullulans* no se da un tiempo de consolidación del uso de los agentes de pulverización antes de la cosecha y, en particular, la formación de una resistencia frente a determinadas cepas de antibióticos.

30 Así, por ejemplo, el documento DIMAKOPOULOU M et al. "Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine producing vineyards in Greece", *BIOLOGICAL CONTROL*, Tomo 46, N.º. 2, 1 de agosto de 2008, se puede deducir una finalidad de empleo de este tipo.

35 Además de ello, en los últimos tiempos, adicionalmente a los agentes de pulverización adecuados para frutos de hueso contra el fuego bacteriano, que se basan en determinadas cepas de *Aureobasidium pullulans*, también se desarrollaron agentes de pulverización que actúan contra el moho gris en diferentes plantas útiles, pasando a emplearse asimismo cepas elegidas de *Aureobasidium pullulans*. En este caso, las plantas o bien los frutos tales como, por ejemplo, tomates, vino, pero también plantas ornamentales son pulverizados después de la floración y antes de la cosecha varias veces con un agente de pulverización que contiene *Aureobasidium pullulans*, con lo cual se ha de evitar o bien reducir el desarrollo del moho gris, en particular de la pudrición ácida, que posee efectos negativos sobre los frutos inmaduros. El uso de agentes de pulverización basados en *Aureobasidium pullulans* de este tipo, particularmente en el cultivo de frutales, tiene la ventaja de que las plantas, en particular los frutos, pueden ser pulverizados también todavía poco antes de la cosecha, dado que el tiempo de consolidación, que no existe en el caso de utilizar agentes de pulverización químicos, lo cual es particularmente ventajoso en veranos húmedos, dado que la humedad favorece el desarrollo del moho gris.

50 Sorprendentemente, se ha comprobado ahora que, junto al efecto de *Aureobasidium pullulans* frente al germen del fuego bacteriano y frente a enfermedades de las plantas provocadas por *Botrytis cinerea*, cepas especiales del género *Aureobasidium pullulans* actúan contra otros microorganismos presentes en plantas o bien superficies de los frutos, y en particular pueden evitar los efectos negativos sobre la calidad de bebidas alcohólicas preparadas a partir de los frutos, de modo que la presente invención se dirige al uso de al menos un microorganismo especial, perteneciente al género *Aureobasidium pullulans*, para la preparación de un coadyuvante de la fermentación para frutas.

55 Para resolver este problema se emplea, conforme al uso de acuerdo con la invención, al menos un microorganismo perteneciente al género *Aureobasidium pullulans*, elegido de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o *Aureobasidium pullulans* DSM 14941 como coadyuvante de la fermentación para frutos, a saber como agente

para acelerar la fermentación y/o agente para completar la fermentación de los frutos.

5 Para la producción de bebidas alcohólicas a partir de frutos mediante fermentación de zumos de frutas o bien mostos de frutas se recurre habitualmente a la denominada fermentación espontánea, en la cual se recurre a las levaduras presentes en los frutos para la fermentación de los azúcares contenidos en los zumos de frutas o bien mostos, conduciendo fermentaciones espontáneas de este tipo a menudo a fermentaciones defectuosas o bien fermentaciones incompletas, dado que las poblaciones de levaduras que se presentan de forma natural no son habitualmente lo suficientemente potentes como para transformar el azúcar por completo en alcohol. Además de ello, la carencia de sustancias nutricias utilizables por la levadura y partículas de turbidez en el zumo de frutas o bien mosto conducen, junto a la temperatura habitualmente desfavorable durante la fermentación, a un enorme estrés para las levaduras que puede asimismo resultar en una fermentación defectuosa o bien en una inhibición de la fermentación durante la fermentación espontánea.

15 Aun cuando se añaden levaduras de cultivo puro a la fermentación, puede detenerse la fermentación de los mostos de frutas o bien zumos de frutas y, en particular, una adición ulterior de levaduras de cultivo puro o sales nutricias de levaduras o bien el aumento de la temperatura de la fermentación tienen habitualmente efectos negativos sobre la calidad del producto de fermentación conseguido tal como, por ejemplo, del vino o mosto conseguido, de modo que debe intentarse alcanzar una fermentación lo más rápida y completa posible.

20 Mediante el uso de acuerdo con la invención de las cepas de *Aureobasidium pullulans* DSM 14941 y DSM 14940 como coadyuvantes de la fermentación para frutos se ha conseguido, sorprendentemente, no sólo acelerar en conjunto la fermentación, sino también posibilitar, en particular al recurrir a la fermentación espontánea con ayuda de las cepas de levaduras directamente presentes en los frutos, una fermentación a fondo completa sin fermentaciones defectuosas y sin una interrupción de la fermentación.

25 Particularmente, tal como corresponde a un perfeccionamiento de la presente invención, cuando se utilizan cepas de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o DSM 14941 para la preparación de un coadyuvante de la fermentación para uvas, se consigue, siguiendo la tendencia de los consumidores, obtener vinos de tono puro, frescos y afrutados y, en particular, también fermentar a fondo de manera segura y fiable, de manera completa y, en particular rápida, vinos Terroir que se consiguen mediante la fermentación espontánea de cepas de *Saccharomyces* presentes en las uvas, de modo que se pueden evitar con seguridad defectos en la fermentación.

30 Al aplicar el microorganismo, tal como corresponde a un perfeccionamiento de la invención, de manera que sea aplicado en forma de suspensión acuosa sobre los frutos, o sea incorporado directamente en un mosto de frutas, se consigue, inmediatamente antes de la fermentación, expulsar microorganismos perturbadores de la fermentación mediante la aplicación de una suspensión acuosa de al menos una de las cepas *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o DSM 14941 y, con ello, acelerar y, en particular, garantizar la fermentación del mosto de frutas o bien del zumo de fruta producido a partir del mosto, de manera que la fermentación discurra de forma completa y sin interrupciones. Sorprendentemente, mediante el uso de acuerdo con la invención pudo conseguirse también una clara mejora del comportamiento en la fermentación frente a las uvas que fueron tratadas con agentes habituales contra *Botrytis cinerea*.

35 Al tener lugar el uso de acuerdo con la invención de manera que la suspensión acuosa se aplica a las frutas al menos dos veces antes de la preparación de un mosto de frutas, puede conseguirse una mejora adicional del resultado de la fermentación y, en particular, una aceleración adicional de la fermentación de los frutos. La aplicación al menos por dos veces de la suspensión, la cual, apartándose de las suspensiones empleadas como agentes de inyección, no presenta un medio de carácter ácido, antes de la preparación de un mosto de frutas sobre los frutos, se ha manifestado como particularmente ventajoso el poder efectuar la aplicación en el caso de frutos susceptibles de ser almacenados, dos veces después de la cosecha de los frutos o, cuando se trata de frutos no susceptibles de almacenamiento o bien fácilmente perecederos, tales como, por ejemplo, uvas, eventualmente también poder aplicar antes de la cosecha ya una vez la suspensión acuosa sobre los frutos, con el fin de hacer inocuos con seguridad a los microorganismos nocivos para la fermentación. En particular, mediante un uso de este tipo de al menos una cepa de *Aureobasidium pullulans* se consigue influir positivamente sobre el comportamiento en la fermentación de zumos de frutas, en particular vino, pudiendo observarse, en particular en el caso de una fermentación espontánea, una fermentación a fondo rápida y completa.

50 Al realizar el uso de acuerdo con la invención de manera que el microorganismo esté contenido en la suspensión acuosa en una concentración de $5 \cdot 10^7$ UFC/l hasta $5 \cdot 10^{11}$ UFC/l, preferiblemente $1 \cdot 10^9$ hasta $1 \cdot 10^{10}$ UFC/l, se

consigue, junto a una aceleración de la fermentación, en particular de la fermentación espontánea, adicionalmente una eliminación completa de microorganismos perturbadores de la fermentación del mosto de frutas o de las superficies de los frutos a fermentar, de modo que puede excluirse con seguridad una fermentación defectuosa o bien una inhibición de la fermentación. Además de ello, en el caso de utilizar concentraciones empleadas de acuerdo con la invención del microorganismo *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o bien DSM 14941 en la suspensión se garantiza también que no ocurra perturbación alguna de la fermentación de los zumos de frutas ni que exista infección alguna del material de la cosecha por parte de gérmenes secundarios tales como, por ejemplo, *Penicillium*, *Aspergillus*, pudrición ácida, *Trichotherium*, *Cladosporium* o *Alternaria*.

Al utilizar el microorganismo, tal como corresponde a un perfeccionamiento de la presente invención, de manera que se presente inmovilizado sobre un soporte inerte, en particular una bentonita, zeolita o tierra de diatomeas, levaduras o paredes celulares de levaduras, leche en polvo, suero de leche en polvo, sulfato de potasio o carbonato de calcio, puede conseguirse una fermentación acelerada adicional y, en particular, al mismo tiempo una eliminación o bien separación de sustancias nocivas indeseadas. En particular, por ejemplo cuando el microorganismo se utiliza presente de forma inmovilizada sobre levaduras o paredes celulares de levaduras, mediante la elección preestablecida de las levaduras empleadas puede continuar acelerándose o bien continuar sustentándose la fermentación, de manera que, en particular, se puede alcanzar una fermentación rápida y completa y se puede impedir con seguridad un contenido en azúcar residual que perturba la bebida alcohólica preparada.

Al realizar el uso, tal como corresponde a un perfeccionamiento de la presente invención, de manera que se empleen los microorganismos *Aureobasidium pullulans* DMS 14940 y *Aureobasidium pullulans* DSM 14941 en una relación de 10 : 90 a 90 : 10, se recurre al efecto positivo de las dos cepas de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 diferentes entre sí durante la fermentación de frutos, en donde en función de los microorganismos perturbadores, contenidos en los frutos o bien en el mosto, la relación de las dos cepas de *Aureobasidium pullulans* se ajusta de manera arbitraria entre sí. Con el fin de evitar, en particular en el caso de la fermentación de frutos que son propensos al ataque por *Botrytis cinerea* tales como, por ejemplo, uvas, frambuesas, fresas y moras, las infecciones por parte de patógenos secundarios, se ha manifestado favorable, en el caso de este tipo de frutos, en virtud de su sensibilidad frente a la putrefacción y al ataque por *Botrytis*, realizar antes de la cosecha al menos una fumigación con una suspensión que contiene cepas de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941, disponiendo las cepas de *Aureobasidium pullulans* de tiempo suficiente como para competir con los patógenos nocivos por los alimentos y el espacio vital, de modo que ya en la recolección de las plantas el contenido en microorganismos perturbadores o bien nocivos está claramente reducido. En el caso de una fumigación ulterior inmediatamente después de la recolección o bien durante la inoculación del mosto con los microorganismos utilizados, se continúa reduciendo el contenido en sustancias nocivas, de modo que la posterior fermentación puede discurrir de forma completa y rápida, en particular la fermentación espontánea de los frutos.

Con el fin de alcanzar una fermentación completa y fiable, en particular en frutos que presentan en su superficie pocas levaduras encargadas de la fermentación tales como, por ejemplo, manzanas y peras, conforme a la presente invención el uso se realiza de manera que al coadyuvante de la fermentación se le añaden adicionalmente 5 a 95%, referido a la cantidad total de microorganismos, de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se presentan de forma natural.

La invención se explica con mayor detalle en lo que sigue con ayuda de ejemplos de realización representados en los dibujos, en los cuales:

La Fig. 1 muestra un diagrama de la fermentación de uvas de Welschriesling, en donde en un caso uvas tratadas contra *Botrytis cinerea* fueron sometidas a una fermentación espontánea normal, y en otro caso un mosto tratado con el uso de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y *Aureobasidium pullulans* 14941 en la relación 50 : 50 de las mismas uvas Welschriesling fue sometido a una fermentación espontánea,

la Fig. 2 muestra una fermentación espontánea lenta de uvas Chardonnay, representándose una comparación de un control no tratado con una carga que fue tratada con el uso de una mezcla de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 a DSM 14941 en la relación 70 : 30,

la Fig. 3 muestra una fermentación de uvas Pinot blanc bajo la adición de levaduras de cultivo puro, comparándose un control no tratado con una carga tratada utilizando *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 20 : 80, así como una carga pulverizada contra *Botrytis cinerea*,

la Fig. 4 muestra una fermentación espontánea lenta de un mosto a base de uvas Carbernet Sauvignon, mostrándose una comparación de una carga de mosto en la que las uvas fueron tratadas antes de la vendimia frente a *Botrytis cinerea*, con una carga que fue tratada bajo la adición de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y

Aureobasidium pullulans DSM 14941 en la relación de 55 : 45,

la Fig. 5 muestra una fermentación de mostos con contenido en uvas Merlot bajo la adición de una levadura de cultivo puro, tratando una carga tratada frente a Botrytis cinerea con una carga que fue tratada con el uso de Aureobasidium pullulans DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 10 : 90, y

5 la Fig. 6 muestra una fermentación espontánea de un mosto con contenido en uvas Blauburger añadiendo una carga tratada frente a Botrytis cinerea con una carga a la que se añadió Aureobasidium pullulans DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 50 : 50.

Además de ello, se llevó a cabo un ensayo comparativo en el caso de la fermentación de zumo de manzana, pasando a emplearse en un caso un mosto de manzana no tratado y, en otro caso, empleándose un zumo de manzana en el que las manzanas fueron tratadas inmediatamente después de la recolección con una suspensión con contenido en Aureobasidium pullulans DSM 14940.

En la Fig. 1 se recoge en abscisas el número de las etapas de fermentación y en ordenadas se representa la disminución en el peso del mosto durante la fermentación en °Oe (grados Öchsle). En el caso del diagrama de la Fig. 1 se puede reconocer que en el caso de emplear uvas que habían sido tratadas contra Botrytis cinerea, la fermentación tiene lugar lentamente, a pesar de la adición de levadura de cultivo puro y tampoco había todavía transcurrido por completo en el 13° día de fermentación, de manera que, en particular en el caso de un vino que resulta de una fermentación de este tipo, se ha de esperar un dulzor que le cubre como defectuoso, lo cual es considerado como desventajoso o bien es reconocido como defecto por los consumidores, en particular en el caso de un vino blanco fresco, afrutado y joven, como el que habitualmente lo constituye el Welschriesling.

Frente a ello, en el caso de emplear uvas que fueron tratadas utilizando Aureobasidium pullulans DSM 14940 y Aureobasidium pullulans DSM 14941 en la relación de 50 : 50, a saber, en particular una vez mediante la pulverización durante dos veces con una suspensión esencialmente neutra de las cepas de Aureobasidium pullulans DSM 14941 y DSM 1440 algunos días o bien inmediatamente antes de la vendimia, así como después de la preparación de un mosto sin la adición al mosto de una levadura de cultivo puro, se podía observar una disminución significativamente más rápida del peso del mosto y, además de ello, ya después del 11° día se había completado la fermentación, de manera que un Welschriesling obtenido con un proceso de fermentación de este tipo no presenta ni un dulzor residual que cubra los defectos ni tampoco ha fermentado de manera incompleta.

En la Fig. 2 se representa una fermentación espontánea lenta de uvas Chardonnay a 14°C, mostrándose la comparación de un control no tratado con una carga en la que se empleó Aureobasidium pullulans DSM 14940 y DSM 14941 en una relación de 70 : 30, a saber mediante la adición al zumo a fermentar.

A partir de este diagrama se puede deducir inequívocamente que, en particular en el caso de una fermentación espontánea del control no tratado, por una parte la fermentación sólo se ha puesto en marcha lentamente y, en particular, en el espacio entre el 9° y 13^{er} día se había inhibido por completo, con lo cual era de temer la formación de defectos del vino, en particular productos secundarios de la fermentación indeseados. El día 13, esta fermentación paralizada se puso de nuevo en marcha en el caso de la adición de levadura y sales nutricias y discurrió entonces rápidamente hasta una fermentación a fondo lenta y completa del mosto de uva.

En el caso de las uvas Chardonnay tratadas con Aureobasidium pullulans se manifestó asimismo un aplanamiento de la curva de fermentación en el espacio de tiempo entre el 7° y 11° día, habiendo transcurrido automáticamente la fermentación, sin embargo, sin inoculación ulterior de levaduras de cultivo puro o bien sin la adición de sales nutricias, y a partir del día 14 discurre aproximadamente igual que la fermentación del control no tratado. A partir de este resultado se puede reconocer que, en particular en el caso de la fermentación espontánea, la adición de Aureobasidium pullulans DSM 14941 o bien DSM 14940 asegura que la fermentación espontánea continúe desarrollándose de manera fiable y no se paralice ni se manifieste inhibición de la fermentación alguna.

En la Fig. 3 se representa una rápida fermentación de uvas Pinot blanc bajo la adición de una levadura de cultivo puro, en donde se puede reconocer que un control no tratado, al igual que una carga tratada contra Botrytis cinerea de las uvas Pinot blanc fermentan aproximadamente con la misma velocidad. En el espacio de tiempo entre el 5° y el 9° día tiene lugar una fermentación relativamente rápida, la curva de fermentación se aplanan entre el 9° y 12° día y, a continuación, a partir del 12° día continúa discurriendo solo muy lentamente hasta una fermentación completa a partir del 22° día.

Frente a ello, las uvas Pinot blanc, que fueron tratadas con las cepas de Aureobasidium pullulans en una relación

20 : 80 de DSM 14940 y DSM 14941, fermentan en los primeros 5 días aproximadamente en el mismo tiempo con los otros dos grupos de uvas. A partir del día 5 se puede observar una intensa caída de la curva de fermentación hasta el 9º día, lo cual corresponde a una fermentación a fondo rápida del mosto de uva, tras lo cual tiene lugar un aplanamiento intenso de la curva de fermentación hasta el 13^{er}, y a partir del 13^{er} día se consideran fermentadas a fondo por completo las uvas.

A partir de esta comparación resulta de manera inequívoca que las uvas Pinot blanc, tratadas con la adición de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o bien DSM 14941, fermentan a fondo de una manera claramente más rápida, de forma que, en particular, es de esperar un vino blanco más fino y seco que no presente defectos de fermentación de ningún tipo.

En la Fig. 4 se representa una fermentación espontánea lenta de un mosto con contenido en uvas Carbernet Sauvignon, en donde la fermentación en los 10 primeros días tuvo lugar directamente en el mosto y, a continuación, fermentó definitivamente el mosto rojo prensado. A partir del diagrama se puede observar inequívocamente que en el caso de la fermentación espontánea de la carga de mosto que contenía las uvas Carbernet Sauvignon, que fueron tratadas contra *Botrytis cinerea*, la fermentación espontánea se ha puesto en marcha aproximadamente el 6º día y luego ha discurrido de forma relativamente rápida hasta el 13^{er} día, tras lo cual ya sólo ha tenido lugar una lenta fermentación residual.

En aquel mosto que contenía uvas Carbernet Sauvignon, para la cual las uvas Carbernet Sauvignon fueron tratadas directamente antes de la vendimia con *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 55 : 45, se demostró que, que ya al 3^{er} día se había iniciado la fermentación espontánea, que en los días 4 a 10 había transcurrido de forma muy rápida y, a continuación, discurre ya sólo muy lentamente hasta una fermentación definitiva. La fermentación no se interrumpía en este caso por parte del prensado del mosto rojo ni en la carga tratada contra *Botrytis* ni en la carga tratada con *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 55 : 45.

En conjunto se puede reconocer, sin embargo, que la fermentación espontánea del mosto que contenía las uvas tratadas con *Aureobasidium pullulans*, se ha iniciado rápidamente y continúa sin detención alguna hasta una fermentación a fondo completa del mosto o bien del mosto rojo prensado.

En la Fig. 5 se representa la fermentación rápida de un mosto que contiene uvas Merlot, llevándose a cabo la fermentación total directamente en el mosto y efectuándose el prensado sólo después de finalizar la fermentación del mosto. La fermentación de las dos cargas de maceración tuvo lugar bajo la adición de una levadura de cultivo puro, pudiendo reconocerse que la carga tratada contra *Botrytis cinerea* comienza a fermentar el día 3, y la fermentación discurre rápidamente hasta el día 7, tras el cual se aplaná intensamente la curva de fermentación entre el 7º y 12º día.

Frente a ello, el mosto de las uvas Merlot que contenían uvas que habían sido tratadas, antes de su vendimia con las cepas *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 10 : 90, fermenta algo más rápidamente, en particular la fermentación se inicia ya al 2º día, discurre muy rápidamente entre el 3^{er} y 5º días, tras lo cual la curva de fermentación se aplaná lentamente entre el 5º y el 7º día, para coincidir después aproximadamente con la curva de fermentación de la carga tratada contra *Botrytis*. A partir de aproximadamente el 11º día, puede considerarse al mosto como fermentado a fondo por completo.

A partir de esta comparación resulta que la fermentación del mosto de las uvas Merlot, que fueron tratadas con *Aureobasidium pullulans* antes de la vendimia, se inicia de forma claramente más rápida y, en particular, fermenta a fondo de forma claramente más rápida, de modo que se ha de esperar un vino tinto que no presente defectos de fermentación de ningún tipo.

En la Fig. 6 se representa la fermentación espontánea de mostos con contenido en uvas Blauburger, en donde en el caso de una carga las uvas fueron tratadas antes de la vendimia con un agente habitual contra *Botrytis cinerea*, y en el caso de una segunda carga las uvas fueron tratadas antes de la vendimia con *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 50 : 50.

A partir de la comparación de las dos curvas resulta que la fermentación espontánea del mosto, en la que pasan a emplearse las uvas tratadas contra *Botrytis cinerea*, no se iniciaba hasta el 6º día, tras lo cual el mosto se calentó hasta aproximadamente 45 °C, con el fin de desprender, por una parte, los colorantes de las uvas negras y, por

otra parte, para poner en funcionamiento la fermentación. Después del calentamiento del mosto y después del pisado de las uvas, se ha puesto en funcionamiento espontáneamente la fermentación y el zumo de uva ha fermentado a fondo por completo hasta el 12º día.

5 La segunda carga de maceración que contiene aquellas uvas Blauburger que fueron tratadas antes de la vendimia con *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación 50 : 50 muestra que la fermentación espontánea se ha puesto automáticamente en funcionamiento el 3^{er} día, ha discurrido muy rápidamente hasta el 7º días, tras lo cual la curva de fermentación se ha aplanado y el día 12 coincide con aquella carga cuyas uvas fueron tratadas de una manera habitual contra *Botrytis cinerea*.

10 A partir de las curvas de fermentación se puede reconocer que, en virtud de la inhibición de la fermentación del mosto de las uvas que habían sido tratadas de manera habitual contra *Botrytis cinerea*, se podría contar con defectos en la fermentación en el caso del vino formado y, además de ello, la fermentación espontánea se podía poner en funcionamiento sólo mediante un calentamiento de la maceración, con lo cual se ha de temer una
15 disminución adicional de la calidad del vino tinto obtenido. Frente a ello, la fermentación espontánea del mosto con contenido en uvas Blauburger, en la cual las uvas fueron tratadas antes de la vendimia con *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y DSM 14941 en la relación de 50 : 50 ha discurrido de manera uniforme y rápida sin ninguna parada, de manera que se ha de esperar un vino tinto fino que, en particular, no presente defectos de la
20 fermentación de ningún tipo.

20 Ensayo comparativo

Fermentación de zumo de manzanas para mosto

25 Un mosto de manzana no tratado fue mezclado con levaduras de cultivo noble con el fin de fabricar una sidra o bien un mosto de manzana en el que la fermentación haya transcurrido por completo en el espacio de 6 días y se alcanzó una sidra con un contenido en alcohol de aproximadamente 7%. Para el almacenamiento ulterior del producto, la levadura tuvo que retirarse rápidamente, con el fin de eliminar el riesgo de defectos en el vino
30 condicionados por microbios y, en particular, el desarrollo de microorganismos indeseados en virtud del bajo contenido en alcohol de la sidra.

Una segunda carga de manzanas para mosto fue tratada una vez antes de la recolección con una suspensión de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y una vez al mosto de frutas se añadió otra carga de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940. La fermentación ulterior tuvo lugar análogamente a la primera carga de manzanas para
35 mosto, y la velocidad de fermentación era ligeramente mayor que en el primer grupo.

Sorprendentemente, se ha demostrado, sin embargo, que la sidra producida era significativamente más estable frente a la sidra comparativa, y que se había reducido claramente su propensión a defectos en la sidra
40 condicionados por microbios y al desarrollo de microorganismos indeseados que pueden conducir a que se eche a perder la sidra y, en particular, tampoco la levadura hubo de retirarse de una forma tan rápida.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos un microorganismo perteneciente al género *Aureobasidium pullulans*, elegido de *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 o *Aureobasidium pullulans* DSM 14941 como coadyuvante de la fermentación para frutas, a saber como agente para acelerar la fermentación y/o agente para completar la fermentación de frutas.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que las frutas son uvas.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que el microorganismo se aplica en forma de suspensión acuosa a las frutas, o se incorpora directamente en un mosto de frutas.
4. Uso según la reivindicación 3, caracterizado por que la suspensión acuosa se aplica a las frutas al menos dos veces antes de la preparación de un mosto de frutas.
- 15 5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el microorganismo en la suspensión acuosa está contenido en la suspensión acuosa en una concentración de $5 \cdot 10^7$ UFC/l hasta $5 \cdot 10^{11}$ UFC/l, preferiblemente $1 \cdot 10^9$ hasta $1 \cdot 10^{10}$ UFC/l.
- 20 6. Uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que el microorganismo se presenta inmovilizado sobre un soporte inerte, en particular una bentonita, zeolita o tierra de diatomeas, levaduras o bien paredes celulares de levaduras, leche en polvo, suero de leche en polvo, sulfato de potasio o carbonato de calcio.
- 25 7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que los microorganismos *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 y *Aureobasidium pullulans* DSM 14941 se emplean en una relación de 10 : 90 a 90 : 10.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que realiza de manera que al coadyuvante de la fermentación se le añaden adicionalmente 5 a 95%, referido a la cantidad total de microorganismos, de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se presentan de forma natural.
- 30

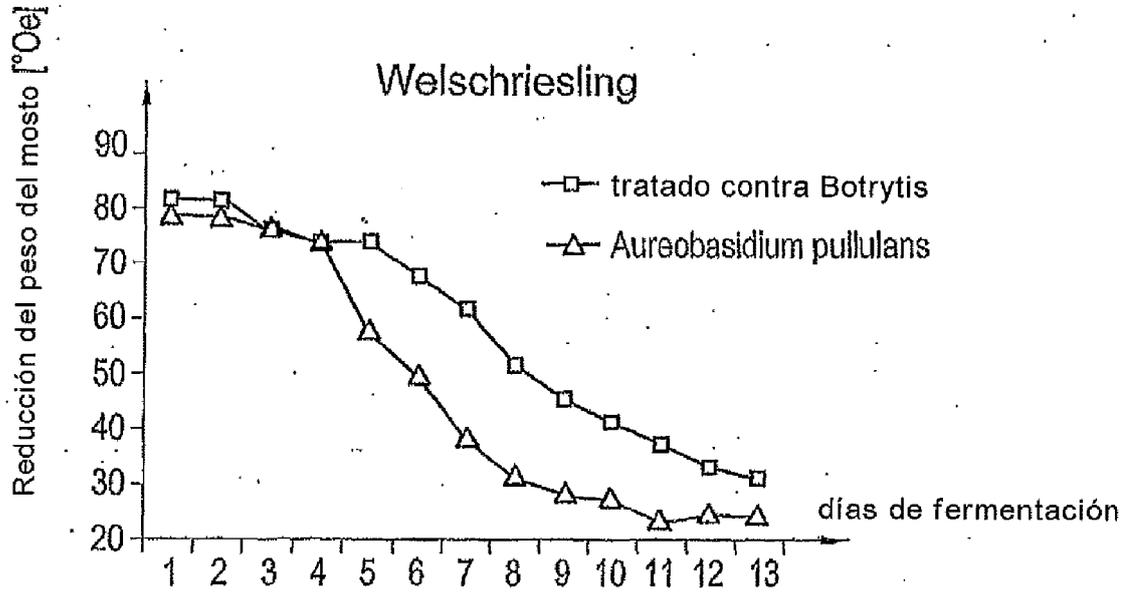


Fig. 1

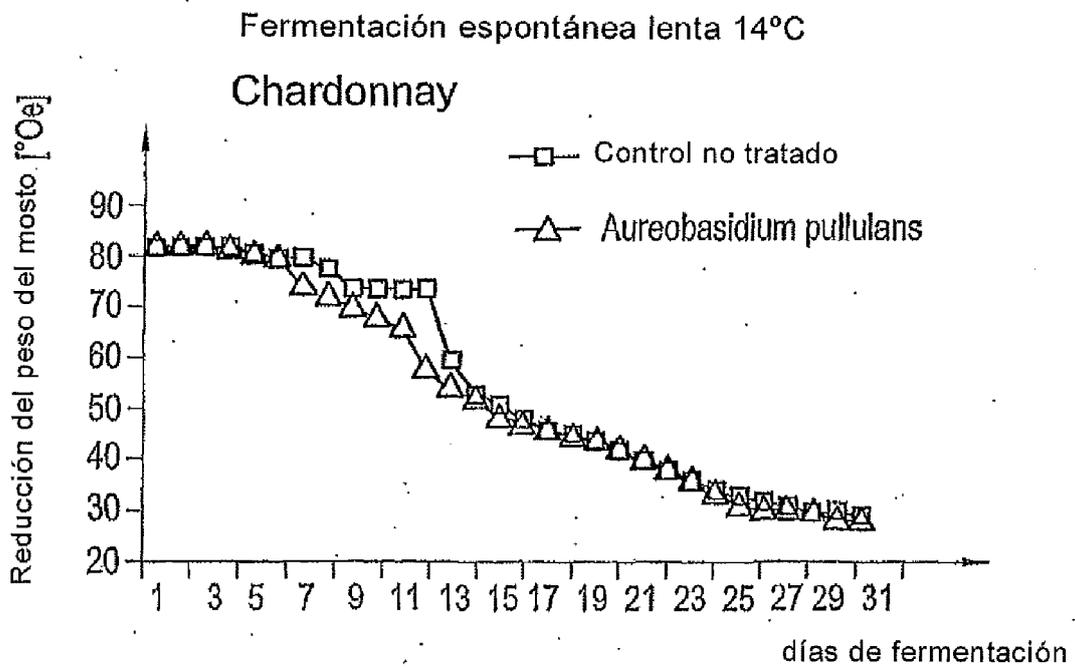


Fig. 2

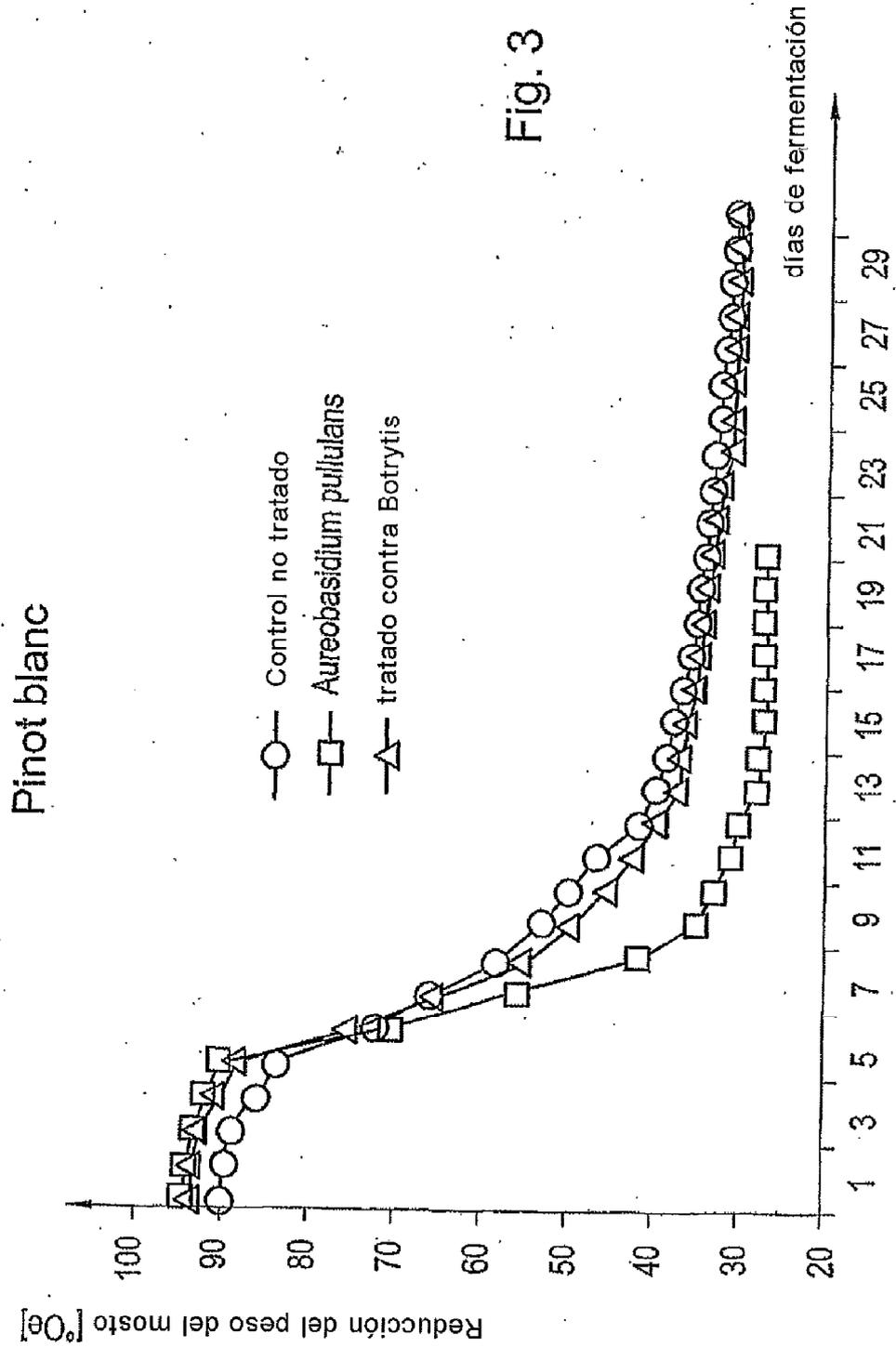


Fig. 3

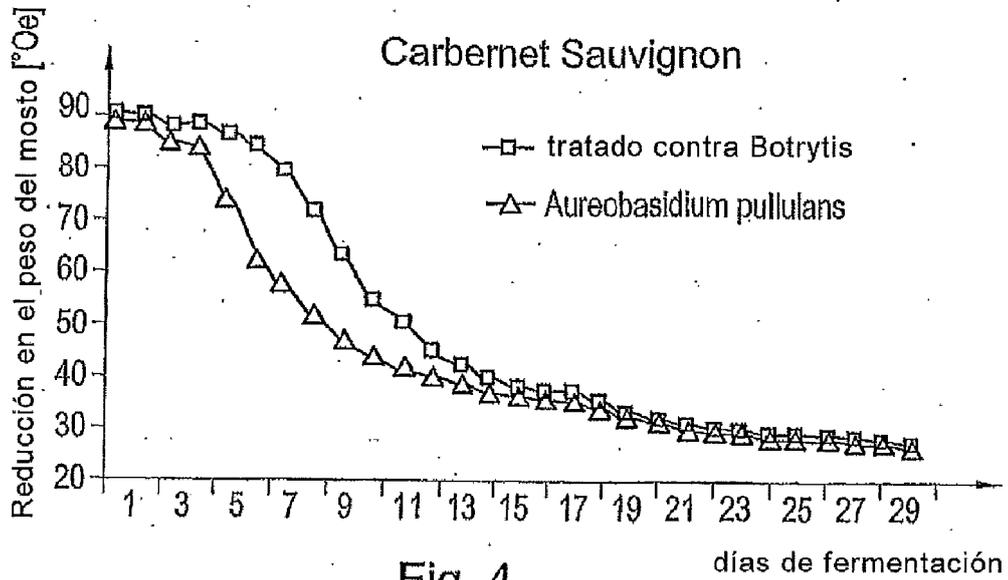


Fig. 4

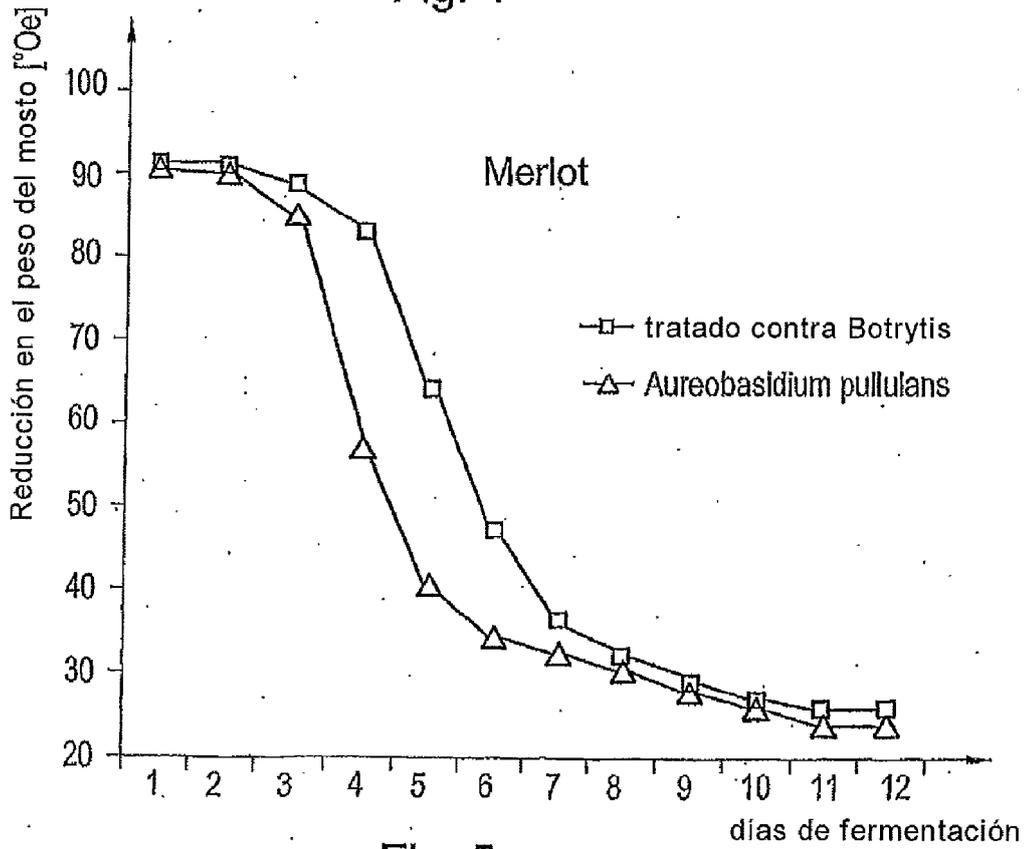


Fig. 5

Blauburger

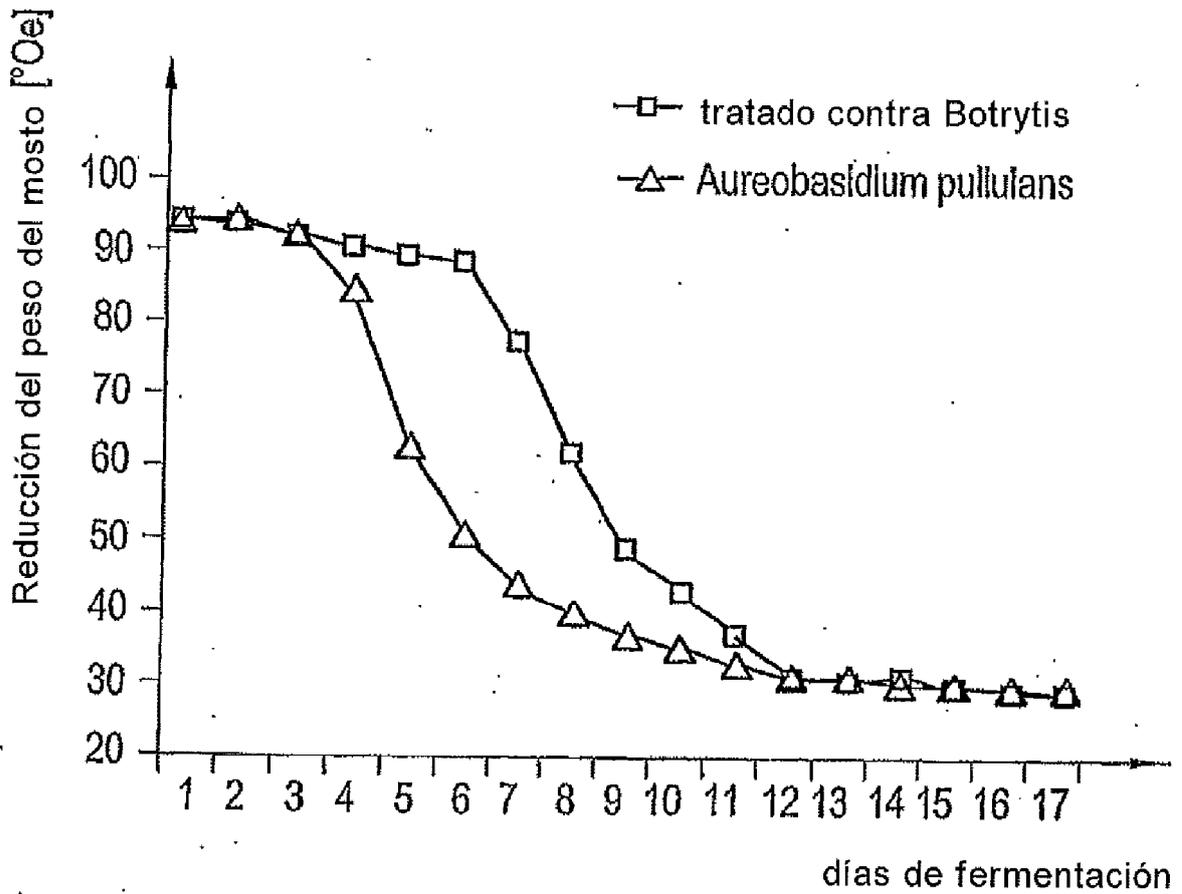


Fig. 6