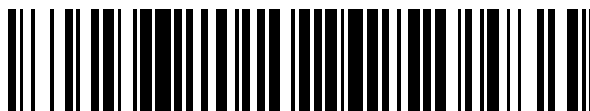


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 234**

51 Int. Cl.:

C12G 1/00 (2006.01)

A23L 1/236 (2006.01)

A23L 2/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 05818972 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1850682**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de una bebida para aumentar su dulzor y compuesto destinado a ser añadido a una bebida para aumentar su dulzor**

30 Prioridad:

29.11.2004 FR 0452803

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

26.11.2015

73 Titular/es:

**BIOLAFFORT (100.0%)
126 Quai De La Souys
33100 Bordeaux, FR**

72 Inventor/es:

MOINE, VIRGINIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 552 234 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

Procedimiento de tratamiento de una bebida para aumentar su dulzor y compuesto destinado a ser añadido a una bebida para aumentar su dulzor

5 La invención tiene por objeto un procedimiento de tratamiento de una bebida, destinada al consumo por un ser humano o animal, con el fin de aumentar el dulzor de dicha bebida. El procedimiento puede ser utilizado para el tratamiento de bebidas alcohólicas así como para el tratamiento de bebidas no alcohólicas. El procedimiento de la invención puede aplicarse principalmente al tratamiento de vino. La invención tiene igualmente por objeto un compuesto edulcorante destinado a ser utilizado para el tratamiento de una bebida con el fin de aumentar su dulzor.

10 Se conocen agentes de sapidez de diferentes orígenes químicos y biológicos utilizados corrientemente en la industria agroalimentaria, principalmente para conferir características organolépticas a bebidas y alimentos. Por ejemplo, el aspartamo es un agente edulcorante de origen peptídico utilizado en la industria agroalimentaria. Proteínas tales como la taumatina pueden poseer igualmente dichas propiedades edulcorantes (Gibbs et al., 1996).

15 Ciertos péptidos probablemente procedentes de levadura (Desportes et al., 2001) y que se encuentran en los vinos base de Champagne se citan igualmente como poseedores de propiedades organolépticas, tales como la amargura, acidez y *umami* (sabor a caldo de carne).

Sin embargo, estos péptidos se deben añadir en grandes dosis en las bebidas para ser detectados a nivel sensorial. Por grandes dosis de péptido, se entiende al menos igual a 5 g/L.

En el ámbito normativo de las prácticas enológicas, se admiten ciertos tratamientos con el fin de mejorar las propiedades organolépticas de los vinos, y entre ellos, la conservación sobre posos.

20 Durante la conservación sobre posos, se producen en el vino una multitud de fenómenos bioquímicos y fisicoquímicos, que tienden a modificar las propiedades organolépticas.

25 La conservación de los vinos blancos sobre posos es una técnica muy antigua utilizada durante la crianza en barricas de grandes vinos blancos, principalmente los de Borgoña. Este método de crianza se practica actualmente en todo el mundo. Los fenómenos bioquímicos y fisicoquímicos asociados a esta práctica resultan de las interacciones entre el vino, las levaduras y eventualmente la madera, y conducen a la mejora de las cualidades organolépticas y a la estabilidad fisicoquímica de los vinos blancos, así conservados.

30 Por ejemplo, los posos modifican el aroma amaderado de los vinos blancos. En particular, el aroma a vainilla es menos intenso en los vinos fermentados y conservados en barricas que cuando son puestos en barriles después de su fermentación alcohólica y/o conservados trasvasados. Este fenómeno es debido a la reducción de la vainillina por las levaduras contenidas en los posos (Chatonnet et al., 1992). Por otra parte, la fermentación y conservación en barricas pueden aumentar igualmente los aromas tostados, por la producción de furanmetanotiol por los posos a partir del furfural de las maderas calentadas (Tominaga et al., 2000).

35 La conservación sobre posos enriquece también los vinos en polisacáridos de origen parietal, particularmente manoproteínas (Llaubères et al., 1987). El resultado es una mejora espontánea de la estabilidad proteica (Ledoux et al., 1992) y tartárica de los vinos (Moine-Ledoux et al., 1997). Por otra parte, los polisacáridos liberados durante la conservación sobre posos se pueden combinar con los compuestos fenólicos del vino y los elagitaninos procedentes de la barrica (Chatonnet et al., 1992). Esta unión natural realizada durante el *batoneo* de los posos contribuye no solo a limitar la evolución del color de los vinos blancos, sino también a la amargura de los taninos de la madera y preservar a los vinos del enrojecimiento oxidante.

40 Además, gracias a su poder reductor, los posos desempeñan un papel fundamental en los fenómenos de oxidorreducción. Su aptitud para consumir el oxígeno disuelto ha sido demostrada recientemente por Fornairon et al., 1999. En barricas su presencia es absolutamente necesaria para proteger de la oxidación ciertos aromas afrutados.

45 Al mismo tiempo, los posos previenen el desarrollo de aromas oxidantes característicos de un envejecimiento aromático defectuoso (Lavigne-Cruège et al., 1999). El mantenimiento de un vino sobre los posos puede conducir a la aparición de olores azufrados desagradables, que requieren un trasiago rápido. En efecto, siempre que la actividad de la sulfitorreductasa permanezca en las levaduras, los vinos blancos secos vinificados en cubas de gran capacidad no pueden conservarse sobre posos, sin el riesgo de desarrollar defectos de reducción. Pero si los posos se separan temporalmente del vino y se conservan en barricas, podrán ser reincorporados a continuación cuando hayan perdido su actividad reductora. Además, su adición en este estado provoca una disminución muy significativa del contenido de ciertos tioles volátiles, tales como metanotiol o etanotiol. Los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína constitutivos de las manoproteínas (localizadas en la capa exterior de la pared de la levadura) y los grupos SH de los tioles, permiten la fijación de los tioles por las levaduras (Lavigne et Dubourdiou, 1996).

55 Las múltiples consecuencias positivas de la crianza sobre posos de los vinos blancos han llevado a algunos bodegueros a aplicar esta práctica para la crianza de los vinos tintos, con la esperanza de obtener beneficios en el

plano organoléptico, suponiendo que los posos aportan "grasa y redondez" a los vinos, es decir, aumentan su dulzor.

5 En los vinos tintos, la crianza sobre posos permite igualmente limitar los fenómenos de oxidación actuando, en cierta medida, sobre la textura de los vinos. En la bibliografía (Escot et al., 2001) se ha recogido que las glicoproteínas de origen parietal, liberadas durante la autólisis de las levaduras presentes en los posos, parecen tener una acción sobre ciertas fracciones polifenólicas con la consecuencia de una disminución de las sensaciones astringentes unidas a estas fracciones.

En general, el experto en la técnica sabe, que la crianza sobre posos de los vinos, tintos o blancos, se traduce entre otras cosas en un aumento del dulzor de dichos vinos.

10 Sin embargo, no es fácil para el técnico generar estos aumentos de dulzor. En efecto, el control de la crianza sobre posos depende de múltiples factores, tales como la duración, la temperatura, la frecuencia de *batoneo*, la estructura coloidal del vino, etc.

Además, la puesta en práctica de esta técnica es costosa y por lo tanto no es posible en todos los vinos. Por último, esta técnica no se aplica generalmente más que a las bebidas alcohólicas.

15 En la invención, se intenta proporcionar un procedimiento de tratamiento que se pueda aplicar a cualquier tipo de bebida, alcohólica o no, que permita aumentar la sapidez de la bebida, más precisamente el dulzor, de manera controlada. Por manera controlada, se entiende la manera de obtener el nivel de sapidez deseado, que puede variar de una a otra bebida, de acuerdo con los deseos de los consumidores, las normas, etc.

20 Para ello, la invención propone utilizar una preparación de levaduras inertizadas que contengan un péptido particular, cuyo peso molecular esté comprendido entre 0,5 y 3 kDa, con el fin de amplificar la sensación de dulzor de una bebida a la que se añade esta preparación. Esta preparación de levaduras inertizadas se puede obtener por autólisis de las levaduras presentes en los posos del vino, como por ejemplo levaduras que pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

25 El uso de la preparación de levaduras inertizadas que contienen el péptido de interés es particularmente interesante para el tratamiento de los vinos, blancos, tintos o rosados. En efecto, en este caso la adición de la preparación de levaduras inertizadas de la invención corresponde a la adición de un producto enológico autorizado por la legislación.

El uso de este preparado de levaduras permite tratar todo tipo de bebidas destinadas al consumo de seres humanos o animales con el fin de aumentar la sensación dulce percibida tras la absorción de la bebida.

30 Por supuesto, es posible utilizar la preparación de levaduras que contienen el péptido edulcorante de la invención para aumentar el dulzor, o más generalmente mejorar la sapidez, de todo tipo de productos agroalimentarios. La preparación de levaduras de la invención puede servir principalmente en la preparación de platos cocinados, productos alimenticios a base de leche o cualquier otro producto destinado a la gran distribución. La preparación de levaduras de la invención que contienen la fracción peptídica sávida de interés se puede utilizar también como edulcorante de mesa de la misma forma que el aspartamo u otros edulcorantes actualmente utilizados.

35 En el caso de bebidas y alimentos para los que está autorizado por el marco reglamentario, es posible añadir directamente la fracción peptídica sávida de la invención obtenida, por ejemplo, por síntesis química.

40 La fracción peptídica sávida de acuerdo con la invención tiene un umbral de percepción muy bajo con relación a la de los agentes aromatizantes utilizados actualmente en la industria agroalimentaria. Por umbral de percepción se entiende la concentración mínima de esta fracción peptídica necesaria para que los consumidores puedan detectarla. Por lo tanto, gracias a su poder edulcorante, es posible añadir pequeñas cantidades de la preparación de levaduras inertizadas que contienen dicha fracción peptídica en un alimento o una bebida para conseguir un aumento deseado del dulzor.

45 También es posible utilizar directamente la fracción peptídica edulcorante, previamente aislada de una preparación de levaduras inertizadas que la contiene u obtenida por síntesis química.

Por consiguiente, la invención tiene por objeto un procedimiento de tratamiento de una bebida destinada al consumo por un ser humano o animal con el fin de aumentar el dulzor de dicha bebida, tal como se define en la reivindicación 1. Este procedimiento puede responder a una o varias características objeto de las reivindicaciones 2 a 6.

50 Por preparación de levaduras, se entiende la fracción intracelular, así como los fragmentos de paredes celulares de dichas levaduras.

Por levaduras inertizadas por tratamiento enzimático y/o fisicoquímico, se entienden levaduras que han sido sometidas a autólisis con o sin enzimas exógenas. Las enzimas exógenas son, por ejemplo β -1-3-glucanasas y/o β -

1-6-glucanasas y/o proteasas. Las levaduras también pueden ser inertizadas por un tratamiento fisicoquímico, tal como un tratamiento ácido, básico o térmico, añadiéndose estos tratamientos eventualmente al tratamiento enzimático.

5 Por compuesto peptídico edulcorante, se entiende un compuesto peptídico capaz de aumentar el dulzor de la solución a la que se añade.

Más exactamente, la preparación de levaduras de la invención contiene un compuesto peptídico edulcorante de peso molecular igual a 2,750 kDa +/- 0,1 kDa.

La preparación de levaduras según la invención se puede añadir a la bebida en forma de polvo, en forma disuelta en una solución o de otro modo.

10 El compuesto peptídico edulcorante de interés, presente en la preparación de levaduras según la invención, presenta un pico de retención a los 34 minutos en una columna de HPLC Superdex Peptide HR 10/30.

El procedimiento de tratamiento de acuerdo con la invención se aplica tanto a las bebidas alcohólicas como a las bebidas no alcohólicas, cuando se debe conferir o aumentar en dicha bebida un sabor dulce.

15 En un ejemplo particular de puesta en práctica del procedimiento de la invención, se añade a la bebida que se ha de tratar al menos 50 g +/- 10 g, de preparación de levaduras inertizadas por hectolitro de bebida a tratar. Por supuesto, esta concentración se puede adaptar, es decir disminuir o aumentar, por ejemplo según el tipo de bebida y/o el destinatario de la bebida.

El compuesto edulcorante de acuerdo con la invención se puede añadir a la bebida en forma de polvo, en forma disuelta en una solución o de otro modo.

20 Es posible añadir una preparación que comprenda una mezcla de varios compuestos edulcorantes, teniendo cada uno al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, con una similitud de al menos 95% o mejor 98 %.

25 La invención tiene igualmente por objeto un compuesto peptídico edulcorante procedente de levaduras, tal como se define en la reivindicación 7. Este compuesto puede estar de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9.

Más específicamente, el compuesto peptídico edulcorante tiene un peso molecular igual a 2,750 kDa +/- 0,1 kDa.

Este compuesto peptídico edulcorante se puede obtener principalmente por síntesis química o por extracción y purificación a partir de una preparación de levaduras inertizadas que lo contienen.

30 La invención tiene igualmente por objeto una preparación de levaduras inertizadas por tratamiento enzimático y/o fisicoquímico, tal como se define en la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

La preparación de levaduras contiene más específicamente un compuesto peptídico edulcorante que tiene un peso molecular de 2,750 kDa +/- 0,1 kDa.

Otras ventajas y características serán evidentes de la lectura de los ejemplos siguientes y que hacen referencia a las figuras anexas en las que:

35 - las figuras 1A y 1B muestran los resultados de las mediciones de la evolución de la DO a 254 nm (figura 1A) y a 280 nm (figura 1 B) respectivamente, en un medio de autólisis de levaduras cuando el medio está enriquecido o no en enzimas exógenas;

- la figura 2 muestra la evolución de la concentración, en g/L de equivalente de leucina, de compuestos nitrogenados de un medio de autólisis de levaduras cuando el medio está enriquecido o no en enzimas exógenas;

40 - la figura 3 muestra los resultados de las diferentes pruebas triangulares que comparan vinos tratados por adición de diferentes preparaciones de levaduras inertizadas con vinos no tratados;

- las figuras 4A y 4B representan calibraciones moleculares de una columna TSK S2000 sw (figura 4A) y una columna Superdex Peptide HR 10/30 (figura 4B) respectivamente, para su uso en la separación de péptidos en una preparación peptídica que contiene la fracción sávida de interés y en una preparación de levaduras inertizadas;

45 - las figuras 5A y 5B representan los cromatogramas de cromatografía de líquidos a alta presión de la preparación peptídica que contiene la fracción sávida de interés sobre TSK G2000 sw (figura 5A) y sobre Superdex Peptide HR 10/30 (figura 5B), respectivamente;

- las figuras 6A y 6B representan los cromatogramas de cromatografía de líquidos a alta presión de una preparación de levaduras inertizadas sobre TSK G2000 sw (figura 5A) y Superdex Peptide HR 10/30 (figura 5B),

respectivamente;

- la figura 7 representa el cromatograma de cromatografía de líquidos a alta presión de la fracción sávida de interés sobre C18RP.

I- Identificación de fracciones sápidas liberadas durante la autólisis de levaduras.

5 Para identificar moléculas que tienen un poder edulcorante, o fracción sávida, los inventores utilizaron en sus trabajos levaduras presentes en los posos de vino.

Por autólisis, se entiende la digestión de los materiales constituyentes de las levaduras por acción de enzimas endógenas, es decir, enzimas propias de dichas levaduras.

10 La identificación de fracciones sápidas liberadas durante la autólisis de las levaduras se realiza en un medio modelo de autólisis. El medio modelo de autólisis se obtiene a partir de un medio sintético sometido a una fermentación alcohólica.

1 - Material

1.1 - Preparación del medio sintético

La composición del medio sintético se describe en la Tabla I.

15 **Tabla I:** Composición del medio sintético

| | Concentración (g/L) |
|---|------------------------------------|
| Glucosa (VWR) | 100 |
| Fructosa (VWR) | 100 |
| Ácido tartárico (VWR) | 3 |
| Ácido cítrico (VWR) | 0,3 |
| Ácido (L-)málico (Sigma) | 0,3 |
| Fosfato de potasio (VWR) | 2 |
| Sulfato de magnesio (VWR) | 0,2 |
| Sulfato de amonio (Sigma) | 0,3 = 63,6 mg de N |
| Asparagina (Sigma) | 0,6 = 127,2 mg de N |
| Meso-inositol (VWR) | 0,3 |
| Solución de oligoelementos concentrada 1000 veces | Concentración final en mg/L |
| MnSO ₄ .7 H ₂ O (Sigma) | 4 |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O (Sigma) | 4 |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O (Sigma) | 1 |
| KI (yoduro de potasio) (Sigma) | 1 |
| CoCl ₂ .6 H ₂ O (Sigma) | 0,4 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O (Sigma) | 1 |
| H ₃ BO ₃ (ácido bórico) (Sigma) | 1 |
| Solución de vitaminas concentrada 1000 veces | Concentración final en mg/L |
| Biotina (Sigma) | 40 µg |
| Tiamina (Sigma) | 1 |
| Piridoxina (Sigma) | 1 |
| Ácido nicotínico (Sigma) | 1 |
| Ácido pantoténico (Sigma) | 1 |
| Ácido para-aminobenzoico (Sigma) | 1 |
| Solución de ácidos grasos concentrada 1000 veces | Concentración final en µg/L |
| C 16 ácido palmítico (Sigma) | 100 |
| C 16-1 ácido palmitoleico (Sigma) | 20 |
| C 18 ácido esteárico (Sigma) | 300 |
| C 18-1 ácido oleico (Sigma) | 50 |
| C 18-2 ácido linoleico (Sigma) | 50 |

| | Concentración (g/L) |
|---------------------------------|---------------------|
| C 18-3 ácido linolénico (Sigma) | 20 |

Todo el material de vidrio utilizado en la preparación de este medio sintético, así como el sistema de filtración se sometieron previamente a tratamiento en autoclave durante 10 minutos a 105°C.

5 Inicialmente, los azúcares, los ácidos, las fuentes nitrogenadas, el fosfato de potasio, el sulfato de magnesio, el meso-inositol así como las soluciones de vitaminas y de oligoelementos se disuelven en agua milli-Q (Millipore). El pH se ajusta a 3,3 con hidróxido de potasio 4N (VWR).

Se añade SO₂ en la cantidad de 2 g/hL.

La mezcla obtenida se filtra de manera estéril por una membrana de éster de celulosa de 0,45 µM (Pall).

10 Paralelamente, al volumen necesario de solución de ácidos grasos se añaden 0,5 g/L de celulosa (Granucell, Laffort CEnologie) y luego se disuelve en 100 mL de etanol.

Esta suspensión se evapora hasta sequedad en un rotavapor. El polvo blanco obtenido (celulosa sobre la que se han fijado los ácidos grasos) se disuelve en el medio sintético filtrado. La turbidez del medio es entonces 150 NTU.

1.2 - Preparación del medio de autolisis

15 El medio sintético se siembra con 10 g/hL de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* «Montrachet» 522 Davis (Levures Sèches Actives: Actiflore cerevisiae, Laffort CEnologie). Las fermentaciones se desarrollan en matraces redondos de 6 litros. Las levaduras se oxigenan regularmente, con un burbujeo fuerte de aire comprimido. El contenido de azúcares reductores residuales al final de la fermentación se estima por el método de «Clinitest» (Bayer).

20 Al final de la fermentación alcohólica, las levaduras se vuelven a poner en suspensión en el medio sintético fermentado que se separa en dos modalidades realizadas por triplicado.

Una primera modalidad consiste en un medio de autolisis desprovisto de enzima exógena.

Una segunda modalidad consiste en un medio de autolisis al que se han añadido 5 g/hL de enzimas exógenas. Las enzimas exógenas son una mezcla de proteasas y glucanasas.

25 La autolisis se desarrolla a 30°C, protegida de la luz, durante 6 meses con una nueva puesta en suspensión semanal de los posos.

El muestreo durante la autolisis se realizó después de 11, 42, 88, 123 y 148 días de autolisis. Las levaduras se separaron del medio por centrifugación (4500 g, 10 min). A continuación se analizó el líquido sobrenadante.

2- Métodos de análisis utilizados para la identificación de las fracciones sápidas durante la autolisis

2.1 - Medición de las densidades ópticas de los productos de autolisis a 280 nm y 254 nm.

30 Después de dilución, la densidad óptica del líquido sobrenadante de autolisis se mide a 280 nm y 254 nm en celdas de cuarzo con 1 cm de camino óptico con relación al agua destilada.

2.2 - Dosificación de compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados en los líquidos sobrenadantes de autolisis se dosifican por el método colorimétrico con ninhidrina (Rosen, 1957).

35 2.3 – Fraccionamiento de moléculas según su tamaño

Los posos se eliminan de los medios modelos de autolisis por centrifugación y los líquidos sobrenadantes se someten a tres ultrafiltraciones tangenciales sucesivas en un módulo Minitan™ (Millipore) a los umbrales de corte de 10, 3 y 0,5 kDa, con el fin de ser fraccionados.

40 El producto que se ha de filtrar es introducido en el módulo de ultrafiltración tangencial por una bomba Beckman de tipo 112. Las filtraciones se realizan a la temperatura del laboratorio (23°C). Los productos retenidos se dializan a 500 Da (Spectra/Por® CE [éster de celulosa]) para desalinizar y eliminar las moléculas más pequeñas y luego se liofilizan y conservan a -18°C.

2.4 - Evaluación sensorial

45 Para identificar la o las fracciones sápidas obtenidas de los medios de autolisis y cotejarlas con las fracciones moleculares obtenidas del fraccionamiento de los posos, se realizan en paralelo dos catas.

Cada cata consiste en una prueba triangular. La prueba triangular consiste en presentar tres muestras codificadas a un sujeto. Dos muestras son idénticas y la tercera es diferente. El sujeto debe identificar la muestra diferente. Después de una interpretación estadística de los resultados, las diferencias significativas se determinaron de acuerdo con los umbrales de 5, 1 o 0,1%.

- 5 Una primera cata enfrenta las tres fracciones moleculares, obtenidas del fraccionamiento de posos purificados, a una solución sintética.

La solución sintética es una solución hidroalcohólica que comprende 1,5 g/L de ácido tartárico; 1,5 g/L de ácido málico; etanol al 12% (v/v). El pH de la solución hidroalcohólica es 3,5 (por adición de NaOH 1M). La solución hidroalcohólica se valora al 12% v/v con el fin de imitar el porcentaje de alcohol en el vino.

- 10 Una segunda cata enfrenta los diferentes productos de autólisis, según el medio de autólisis, es decir con o sin enzima exógena.

2.5 - Identificación del umbral de percepción del sabor dulce.

- 15 La búsqueda de un umbral de percepción, o detección, del sabor dulce consiste en presentar a un sujeto una muestra que tenga una concentración dada de componente edulcorante. El sujeto debe entonces determinar si esta muestra es diferente o no a la de control.

Un modelo matemático se asocia a la variación de las frecuencias de respuestas correctas en función de la concentración de compuesto edulcorante.

El umbral de percepción se define como la concentración a partir de la cual el 50% de los catadores detecta sistemáticamente la presencia de la sustancia.

- 20 Las respuestas se obtienen utilizando una serie de pruebas triangulares.

Una gama de cinco concentraciones del compuesto edulcorante cuyo umbral de percepción se debe estimar se determina previamente en el laboratorio. Esta gama de concentraciones se somete a continuación a un panel de catadores. Para cada una de las concentraciones a ensayar se prepara una prueba triangular. Las muestras se presentan al panel según un orden creciente de concentraciones.

25 **3 - Resultados**

3.1 - Evolución de la cantidad de sustancias liberadas durante la autólisis.

Las sustancias liberadas durante la autólisis eran principalmente proteínas o péptidos y ácidos nucleicos, su liberación en el medio fue seguida por la medición respectiva de la evolución de las densidades ópticas a 280 y 254 nm.

- 30 Los resultados se representan en las figuras 1A y 1B.

Comparando el aumento de la densidad óptica en el medio de autólisis desprovisto de enzima exógena con la densidad óptica en el medio de autólisis que contiene enzimas exógenas, se observa un aumento más rápido de la DO, ya sea a 254 nm o a 280 nm, en el medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas. Este aumento más rápido de la DO en el medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas se vuelve significativo a partir de la tercera muestra, es decir, desde el día 88 de la autólisis.

- 35 El aumento de las densidades ópticas a 280 nm y 254 nm es aproximadamente del 43% en la última muestra, en comparación con la densidad óptica antes de la autólisis, en los medios de autólisis tratados con 5 g/hL de enzimas exógenas.

3.2 - Evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados

- 40 Los resultados de las dosificaciones de compuestos nitrogenados liberados durante la autólisis, en presencia o ausencia de enzimas exógenas, se representan en la Figura 2.

Después de 160 días de autólisis, la concentración de compuestos nitrogenados es 0,3 g/L de equivalente de leucina en el medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas frente a aproximadamente 0,16 g/L de equivalente de leucina en el medio de autólisis desprovisto de enzima exógena. Estos resultados confirman los obtenidos durante la medición de la evolución de la densidad óptica.

- 45 La presencia de enzimas exógenas en el medio de autólisis tiene por tanto un efecto positivo sobre la liberación de las moléculas procedentes de la levadura en el medio de autólisis. Por efecto positivo, se entiende que la cantidad de moléculas liberada en el medio es más rápida e importante.

3.3 - Resultados de las pruebas triangulares.

Las pruebas triangulares se realizaron para permitir la evaluación sensorial de las fracciones moleculares liberadas durante la autólisis, en presencia o ausencia de enzima.

Para este fin, el fraccionamiento se realizó, respectivamente, en el medio de autólisis desprovisto de enzima exógena y en el medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas, después de 154 días.

- 5 El contenido de compuestos nitrogenados de estas diferentes fracciones en los dos medios, a 154 días, se recogen en la Tabla I siguiente.

Tabla I: Contenidos de compuestos nitrogenados en las diferentes fracciones

| Fracciones | Medio de autólisis sin enzima exógena | | | Medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------|-----------|--|----------|------------|
| | > 10 kDa | 3-10 kDa | 0,5-3 kDa | > 10 kDa | 3-10 kDa | 0,5 -3 kDa |
| Compuestos nitrogenados (mg/L) | 60 | 10 | 110 | 90 | 20 | 200 |

3.3.1 - Primera evaluación sensorial: identificación de la fracción sávida.

- 10 La primera evaluación sensorial consistía en tres pruebas triangulares que enfrentaban las fracciones purificadas obtenidas de la autólisis en presencia de enzimas a la solución hidroalcohólica sintética sola.

Los resultados se representan en la Tabla II siguiente.

Tabla II: Resultados del análisis sensorial de tres fracciones moleculares aisladas enfrentadas a la solución hidroalcohólica sintética sola.

| Modalidades opuestas | Fracción 0,5-3 kDa | Fracción 3-10 kDa | Fracción > 10 kDa |
|----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Número de catadores | 7 | 7 | 7 |
| % de respuestas buenas | 100 | 43 | 14 |
| Diferencias significativas | Si (umbral de 0,1%) | No | No |

- 15 Estas pruebas muestran que sólo la fracción comprendida entre 0,5 y 3 kDa es diferenciada desde un punto de vista gustativo de la solución sintética por el 100% de los catadores, a una concentración de 200 mg/L.

Las moléculas de tamaño superior a 10 kDa no tienen función organoléptica.

3.3.2 - Segunda evaluación sensorial: umbral de detección de la fracción sávida

- 20 A partir de los resultados de la primera evaluación sensorial, se ha tratado de saber a partir de que umbral se detecta la fracción sávida comprendida entre 0,5 y 3 kDa. El umbral de percepción de esta fracción sávida se ha buscado enriqueciendo la solución hidroalcohólica sintética en concentraciones crecientes de la fracción sávida de interés.

Los resultados de este ensayo se representan en la Tabla III.

- 25 1 significa que el catador dio una buena respuesta en la prueba triangular;
0 significa que el catador no dio una buena respuesta en la prueba triangular.

Tabla III: Resultados de las pruebas triangulares para la determinación del umbral de percepción de la fracción sávida.

| Catadores | 2 mg/L | 4 mg/L | 8 mg/L | 16 mg/L | 32 mg/L |
|-----------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| total | 3 | 2 | 4 | 4 | 7 |

5 La fracción sávida es detectada por el 50% de los catadores a partir de una concentración de 16 mg/L. En efecto, una buena respuesta no se considera pertinente más que si los catadores implicados continúan con la siguiente, para concentraciones crecientes, dando respuestas correctas. Para una concentración de 32 mg/L, el 70% de los catadores detectan la presencia de la fracción sávida. El umbral de detección es por tanto particularmente bajo con relación a las moléculas sápidas del estado de la técnica actualmente utilizadas en la industria agroalimentaria.

3.3.3 - Tercera evaluación sensorial: comparación de las propiedades organolépticas de la fracción sávida obtenida del medio de autólisis desprovisto de enzima exógena y de la fracción sávida obtenida del medio de autólisis enriquecido en enzimas exógenas.

10 Después de haber demostrado que una sola de las fracciones aisladas es sávida, los autores verificaron si las moléculas obtenidas del fraccionamiento entre 0,5 y 3 kDa producidas en los dos medios de autólisis, con o sin enzima exógena, poseen las mismas propiedades organolépticas.

Para ello, se realiza una prueba triangular, enfrentando las dos fracciones sápidas. Los resultados de esta prueba se representan en la Tabla IV.

15 **Tabla IV:** Resultados de las pruebas triangulares que comparan la sapidez de cada una de dos fracciones obtenidas respectivamente del medio de autólisis con enzima exógena o del medio de autólisis sin enzima exógena.

| Fracciones sápidas enfrentadas para la prueba triangular | Fracción 0,5-3 kDa obtenida de la autólisis sin enzima exógena/fracción 0,5-3 kDa obtenida de la autólisis con enzimas exógenas |
|--|---|
| Número de catadores | 10 |
| % de respuestas buenas | 30 |
| Diferencias significativas | No |

Las fracciones sápidas obtenidas de los dos medios de autólisis no son por tanto distinguibles desde el punto de vista organoléptico. Son por consiguiente equivalentes.

20 Gracias a estas pruebas sucesivas, se demuestra la sapidez de la fracción de peso molecular comprendido entre 0,5 y 3 kDa.

3.3.4 - Cuarta evaluación sensorial: confirmación de la naturaleza peptídica de la fracción de interés y sus propiedades organolépticas

Con el fin de confirmar la naturaleza peptídica de la fracción sávida, se somete dicha fracción de peso molecular comprendido entre 0,5 y 3 kDa a una proteasa no específica, la proteinasa K.

25 Después de hidrólisis, la proteinasa K se elimina por ultrafiltración y las sustancias residuales se recuperan y se disuelven en una solución hidroalcohólica sintética.

Se realiza una prueba triangular a partir de esta solución enriquecida en sustancias residuales. El resultado de la prueba triangular se representa en la Tabla V siguiente.

30 **Tabla V:** Resultado del análisis sensorial enfrentando una solución hidroalcohólica sintética enriquecida en la fracción molecular de peso molecular 0,5-3 kDa después de hidrólisis por proteinasa K y una solución hidroalcohólica sintética no enriquecida.

| Modalidades opuestas | Solución hidroalcohólica sintética enriquecida en la fracción 0,5-3 kDa después de digestión por la proteinasa K/Solución hidroalcohólica sintética no enriquecida |
|----------------------------|--|
| Número de catadores | 13 |
| % de respuestas buenas | 54 |
| Diferencias significativas | No |

35 Los resultados de esta prueba muestran que no hay diferencia significativa desde el punto de vista organoléptico entre las dos soluciones. En efecto, el análisis estadístico de estos resultados muestra que un umbral de significación del 5% necesita, para 13 catadores, al menos 61% de respuestas buenas para que la diferencia sea considerada significativa, a causa del porcentaje de respuestas correctas debido al azar. Igualmente, el umbral de significación del 1% necesita, para 13 catadores, al menos 69% de respuestas buenas, y el umbral de significación de 0,1% necesita, para 13 catadores, al menos 77% de respuestas buenas.

Esta prueba permite confirmar que la fracción molecular sávida es de origen peptídico, ya que es digerida por la proteinasa K.

Esta prueba permite mostrar además que una vez hidrolizados los compuestos peptídicos, la fracción 0,5-3 kDa no se diferencia. La fracción sávida pierde sus propiedades organolépticas cuando se hidroliza.

5 **II- Identificación de la presencia de la fracción sávida comprendida entre 0,5-3 kDa en las preparaciones de levadura inertizadas.**

Una vez identificada y aislada la fracción sávida, se intentó verificar la presencia de esta fracción sávida directamente en las preparaciones de levaduras inertizadas. Uno de los objetivos es saber si la fracción peptídica de interés conserva su poder organoléptico cuando no está aislada.

10 **1- Identificación de la fracción sávida en preparaciones de levaduras inertizadas.**

Con el fin de identificar la fracción peptídica comprendida entre 0,5 y 3 kDa en extractos de levaduras, se utiliza un método de análisis de péptidos por HPLC de tamizado molecular. Dicho análisis se realiza en paralelo sobre preparaciones de levaduras inertizadas y sobre la fracción peptídica de interés purificada.

15 Las preparaciones de levaduras inertizadas y la fracción sávida purificada se separan en función de su peso molecular en dos tipos de columnas, TSK G2000sw y Superdex Peptide HR 10/30, respectivamente, por cromatografía de líquidos de alta resolución (Spectrasystem AS 1000). La zona de fraccionamiento es de 10 a 70 kDa para las proteínas globulares en la primera columna y de 100 a 7000 Da en la segunda columna.

Las condiciones de separación son las siguientes:

20 TSK G 2000 sw
 Volumen de inyección: 100 µL
 Eluyente: NaCl 0,1 M
 Caudal: 0,6 mL/min
 Superdex Peptide HR10/30
 25 Volumen de inyección: 50 µL
 Eluyente: 0,1 M
 Caudal: 0,5 mL/min

La detección se realiza en UV a 200 nm.

La calibración de las 2 columnas se realiza con una mezcla de proteínas de diferentes tamaños moleculares que permita establecer una curva para cada columna (véanse las Figuras 4A y 4B).

30 La calibración molecular de la columna TSK G 2000 sw (Figura 4A) se realiza como sigue:

94000 : fosforilasa B
 67000 : suero de albúmina bovina
 43000 : ovoalbúmina
 30000 : anhidrasa carbónica
 12500 : citocromo C

La calibración molecular de la columna Superdex Peptide HR 10/30 (Figura 4B) se realiza como sigue:

200000: azul dextrano
 12500 : citocromo C
 65000 : aprotinina
 3500 : fragmento de insulina
 300: glutatión

2- Resultados de identificación

35 La fracción sávida identificada se analiza por HPLC siguiendo los dos métodos descritos anteriormente.

En las Figuras 5A y 5B, se pueden ver los resultados del análisis por HPLC de tamizado molecular de la fracción peptídica sávida purificada en TSK G2000sw (Figura 5A) y en Superdex Peptide HR 10/30 (Figura 5B), respectivamente.

El tiempo de retención característico de la fracción peptídica sávida purificada es de 37 minutos en la columna TSK

G2000sw y 34 minutos en la columna Superdex Peptide HR 10/30, correspondiente al peso molecular descrito anteriormente, inferior a 3 kDa, es decir aproximadamente 2,750 kDa. Por aproximadamente 2,750 kDa, se entiende 2,750 kDa más o menos 0,1 kDa.

- 5 Las diferentes preparaciones de levaduras inertizadas se analizan a continuación por HPLC. La comparación de uno de los perfiles obtenidos (Figuras 6A y 6B) con el de la fracción peptídica sávida purificada muestra la presencia, en todos los tipos de preparaciones de levaduras analizadas, de la fracción en el tiempo de retención de 37 minutos (Figura 6A) y de 34 minutos (Figura 6B). El péptido correspondiente al tiempo de retención de 37 o 34 minutos en la preparación de levadura tiene un peso molecular de aproximadamente 2,750 kDa.

Así, se confirma la presencia de la fracción peptídica sávida en las preparaciones de levaduras inertizadas.

- 10 Los métodos de análisis por HPLC pueden permitir controlar la eficacia de la producción de preparaciones de levaduras inertizadas. Es posible utilizar de forma sistemática estos métodos de análisis, como ensayo de control de calidad de las preparaciones de levaduras inertizadas. La presencia de un pico en el tiempo de retención de 34 minutos en la columna Superdex Peptide HR 10/30 certifica la presencia de la fracción peptídica sávida (de 2,750 kDa) en la preparación analizada.

15 **3- Producción de preparación de levaduras inertizadas aptas para aumentar el dulzor de una bebida.**

En la presente invención se ha investigado saber si la calidad de las características organolépticas de la fracción peptídica según la invención puede variar dependiendo de las levaduras utilizadas y/o dependiendo del tratamiento al que se somete las levaduras.

- 20 Se realizaron cuatro preparaciones de diferentes levaduras inertizadas. Las preparaciones A, B, C y D corresponden a los siguientes tratamientos:

Preparación A: levaduras BO213 inertizadas por un procedimiento fisicoquímico;
Preparación B: levaduras 522D inertizadas por un procedimiento fisicoquímico;
Preparación C: levaduras 522D inertizadas por un procedimiento enzimático;
Preparación D: levaduras VL3C inertizadas por un procedimiento fisicoquímico.

- 25 Al final de su producción, el impacto sensorial de estas diferentes preparaciones se mide por pruebas de cata triangulares que enfrentan vinos a los que se han añadido estas preparaciones de levaduras inertizadas y los mismos vinos de control no tratados. El panel de catadores está compuesto por 15 personas.

Un ejemplo de estos resultados se representa en la Figura 3.

- 30 El análisis estadístico de estas catas triangulares muestra que para el panel el umbral de diferenciación significativa se alcanza a partir del 78% de respuestas correctas. Este umbral no se logra más que después de la adición de la preparación D de levaduras inertizadas. En estas condiciones, el 100% de los catadores prefiere el vino tratado.

La fracción peptídica edulcorante se presenta igualmente en las preparaciones de levaduras inertizadas A, B y C. Sin embargo, las concentraciones respectivas de la fracción peptídica edulcorante en estas preparaciones es insuficiente para ser detectada con certeza por el panel.

- 35 Estos experimentos demuestran que el tipo de preparación de levaduras inertizadas, bien por tratamiento enzimático, bien por tratamiento fisicoquímico, bien por tratamiento térmico, puede influir sobre la presencia de la fracción peptídica edulcorante que permite aumentar la sapidéz de los vinos. Dependiendo del tratamiento al que se somete la preparación de levadura, la preparación de levadura inertizada obtenida es más o menos rica en la fracción peptídica edulcorante.

40 **4- Umbral de percepción de la preparación de levaduras inertizadas en diferentes vinos.**

La preparación D de levaduras inertizadas se añadió a diferentes tipos de vinos a las dosis de 30, 50 y 70 g/hL. El impacto sensorial de estos diferentes tratamientos se mide por pruebas de cata triangulares que enfrentan a los vinos de control con los vinos a los que se han añadido estas preparaciones de levaduras inertizadas. Un panel de nueve catadores participa en estas pruebas triangulares.

- 45 Se realiza un análisis estadístico con el fin de determinar las respuestas significativas. Para un panel de nueve catadores, se necesita un mínimo de siete respuestas buenas, es decir, el 78% de respuestas correctas para que la diferencia sea significativa en el umbral del 5%.

Un ejemplo de estos resultados se recoge en la Tabla IV.

Tabla VI: Umbral de percepción de la preparación de levaduras inertizadas en diferentes vinos

| Tipos de vinos | 30 g/hL | | 50 g/hL | | 70 g/hL | |
|---|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Respuestas correctas (%) | Diferencias significativas | Respuestas correctas (%) | Diferencias significativas | Respuestas correctas (%) | Diferencias significativas |
| Vino blanco Chardonnay 2003 | 56 | no | 78 | si | 78 | si |
| Vino tinto Cabernet Sauvignon 2003 | 45 | no | 56 | no | 78 | si |
| Vino blanco Sauvignon 2003 | 78 | si | 78 | si | 78 | si |
| Vino tinto Merlot 2003 | 56 | no | 78 | si | 78 | si |
| Vino tinto Cabernet Sauvignon/Merlot 2002 | 45 | no | 56 | si | 78 | si |

5 En todos los ejemplos de la Tabla VI, con la excepción del vino tinto Cabernet Sauvignon 2003, la calidad gustativa del vino se mejora por la adición de 50 g/hL de preparación de levaduras inertizadas. La calidad gustativa del vino tinto Cabernet Sauvignon 2003 mejoró por la adición de 70 g/hL de preparación de levaduras inertizadas. Por calidad gustativa mejorada, se entiende un aumento del dulzor.

Se obtiene por consiguiente el aumento de la sapidez del vino por adición de pequeñas cantidades de preparaciones de levaduras inertizadas que contienen la fracción sávida de la invención.

II- Purificación y secuenciación de los péptidos contenidos en la fracción sávida

10 La fracción peptídica sávida de 0,5-3 kDa, obtenida de las preparaciones de levaduras inertizadas, se purifica por cromatografía de líquidos de alta resolución (Spectrasystem AS 1000) de tamizado molecular en una columna Superdex Peptide HR 10/30.

Se recoge la fracción peptídica sávida eluida en el tiempo de retención de 34 minutos.

A continuación se purifica de nuevo la fracción por HPLC en una columna C18RP con las siguientes condiciones:

15 Columna Lichrospher RP18 5 µm 250 x 4,6 mm
Eluyente
Tampón A: Acetonitrilo/Agua (80/20);
Tampón B: Acetonitrilo/Agua (8/92)

| Gradiente: | tiempo (min) | %A | %B |
|------------|--------------|----|----|
| | 0 | 15 | 85 |
| | 10 | 40 | 60 |
| | 15 | 81 | 19 |
| | 17 | 81 | 19 |
| | 18 | 81 | 19 |
| | 20 | 17 | 83 |
| | 22 | 17 | 83 |

20 Volumen de inyección: 100 µL
Caudal: 1 mL/min
Detección: 200 nm

La fracción sávida se eluye en el tiempo de retención de 2,10 +/- 0,1 min (Figura 7).

25 Se realizan unas cincuenta inyecciones y la fracción sávida así purificada se recoge y reúne y luego se evapora a vacío y se liofiliza.

El extracto seco obtenido se analiza por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas MS/MS.

A continuación se realiza una consulta en un banco de levaduras con el fin de identificar las proteínas de las que proceden los péptidos aislados.

5 Los resultados de la secuenciación muestran que la fracción sávida contiene veintinueve péptidos de las secuencias respectivas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29, procedentes de nueve proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más exactamente, las nueve proteínas identificadas son respectivamente

- 10 - una proteína de choque térmico de 12 kDa, para los péptidos según las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11;
- una fosfogliceratoquinasa (EC 2.7.2.3), para los péptidos según las secuencias SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16;
- 15 - una enolasa 1 (EC 4.2.1.11) (2-fosfogliceratodeshidratasa) (2-fosfo-D-glicerasa), para los péptidos según las secuencias SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21;
- una fosfogliceratomutasa 1 (EC 5.4.2.1) (Fosfogliceromutasa 1) (PGAM 1) (MPGM), para los péptidos según las secuencias SEQ ID NO: 20a, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23;
- 20 - un factor de alargamiento 1-alfa (EF-1-alfa), para los péptidos según las secuencias SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25;
- una superóxidodismutasa [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1), para el péptido según la secuencia SEQ ID NO: 26;
- un precursor mitocondrial NADH-ubiquinona-oxidoreductasa insensible a la rotenona, para el péptido según la secuencia SEQ ID NO: 27;
- una proteína ribosómica 60S L26-A (YL33), para el péptido según la secuencia SEQ ID NO: 28;
- 25 - un ORF YDL223c del cromosoma IV, para el péptido según la secuencia SEQ ID NO: 29.

30 Los compuestos peptídicos edulcorantes de la fracción sávida tienen una similitud de al menos 60% con una de estas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

35 Estos compuestos peptídicos, aislados o mezclados, presentan las propiedades edulcorantes atribuidas a la fracción sávida comprendida entre 0,5 y 3 kDa aislada inicialmente a partir de preparaciones de levaduras inertizadas y caracterizada por HPLC en TSK G2000sw a un tiempo de retención de 34 minutos o en Superdex Peptide HR 10/30 a un tiempo de retención de 34 minutos, según las condiciones de separación descritas.

Bibliografía

- Chae H. J., Hyun J.; In M-J. Utilization of brewer's cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effect of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*. **2001**, 76, 253-258.
- 5 Chatonnet P.; Dubourdiou D. et Boidron J.N. Incidences des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci. Alim.* **1992**, 12, 665-685.
- Desportes C. ; Charpentier M. ; Duteurtre B. ; Maujean A. and Duchiron F. Isolation, Identification and organoleptic characterization of low-molecular weight peptides from white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52 (4), 376-380.
- 10 Escot S.; Feuillat M. ; Dulau L. et Charpentier C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Austr. J. of Grape and Wine Res.* **2001**, 7, 153-156
- Fornairon C.; Mazauric J.P.; Salmon J.M.; Moutounet M. Observations on oxygen consumption during maturation of wine lees. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1999**, 33 (2), 79-86.
- 15 Gibbs B. F. ; Intez A. and Mulligan C. Sweet and taste-modifying proteins: a review. *Nutrition Research*. **1996**, 16 (9), 1619-1630.
- Lavigne V.; Dubourdiou D. Mise en évidence et interprétation de l'aptitude des lies à éliminer certains thiols volatils du vin. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1996**, 30 (4), 201-206.
- 20 Lavigne-Cruège V.; Cutzach I.; Dubourdiou D. Interprétation chimique du vieillissement aromatique défectueux des vins blancs. Incidence des modalités d'élevage. In: Actualités oenologiques **1999**. VI^{ème} Symposium International d'OEnologie 10-12 Juin 1999. Bordeaux.
- Ledoux V.; Dulau L.; Dubourdiou D. Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1992**, 26 (4), 239-251.
- 25 Llaubères R.M.; Dubourdiou D.; Villetaz J.C. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1987**, 41, 277-286.
- Moine-Ledoux V.; Perrin A.; Paladin I.; Dubourdiou D. Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (MannostabTM). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1997**, 31 (1), 23-31.
- Rosen H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 67, 102-115.
- 30 Tominaga T.; Blanchard L.; Darriet P.; Dubourdiou D. A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanthiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grapes varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1799-1802.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SARCO

5 <120> Procedimiento de tratamiento de una bebida para aumentar su dulzor y compuesto destinado a ser añadido a una bebida para aumentar su dulzor

<130> 13746Wo

10 <150> FR04/52803
<151>29-11-2004

<160> 29

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> saccharomyces cerevisiae

20 <400> 1
Lys Ala Asp Lys Val Ala Gly Lys Val Gln Pro Glu Asp Asn Lys Gly
1 5 10 15

25 <210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2
Lys Glu Tyr Ile Thr Asp Lys Ala Asp Lys Val Ala Gly Lys Val Gln
1 5 10 15

30 Pro Glu Asp Asn Lys Gly
20

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

35 <400> 3
Lys Ala Ser Glu Ala Leu Lys Pro Asp Ser Gln Lys Ser
1 5 10

40 <210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> saccharomyces cerevisiae

45 <400> 4
Asp Ala Val Glu Tyr Val Ser Gly Arg Val His Gly Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15

50 <210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 5
Lys Ala Ser Glu Ala Leu Lys Pro Asp Ser Gln Lys Ser Tyr Ala Glu
1 5 10 15

Gln Gly Lys Glu Tyr Ile Thr Asp Lys Ala
20 25

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 5
 <400> 6
 Tyr Val Ser Gly Arg Val His Gly Glu Glu Asp Pro Thr Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 7
 Lys Ala Asp Lys Val Ala Gly Lys Val Gln Pro Glu Asp Asn
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae
 <400> 8
 Lys Ala Ser Glu Ala Leu Lys Pro Asp Ser Gln Lys Ser Tyr Ala Glu
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Glu
 20
 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae
 <400> 9
 Asp Ala Val Glu Tyr Val Ser Gly Arg Val His Gly Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15
 Thr Lys Lys
 <210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae
 <400>
 Lys Ala Asp Lys Val Ala Gly Lys Val Gln Pro Glu Asp Asn Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Phe Gln Gly Val His Asp Ser
 20
 <210> 11
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 11
 Lys Gly Val Phe Gln Gly Val His Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Asp
 1 5 10 15
 Asn Ala Glu Gly Gln Gly Glu Ser Leu Ala Asp Gln Ala Arg Asp
 20 25 30
 <210> 12
 <211> 7

<212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae

 <400> 12
 Lys Arg Val Phe Ile Arg Val
 1 5
 5

 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 10

 <400> 13
 Asp Lys Ile Ser His Val Ser Thr Gly Gly Gly Ala Ser Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 15

 <210> 14
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae
 20

 <400> 14
 Glu Val Val Lys Ser Ser Ala Ala Gly Asn Thr Val Ile Ile Gly Gly
 1 5 10 15

 Gly Asp Thr Ala Thr Val Ala Lys Lys Tyr
 20 25

 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 25

 <400> 15
 Lys Ser Ser Ala Ala Gly Asn Thr Val Ile Ile Gly Gly Gly Asp Thr
 1 5 10 15

 Ala Thr Val Ala Lys Lys Tyr
 20
 30

 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 35

 <400> 16
 Arg Ile Val Ala Ala Leu Pro Thr Ile Lys Tyr
 1 5 10

 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 40

 <400> 17
 Ala Gly Glu Asn Phe His His Gly Asp Lys Leu
 1 5 10
 45

 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 50

<400> 18

Phe Ala Gly Glu Asn Phe His His Gly Asp Lys Leu
 1 5 10

<210> 19

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 19

10 Tyr Ala Arg Ser Val Tyr Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr Val Glu Val
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 20

Asp Pro Glu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Val Ala Asn Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Lys

20 <210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

25 <400> 21

Val Ser Leu Ala Ala Ser Arg Ala Ala Ala Ala Glu Lys Asn Val Pro
 1 5 10 15

Leu

<210> 22

<211> 13

30 <212> PRT

<213> saccharomyces cerevisiae

<400> 22

Arg Ala Ile Gln Thr Ala Asn Ile Ala Leu Glu Lys Ala
 1 5 10

35 <210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> saccharomyces cerevisiae

40 <400> 23

Tyr Tyr Leu Asp Pro Glu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

Asn Gln Gly Lys Lys
 20

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

45 <213> Saccharomyces cerevisiae

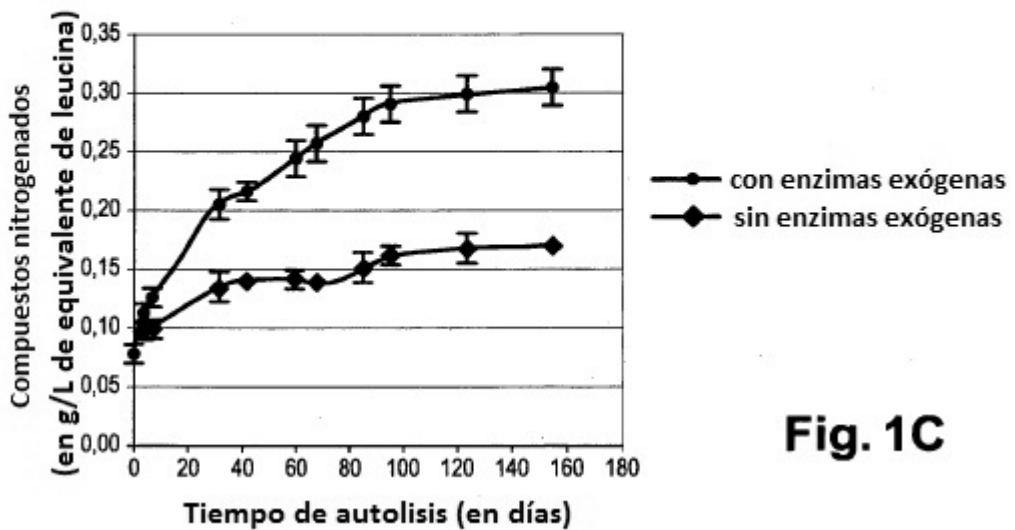
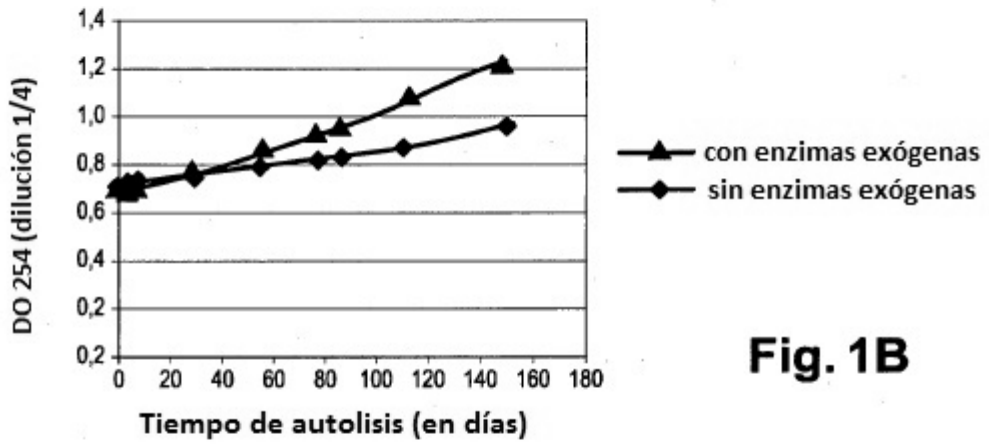
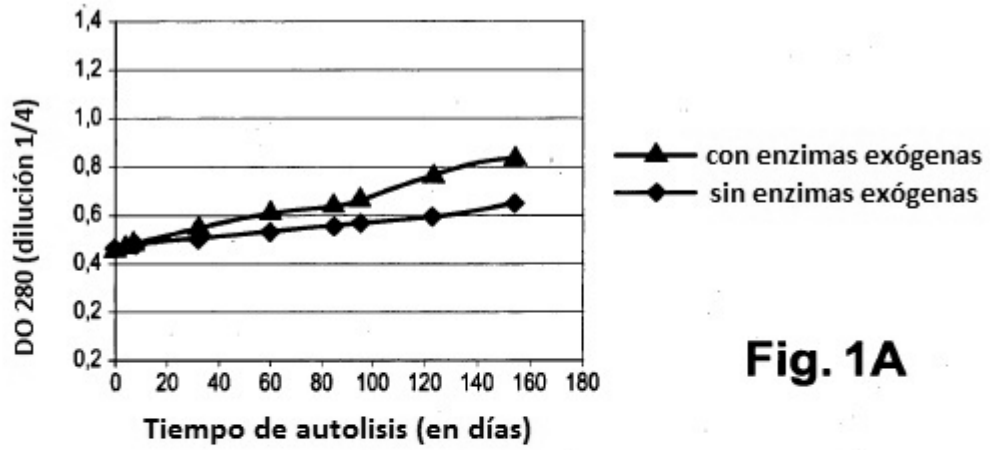
<400> 24

Lys Ala Gly val val Lys Gly Lys Thr Leu Leu Glu Ala Ile
 1 5 10

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 5
 <400> 25
 Tyr Lys Ile Gly Gly Ile Gly Thr val Pro val Gly Arg Val
 1 5 10
 10 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 15 <400> 26
 Val Gln Ala Val Ala Val Leu Lys Gly Asp Ala Gly val Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Val Lys Phe
 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 27
 Ser Lys Asn Leu Tyr Ser Asn Lys Arg Leu Leu Thr Ser Thr Asn Thr
 1 5 10 15
 25 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> saccharomyces cerevisiae
 30 <400> 28
 Arg Arg Val Leu Leu Ser Ala Pro Leu Ser Lys Glu
 1 5 10
 35 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 29
 Lys Asn Ala Lys Val Leu Glu Glu Asp Ala Pro Gly Tyr Lys Arg Glu
 1 5 10 15
 40
 45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para tratamiento de una bebida destinada al consumo por un ser humano o animal con el fin de mejorar la sápidéz asociada al dulzor de dicha bebida, caracterizado por que se añade a dicha bebida una fracción peptídica sávida que comprende al menos un compuesto peptídico edulcorante procedente de levadura, que tiene un peso molecular comprendido entre 0,5 y 3 kDa y una similitud de al menos 95% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
2. Procedimiento de tratamiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la fracción peptídica sávida se añade a la bebida en forma de una preparación de levaduras inertizadas por tratamiento enzimático y/o fisicoquímico.
3. Procedimiento de tratamiento según la reivindicación 2, caracterizado por que las levaduras de la preparación de levaduras inertizadas son levaduras presentes en los posos de los vinos.
4. Procedimiento de tratamiento según una de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado por que las levaduras de la preparación de levaduras inertizadas pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Procedimiento de tratamiento según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que se añaden al menos 50 g +/- 10 g, de preparación de levaduras inertizadas por hectolitro de bebida.
6. Procedimiento de tratamiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el compuesto peptídico edulcorante presenta una similitud de al menos 98% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
7. Un compuesto peptídico edulcorante procedente de una levadura, caracterizado por que tiene un peso molecular comprendido entre 0,5 y 3 kDa y una similitud de al menos 95% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
8. Compuesto peptídico edulcorante según la reivindicación 7, caracterizado por que presenta un umbral de percepción en una solución hidroalcohólica al 12%, de 16 mg/L +/- 5 mg/L.
9. Compuesto peptídico edulcorante según una de las reivindicaciones 7 a 8, caracterizado por que tiene una similitud de al menos 98% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
10. Preparación de levaduras inertizadas por tratamiento enzimático y/o fisicoquímico, caracterizada por que contiene al menos un compuesto peptídico edulcorante que tiene un peso molecular comprendido entre 0,5 y 3 kDa y una similitud de al menos 95% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
11. Preparación de levaduras inertizadas según la reivindicación 10, caracterizada por que el compuesto peptídico edulcorante tiene una similitud de al menos 98% con al menos una de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.



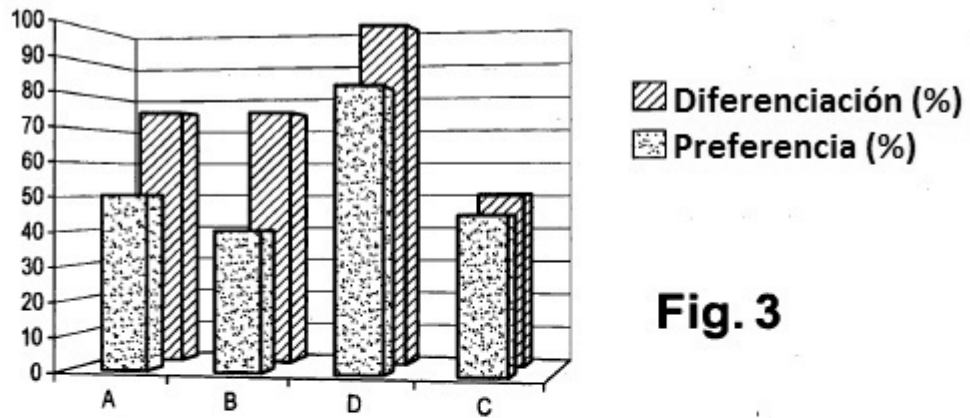


Fig. 3

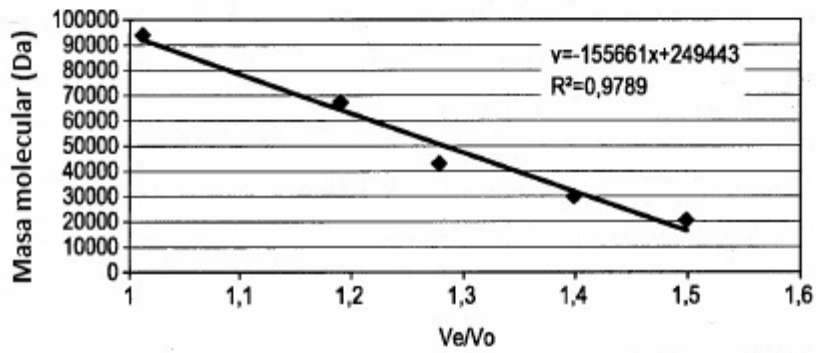


Fig. 4A

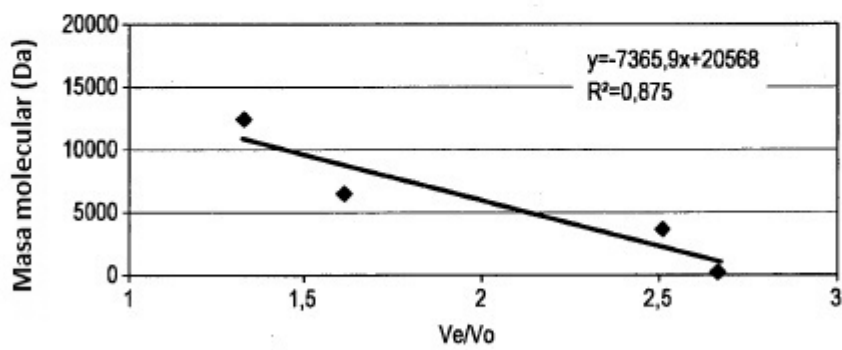


Fig. 4B

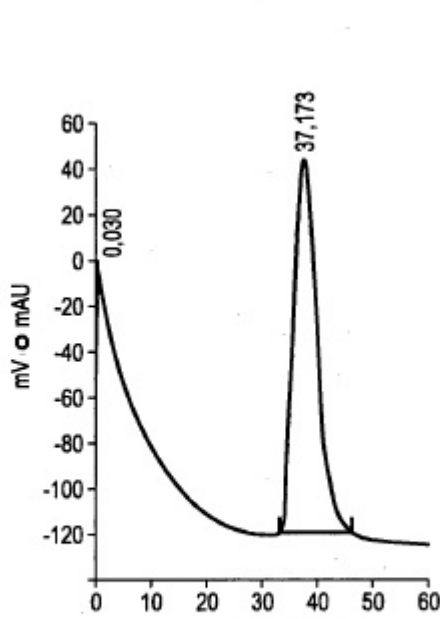


Fig. 5A

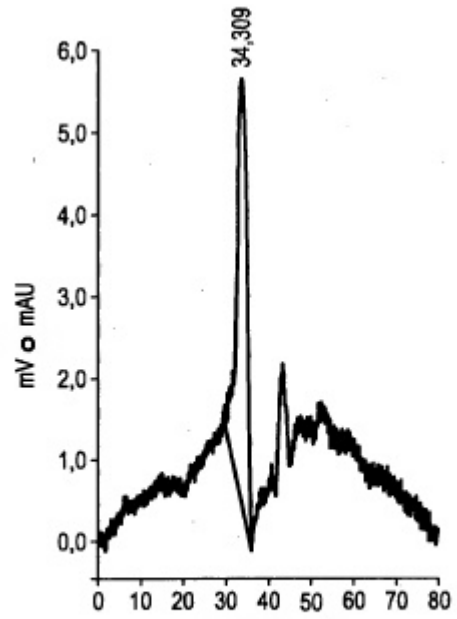


Fig. 5B

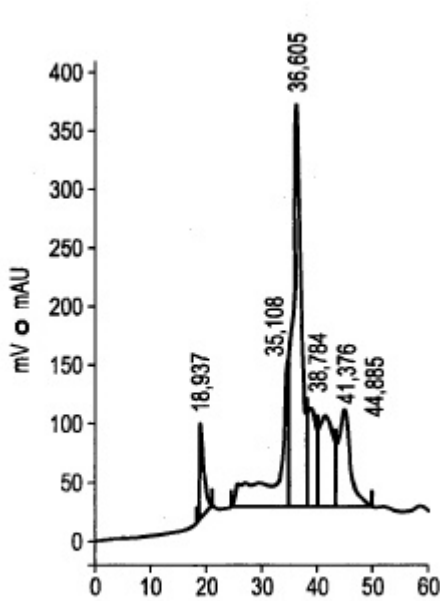


Fig. 6A

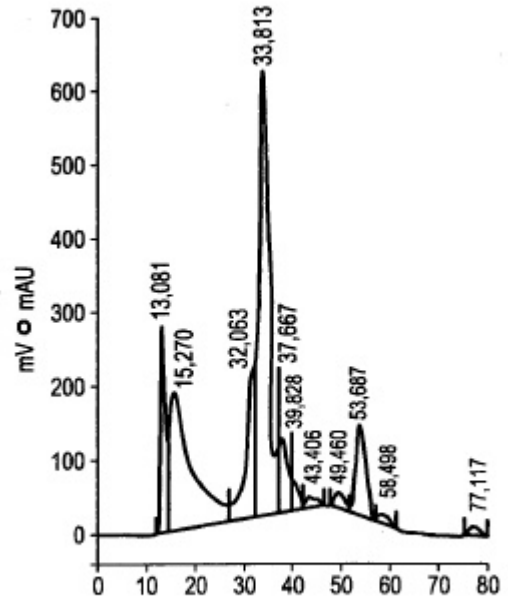


Fig. 6B

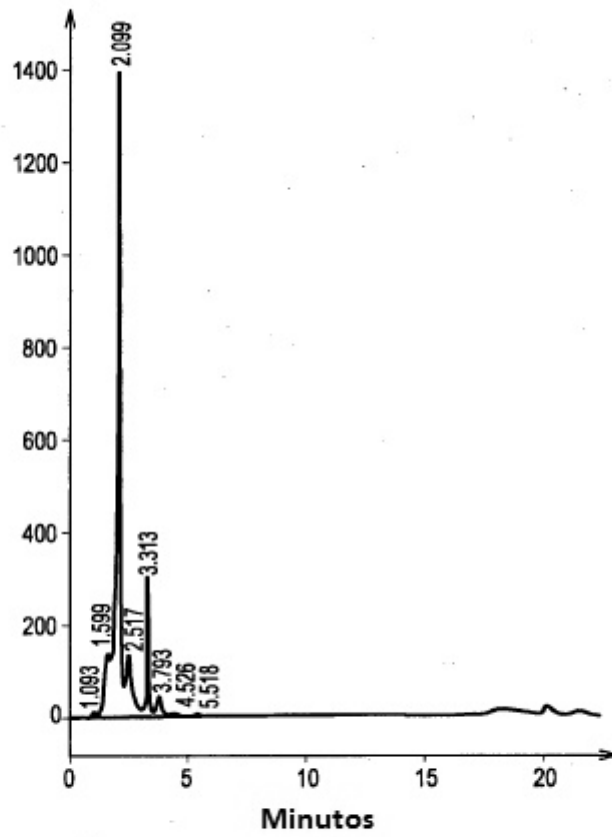


Fig. 7