

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 491**

51 Int. Cl.:

<b>A23L 3/3526</b>	(2006.01)	<b>A01N 43/16</b>	(2006.01)
<b>A23L 3/3544</b>	(2006.01)	<b>A23L 2/44</b>	(2006.01)
<b>C12G 1/02</b>	(2006.01)	<b>A23L 2/52</b>	(2006.01)
<b>B32B 5/16</b>	(2006.01)	<b>C12H 1/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)	<b>C08B 37/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/50</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)		
<b>A23L 29/275</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)		
<b>C08L 5/08</b>	(2006.01)		

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/FR2011/051368**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157955**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11734166 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2582730**

54 Título: **Quitosano en polvo**

30 Prioridad:

**18.06.2010 FR 1054887**

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

**16.11.2017**

73 Titular/es:

**KITOZYME (100.0%)  
Rue Haute Claire, 4 Parc Industriel des Hauts  
Sarts, Zone 2  
4040 Herstal, BE**

72 Inventor/es:

**BORNET, AURÉLIE;  
GAUTIER, SANDRINE;  
MAQUET, VÉRONIQUE;  
TEISSÉDRE, PIERRE-LOUIS;  
GRANES, DANIELS y  
PIC-BLATEYRON, LUCILE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 642 491 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

Quitosano en polvo

- 5 [0001] La invención se refiere a quitosano en polvo fino y controlado, para su utilización para luchar contra ciertas levaduras, como las *Brettanomyces*, y un procedimiento de tratamiento de un líquido alimenticio.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

- 10 [0002] Las *Brettanomyces* son descritas como un agente de contaminación de numerosos productos de fermentación incluyendo el vino, la sidra, la cerveza, la kombucha, el kéfir, el tequila, etc.

[0003] En el medio vitícola, la detección de levaduras de contaminación en el viñedo se ha vuelto delicada por el hecho de que son minoritarias en esta etapa. Sin embargo la fermentación (proceso de transformación de azúcares en alcohol) conlleva una verdadera "selección" de estos microorganismos. En efecto, las *Brettanomyces* son particularmente resistentes al etanol y al SO<sub>2</sub> y son capaces de subsistir en el medio a pesar de su empobrecimiento en azúcares. Además, ciertas técnicas o ciertos protocolos de vinificación puede favorecer el desarrollo de *Brettanomyces* en el vino, como la crianza sobre lías. Para que las *Brettanomyces* se puedan desarrollar, son suficientes menos de 500mg.

20 [0004] El impacto de las levaduras de contaminación *Brettanomyces* ha sido probado por numerosos autores sobre los vinos en diferentes países, los vinos espumosos alemanes, los vinos amarillos de Arbois, o los vinos del sur de Francia. En 1965, Domercq informó sobre el aislamiento de *Brettanomyces* en mostos de las denominaciones de Saint Emilion y las primeras costas de Burdeos y en los vinos tintos o blancos en proceso de conservación de las denominaciones Médoc, Graves y Saint-Emilion. En cuanto a cepas, la pinot parece ser la más afectada. En Borgoña, por ejemplo, para la cosecha 2000, un 50% de los vinos en fermentación obtenidos de esta cepa y un 25% tras su embotellamiento habían resultado afectados.

[0005] En definitiva, la maestría de esta alteración resulta difícil, incluso con las prácticas enológicas consideradas. Los medios de lucha son esencialmente preventivos, permiten actuar sobre las poblaciones de *Brettanomyces* (SO<sub>2</sub>, DMDC, pasteurización instantánea, filtrado). Sin embargo estos tratamientos modifican las cualidades organolépticas de los vinos y no preservan los vinos tratados con contaminaciones posteriores.

35 [0006] Este problema no está asociado solamente a los vinos, sino que se extiende a los líquidos alimentarios de origen vegetal producidos principalmente por fermentación.

[0007] El quitosano es conocido como auxiliar tecnológico, pero su uso en solución requiere concentraciones elevadas, generalmente del orden de 30 a 100g/hL. Por otra parte las propiedades antibacterianas y antifúngicas del quitosano han sido estudiadas extensamente y documentadas y son a día de hoy bien conocidas. El quitosano es conocido por su efecto antimicrobiano, en un tiempo relativamente corto, cuando es utilizado en solución con ácidos orgánicos, en general con PH ácido, en concentraciones del orden de 0.5 a 1,5% (pueden ser concentraciones de 0.5g/100ml, 5g/l, 500g/hl a 1000g/hl). Estas concentraciones son elevadas porque en la mayorías de las aplicaciones cosméticas, alimentarias o médicas se necesita un gran espectro de inhibición (bacterias, levaduras).

45 [0008] Del mismo modo, la actividad antifúngica del quitosano frente a diversos hongos exceptuando aquellos que contienen quitosano como componente importante de su pared celular es descrita también. El quitosano en solución ha sido estudiado para luchar contra las cepas fitopatógenas (*Fusarium*, *Rhizopus*, *Phyllum*, *Candida*, *Aspergillus*). El quitosano en solución ha sido igualmente estudiado con el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias lácticas (*Pediococcus* y *Lactobacillus*) durante la fermentación. Los autores demuestran que el quitosano inhibe de manera más pronunciada el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* que de las bacterias lácticas (*Pediococcus* y *Lactobacillus*).

55 [0009] La acción fungicida del quitosano en micropartículas con un tamaño inferior a 5mm es descrito por Allan C. y otros (Allan C. y otros, (1979) The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition Experimental Mycology, 3: 285-287) en pruebas de laboratorio destinadas a medir la inhibición del crecimiento de microorganismos en presencia y en ausencia del quitosano. Las concentraciones utilizadas son elevadas (0.1 a 6 g/L). No se han proporcionado datos sobre la lucha contra *Brettanomyces*. Además los autores han observado que la variabilidad de respuesta y la sensibilidad al quitosano dependen en gran medida del género y de la especie.

**[0010]** Gomes-Rivas y otros (Gomes-Rivas L. y otros, (2004) Sélective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations, J. Int Microbial Biotechnol 31:16-22) describen la acción del quitosano para luchar específicamente contra el género *Brettanomyces*/Dekkera. Sin embargo los autores describen el efecto del quitosano en polvo fino de micropartículas con un tamaño inferior a 420µm, DA 9%; DA = grado de acetilación) en el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* y de *Saccharomyces cerevisiae*. Las pruebas se realizan en un medio de cultivo. El efecto no se mide por tanto sobre la matriz de vino lo que hace aleatoria cualquier conclusión sobre el uso de dicho quitosano como auxiliar tecnológico. Los autores indican que el crecimiento de *B. bruxellensis* está inhibido durante las primeras 80 horas de tratamiento con quitosano pero que el crecimiento se reanuda al concluir este periodo de latencia. Muestran que el quitosano a 600 g/h permite controlar el crecimiento de *B. bruxellensis*. Esta concentración es por tanto muy elevada aún para un uso industrial conveniente.

**[0011]** La solicitud de patente US 2004/0176477 describe un quitosano micronizado soluble en el agua, utilizado como antimicrobiano frente a la *Malassezia furfur* y la *Staphylococcus epidermis*.

**[0012]** La solicitud de patente FR 2 599 048 enseña tras los ejemplos que se puede utilizar una concentración de quitosano de aproximadamente 80g por hectolitro de líquido alimentario para estabilizar dicho líquido alimentario, principalmente en términos de su color. Esta concentración de quitosano es aún muy elevada.

**[0013]** La patente US 6,482,456 describe una solución acuosa de quitosano, es decir quitosano soluble en el agua.

**[0014]** La solicitud de patente FR 1 164 984 enseña a utilizar el quitosano mezclado con bentonita cuando la cantidad de quitosano debe ser disminuida para aclarar zumos exprimidos.

**[0015]** Como se ha mencionado ya, en su forma catiónica, el quitosano está prevista de una actividad antimicrobiana en cepas. La presencia de grupos funcionales fácilmente sustituibles permite modificar las propiedades del quitosano y por tanto su actividad. Por ejemplo, el glutamato o el lactato del quitosano en solución ha sido utilizado ya para limitar una acción antimicrobiana o antifúngica.

**[0016]** Sin embargo el quitosano propuesto hasta la fecha no se utiliza como auxiliar tecnológico para responder a las necesidades de los profesionales del sector para la prevención del "riesgo *Brettanomyces*".

### **PROPÓSITOS DE LA INVENCIÓN**

**[0017]** Por esto la sociedad Kitozyme SA ha puesto en marcha un programa de investigación y desarrollo para encontrar un auxiliar tecnológico que resuelva los problemas técnicos descritos anterior y subsecuentemente.

**[0018]** La invención tiene como principal propósito resolver el nuevo problema técnico que consiste en proporcionar un auxiliar tecnológico, para luchar contra las levaduras del género *Brettanomyces*.

**[0019]** La invención tiene igualmente como propósito resolver el nuevo problema técnico que consiste en proporcionar un auxiliar tecnológico, para luchar contra las levaduras indeseadas en un líquido alimentario, y en concreto de un líquido alimentario preparado mediante fermentación, y principalmente las levaduras del género *Brettanomyces*.

**[0020]** La invención tiene también como propósito proporcionar un auxiliar tecnológico utilizable de manera fiable en términos de seguridad alimentaria y que no degrade la calidad de líquidos alimentarios tratados.

**[0021]** La invención tiene como propósito resolver estos problemas técnicos a escala industrial, principalmente para la industria de líquidos alimentarios, a los que eventualmente se añade alcohol y/o son fermentados.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

**[0022]** Por tanto, la presente invención se refiere a quitosano en polvo en el que la granulometría (diámetro de las partículas) está comprendido entre 0.1 y 200 micrómetros como se define en la reivindicación 1. De manera ventajosa, el quitosano comprende una granulometría comprendida entre 5 y 100 micras, y preferiblemente de entre 5 y 60 micras, y si es posible comprendida entre 5 y 50 micras.

**[0023]** Según una variante, el quitosano comprende una granulometría inferior a 70 micras, y preferiblemente inferior a 50 micras. De manera sorprendente, un polvo con una granulometría inferior a 100 micras permite obtener un efecto muy importante y muy rápido sobre la población de levaduras indeseadas. Este efecto está particularmente pronunciado cuando la granulometría es inferior a 50 micras.

5

**[0024]** La granulometría es aquella obtenida por difracción láser.

**[0025]** El quitosano de la invención tiene una granulometría que presenta un D (0.5) (diámetro medio de la distribución total con un 50% de volumen de partículas con un diámetro inferior a este valor y un 50% con un diámetro superior) comprendido entre 5 y entre 30µm, preferiblemente entre 10 y 30µm, y si es posible entre 10 y 25µm. D (0.5) representa por tanto el medio de la distribución teniendo en cuenta las áreas bajo la zona de distribución de la granulometría.

10

**[0026]** Según una variante, el quitosano puede ser utilizado después del tamizado.

15

**[0027]** Preferiblemente, el quitosano comprende un grado de acetilación (DA) comprendido entre 0 y 30 mol%. El grado de acetilación es la relación entre el número de unidades de N-Acetilglucosamina y el número de monómeros totales. El grado de acetilación del quitosano es determinado mediante valoración potenciométrica que consiste en determinar el grado de acetilación del quitosano mediante la valoración de grupos de aminas. Está basada en los trabajos de Rinaudo y otros, (1999). Brevemente, el quitosano se introduce en solución con un exceso de ácido clorhídrico diluido. Las aminas agrupadas (en las unidades de glucosamina no acetiladas (G)) son cargadas positivamente (HCl en exceso). La solución es entonces valorada con una solución de NaOH diluido, con ayuda de un valorador automático (KEM, automatic potentiometric titrator, AT-500N) y se mide el pH. En la primera parte de la reacción, se determina la cantidad del exceso de HCl. A continuación, se determina la cantidad de grupos de aminas cargados:

20

25

La curva de valoración muestra dos puntos de inflexión. La diferencia entre los dos volúmenes de NaOH permite conocer la cantidad de aminas libres.

**[0028]** Se hace referencia al quitosano en el documento N°CAS 9012-76-4. El quitosano de la invención es un polisacárido preparado a partir de un origen fúngico. Es extraído y purificado a partir de fuentes fúngicas alimentarias o biotecnológicas seguras y abundantes como *Agaricus bisporus* o *Aspergillus niger*. El quitosano es obtenido mediante hidrólisis de un extracto rico en quitina, La quitina es un polisacárido compuesto de múltiples unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas entre ellas por un enlace de tipo β (1,4). El quitosano está compuesto por unidades de azúcares de glucosamina (unidades desacetiladas) y unidades de N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) unidas entre ellas por enlaces de tipo β (1,4) y constituido por un polímero del tipo Poli(N-acetil-D-glucosamina)-poli(D-glucosa). En la invención, el porcentaje de glucanos (unidades D-glucosas) es preferiblemente inferior al 15% (masa/masa) del polímero.

30

**[0029]** El quitosano de la invención es útil como auxiliar tecnológico. Por auxiliar tecnológico se entiende una sustancia o materia a excepción de todo equipo o instrumental, que no es consumido como ingrediente alimentario en sí mismo, que es utilizado intencionadamente en la transformación de materias primas, de productos alimenticios o de sus ingredientes, para responder a un cierto objetivo tecnológico durante el tratamiento o la transformación y puede tener como resultado la presencia no intencional pero inevitable de residuos o de alimentos en el producto final (definición del CODEX Alimentario).

40

**[0030]** El quitosano de la invención es de manera ventosa de origen fúngico, y preferiblemente obtenidos del micelio de un hongo del tipo *Ascomycète*, y en concreto, de *Aspergillus niger*, y/o de un hongo *Basidiomycète*, y en concreto, *Lentinula edodes* (shiitake) y/o *Agaricus bisporus*. Preferiblemente el hongo es *Aspergillus niger*. El quitosano puede ser de origen OGM, pero preferiblemente es de origen no OGM. Cualquier tipo de quitosano puede ser utilizado. Un proceso de preparación del quitosano es descrito en las patentes WO03068824 (EP1483299 ; US 7,556,946).

50

**[0031]** Numerosos estudios demuestran que la actividad antimicrobiana del quitosano varía en función del grado de acetilación (DA) y de la masa molecular (Masa Molecular: MW) del quitosano. La invención cubre de esta manera los diferentes dominios de DA y MW.

55

**[0032]** Los dos parámetros (DA y MW) afectan a la actividad antimicrobiana del quitosano independientemente, sin embargo parece que la influencia de la MW es más importante en la actividad

antimicrobiana que la influencia de la DA (Sekiguchi, S., and al. (1994) Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers, in: Nishinari, K. & Doi, E. (Eds), "Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions", Plénum Press, New York).

5 **[0033]** Para citar ejemplos recientes, estudios efectuados en bacterias donde destacan los de Omura, Y., and al. (Omura, Y., and al. (2003) Antimicrobial activities of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights Biocontrol. Sci., 8(1) : 25-30); Tsai, G. J.; Zhang, S. L., Shieh, P. L. (Tsai, G. J. et al. (2004) Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained from Cellulase Digestion of Chitosan J. Food Prot., 67(2) : 396-398); Zivanovic S., et al. (Zivanovic S. et al., (2004) Molecular Weight of Chitosan Influences Antimicrobial  
10 Activity in Oil-in-Water Emulsions J. Food Prot., 67(5): 952-959.

**[0034]** Para los hongos, Eaton, P. y otros (Eaton, P. y otros, (2008) Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus Ultramicroscopy, 108 (10): 1128-1134.) han descubierto que cuanto más débil sea la masa molecular (MW) del quitosano, mejor es el efecto inhibidor  
15 del quitosano sobre el crecimiento y la multiplicación de microorganismos.

**[0035]** De la misma manera, numerosos estudios han demostrado una relación inversa entre el DA del quitosano y su actividad antimicrobiana (Hongpattarakere, T., and al. (2008) Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (Penaeus monodon) Songklanakarin  
20 J. Sci. Technol. 30(1): p.1-9; Tsai, G. J., y otros (2002) Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments Fisheries Sci., 68 (1): 170-177).

**[0036]** La invención se refiere igualmente una composición que comprende quitosano como el que se ha definido anteriormente.  
25

**[0037]** En concreto, la invención se refiere a una suspensión de quitosano de la invención. Más particularmente esta suspensión es adaptada para su utilización como auxiliar tecnológico, por ejemplo en términos de su composición cualitativa

30 **[0038]** El quitosano está incorporado en forma de polvo en el líquido alimentario a tratar. Es usado principalmente para realizar una estabilización microbiológica mediante la eliminación de *Brettanomyces*.

**[0039]** El quitosano de la invención es por tanto insoluble en agua. Se entiende por "insoluble en el agua" un quitosano que tiene al menos un 90% y preferiblemente un 95% (masa/masa), no es soluble en agua destilada. En  
35 los ejemplos, dado que el quitosano está considerado totalmente insoluble podemos atribuir el porcentaje de materias solubles en el agua a impurezas.

**[0040]** El quitosano de la invención, insoluble, posee una parte cristalina, generalmente superior al 2% (masa/masa) tras su hidratación.  
40

**[0041]** Antes de su utilización como auxiliar tecnológico, el quitosano está suspendido y mezclado en un líquido (como por ejemplo agua) compatible con el líquido alimenticio que se va a tratar, es decir, que no es perjudicial para la utilización final del líquido alimenticio. La relación másica de quitosano/líquido (por ejemplo: quitosano/agua) está comprendido preferiblemente entre 1/1 y 1/10, y preferiblemente de 1/5 (masa/masa; m/m) El  
45 quitosano no se diluye en el agua, hace falta remover bien la mezcla previa. Preferiblemente la mezcla es removida justo antes de añadirla al líquido a tratar.

**[0042]** El quitosano o suspensión de quitosano de la invención es añadido al líquido alimenticio a tratar. El quitosano debe ser igualmente homogéneo en el conjunto del volumen de líquido a tratar y por ejemplo durante un  
50 reensamblado vertiendo el producto en pequeños volúmenes, para asegurar una buena distribución en la masa del vino. El quitosano debe entonces ser añadido progresivamente. Es preferible homogeneizar el líquido a tratar a la vez que se añade el quitosano. Para el tratamiento de un vino, volver a ensamblar por completo la cuba es normalmente necesario. Al finalizar el tratamiento, el quitosano (auxiliar tecnológico) es eliminado mediante extracción para eliminar el quitosano y los microorganismos absorbidos. Se realiza esta etapa de eliminación por  
55 ejemplo tras un tiempo de acción de 7 días a 10 días y tras la decantación natural del líquido a tratar, y típicamente durante el tratamiento de un líquido alimenticio fermentado como un vino.

**[0043]** La invención se refiere igualmente a la utilización de quitosano o de una composición como la que se ha definido anteriormente, por su cualidad antifúngica, y principalmente para luchar contra las levaduras, en concreto

las levaduras *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, y aún más concretamente las levaduras *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. clausenii*, *B. custersianus*, *B. lambicus*, *B. naardenensis*, y/o *B. nanus*. La acción del quitosano de la invención no está limitada a una cepa concreta porque se hayan probado varias cepas del mismo tipo. Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones de quitosano de la técnica conocida anterior son elevadas porque en la mayoría de las aplicaciones cosméticas, alimentarias o médicas se necesita un gran espectro de inhibición (bacterias, levaduras). Sin embargo este efecto no es investigado en la presente invención, en cambio hace falta evitar la inhibición de bacterias y de levaduras por ejemplo durante una fermentación como en la crianza de vinos por ejemplo. La invención es por tanto sorprendente ya que con dosis muy débiles (<10g/hl), el quitosano de la invención actúa de manera selectiva en las levaduras indeseadas.

10

**[0044]** La invención está relacionada por otra parte con la utilización de quitosano o de un componente como los que se han definido anteriormente, por su cualidad antifúngica, y principalmente para luchar contra las levaduras indeseadas en un líquido alimenticio, y principalmente de origen vegetal, es decir preparado a partir de plantas (uva, manzana, patata, remolacha, etc), y en concreto de un líquido alimenticio preparado por fermentación, por ejemplo un vino, una cerveza, una sidra, un vino efervescente, o un zumo de fruta. La invención está relacionada con el tratamiento de líquidos alimentarios como el agua, las bebidas fermentadas (bebidas obtenidas por transformación de azúcares diluidos en alcohol, por fermentación del producto base), los vinos de licor (mosto al que se le añade alcohol), las bebidas espirituosas (obtenidas por destilación de bebidas fermentadas). Los vinos de licor más corrientes son: el Pineau de Charentes (a base de Coñac), el Floc de de Gacone (a base de Armagnac), el Ratafia de Champaña y de Borgoña, el Riquiqui, el Macvin del Jura, la Cataroise de Béziers, el Pommeau de Normandía (a base de Calvados). Los líquidos alimenticios pueden obtenerse de diferentes partes de plantas: hojas, raíces, cereales, fruto, etc. La invención se refiere por tanto a todos los líquidos alimenticios, y comprende cualquier líquido susceptible de ser contaminado por levaduras indeseadas del tipo *Brettanomyces*; los líquidos obtenidos de la fermentación (alimentarios o no), como el mosto antes de la fermentación o en proceso de fermentación, o del líquido fermentado (por ejemplo mosto/biomasa de vegetales - patata, remolachas,... - o uvas); los líquidos alimenticios de origen vegetal no fermentados (zumo de frutas), y los líquidos alimenticios obtenidos de la fermentación de mostos de uvas.

15

20

25

**[0045]**

El tratamiento de la invención es por tanto principalmente aplicable al pisco, Pineau des Charentes, aguardientes, sidra, cerveza, alcohol con destino industrial y vino.

30

**[0046]**

Se ha descubierto de manera sorprendente que el quitosano de la invención puede utilizarse como antifúngico contra las levaduras indeseadas en un líquido alimenticio, y principalmente de origen vegetal, eventualmente fermentado que es generalmente complejo en términos de su composición. La capacidad del quitosano para eliminar las levaduras, principalmente aquellas de los géneros o especies citadas anteriormente dentro de un líquido alimenticio vegetal, en los ya obtenidos o los que están aún en proceso de fermentación, sin que ésta pudiera predecirse.

35

**[0047]**

Según otro aspecto, la invención está relacionada con un procedimiento de tratamiento curativo y/o preventivo de un líquido alimenticio, y principalmente de origen vegetal, en concreto de un líquido alimenticio de origen vegetal preparado por fermentación, en el que se quieren eliminar las levaduras indeseadas, cuya presencia hay que prevenir, y/o cuya población hay que limitar, y en concreto de levaduras del género *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, y más concretamente las levaduras *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. clausenii*, *B. custersianus*, *B. lambicus*, *B. naardenensis*, y/o *B. nanus*, comprendiendo el procedimiento mencionado la puesta en contacto de un líquido alimenticio con un quitosano o una composición como la definida anteriormente.

40

45

**[0048]**

La invención se refiere también a un procedimiento de higiene y prevención en un local de producción (fábrica de producción, bodega, etc.), que permite principalmente evitar una para de la producción para limpiar. El uso preventivo es importante de manera general (higiene preventiva de las bodegas o de la fábrica), tanto como el tratamiento curativo.

50

**[0049]**

El líquido alimenticio a tratar según la invención es en concreto un vino, una cerveza o una sidra.

**[0050]**

Las levaduras indeseadas son principalmente *B. anomalus* y/o *B. bruxellensis*. La invención se refiere en concreto a un procedimiento de tratamiento de un líquido alimenticio, eventualmente fermentado, para luchar con la presencia de levaduras del género *Brettanomyces*, y en concreto de la especie *Brettanomyces bruxellensis*.

55

**[0051]**

Según una variante preferida el quitosano está presente en una concentración de 1 a 10 g/hL de líquido alimenticio a tratar, y preferiblemente comprendido entre 2 y 5 g/hL de líquido alimenticio a tratar. La

concentración utilizada es por tanto particularmente débil en comparación con otros productos de la técnica anterior, que necesitan a menudo más de 20g/hL como un tratamiento con dicarbonato de dimetilo (DMDC).

5 **[0052]** El líquido alimenticio es puesto en contacto con el quitosano durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar, limitar o prevenir la presencia de levaduras, principalmente las levaduras descritas anteriormente. Este periodo de tiempo es generalmente de al menos 3 días, y preferiblemente de al menos 5, y si es posible de al menos 7 días.

10 **[0053]** Se entiende por "eliminar" la presencia de las levaduras, el hecho de reducir la población de levaduras indeseadas por debajo del umbral de detección (10UFC/mL). Por "eliminar" se entiende limitar la población en al menos un factor 10 e incluso 100 la población de levaduras indeseadas. Por "prevenir" se entiende impedir el desarrollo, la proliferación y/o limitar la población indeseadas.

15 **[0054]** El tratamiento puede efectuarse en un líquido alimenticio en proceso de fermentación. En efecto, se ha descubierto de manera sorprendente que el quitosano de la invención permite continuar una fermentación, y principalmente una fermentación alcohólica y/o maloláctica. La fermentación no es alterada por la presencia del quitosano de la invención. El quitosano de la invención no tiene principalmente efectos nefastos sobre una población de *Saccharomyces cerevisiae*.

20 **[0055]** El quitosano y/o la composición que comprende el quitosano, está preferiblemente separado, por ejemplo mediante extracción, encolado, filtrado y o centrifugado del líquido alimenticio para conservar el líquido alimenticio. El líquido alimenticio puede ser extraído después de un tiempo de contacto suficiente con el quitosano de la invención.

25 **[0056]** Otros objetivos, características y ventajas de la invención se harán evidentes a los expertos de la técnica tras la lectura de la descripción explicativa que hace referencia a los ejemplos que se dan solamente a modo de ilustración y que no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

30 **[0057]** Los ejemplos son parte integrante de la presente invención y toda característica que aparezca como nueva en relación a un estado cualquiera de la técnica anterior a partir de la descripción considerada en su conjunto, incluyendo los ejemplos, es una parte integrante de la invención en su función y en su alcance.

**[0058]** Por tanto, cada ejemplo tiene un alcance general.

35 **[0059]** Por otra parte, en los ejemplos, todos los porcentajes se refieren al peso, si no se indica lo contrario, y la temperatura está expresado en grados Celsius a menos que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, a menos que se indique lo contrario.

**EJEMPLOS**

40

**A- Las cepas de levadura**

45 **[0060]** Las cepas de *Brettanomyces bruxellensis* utilizadas para su inoculación artificial son cepas identificadas como mayoritarias en el viñedo mediterráneo y tienen genotipos 100% A y 100% B. Proviene de la colección de cepas ICV-ADN<sup>id</sup>. Se conservan a 4°C en un medio de agar inclinado (medio YAC) tras 7 días de incubación a 28°C.

**B- El medio y las condiciones de cría de la masa madre**

50 **[0061]** La masa madre es un medio de aclimatación en el que las levaduras pueden crecer y alcanzar una población del orden de 10<sup>7</sup>UFC/ml, adaptándose además a un entorno poco favorable (pH ácido, tasa de etanol elevada). La composición de la masa madre utilizada para los experimentos se describe en la siguiente Tabla 1:

**Tabla 1-** Composición del medio de fermentación para la *Brettanomyces bruxellensis*

55

Compuestos	Concentraciones/condiciones
Base de Nitrógeno para Levaduras	6,7g/l
Glucosa	20g/l

Etanol	10%(v/v)
Agua desmineralizada	Completar al volumen deseado
pH	Ajustar a 3,5 con cristales de ácido tartárico
Esterilización	20 mins. a 121 mins.

### C- Técnicas analíticas de recuento

**[0062]** El recuento de *Brettanomyces* viables se hace mediante el cultivo en un medio específico de agar YAC (YEPD + Actidione + Cloranfenicol) según el siguiente protocolo: las muestras son extraídas y diluidas en cascada en un entorno estéril, en tubos que contienen 9ml o 9,9ml de agua fisiológica estéril. Se cultivan 100µl por dispersión en un medio de agar YAC, a partir de la adecuada disolución para tener entre 30 y 300 colonias en el agar. Las placas son incubadas a 28°C durante 10 días. Se duplican los cultivos.

### 10 D- Micronización del quitosano

**[0063]** El quitosano es obtenido originalmente por extracción y desacetilación (hidrólisis de los grupos de N-acetil-glucosamina) del micelio de *Aspergillus niger* por acción de la sosa. Tras varias etapas de lavado y purificación, el quitosano está entonces secado y molido para alcanzar la granulometría deseada. Podemos igualmente utilizar un quitosano insoluble en agua disponible comercialmente para micronizarlo después. El quitosano micronizado resultante debe ser insoluble en agua conforme a la invención.

**[0064]** La micronización del quitosano obtenido de una fuente fúngica (*Aspergillus niger*) se realiza con la ayuda de un molino de chorros opuestos. Pueden utilizarse diferentes marcas y modelos de equipamiento según las cantidades de polvo a tratar: por ejemplo equipamiento de la marca Hozokawa - Alpine (modelo 200 AFG) para las cantidades >200kg y por ejemplo equipamiento de la marca Netzsch - modelo CGS 10 para las cantidades más pequeñas.

**[0065]** El polvo es molido continuamente hasta que se pasa el polvo micronizado a través de una turbina de selección para obtener un polvo en el que las partículas tienen un diámetro inferior a 100 µm; incluso a 50µm. Un análisis granulométrico del polvo se realiza entonces con ayuda de un difractómetro Laser Mastersizer 2000 de la marca Malvern Instruments Ltd.

**[0066]** El D(0.50) está comprendido entre 10 y 30µm y preferiblemente entre 10 y 25µm, incluso entre 10 y 20µm.

### E- Características de los lotes de quitosano utilizados en los ejemplos 1-26

**[0067]**

Tabla 1

Ejemplo	DA (% mol)	Granulometría (por difractometría láser)	Granulometría (por tamizado)	Contenido en quitosano (%)	Glucanos residuales (%)
2,3	22	ND	<50mm	89.6	6.7
1.1	ND	ND	ND	ND	ND
1.2 10-15	4.2	<50mm; D (0.5): 13.6mm	ND	87	5.2
4	22	ND	<25mm, <50mm, <90mm	89.6	6.7
5	8.5	ND	ND	89.6 90.8	6.7 7.6
6.1	8.5	ND	<25mm, <90mm	90.8	7.6
6.2	22	ND	<25mm, <90mm	89.6	6.7
7-9; 16	22	ND	<50mm	89.6	6.7
17	4.2	D(0.5): 13.6	<50mm	87	5.2
18	4.2	D(0.5): 13.6	<50mm	87	5.2
19	14:30	D (0.5):14.1	<50mm	87	10.86
20	11.80	D (0.5):14.0	<50mm	90	8.3

21	11.80	D (0.5):14.0	<50mm	90	8.3
22	12:47	D (0.5):13.6	<50mm	88	10:21
23	14:49	D (0.5):11.2	<50mm	87	7.77
26	11.80	D (0.5):14.0	<50mm	90	8.3

\*calculado restando las cenizas, proteínas y glucanos al peso de la muestra seca. ND: No determinado.

[0068] Cierta porcentaje de glucanos residuales subsiste en el quitosano.

**EJEMPLO 1.1- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en diferentes dosis (prueba de laboratorio)**

[0069] Un vino fino de Médoc (Merlot) cosecha 2006 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $2,8 \cdot 10^5$  células/ml ha sido tratado añadiéndole quitosano en diferentes dosis.

10 **Tabla 2-** Recuento por PCR cuantitativa de las *Brettanomyces bruxellensis* 7 días después del tratamiento.

Dosis de tratamiento	Control	0,2g/hl	0,5g/hl	0,7g/hl	1g/hl	2g/hl	5g/hl
Recuento de <i>Brettanomyces</i>	$2.8 \cdot 10^5$	3563	1527	509	254	0	0

[0070] Tras 7 días de tratamiento, el quitosano en una dosis de 2g/hL permite una eliminación total de las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en el vino.

15 **EJEMPLO 1.2- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces intermedius* con ayuda de quitosano en diferentes dosis (prueba de laboratorio)**

[0071] Un vino fino de la cosecha 2009 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces intermedius* de  $3,7 \cdot 10^6$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano (DA≈4,2mol%) en diferentes dosis. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

**Tabla 3-** Recuento por PCR cuantitativa y en el medio de agar específico de las *Brettanomyces bruxellensis* 10 días después del tratamiento.

Dosis de tratamiento	Control	0 g/hl	2 g/hl	3 g/hl	4 g/hl
Recuento de <i>Brettanomyces</i> (q-PCR)	$3.7 \cdot 10^6$	$8.8 \cdot 10^6$	$2.3 \cdot 10^2$	$1.0 \cdot 10^3$	30
Recuento de <i>Brettanomyces</i> (medio de agar)	$1.1 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^6$	30	<1	1

25 [0072] Tras 10 días de tratamiento, el quitosano permite una disminución importante de las *Brettanomyces intermedius* presentes en el vino con la dosis de 4g/hl.

**EJEMPLO 2- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa A con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hL (prueba de laboratorio)**

30 [0073] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa A de  $10^6$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl o añadiendo DMDC en una dosis de 20g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

35 [0074] **Figure 1-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa A en el vino tras el tratamiento

**Leyenda -**

40 [0075]

**Modalidad 1:** Control;

**Modalidad 2:** Tratamiento con la ayuda de DMDC 20g/hL;

**Modalidad 3:** Tratamiento con la ayuda de quitosano 4g/hL.

[0076] Se constata que el tratamiento con ayuda de quitosano (modalidad 3) es más eficaz que el tratamiento con ayuda del DMDC (modalidad 2) frente a la cepa de *Brettanomyces bruxellensis*. En efecto, se constata una reducción significativa de la población de *Brettanomyces bruxellensis* cepa A ( $\leq 10$  UFC/ml) después de entre 5 y 10 días con los dos tipos de tratamiento.

**EJEMPLO 3- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa B con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hL (prueba de laboratorio)**

10 [0077] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa B de  $10^5$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl o añadiendo DMDC en una dosis de 20g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

15 [0078] **Figure 2-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* de la cepa B en el vino tras el tratamiento

**Leyenda -**

20 [0079]

- Modalidad 1:** Control;
- Modalidad 2:** Tratamiento con la ayuda de DMDC 20g/hL;
- Modalidad 3:** Tratamiento con la ayuda de quitosano 4g/hL

25 [0080] Se constata que el tratamiento con ayuda de quitosano (modalidad 3) es más eficaz que el tratamiento con ayuda del DMDC (modalidad 2) frente a la cepa de *Brettanomyces bruxellensis*. En efecto, se constata una reducción significativa de la población de *Brettanomyces bruxellensis* cepa B ( $\leq 10$  UFC/ml) después de entre 5 y 10 días con los dos tipos de tratamiento.

30 **EJEMPLO 4- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano de diferentes granulometrías en una dosis de 4 g/hl (prueba de laboratorio)**

35 [0081] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $10^5$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano de diferentes granulometrías: <25 $\mu$ m, <50 $\mu$ m, <90 $\mu$ m en una dosis de 4g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

[0082] **Figure 3-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino tras el tratamiento.

**Leyenda -**

40

[0083]

- Modalidad 1:** Control;
- Modalidad 2:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <25 $\mu$ m ;
- 45 **Modalidad 3:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <50 $\mu$ m ;
- Modalidad 4:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <90 $\mu$ m .

50 [0084] Tras 7 días de tratamiento, la utilización de quitosano de granulometría <25 $\mu$ m (modalidad 2) y de granulometría <50 $\mu$ m (modalidad 3) provoca una disminución de la población *Brettanomyces bruxellensis* en un factor 5000 a 10000 para alcanzar el umbral de detección ( $\leq 10$  UFC/ ml).

[0085] El quitosano que presenta una granulometría de <90 $\mu$ m (modalidad 4) ha permitido reducir la población de *Brettanomyces bruxellensis* al umbral de detección ( $\leq 10$  UFC/ ml) en 10 días, siendo 3 días más que las otras modalidades.

55

**EJEMPLO 5- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano de diferentes grados de acetilación en una dosis de 2 g/hl (prueba de laboratorio)**

[0086] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Cabernet Sauvignon) cosecha 2008 que presenta un

nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $5 \cdot 10^5$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano de diferentes grados de acetilación: 8,5mol%, 22,0mol% en una dosis de 2g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

5 [0087] **Figure 4-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino tras el tratamiento.

**Leyenda -**

[0088]

10

**Modalidad 1:** Control;

**Modalidad 2:** Tratamiento con quitosano 2g/hl - DA 22mol% ;

**Modalidad 3:** Tratamiento con quitosano 2g/hl - DA 8,5mol% ;

15 [0089] Tras 11 días de tratamiento, la utilización de quitosano de DA 22mol% (modalidad 2) y de DA 8,5mol% (modalidad 3) provoca una disminución de la población *Brettanomyces bruxellensis* en un factor 100.

**EJEMPLO 6.1- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano de diferentes granulometrías en una dosis de 4 g/hl (prueba de laboratorio)**

20

[0090] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $10^5$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano (DA≈8,5mol%) de diferentes granulometrías: <25µm, <90µm en una dosis de 4g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

25

[0091] **Figure 5A-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino tras el tratamiento.

**Leyenda -**

30 [0092]

**Modalidad 1:** Control;

**Modalidad 2:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <25µm ;

**Modalidad 3:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <90µm ;

35

[0093] Tras 9 días de tratamiento, la utilización de los lotes de quitosano que presentan una granulometría de <25µm (modalidad 2) ; <90µm (modalidad 3) tienen permiso para hacer descender la población de *Brettanomyces bruxellensis* al umbral de detección ( $\leq 10$  UFC/ ml) mientras que la población de control no tratada (modalidad 1) se mantiene durante el mismo lapso de tiempo a su nivel inicial ( $10^5$ UFC/ml).

40

**EJEMPLO 6.2- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano de diferentes granulometrías en una dosis de 4 g/hl (prueba de laboratorio)**

45 [0094] Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $10^5$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano (DA≈22mol%) de diferentes granulometrías: <25µm, <90µm en una dosis de 4g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

50 [0095] **Figure 5B-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino tras el tratamiento.

**Leyenda -**

[0096]

55 **Modalidad 1:** Control;

**Modalidad 2:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <25µm ;

**Modalidad 3:** Tratamiento con quitosano 4g/hl - granulometría <90µm ;

[0097] Tras 9 días de tratamiento, la utilización del lote de quitosano que presenta una granulometría de

<25µm (modalidad 2) tiene permiso para hacer descender la población de *Brettanomyces bruxellensis* al umbral de detección (≤10 UFC/ ml) mientras que la población de control no tratada (modalidad 1) se mantiene durante el mismo lapso de tiempo a su nivel inicial (10<sup>5</sup>UFC/ml).

- 5 **[0098]** El quitosano que presenta una granulometría de <90µm (modalidad 3) ha permitido reducir la población de *Brettanomyces bruxellensis* al umbral de detección (≤10 UFC/ ml) en 21 días, siendo 12 días más que la modalidad 2

10 **EXEMPLE 7- Eficacia del tratamiento con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hl en un vino tinto en el que la duración de la implantación de *Brettanomyces bruxellensis* varía (prueba de laboratorio)**

15 **[0099]** Un vino terminado de Languedoc Roussillon (Merlot) de la cosecha 2008 en el que las *Brettanomyces bruxellensis* se han implantado en el vino 3 días o 24 horas después de haber sido tratadas por adición de quitosano en una dosis de 4g/hl. **Figure 6-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino tras el tratamiento.

**Leyenda -**

20 **[0100]**

**Modalidad 1:** Tratamiento con 4g/hL de quitosano en una población de *Brettanomyces bruxellensis* 3 días después de ser implantada;

**Modalidad 2:** Tratamiento con 4g/hL de quitosano en una población de *Brettanomyces bruxellensis* 24 días después de ser implantada;

25

**[0101]** Este ejemplo permite demostrar que el impacto del quitosano frente a las *Brettanomyces bruxellensis* depende de su duración de implantación en el vino. De esta manera la población de *Brettanomyces bruxellensis* implantadas tras 24 horas en el vino (modalidad 2) son más sensibles al quitosano. Al cabo de 7 días, la población de *Brettanomyces bruxellensis* ha disminuido para alcanzar el umbral de detección (≤10 UFC/ ml) mientras que hacen falta 10 días para alcanzar este mismo resultado en una población de *Brettanomyces bruxellensis* implantada recientemente (modalidad 1).

35 **EXEMPLE 8- Impacto de la utilización del quitosano en una dosis de 4g/hl en las *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras importantes en el proceso de fermentación alcohólica de los vinos) (prueba de laboratorio)**

**[0102]** Un zumo de uva blanca de la marca Casino ha sido suplementado con azúcar para alcanzar el contenido de 200g/l y con nitrógeno para alcanzar un contenido superior a 200g/l que después se inocula con *Saccharomyces cerevisiae* ICV D47® en una dosis de 30g/hl.

40 **[0103]** El quitosano ha sido añadido durante el proceso de fermentación alcohólica en dos momentos diferentes:

- densidad de 1035: 3 días después de la adición de las levaduras

- densidad de 1015: 6 días después de la adición de las levaduras

45

El mosto de control no ha recibido ningún tratamiento.

**[0104]** **Figura 7-** Evolución de la población de *Saccharomyces cerevisiae* y seguimiento de la densidad en el mosto antes y después del tratamiento con quitosano.

50

**Leyenda -**

**[0105]**

55 **Modalidad 1:** Mosto de control

**Modalidad 2:** Tratamiento con quitosano en una dosis 4g/hl - 3 días después de la adición de las levaduras (densidad 1035);

**Modalidad 3:** Tratamiento con quitosano en una dosis 4g/hl - 6 días después de la adición de las levaduras (densidad 1031)

[0106] La cinética de crecimiento de la población de *Saccharomyces cerevisiae* alcanza su valor máximo del orden de  $6.10^7$ UFC/ml tras 3 días de fermentación, después el número de levaduras se mantiene en  $5.10^7$ UFC/ml durante 10 días para iniciar su fase de decrecimiento tras 13 días de fermentación. Esta cinética es similar para todas las modalidades. En consecuencia podemos concluir que el quitosano no ha tenido impacto negativo en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

**EXEMPLE 9- Impacto de la utilización del quitosano en una dosis de 4g/hl en las *Oenococcus oeni* (bacterias importantes en el proceso de fermentación maloláctica de los vinos) (prueba de laboratorio)**

10 [0107] Un vino tinto del Languedoc Roussillon (Merlot) cosecha 2008 terminando la fermentación alcohólica ha sido inoculado o no con *Oenococcus oeni* Elios 1 ®

15 [0108] El quitosano ha sido añadido en el marco de una fermentación maloláctica en modo espontáneo, es decir en el marco de una fermentación maloláctica por inoculación.

[0109] El vino de control no sufre ni la inoculación de *Oenococcus oeni* ni el tratamiento con quitosano.

20 [0110] **Figura 8 --** Evolución de la población de *Oenococcus oeni* y seguimiento de la degradación en ácido málico en el vino antes y después del tratamiento con quitosano.

**Legenda -**

25 [0111]

**Modalidad 1:** Vino de control en fermentación maloláctica en modo espontáneo - sin tratamiento con quitosano

**Modalidad 2:** Vino en fermentación maloláctica en modo espontáneo - tratamiento con quitosano 4g/hl

**Modalidad 3:** Vino en fermentación maloláctica por inoculación - tratamiento con quitosano 4g/hl 8 días antes de la inoculación.

30 [0112] Un tratamiento con quitosano realizado 8 días antes de la inoculación en bacterias lácticas no tiene impacto en la realización de la fermentación maloláctica (modalidad 3).

35 [0113] En el caso de una fermentación maloláctica espontánea (modalidad 2), el tratamiento con quitosano tiene el efecto de alargar la fase de latencia de la fermentación maloláctica de 3 días.

40 [0114] En conclusión, el quitosano no tiene impacto en el desarrollo de la fermentación maloláctica (ya sea en modo espontáneo, o en inoculación). Sin embargo, se recomienda esperar 8 días tras el fin del tratamiento antes de realizar una inoculación en bacterias lácticas.

**EJEMPLO 10- Tratamiento de un vino tinto en proceso de fermentación alcohólica contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl, (cuba de 350hl)**

45 [0115] Un vino tinto en proceso de fermentación alcohólica languideciente (Merlot) de la bodega C que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis* <10UFC/ml ha sido tratado por adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

**Tabla 4 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del tratamiento	12.4	14.1	4.3	0:24	3:53	1:03	<0.4
Después del tratamiento	9.9	14:26	4:39	0:19	3:55	1:03	<0.4

50 [0116] Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

**Tabla 5-** Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7).

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	<10
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días (T7)	7
Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	1,05

5 [0117] En este ejemplo, la tasa de contaminación inicial (T0) es débil (< 10UFC/ml). Sin embargo, tras 7 días la población de *Brettanomyces bruxellensis* se ha desarrollado en la muestra no tratada (T7)

[0118] Por el contrario, el tratamiento con quitosano ha permitido reducir la población de *Brettanomyces bruxellensis* de la muestra tratada (TR7).

10

[0119] Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino en proceso de fermentación alcohólica.

15 **EJEMPLO 11- Tratamiento de un vino tinto en proceso de fermentación maloláctica languideciente contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl, (cuba de 200hl)**

20 [0120] Un vino tinto en proceso de fermentación maloláctica (Merlot) de la bodega SG que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis* <10UFC/ml ha sido tratado por adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control (T7) no ha recibido ningún tratamiento.

**Tabla 6 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del tratamiento	9.4	13.85	4	0:39	3.65	1:33	0.6
Después del tratamiento	8.3	13.86	3.98	0:26	3.64	1.2	0:55

25 [0121] Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

**Tabla 7-** Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7).

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	<10
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días(T7)	10
Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	<10

30 [0122] En este ejemplo, la tasa de contaminación inicial (T0) es débil (< 10UFC/ml). Sin embargo, tras 7 días la población de *Brettanomyces bruxellensis* se ha desarrollado en la muestra no tratada (T7)

[0123] Por el contrario, el tratamiento con quitosano ha permitido mantener la población de *Brettanomyces bruxellensis* bajo el umbral de detección (≤10UFC/ml).

35 [0124] Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino en proceso de fermentación maloláctica languideciente.

**EJEMPLO 12- Tratamiento de un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica que presenta una contaminación débil por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl, (cuba**

de 130hl)

**[0125]** Un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica (Assemblage Syrah Carignan Grenache) de la bodega MT que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis*  $\leq 10$ UFC/ml ha sido tratado por 5 adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control (T7) no ha recibido ningún tratamiento.

**Tabla 8 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del tratamiento	2.95	15:29	3:27	0:25	3.65	<0.3	0.85
Después del tratamiento	2.75	15:01	3:24	0.61	3.64	<0.3	1

**[0126]** Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

10

**Tabla 9-** Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7).

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	<10
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días(T7)	80
Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	0,04

**[0127]** Si bien la tasa de contaminación inicial era débil ( $\leq 10$  UFC/ml), esta se ha desarrollado tras siete días en la muestra controlada. Por el contrario, el desarrollo de las *Brettanomyces bruxellensis* ha podido detenerse eficazmente en el vino tratado con ayuda de quitosano.

**[0128]** Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino al final del proceso de fermentación maloláctica en el que la población inicial es débil.

20

**EJEMPLO 13- Tratamiento de un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica que presenta una contaminación moderada por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl (cuba de 45hl)**

**[0129]** Un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica (Assemblage Syrah Mourvèdre) de la bodega MP que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis* de 30UFC/ml ha sido tratado por adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control (T7) no ha recibido ningún tratamiento.

**Tabla 10 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del tratamiento	1.8	14:39	2.97	0:15	3.75	<0.3	1.4
Después del tratamiento	1.85	14:29	3:02	0:19	3.76	<0.3	1.4

30

**[0130]** Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

**Tabla 11-** Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7).

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	30
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días(T7)	<3000

Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	<10
--	-----

[0131] A pesar de una tasa inicial de contaminación moderada (30UFC/ml), esta ha alcanzado tras 7 días un nivel muy elevado (>3000 UFC/ml) en la muestra no tratada con quitosano. Por el contrario la muestra tratada con quitosano presenta una población de *Brettanomyces bruxellensis* ≤10UFC/ml.

5

[0132] Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino al final del proceso de fermentación maloláctica en el que la población inicial es moderada.

**EJEMPLO 14- Tratamiento de un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica que presenta una contaminación fuerte por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl (cuba de 500hl)**

[0133] Un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica (Syrah) de la bodega R que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis* de 3400UFC/ml ha sido tratado por adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control (T7) no ha recibido ningún tratamiento.

15

**Tabla 12 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del tratamiento	1.9	12.63	3.3	0.86	3.72	<0.3	1.4
Después del tratamiento	1.8	12.6	3:29	0.79	3.73	<0.3	1.4

[0134] Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

20

**Tabla 13- Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7)**

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	3400
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días(T7)	<3000
Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	20

[0135] Se observa que el tratamiento con quitosano permite eliminar eficazmente las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en el vino. Siete días después del tratamiento, la muestra tratada con la ayuda de quitosano presenta una población de *Brettanomyces bruxellensis* muy débil (<20UFC/ml) comparada con la muestra de control que ha mantenido un nivel de contaminación elevado.

25

[0136] Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino al final del proceso de fermentación maloláctica en el que la población inicial es elevada.

30

**EJEMPLO 15- Tratamiento de un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica que presenta una contaminación fuerte por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hl ,(cuba de 80hl)**

35

[0137] Un vino tinto al final del proceso de fermentación maloláctica (Assemblage Syrah, Grenache) de la bodega G que presenta un nivel de población de *Brettanomyces bruxellensis* de 1800UFC/ml ha sido tratado por adición de quitosano, en una dosis de 4 g/hl. El vino de control (T7) no ha recibido ningún tratamiento.

40

**Tabla 14 - Características analíticas del vino**

	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH	Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)
Antes del	1.9	13.66	3:25	0:16	3.68	<0.3	1:15

tratamiento							
Después del tratamiento	2	13.73	3:26	0:16	3.67	<0.3	1:15

[0138] Se observa que el quitosano no modifica los parámetros de análisis clásico tras el tratamiento.

**Tabla 15-** Recuento del nivel inicial de contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* (T0), de su evolución en el vino sin tratar (T7) y en el vino tratado con quitosano (TR7).

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)
Nivel inicial de contaminación de los vinos (T0)	1800
Nivel de contaminación del vino de control tras 7 días(T7)	<3000
Nivel de contaminación de un vino tratado con quitosano tras 7 días (TR7).	<10

[0139] El tratamiento con quitosano permite de hacer descender significativamente la población de *Brettanomyces bruxellensis*. La prueba tratada con la ayuda de quitosano (TR7) presenta una población de *Brettanomyces bruxellensis*  $\leq 10$ UFC/ml de manera comparativa a la muestra no tratada en la que las *Brettanomyces bruxellensis* han continuado creciendo.

[0140] Este ejemplo demuestra que el quitosano es eficaz para eliminar las *Brettanomyces bruxellensis* en un vino al final del proceso de fermentación maloláctica en el que la población inicial es elevada.

**15 EJEMPLO 16- Tratamiento de una sidra contaminada por *Brettanomyces anomalus* con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hL (prueba de laboratorio)**

[0141] Una sidra comercial que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces anomalus* de  $10^7$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl o añadiendo DMDC en una dosis de 20g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento.

[0142] **Figure 9-** Seguimiento de la población de *Brettanomyces anomalus* en la sidra tras el tratamiento

**Levenda -**

[0143]

**Modalidad 1:** Control;

**Modalidad 2:** Tratamiento con la ayuda de quitosano 4g/hL

**30 Modalidad 3:** Tratamiento con la ayuda de DMDC 20g/hL;

[0144] Se constata que solo el tratamiento con ayuda de quitosano (modalidad 2) permite reducir significativamente el nivel de la población de *Brettanomyces anomalus* de  $10^7$  UFC/ml a 100 UFC/m en menos de 5 días. Sin embargo después de 10 días la población de *Brettanomyces anomalus* ha aumentado sensiblemente para alcanzar  $5 \cdot 10^4$ UFC/ml.

[0145] El tratamiento con ayuda del DMDC (modalidad 3) no tiene ningún efecto en las *Brettanomyces anomalus*.

**40 EJEMPLO 17- Tratamiento de un zumo de fruta contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en diferentes dosis (prueba de laboratorio)**

[0146] Un zumo de fruta comercial (joker) que presenta una contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* ha sido tratado por adición de quitosano (DA $\approx$ 4,2mol%) en diferentes dosis. El zumo de fruta de control no ha recibido ningún tratamiento.

[0147] Tras 7 días de tratamiento, el quitosano permite un eliminación total de las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en el zumo de frutas.

**EJEMPLO 18- Tratamiento de una matriz de mosto para la producción de alcohol industrial contaminada por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en diferentes dosis (prueba de laboratorio)**

[0148] Una matriz de mosto para la producción de alcohol industrial que presenta una contaminación por *Brettanomyces bruxellensis* ha sido tratado por adición de quitosano (DA≈4,2mol%) en diferentes dosis. La matriz de control no ha recibido ningún tratamiento.

[0149] Tras 7 días de tratamiento, el quitosano permite un eliminación total de las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en la matriz de mosto industrial.

10

**EJEMPLO 19- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hL (prueba de laboratorio)**

[0150] Un vino fino de Burdeos cosecha 2010 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de  $1.2 \cdot 10^3$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl.

15

**Tabla 16:** Seguimiento de la eficacia del tratamiento con quitosano en una dosis de 4g/hl por recuento por PCR cuantitativa y recuento en medio selectivo.

		Recuento por PCR cuantitativa (UFC/ml)	Recuento en medio selectivo (UFC/ml)
Burdeos 2010	Antes del tratamiento	12000	/
	10 días después del tratamiento	5000	<10
	20 días después del tratamiento	3300	<10
	30 días después del tratamiento	<10	<10

[0151] Los resultados presentes en la tabla 16 muestran una diferencia en función del procedimiento de análisis: mientras que mediante el cultivo en el medio de agar, la población viable se estima en menos de 10 unidades que forman colonias desde el primer control (10 días después del tratamiento), hace falta esperar 30 días después del tratamiento con el análisis por RT-PCR para obtener este resultado.

[0152] Esto ilustraría que el quitosano interactúa probablemente con la pared membranosa de las células de *Brettanomyces* conllevando una desestructuración de esta última; este mecanismo induciría una respuesta de las células comparables a un estado subletal, precediendo su muerte. En este estado subletal, las células serían identificadas como viables por la PCR cuantitativa durante varios días tras su muerte total mientras que el análisis en el medio de agar las identificaría enseguida como no cultivables.

30

**EJEMPLO 20- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 8 g/hL (prueba de laboratorio)**

[0153] Un vino fino de la Vallée du Rhône cosecha 2009 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* superior a  $10^3$  células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 8 g/hl al punto de partida de una suspensión al 20%.

35

[0154] Para esta prueba, el quitosano es pesado y mezclado en 5ml de agua destilada (suspensión inicial al 20%). 100ml de esta suspensión inicial son extraídos para añadir al vino a tratar a razón de 8g/hL (en peso de quitosano en relación al volumen de líquido total) para un volumen de 250mL.

40

**Tabla 17 - Características analíticas del vino**

Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH
1,33	13,85	2,77	0,39	3,75

**Tabla 18-** Recuento en el medio de crianza de las *Brettanomyces bruxellensis* 10 días después del tratamiento.

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/l)
Nivel inicial de contaminación del vino (T0)	<10000
Nivel de contaminación del vino tratado con quitosano tras 10 días (TR10)	<1

[0155] Tras 10 días de tratamiento, el quitosano en una dosis de 8g/hL permite un eliminación total de las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en el vino.

5

**EJEMPLO 21-** Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4 g/hL (prueba de laboratorio)

[0156] Un vino fino de la Vallée du Rhône cosecha 2009 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* superior a 270 células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl al punto de partida de una suspensión al 20%.

10

[0157] Para esta prueba, el quitosano es pesado y mezclado en 5ml de agua destilada (suspensión inicial al 20%). 50ml de esta suspensión inicial son extraídos para añadir al vino a tratar.

15

**Tabla 19 -** Características analíticas del vino

Azúcar (g/l)	alc. (%vol.)	Ac.T (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SO <sub>2</sub> activo (mg/l)	pH
1,35	13,74	2,70	0,26	3,86

**Tabla 20-** Recuento por q-PCR de las *Brettanomyces bruxellensis* 10 días después del tratamiento.

	Levaduras del tipo <i>Brettanomyces</i> (UFC/l)
Nivel inicial de contaminación del vino (T0)	270
Nivel de contaminación del vino tratado con quitosano tras 10 días (TR10)	No detectado

[0158] Tras 10 días de tratamiento, el quitosano en una dosis de 4g/hL permite un eliminación total de las *Brettanomyces bruxellensis* presentes en el vino.

20

**EJEMPLO 22-** Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* con ayuda de quitosano en una dosis de 4g/hL (prueba de laboratorio)

25

[0159] Un vino fino de Burdeos cosecha 2003 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de 10<sup>5</sup> células/ml ha sido tratado por adición de quitosano en una dosis de 4 g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento. El ensayo ha sido duplicado.

[0160] **Tabla 21 :** Recuento en el medio de cultivo selectivo de las poblaciones de levaduras cultivables en los vinos extraídos y reducción logarítmica de la población inicial 10 días después del tratamiento.

30

	Recuento de las levaduras cultivables (UFC/ml)	Reducción logarítmica
Control (1ª repetición)	68 10 <sup>5</sup>	/
Control (2ª repetición)	5.7 10 <sup>5</sup>	/
Quitosano 4g/hl (1ª repetición)	No detectado	Superior 5
Quitosano 4g/hl (2ª repetición)	No detectado	Superior 5

[0160] Los resultados de la aplicación del control y presentados en la Tabla 21 demuestran que las poblaciones criadas de *Brettanomyces bruxellensis* persisten. En cambio, en los resultados de las modalidades tratadas con quitosano, se observa que no se ha detectado ninguna población de levadura cultivable. La reducción logarítmica se calcula tomando como referencia la población cultivable presente en el vino justo antes del tratamiento (2.1 10<sup>5</sup> UFC/ml). Esta reducción logarítmica es siempre superior a 5.

35

[0161] **Tabla 22 :** Recuento mediante microscopio de epifluorescencia de las poblaciones de levaduras viables y no viables realizadas en las lías 10 días después del tratamiento y el porcentaje de células vivas entre las lías que representan la relación de células vivas sobre la totalidad de células recontadas en las lías.

40

	Levaduras vivas (células/ml)	Levaduras muertas (células/ml)	% de células vivas entre las lías
Control (1ª repetición)	4.8 10 <sup>6</sup>	Ninguna levadura muerta	/
Control (2ª repetición)	8.9 10 <sup>6</sup>	Ninguna levadura muerta	/
(CONTINUACIÓN)			
	Levaduras vivas (células/ml)	Levaduras muertas (células/ml)	% de células vivas entre las lías
Quitosano 4g/hl (1ª repetición)	6.1 10 <sup>4</sup>	2.4 10 <sup>6</sup>	2.5
Quitosano 4g/hl (2ª repetición)	6.1 10 <sup>4</sup>	3.2 10 <sup>6</sup>	1.9

[0161] El análisis de las lías mediante microscopio de epifluorescencia 10 días después del tratamiento (Tabla 22) demuestra que en los controles no tratados no se ha contabilizado ninguna célula muerta.

5 [0162] Al contrario en las modalidades tratados con quitosano en una dosis de 4g/hL, una fuerte proporción de levaduras detectadas están muertas y el porcentaje de levaduras vivas es muy débil.

**EJEMPLO 23- Tratamiento de un vino tinto contaminado por *Brettanomyces bruxellensis* de diferentes granulometrías y grados de acetilación (DA) con una dosis de 4 g/hl (prueba de laboratorio)**

10

[0163] Un vino fino de Burdeos cosecha 2003 que presenta un nivel de población inicial de *Brettanomyces bruxellensis* de 10<sup>5</sup> células/ml ha sido tratado por adición de quitosano de diferentes granulometrías y grados de acetilación. <50µm, DA = 15 (% mol) (Fórmula A) y <90µm, DA = 15(% mol) (Fórmula B) en una dosis de 4g/hl. El vino de control no ha recibido ningún tratamiento. El ensayo ha sido duplicado.

15

**Tabla 23** : Recuento en el medio de cultivo selectivo de las poblaciones de levaduras cultivables en los vinos extraídos y reducción logarítmica de la población inicial 10 días después del tratamiento.

	Recuento de las levaduras cultivables (UFC/ml)	Reducción logarítmica
Control (1ª repetición)	6.8 10 <sup>5</sup>	/
Control (2ª repetición)	5.7 10 <sup>5</sup>	/
Fórmula A 4g/hl (1ª repetición)	No detectado	Superior 5
Fórmula A 4g/hl (2ª repetición)	No detectado	Superior 5
Fórmula B 4g/hl (1ª repetición)	No detectado	Superior 5
Fórmula B 4g/hl (1ª repetición)	No detectado	Superior 5

[0164] Los resultados de los controles presentas presentados en la Tabla 23 demuestran que las poblaciones criadas de *Brettanomyces bruxellensis* persisten. En cambio, en los resultados de las modalidades tratadas con quitosano, se observa que no se ha detectado ninguna población de levadura cultivable. La reducción logarítmica se calcula tomando como referencia la población cultivable presente en el vino justo antes del tratamiento (2.1 10<sup>5</sup> UFC/ml). Esta reducción logarítmica es siempre superior a 5.

25 **Tabla 24** : Recuento mediante microscopio de epifluorescencia de las poblaciones de levaduras viables y no viables realizadas en las lías 10 días después del tratamiento y el porcentaje de células vivas entre las lías que representan la relación de células vivas sobre la totalidad de células recontadas en las lías.

	Levaduras vivas (células/ml)	Levaduras muertas (células/ml)	% de células vivas entre las lías
Control (1ª repetición)	4.8 10 <sup>6</sup>	Ninguna levadura muerta	/
Control (2ª repetición)	8.9 10 <sup>6</sup>	Ninguna levadura muerta	/
Fórmula A 4g/hl (1ª repetición)	1.5 10 <sup>4</sup>	9.1 10 <sup>5</sup>	1.6
Fórmula A 4g/hl	1.5 10 <sup>4</sup>	1.6 10 <sup>6</sup>	0.9

(2ª repetición)			
Fórmula B 4g/hl (1ª repetición)	3.1 10 <sup>4</sup>	7.0 10 <sup>5</sup>	4.2
Fórmula B 4g/hl (1ª repetición)	6.3 10 <sup>4</sup>	1.5 10 <sup>6</sup>	4.0

[0165] El análisis de las lías mediante microscopio de epifluorescencia 10 días después del tratamiento (tabla 24) demuestra que en los controles no tratados no se ha contabilizado ninguna célula muerta.

5 [0166] Al contrario en las modalidades tratados con quitosano en una dosis de 4g/hL, una fuerte proporción de levaduras detectadas están muertas. El porcentaje de células vivas es débil con cualquier fórmula. Sin embargo se observa que la fórmula B (granulometría <90µm) presenta un porcentaje de levaduras vivas superior al de la fórmula A.

10 **EJEMPLO 24- Solubilidad del quitosano - Pureza y residuos solubles - Dosificación mediante el procedimiento del Codex enológico**

[0167] El quitosano según la invención es práctica y totalmente insoluble.

15 [0168] El porcentaje de materiales insolubles debe ser igual o superior al 95%. Se determina de la siguiente manera (sacada de la monografía OIV del quitosano adjunta al Codex Enológico internacional):

[0169] Colocar en solución 5g de quitosano en 100ml de agua bidestilada y agitar 2 minutos. Filtrar tras el enfriamiento en un filtro apretado o en una membrana. Evaporar el filtrado y secar a 100-105 °C. El contenido de materiales solubles no debería ser superior al 5 %.

[0170] El % de materiales insolubles medido en 10 lotes de quitosano se muestra en la tabla 25 a continuación.

Número de lote de quitosano	% de insolubles
1	96,79%
2	94,50%
3	97,76%
4	96,42%
5	98,54%
6	95,06%
7	98,62%
8	95,61%
9	97,19%
10	95,42%

25

**EJEMPLO 25 - Cálculo del grado de cristalinidad.**

[0171] El grado de cristalinidad de un quitosano según la invención, completamente hidratado es medido mediante difracción de rayos X. El polvo de quitosano se hidrata colocándolo en un exceso de agua desionizada (10 veces su peso) durante 24h. Un difractómetro Siemens D5000 (radiación Cu Kalpha, 40 kV, 45 mA, ranura variable de divergencia V20, filtro Ni + ranuras de 0.6mm y 0.2mm delante del detector) es utilizado. Los datos son recolectados utilizando modo de escaneo por pasos de 2 a 60 grados 2theta a 2.5 seg/paso, y un tamaño de paso de 0.04°.

35 [0172] El grado de cristalinidad se calcula por la relación entre el área de los picos cristalinos y la suma de las áreas de los picos cristalinos y de la región amorfa entre 7 y 49 grados 2theta. El resultado mostrado es la media de 2 medidas de un lote de quitosano.

**Tabla 26**

Grado de cristalinidad	
Antes de la	Después de la

hidratación	hidratación
26%	6%

**EXEMPLE 26- dosificación del quitosano residual en un vino tratado**

**[0173]** Un vino tratado con quitosano ha sido filtrado en un embudo Buchner con la ayuda de un filtro de 1µm del tipo Pall. El residuo obtenido tras la filtración es lavado con agua después (Ph. Eur.). El residuo presente en el filtro es recuperado entonces, situado en un Falcon y lavado con agua (Ph. Eur.) mediante centrifugación hasta obtener una conductimetría del sobrenadante inferior a 100µS. El residuo es congelado, liofilizado y recuperado (100mg) Es puesto en suspensión en 10ml de agua + 50ml de ácido láctico. La muestra es diluida en el ácido acético al 1% y después es inyectado en HPLC-ELSD (cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector universal ELSD (Detector de Dispersión de Luz Evaporativa) y dosificado en relación a una calibración con un estándar de quitosano. Los resultados del análisis son los siguientes:

Contenido de quitosano en la muestra: inferior al límite de detección (10mg/l).

## REIVINDICACIONES

1. Quitosano insoluble en agua en polvo en el que la granulometría está comprendida en entre 0.1 y 200 micrómetros y donde el D (0.5) y en el que la granulometría está comprendido entre 5 y 30 micrómetros, estando la mencionada granulometría medida mediante difracción láser, presentando el mencionado quitosano al menos un 90% de su masa insoluble en el agua destilada en relación a la masa total de quitosano.
2. Quitosano, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** comprende un grado de acetilación (DA) comprendido entre 0 y 30 mol%.
3. Quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** comprende una granulometría con un D (0.5) comprendido entre 10 y 30 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).
4. Quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** comprende una granulometría con un D (0.5) comprendido entre 10 y 25 micrómetros .
5. Composición **caracterizada porque** comprende un quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Composición según la reivindicación 5, **caracterizada porque** se presenta como una suspensión de quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un líquido.
7. Utilización de quitosano en polvo insoluble en el agua en el que la granulometría está comprendida entre 0.1 y 200 micrómetros y en el que el D (0.5) está comprendido entre 5 y 30 micrómetros, estando la mencionada granulometría medida mediante difracción láser, presentando el mencionado quitosano al menos un 90% de su masa insoluble en agua destilada en relación a la masa total de quitosano, estando presente el mencionado quitosano en una concentración de 1 a 10 g/hL de líquido alimenticio a tratar, o de quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una composición como la que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, como antifúngico para tratar un líquido alimenticio.
8. Utilización, según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el antifúngico es utilizado para luchar contra las levaduras *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. claussenii*, *B. custersianus*, *B. lambicus*, *B. naardenensis*, y/o *B. nanus*.
9. Utilización, según la reivindicación 7 u 8, **caracterizada porque** el mencionado líquido alimenticio es un líquido alimenticio de origen vegetal.
10. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizada porque** el mencionado líquido alimenticio es un líquido alimenticio preparado por fermentación.
11. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizada porque** el mencionado quitosano presenta una concentración comprendida entre 2 y 5g/hL de líquido alimenticio a tratar.
12. Procedimiento de tratamiento curativo y/o preventivo de un líquido alimenticio de origen vegetal, en el que se eliminan las levaduras indeseadas, cuya presencia se pretende prevenir, y/o donde se quiere limitar la población, comprendiendo el procedimiento mencionado la puesta en contacto de un líquido alimenticio con un quitosano en polvo insoluble en el agua en el que la granulometría está comprendida entre 0.1 y 200 micrómetros y en el que el D (0.5) está comprendido entre 5 y 30 micrómetros, estando la mencionada granulometría medida mediante difracción láser, presentando el mencionado quitosano al menos un 90% de su masa insoluble en agua destilada en relación a la masa total de quitosano, estando presente el mencionado quitosano en una concentración de 1 a 10 g/hL de líquido alimenticio a tratar, o un quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una composición como la que se ha definido en la reivindicaciones 5 o 6.
13. Procedimiento, según reivindicación 12, **caracterizado porque** el líquido alimenticio es un vino, una cerveza, o una sidra, y/o **porque** las levaduras indeseadas son *B. anomalus* y/o *B. bruxellensis*.
14. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, **porque** el quitosano, como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o en una composición como la que se ha definido en la reivindicación 5 o 6, está presente en una concentración de 1 a 10g/hL de líquido alimenticio a tratar.

15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado porque** el líquido alimenticio se pone en contacto con quitosano durante al menos 3 días.
- 5 16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado porque** el tratamiento es efectuado en un líquido alimenticio en proceso de fermentación.
17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, **caracterizado porque** el quitosano y/o la composición que comprende el quitosano, es separado para conservar el líquido alimenticio.
- 10 18. Procedimiento de higiene y de prevención en un local de producción, utilizando el mencionado procedimiento con carácter preventivo un quitosano como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de un composición como la que se ha definido en la reivindicación 5 o 6.

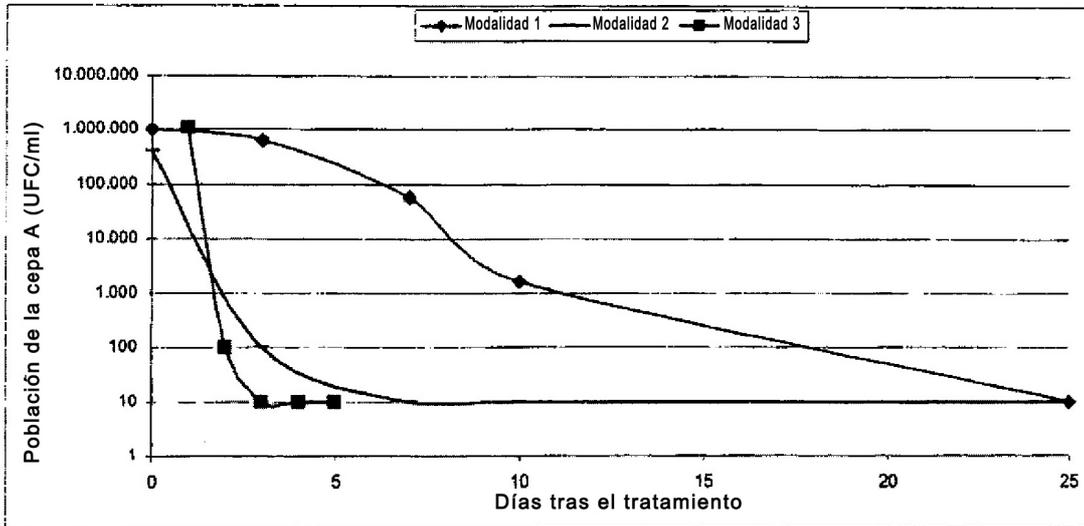


FIG.1

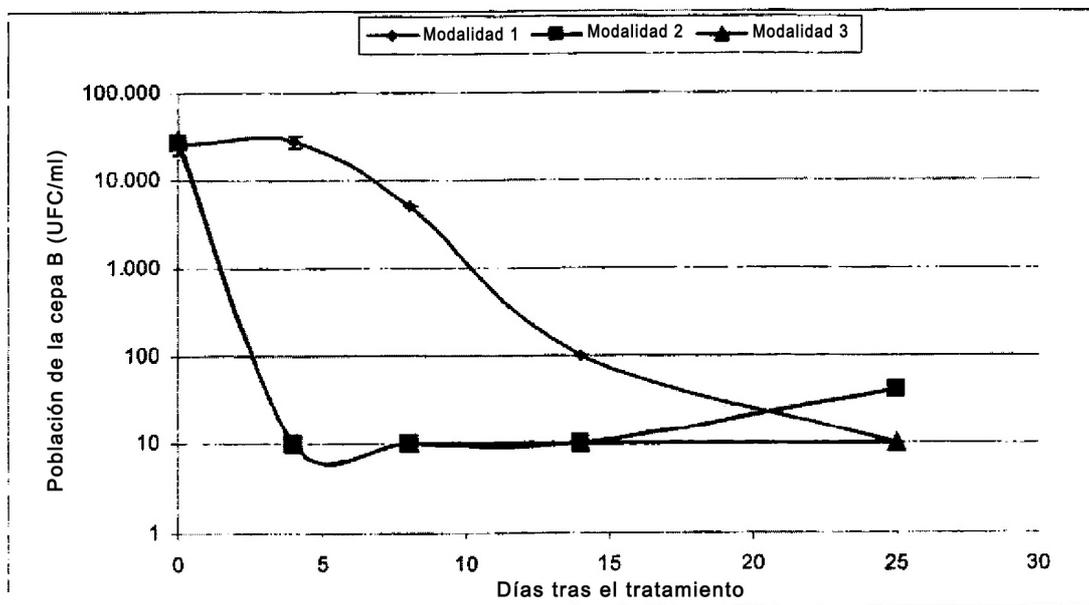


FIG.2

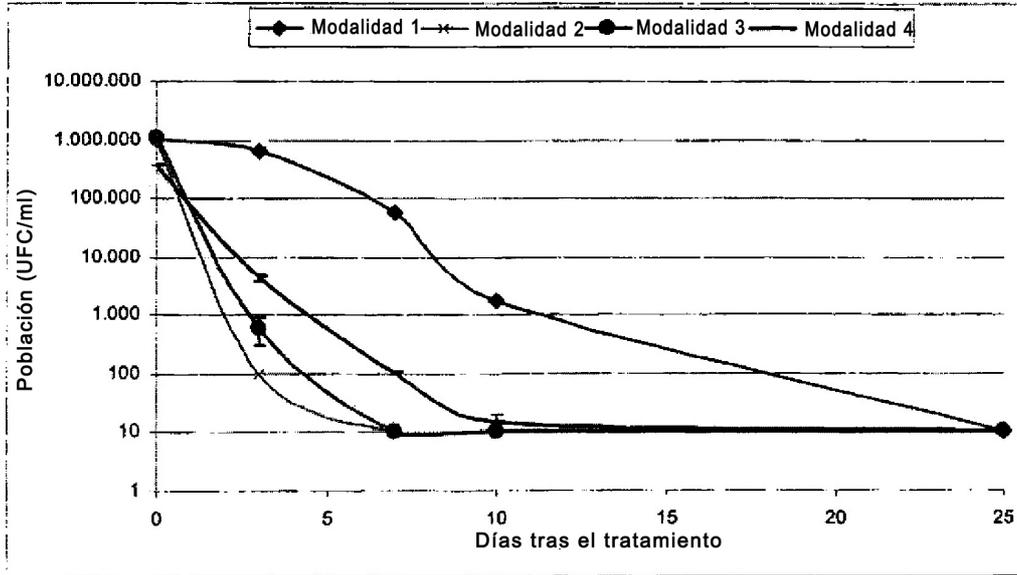


FIG.3

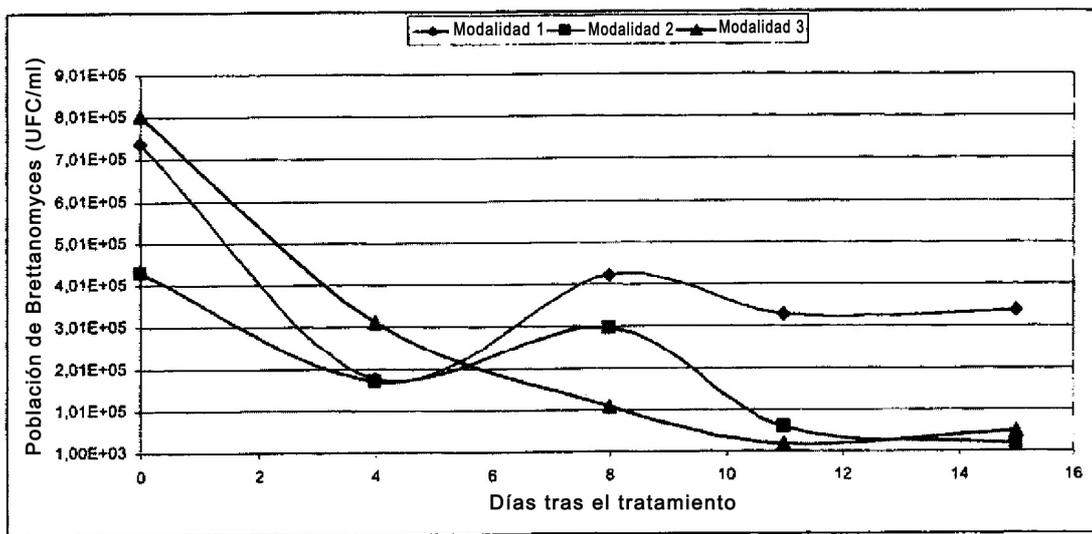
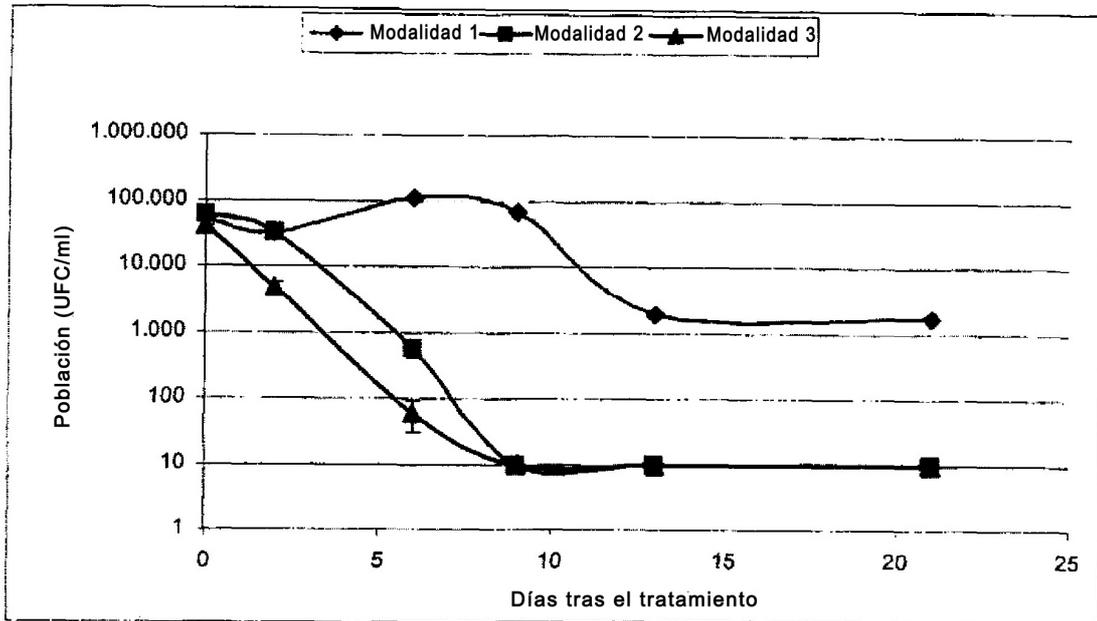
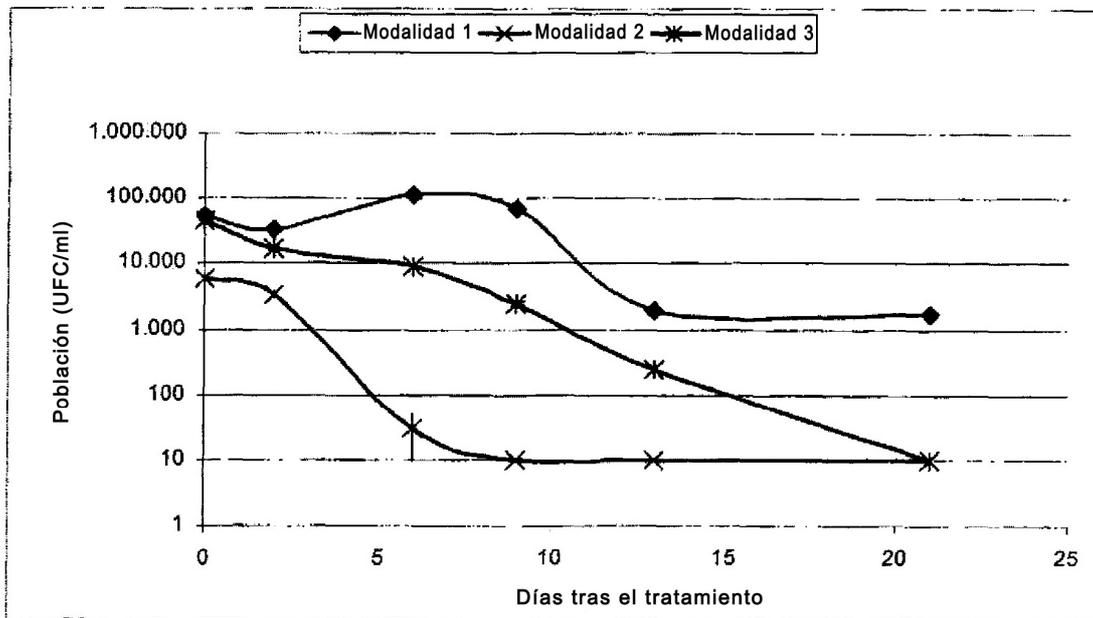


FIG.4



**FIG.5A**



**FIG.5B**

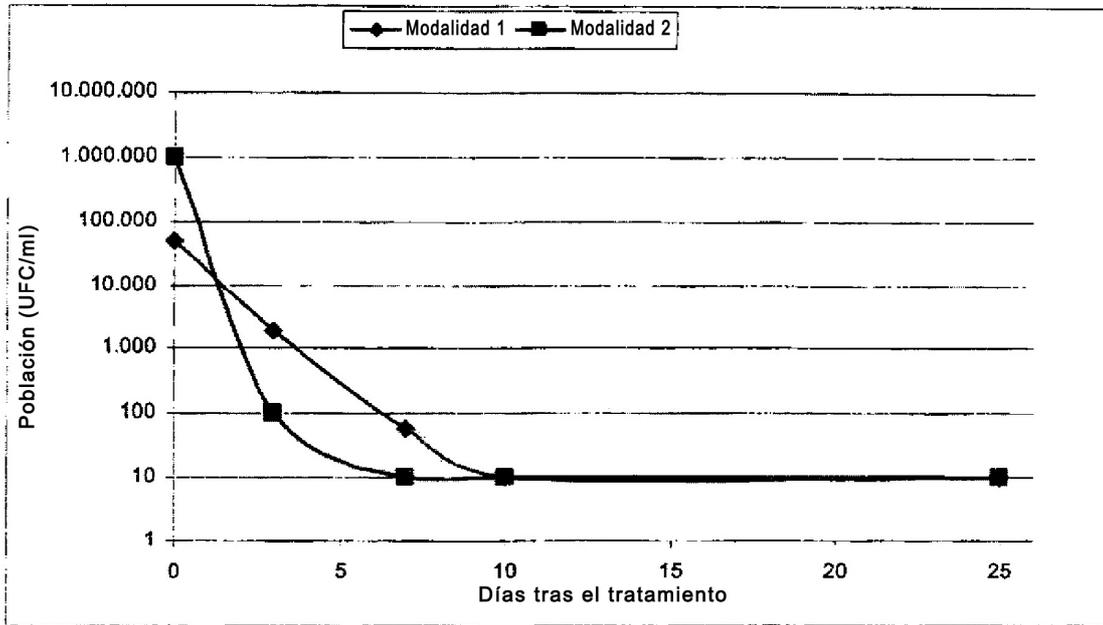


FIG.6

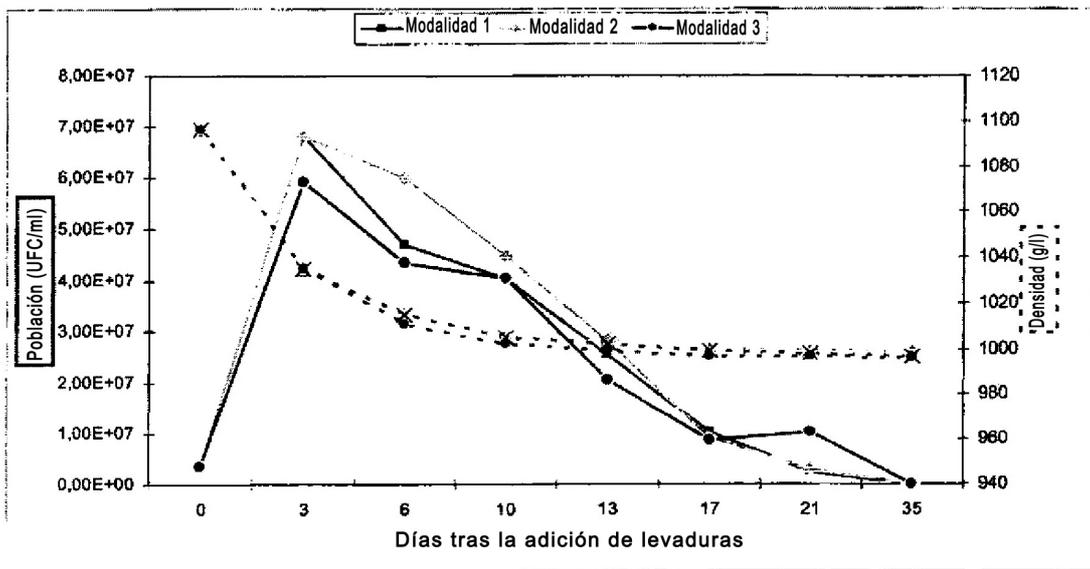


FIG.7

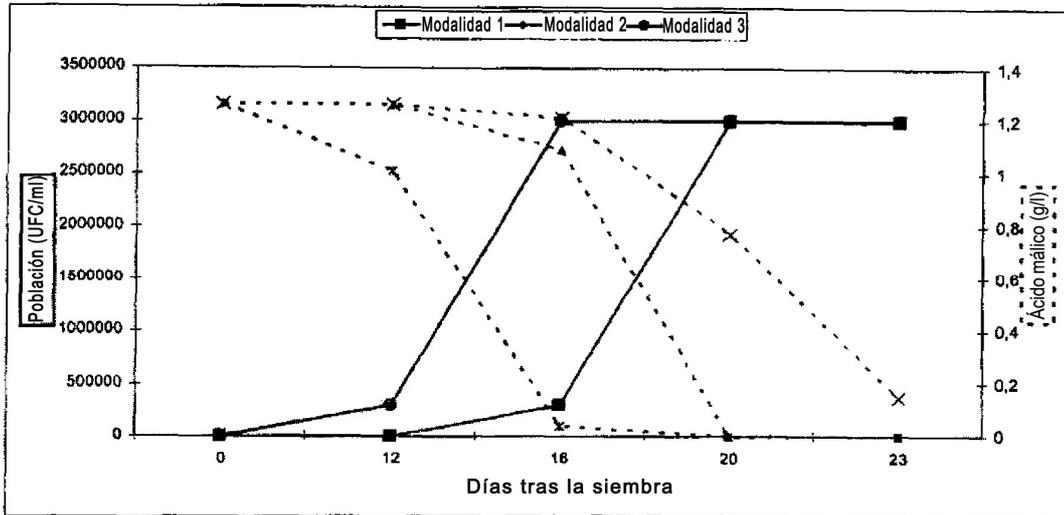


FIG.8

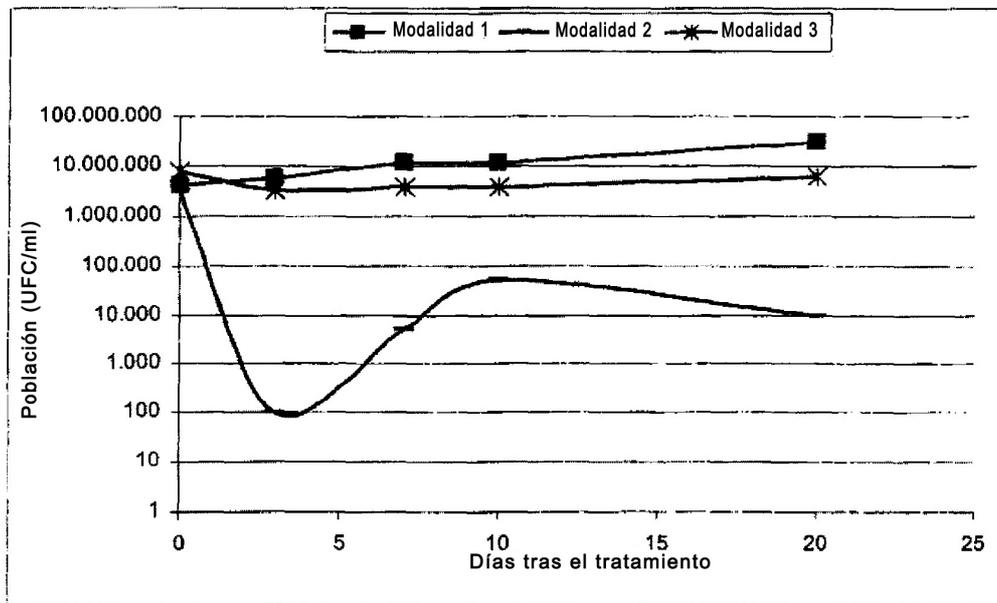


FIG.9