

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 903**

21 Número de solicitud: 201600404

51 Int. Cl.:

C12H 1/00 (2006.01)

C12H 1/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha, 16
11001 Cádiz ES**

72 Inventor/es:

**PALACIOS MACÍAS, Víctor Manuel;
ROLDÁN GÓMEZ, Ana María y
LLORET VIEIRA, Marta Isabel**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada**

57 Resumen:

Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada.

El área científica al que corresponde la invención es tecnología de alimentos, y el sector industrial vinícola.

Consiste en establecer sobre el vino a tratar: un cultivo sumergido de levaduras de flor con aportación y regulación de flujo de aire mediante microaireación y la adición de lisozima, una vez iniciada la fase exponencial de crecimiento de las levaduras.

El procedimiento permite tratar vinos de crianza biológica con acidez volátil de hasta 1,2 g/L, donde el desarrollo de las levaduras de velo en cultivo filmógeno está inhibido o invalidado. Los vinos tratados mejoran sus características sensoriales y pueden reincorporarse al sistema industrial una vez corregida su graduación alcohólica hasta 15% v/v.

ES 2 642 903 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO CORRECTIVO DE VINOS DE CRIANZA CONTAMINADOS CON BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS QUE PRESENTAN UNA ACIDEZ VOLÁTIL ELEVADA.

5 SECTOR DE LA TÉCNICA.

El área científica al que corresponde la invención es el área de Tecnología de Alimentos, y el sector industrial en el que se puede aplicar es el vinícola, y más concretamente en las bodegas tradicionales de elaboración de vinos de crianza biológica que se concentran en las zonas de Jerez, Huelva, Montilla-Moriles, Jura (Francia), etc.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA.

La "crianza biológica" o "crianza bajo velo de flor" es un fenómeno constituido por el desarrollo de un cultivo filmógeno sobre la superficie del vino de algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* (Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—Their ecology, genetics and metabolism. International Journal of Food Microbiology, 167, 269-275). El velo de flor se desarrolla espontáneamente sobre la superficie del vino, una vez completada la fermentación alcohólica y el vino joven es encabezado con alcohol de vino hasta 15 % v/v (Martinez de la Ossa, E., Caro, I., Bonat, M., Pérez, L., & Domecq, B. (1987). Dry extract in sherry and its evolution in the aging of sherry. American Journal of Enology and Viticulture, 38, 321–325). Durante la crianza biológica, la levadura de velo desarrolla un metabolismo aerobio, en la que consume etanol, glicerina, ácido acético, etc., para dar lugar a otros compuestos como el acetaldehído, acetoína, diacetal, etc. (Martinez de la Ossa, E., Caro, I., Bonat, M., Pérez, L., & Domecq, B. (1987). Dry extract in sherry and its evolution in the aging of sherry. American Journal of Enology and Viticulture, 38, 321–325; Martínez de la Ossa, E., Pérez, L., & Caro, I. (1987). Variations of the major volatiles through ageing of sherry. American Journal of Enology and Viticulture, 38, 293–297; Martínez, P., Valcarcel, M.J., Pérez, L., & Benítez, T. (1998). Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by products and aroma compounds. American Journal of Enology and Viticulture, 49, 240–250). La

crianza biológica produce unas modificaciones sensoriales muy significativas que dan lugar al cabo del tiempo a las tipologías de vinos finos y manzanillas.

En los sistemas industriales de crianza biológica, más del 95% de los microorganismos presentes en el biofilm son levaduras del género *S. cerevisiae* (Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—Their ecology, genetics and metabolism. International Journal of Food Microbiology, 167, 269-275). Sin embargo, bajo determinadas condiciones pueden coexistir y proliferar en el medio algunos microorganismos contaminantes como las bacterias lácticas, las acéticas y en algunos casos levaduras del género *non-Saccharomyces* como las *Brettanomyces* (Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—Their ecology, genetics and metabolism. International Journal of Food Microbiology, 167, 269-275; Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food Microbiology, 25, 875–881; Suarez-Lepe, J. A., & Iñigo-Leal, B. (2004). Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain.). El consumo de oxígeno por parte de las levaduras establece unas condiciones semiaerobias en el seno del vino que favorecen sobre todo desarrollo de las bacterias lácticas. La presencia de sustratos específicos como el ácido glucónico (derivado de la presencia de *Botrytis cinerea* en la vendimia), pueden facilitar su proliferación y el desarrollo de alteraciones como el “picado láctico” o “el ahilado”, que conducen en la mayoría de los casos a un aumento de la acidez volátil y a una pérdida de los atributos sensoriales característicos de la crianza (Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. Food Control, 21, 1442-1447; Pérez, L., Valcárcel, M.J., González, P., & Domecq, B. (1991). Influence of *Botrytis* infection of the grapes on the biological aging process of fino sherry. American Journal of Enology and Viticulture, 42 (1), 58-62). Cuando la acidez volátil alcanza niveles elevados (> 0,8 g/L) el velo de flor se inactiva, cae y muere, generándose condiciones ideales para el desarrollo de las bacterias acéticas (oxígeno disuelto y presencia de ácido acético) (Casas, J. (2008). La vinificación del Jerez en el siglo XX. Ed. Junta de Andalucía. Sevilla, Spain. 310-311). Las bacterias acéticas son clasificadas taxonómicamente como microorganismos aerobios estrictos y requieren de condiciones aerobias para su

desarrollo y supervivencia (Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). Acetic acid bacteria and wine: all is well until oxygen enters the scene. *The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 485a, 86–91; Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 143–154). El desarrollo de las bacterias acéticas produce un aumento rápido y significativo de la acidez volátil en los vinos (> 1g/L), invalidando la regeneración, la presencia y el crecimiento del velo de flor en la superficie del vino. Las botas que presentan estos síntomas son apartadas del sistema de crianza (sacas y rocío en vinos de Jerez), para evitar la contaminación de otras botas, destinándose los vinos a la producción de vinagre.

Generalmente para controlar en los vinos el crecimiento tanto de las bacterias lácticas como acéticas se usan dosis elevadas de sulfuroso de al menos 100 mg/L (SO₂ total) (Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Ribereau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 153–156; Suarez-Lepe, J. A., & Iñigo-Leal, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain). Sin embargo, estas dosis de sulfuroso no puede ser aplicada en crianza biológica por dos razones: una, la levadura de flor es muy sensible a este antiséptico (Suarez-Lepe, J. A., & Iñigo-Leal, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain), y dos, la presencia de altas concentraciones de acetaldehído en estos vinos hacen que prácticamente todo el sulfuroso esté bajo forma combinada, lo que reduce su capacidad antiséptica sobre las bacterias (Casas, J. (2008). *La vinificación del Jerez en el siglo XX*. Ed. Junta de Andalucía. Sevilla, Spain. 310-311).

Una alternativa para el control de las bacterias lácticas en crianza biológica ha sido el uso de la lisozima. En estudios publicados por el equipo solicitante, se pudo constatar que la lisozima en pequeñas dosis 5-15 g/hL reduce las poblaciones de bacterias lácticas en un 99% en los vinos de crianza biológica con una graduación alcohólica entre 15-15,5%, por lo que la lisozima puede ser una buena alternativa como tratamiento preventivo y curativo de picados lácticos y posiblemente preventivos de ahilados y picados acéticos en estos vinos (Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation

in the biological aging of sherry wines. *Food Control*, 21, 1442-1447). Cuando la dosis aplicada es inferior a 5 g/hL se reduce significativamente la efectividad, no produciéndose efecto alguno a dosis inferiores a 1,5 g/hL (Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. *Food Control*, 21, 1442-1447).

La lisozima, cuando se aplica bajo determinadas condiciones, puede tener un efecto inhibitorio en el desarrollo de las levaduras de velo de flor en la superficie del vino, que puede afectar tanto al proceso normal de crianza biológica como a la calidad de los vinos producidos (Roldán, A., Lasanta, C., Caro, I., & Palacios, V. (2012). Effect of lysozyme on “flor” velum yeasts in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiology*, 30, 245–252). Cuando la lisozima se añade en dosis superior a 1 g/hL sobre vinos de crianza biológica (15-15,5% vol.) que carecen de velo de flor, las levaduras presentan dificultades para su ascensión y desarrollo en la superficie del vino, afectando severamente a su hidrofobicidad o flotabilidad y a su estado de agregación (Roldán, A., Lasanta, C., Caro, I., & Palacios, V. (2012). Effect of lysozyme on “flor” velum yeasts in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiology*, 30, 245–252). Bajo estas condiciones las levaduras no tienen capacidad para formar velos estables y cubiertos, inhibiéndose el metabolismo celular y la producción de los compuestos característicos de la crianza biológica. Sin embargo, cuando la lisozima se aplica, en las dosis prescritas (5-15 g/hL), sobre un vino de crianza biológica, que bien ya presenta un velo de flor con el mínimo estado de agregación (puntos o islotes pequeños aislados), o bien se injerta o cultiva en superficie posteriormente (después de la aplicación), mediante asa o espátula de siembra, las levaduras no manifiestan alteración alguna tanto en el crecimiento, como en la evolución en los diferentes estados de agregación (cubierto fino, cubierto rugoso), y la flotabilidad en el vino. Bajo estas condiciones, el metabolismo de las levaduras no sufre ningún tipo de modificación, y el vino presenta la evolución sensorial prevista en este tipo de proceso. Los resultados de este trabajo dieron origen a una patente concedida por examen previo (Palacios Macías, V. Caro Pina, I.; Roldán Gómez, A.; Lasanta, C. Procedimiento para la aplicación industrial de las lisozimas en el proceso de elaboración de vinos de crianza biológica. Patente. Entidad

titular de derechos: Universidad de Cádiz. Nº de solicitud: P201100895. País de inscripción: España. Fecha de registro: 29/07/2011).

La aplicación de la lisozima junto con la inoculación del velo de flor es efectiva para el tratamiento de fermentaciones heterolácticas y la reducción de la acidez volátil en los
5 vinos. Por una parte la lisozima reduce la población de bacterias lácticas hasta un 99%, y por otra el metabolismo de las levaduras de velo de flor disminuye la concentración de ácido acético (acidez volátil). A escala industrial (botas), la eliminación de las bacterias lácticas es rápida, y aproximadamente en una semana la población se reduce a 1 colonia/ml. Sin embargo la disminución de la acidez volátil es mucho más lenta,
10 necesitando del orden de 3 a 6 meses para situar los niveles de 0,6-0,8 g/L iniciales a aproximadamente 0,3 g/L (Palacios Macías, V. Caro Pina, I.; Roldán Gómez, A.; Lasanta, C. Procedimiento para la aplicación industrial de las lisozimas en el proceso de elaboración de vinos de crianza biológica. Patente. Entidad titular de derechos: Universidad de Cádiz. Nº de solicitud: P201100895. País de inscripción: España. Fecha de
15 registro: 29/07/2011).

A pesar de ello, se ha podido corroborar tanto a escala laboratorio como industrial que este tratamiento no resulta efectivo cuando se aplica en vinos con niveles de acidez volátil muy elevados (>0,8 g/L) y con presencia de bacterias acéticas. En estas condiciones la implantación y desarrollo del velo de flor es muy difícil, y la lisozima solo
20 tiene efecto sobre las bacterias lácticas. El tratamiento reducía la población de bacterias lácticas, pero seguía aumentando la acidez volátil en los vinos debido a la falta de velo y al crecimiento y metabolismo de las bacterias acéticas.

Algunos autores en el pasado mostraron que las levaduras de velo de flor bajo cultivo sumergido muestran un metabolismo acelerado tanto en la producción de acetaldehído,
25 como en el consumo de etanol y ácido acético (Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1958) Studies on aldehyde production under pressure oxygen and agitation. American Journal of Enology and Viticulture, 9, 11-122; Ter-Karapetian, M. A. (1953). Biochemical reactions in sherry formation. Akad. Nauk S.S.S.R., Biokhim. Vinodeliia, Sbornik, 4, 83-120). El cultivo sumergido de levaduras de flor acelera el proceso de crianza con
30 respecto al cultivo filmógeno tradicional sin modificar significativamente el perfil sensorial de los vinos, y se ha empleado con levaduras del tipo *Saccharomyces capensis*

para reducir los niveles de ácido glucónico (Peinado, R. A., Mauricio, J. C., Ortega, J. M., Medina, M., & Moreno, J. J. (2003). Changes in gluconic acid, polyols and major volatile compounds in sherry wine during aging with submerged flor yeast content. *Biotechnology Letters*, 25, 1887-1891).

- 5 En la actualidad no existe una técnica u procedimiento efectivo para tratar los picados acéticos derivados de los picados lácticos en los vinos sometidos al proceso de crianza biológica. Como medida preventiva para minimizar el desarrollo de los picados acéticos en los vinos de crianza biológica, algunas bodegas realizan controles de presencia de velo e inoculación, sobre todo en aquellas botas que tienen una acidez volátil moderada
10 (0,50-0,8 g/L) y elevados contenidos en ácido glucónico, que es uno de los principales sustratos para el crecimiento de las bacterias lácticas y cuyo metabolismo deriva en la producción de ácido acético. En algunos casos el consumo de ácido acético por parte de las levaduras de velo de flor puede ser suficiente para evitar un aumento excesivo de la acidez volátil. Pero cuando se parte de una concentración de ácido glucónico elevada (>
15 500 mg/L), las levaduras no pueden mantener los niveles de acidez volátil en los vinos, produciéndose un aumento paulatino de la concentración de ácido acético. Bajo estas circunstancias puede resultar efectiva la aplicación de lisozima y cultivo filmógeno (Palacios Macías, V. Caro Pina, I.; Roldán Gómez, A.; Lasanta, C. Procedimiento para la aplicación industrial de las lisozimas en el proceso de elaboración de vinos de crianza
20 biológica. Patente. Entidad titular de derechos: Universidad de Cádiz. Nº de solicitud: P201100895. País de inscripción: España. Fecha de registro: 29/07/2011).

Sin embargo, se ha podido constatar a escala industrial que a veces el fenómeno de producción de ácido acético es muy rápido, sobre todo en botas con falta de velo o velo muy poco activo. Generalmente esto ocurre en la época de verano, cuando en algunas
25 bodegas se alcanzan temperaturas superiores a 24-25 °C. En estas condiciones de temperatura y con una acidez volátil media (> 0,5-0,6 g/L) se puede producir la inactivación y la caída del velo de flor, patrocinando la disolución de oxígeno en el seno del vino y el crecimiento de las bacterias acéticas, que normalmente se encuentran en las cabezuelas (lías) en muy pequeñas concentración. El crecimiento de las bacterias
30 acéticas produce un aumento rápido de la acidez volátil, situando los niveles por encima de 0,8 g/L en menos de un mes. En estos casos, la metodología de tratamiento de la

lisoizima y cultivo filmógeno (Palacios Macías, V. Caro Pina, I.; Roldán Gómez, A.; Lasanta, C. Procedimiento para la aplicación industrial de las lisoizimas en el proceso de elaboración de vinos de crianza biológica. Patente. Entidad titular de derechos: Universidad de Cádiz. Nº de solicitud: P201100895. País de inscripción: España. Fecha de registro: 29/07/2011) no resulta efectiva, en primer lugar, porque la lisoizima solo tiene acción sobre las bacterias lácticas y no sobre las acéticas, y en segundo lugar, porque a estos niveles de acidez volátil resulta muy difícil la implantación y el crecimiento de las levaduras de velo en la superficie del vino, dada su alta sensibilidad al ácido acético.

10 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.**

Se propone como patentable una nueva metodología de aplicación de la lisoizima en cultivo sumergido para el tratamiento curativo y correctivo de vinos de crianza biológica que presentan una acidez volátil muy elevada (> 0,8 g/L) y una contaminación tanto por bacterias lácticas como por bacterias acéticas. La metodología consiste en establecer sobre el vino a tratar: primero un cultivo sumergido de levaduras de flor con aportación y regulación de flujo de aire mediante microaireación, de manera que permita que los niveles de oxígeno disuelto estén por debajo de 1 ppm; y segundo la adición de lisoizima, una vez iniciada la fase exponencial de crecimiento de las levaduras. Bajo estas condiciones se produce por un lado, una reducción de las poblaciones de bacterias acéticas y lácticas en los vinos contaminados en un 99%, y por otro, una reducción de la acidez volátil desde 0,8-1,2 g/L a 0,3-0,1 g/L.

En estudios recientes realizados por equipo solicitante, se ha podido comprobar que las levaduras de velo bajo cultivo sumergido tienen capacidad para desarrollarse con un metabolismo aerobio activo en vinos con acidez volátil elevada (0,8-1,2 g/L) y en presencia de lisoizima (10-12 g/hl). En estos estudios se ha podido corroborar que si la lisoizima se adiciona al principio, junto con el inóculo de levaduras (o pie de cuba), se produce un aumento de la fase de latencia y una reducción de la población activa final en la fase exponencial de crecimiento, sobre todo en los vinos con mayor acidez volátil (>1 g/L). Sin embargo, cuando la lisoizima se añade al final de la fase de latencia o inicio de la fase exponencial de crecimiento (t = 3 días aproximado en todos los casos), no se produce ningún efecto sobre la cinética de crecimiento de las levaduras, alcanzándose

niveles de población viable incluso más elevados que en los vinos testigos sin lisozima. La lisozima en las condiciones de cultivo sumergido no pierde actividad alguna, y reduce los niveles de población de bacterias lácticas hasta un 99% en un tiempo aproximado de 30 horas. Este tiempo es mucho más corto que el que se necesita cuando se opera en cultivo filmógeno (del orden de 120 horas)(Palacios Macías, V. Caro Pina, I.; Roldán Gómez, A.; Lasanta, C. Procedimiento para la aplicación industrial de las lisozimas en el proceso de elaboración de vinos de crianza biológica. Patente. Entidad titular de derechos: Universidad de Cádiz. Nº de solicitud: P201100895. País de inscripción: España. Fecha de registro: 29/07/2011). Las condiciones de agitación favorecen la difusión y la acción de la lisozima sobre las bacterias lácticas.

Por otro lado, el crecimiento de la levadura de flor en cultivo sumergido lleva implícito un consumo importante del oxígeno disuelto en el vino, de manera que mediante una regulación del flujo de microaireación, se pueden establecer condiciones anóxicas o semiaerobias en el medio ($O_2 < 1$ ppm), que resultan letales para las bacterias acéticas (aerobias estrictas) sin afectar al desarrollo de las levaduras. Para que se puedan conseguir estas condiciones anóxicas se debe establecer un flujo de aire en el rango de 0,01-0,03 L de aire por minuto y litro de vino, y una agitación mediante paletas con una velocidad entre 350 y 450 rpm. A concentraciones de oxígeno por debajo de 1 ppm se produce una reducción drástica de la población de las bacterias acéticas del orden del 99% al segundo o tercer día de iniciado el proceso, coincidiendo casi siempre con el inicio de la fase exponencial de crecimiento de las levaduras. Para que el consumo de oxígeno sea significativo desde el principio del proceso, es necesario inocular un pie de cuba o inóculo de levadura en un porcentaje en volumen del 10% v/v, para que la concentración final de levaduras en el vino a tratar esté en torno a 10^6 células viables/mL. El pie de cuba inicial se debe hacer con vino joven fortificado a una graduación de 15% v/v y esterilizado mediante microfiltración con membrana de 0,22 μ m. La adición del pie de cuba solo tiene que realizarse en el primer tratamiento. Para posteriores se puede dejar un volumen de vino ya tratado en el fermentador (del orden del 10%) como pie de cuba, y el procedimiento es igual de efectivo.

Por último, el desarrollo de las levaduras de flor en cultivo sumergido acelera el metabolismo y el consumo de ácido acético y de acidez la volátil en los vinos. El proceso

de desacidificación es muy rápido, en menos de 7 días un vino con una acidez volátil de 1g/L (acetificación alta) reduce sus niveles por debajo de 0,1 g/L. Cuando se adiciona lisozima al cultivo sumergido, la reducción es más significativa, debido fundamentalmente a que se potencia el crecimiento de las levaduras.

5

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.

Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada

10 1º. Se requiere de un fermentador de capacidad variable dotado de microdifusores de aire y un agitador de paletas, que tienen la misión respectivamente de aportar y homogeneizar el oxígeno necesario para el crecimiento de las levaduras de velo de flor en cultivo sumergido. El fermentador debe estar provisto de un sistema para controlar la temperatura en torno a 20-22°C y como equipo auxiliar se requerirá de un generador de aire a presión (compresor, botella de gas, etc.)

15 2º. Se requiere de levaduras de velo de flor industrial que se puede obtener mediante asa, espátula, venencia u otra herramienta similar en una bota o depósito que esté realizando crianza biológica, y no tenga ningún indicio de contaminación o alteración microbiana (acidez volátil < 0,3 g/L)

20 3º. Con el velo industrial se prepara un pie de cuba o inóculo de levaduras de velo de flor en pleno crecimiento exponencial, preferiblemente en el mismo fermentador donde se va a realizar el tratamiento del vino. Para la preparación del pie de cuba se emplea un vino sano (con acidez volátil < 0,3g/L y un grado alcohólico de 15% v/v) que filtraremos mediante una membrana de microfiltración de 0,22 µm de tamaño de poro, para asegurar su esterilidad. El vino se inocula con las levaduras de velo de flor y mediante
25 una microaireación en un rango de 0,01-0,03 litros de aire por minuto y litro de vino, agitación entre 350 y 450 rpm y temperatura controlada en un intervalo de 20-22°C, se espera que se alcance una población de levaduras igual o superior a 10⁸ cel/ml. El pie de cuba debe representar en todos los casos el 10% del volumen total del vino a tratar.

4º. Sobre el pie de cuba en pleno crecimiento se añade el vino a tratar con una acidez volátil no superior a 1,2 g/L y en un volumen que represente el 90% del total del vino en el fermentador.

5 5º. Se regula el flujo de microaireación mediante un caudalímetro para mantener durante todo el proceso una concentración de oxígeno disuelto inferior a 1 ppm. El oxígeno se medirá mediante un oxímetro digital, dotado de un electrodo que se dispondrá de forma horizontal en el fermentador para evitar la acumulación de microburbujas de aire en la membrana de medida. Normalmente se logra un estado estacionario con concentraciones estables de oxígeno disueltos por debajo de 1 ppm
10 (entre 0,6 y 0,8 ppm) con flujos de microaireación de entre 0,01-0,03 litros de aire por minuto y litro de vino, sin afectar al crecimiento de las levaduras y sin producir oxidación alguna de los vinos.

6º. Una vez iniciada la fase exponencial de crecimiento (2-3 días del inicio del tratamiento), y con una población de levaduras viables en torno a los 10^8 cel/ml, se
15 adiciona la lisozima en una concentración entre 10-12 g/hl. La lisozima se prepara según las indicaciones del fabricante.

7º. El tratamiento del vino termina cuando la acidez volátil se haya reducido hasta niveles entre 0,3 y 0,1 g/L.

8º. Una vez terminado el tratamiento se trasiega el vino, dejando aproximadamente un
20 10% de volumen en el fermentador como pie de cuba, si se va a proseguir con un nuevo tratamiento. En estos casos se recomienda durante este proceso mantener la microaireación, la agitación y el control de temperatura en las condiciones establecidas.

9º. Al vino tratado se le realizará una corrección de alcohol de hasta 15 % v/v antes de su incorporación en el soleraje o sistema de crianza biológica industrial.

25

REIVINDICACIONES.

1. Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada, que comprende:
 - 5 a) Un cultivo sumergido de levaduras de flor con aportación y regulación de flujo de aire mediante microaireación, de manera que permita que los niveles de oxígeno disuelto estén por debajo de 1 ppm.
 - b) El vino se pone en contacto con el cultivo sumergido de levaduras en flor
 - c) La adición de lisozima, una vez iniciada la fase exponencial de
10 crecimiento de las levaduras.

2. Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada, según reivindicación 1, caracterizada por las siguientes fases:
 - 15 a) Preparación del pie de cuba o inóculo de levaduras de velo de flor, en la que se emplea: vino microfiltrado con membrana de 0,22 μm con acidez volátil inferior o igual a 0,3 g/L y grado alcohólico de 15% v/v, levaduras de velo de flor industrial extraídas de una bota o un depósito de crianza biológica.
 - b) Cultivo sumergido del pie de cuba de levaduras de velo según las siguientes
20 condiciones: 0,01-0,03 litros de aire por minuto y litro de vino, agitación 350-450 rpm y temperatura controlada en torno a 20-22°C
 - c) Adición del vino a tratar cuando la población de levaduras viables en el pie de cuba sea superior o igual a 10^8 células/ml. El vino debe tener una acidez volátil no superior a 1,2 g/L
 - 25 d) Cultivo sumergido de levaduras de velo en el vino tratado en las siguientes condiciones: oxígeno disuelto menor de 1 ppm, agitación entre 350 y 450 rpm y una temperatura controlada en torno a 20-22°C.
 - e) Preparación de la lisozima, según las instrucciones del fabricante.
 - f) Adición de lisozima en una dosis entre 10-12 g/hl a cuando el cultivo haya
30 iniciado la fase exponencial de crecimiento, que coincide con una población igual o superior de levaduras viables de 10^8 células/ml.

- g) Finalización del tratamiento cuando la acidez volátil se reduzca a niveles entre 0,3 y 0,1 g/L.
3. Instalación para la realización del procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada, según la reivindicaciones 1 y 2, caracterizada por el siguiente equipamiento:
- 5
- a) Fermentador dotado de microdifusores de aire, agitador de paletas y sistema para control de temperatura del proceso.
- 10 b) Un caudalímetro para la regulación del flujo de aire al fermentador.
- c) Un equipo de generación de aire a presión.
- d) Un oxímetro digital para el control del oxígeno disuelto en el vino
4. Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada, según la reivindicaciones 1 a 3, que comprende la regulación del flujo de aire mediante caudalímetro en el cultivo sumergido del vino tratado, para mantener los niveles de oxígeno disuelto por debajo de 1 ppm.
- 15
5. Procedimiento para el tratamiento correctivo de vinos de crianza contaminados con bacterias lácticas y acéticas que presentan una acidez volátil elevada, según la reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el pie de cuba de levaduras de velo debe representar el 10% del volumen total en el tratamiento.
- 20



②① N.º solicitud: 201600404

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12H1/00** (2006.01)
C12H1/22 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OUGH, C.S. y AMERINE, M.A. Studies on aldehyde production under pressure, oxygen and agitation. American Journal of Enology and Viticulture, 1958, Vol. 9, páginas 111-122. ver "Experimental".	3
A	EP 2957627 A1 (ENOITALIA COSTRUZIONI MACCHINE ENOLOGICHE S R L et al.) 23/12/2015, párrafos 10, 36; figura10.	3
A	ES 2157700 A1 (UNIV CORDOBA) 16/08/2001, Página 3, último párrafo, reivindicaciones 1, 10; figura 1.	3
A	ES 2395166 A1 (UNIV CADIZ) 08/02/2013, Reivindicaciones.	1, 2, 4, 5
A	LASANTA, C. et al. Use of lysozyme for prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. Food Control, 2010, Vol. 21, Páginas 1442-1447.	1-5
A	PEINADO, R.A et al. Changes in gluconic acid, polyols and major volatile compounds in sherry wine during aging with submerges flor yeast cultures. Biotechnology Letters, 2003, Vol. 25, páginas 1887-1891.	1-5
A	ROLDÁN, A. et al. Effect of lysozyme on "flor" velum yeast in the biological aging of sherry wines. Food Microbiology, 2012, Vol. 30, páginas 245-252.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2017

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/5

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

C12G, C12H

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

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXTE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.04.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1, 2, 4, 5	SI
	Reivindicaciones 3	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	OUGH, C.S. y AMERINE, M.A. American Journal of Enology and Viticulture.	1958
D02	EP 2957627 A1 (ENOITALIA COSTRUZIONI MACCHINE ENOLOGICHE S R L et al.)	23.12.2015
D03	ES 2157700 A1 (UNIV CORDOBA)	16.08.2001
D04	ES 2395166 A1 (UNIV CÁDIZ)	08.02.2013

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

Procedimiento (reivindicaciones 1, 2, 4 y 5)

El documento D04 es el documento más cercano del estado de la técnica respecto a la primera reivindicación independiente de la solicitud en estudio puesto que trata de un **procedimiento** para el tratamiento preventivo y curativo (correctivo) de las alteraciones producidas en vinos de crianza biológica por bacterias lácticas.

El procedimiento descrito en D04 comprende la comprobación de la presencia del velo de flor o su actividad mediante un oxímetro, la adición de lisozima (10 a 15 g/hL) y posterior siembra de levaduras en superficie, en el caso de que no exista velo de flor en la superficie del vino o se encuentre inactivo, es decir, cuando la concentración de oxígeno sea superior a 4 ppm (reivindicación 1)

La diferencia entre el procedimiento de la reivindicación 1 de la solicitud en estudio y el documento D04 es que en la solicitud en estudio, antes de añadirse la lisozima, se realiza un cultivo sumergido de las levaduras en flor mediante microaireación manteniendo el oxígeno por debajo de 1 ppm. A este cultivo se añade el vino a tratar y, por último, cuando las levaduras se encuentran en la fase exponencial de crecimiento, se introduce la lisozima.

El efecto técnico que tiene realizar el procedimiento siguiendo estos pasos y en estas condiciones es que la introducción de la lisozima no afecta al crecimiento de la levadura y se pueden corregir los vinos con alta acidez volátil (más de 0,8 g/l).

El problema a solucionar por la invención sería conseguir corregir aquellos vino de crianza que tengan una alta acidez volátil y la manera de corregirlos sería tratándolos con el método de la reivindicación 1, es decir, añadiéndolos a un cultivo sumergido de levadura, mantener los niveles de oxígeno por debajo de 1 ppm y añadir la lisozima cuando las levaduras hayan alcanzado la fase exponencial de crecimiento.

Esta solución no estaba divulgada ni sugerida en ningún documento del estado de la técnica, por lo que se considera que no es obvia para un experto en la materia. Por ello, la reivindicación 1 independiente, que se refiere al procedimiento de tratamiento correctivo de vinos de crianza con acidez volátil elevada, así como las reivindicaciones 2, 4 y 5 que dependen de ella, cumplen el requisito de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de patentes 11/1986.

Instalación (reivindicación 3)

El documento D01 es el documento más cercano del estado de la técnica respecto a la reivindicación independiente 3 ya que describe una **instalación** para llevar a cabo el cultivo sumergido de levaduras de velo que comprende, al igual que la instalación de la reivindicación en estudio, un fermentador o tanque dotado de agitadores, un equipo generador de aire a presión para introducir aire en el tanque, un caudalímetro (sistema de regulador de aire) y un sistema de control de temperatura.

La instalación de la reivindicación 3 de la solicitud tiene, además de las mismas características que la descrita en D01, otros dispositivos como microdifusores de aire y un oxímetro digital para el control de oxígeno, dispositivos que no se describen explícitamente en el documento D01 y que por tanto le otorgan novedad.

Sin embargo, no se puede considerar que dichos elementos aporten actividad inventiva a la invención.

Los microdifusores o difusores porosos ya han sido utilizados como medio de microoxigenación y microaeración para introducir diferentes gases en la industria enológica (ver documento D02, párrafo 36), son pues una de las alternativas de que dispondría un experto en la materia para introducir el aire en la instalación descrita en D01.

En cuanto a los sensores de oxígeno (oxímetros) también se han incluido con anterioridad en instalaciones que se utilizan para envejecer vino con objeto de mantener las concentraciones de oxígeno dentro del margen requerido (ver D03, página 3, último párrafo).

La instalación descrita en la reivindicación 3 tiene esencialmente los mismos elementos que la descrita en D01 con algunas modificaciones que resultarían evidentes para un experto en el campo de la vinificación y envejecimiento de vinos, ya que consiste en modificar o añadir a la instalación ya conocida, dispositivos que se conocen en el mismo campo técnico y con la misma utilidad y que no modifican esencialmente su estructura.

Por tanto, a la vista del documento D01, la instalación de la reivindicación 3 tiene novedad, pero carece de actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986)

En conclusión, las reivindicaciones 1, 2, 4 y 5 cumplen los requisitos de patentabilidad del art. 4.1 de la Ley de Patentes de 11/1986, mientras que la reivindicación 3 no los cumple.