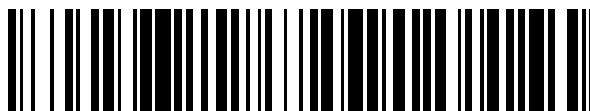


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 131**

51 Int. Cl.:

C12J 1/00	(2006.01) C12P 7/00	(2006.01)
C12G 1/022	(2006.01) C12P 7/12	(2006.01)
C12G 3/02	(2009.01) C12P 7/14	(2006.01)
C12H 1/00	(2006.01) C12C 11/09	(2006.01)
C12G 3/07	(2006.01) C12G 1/02	(2006.01)
C12J 1/02	(2006.01)	
C12J 1/08	(2006.01)	
C12N 1/00	(2006.01)	
C12N 1/16	(2006.01)	
C12N 1/22	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2015 PCT/EP2015/073343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015 E 15778302 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3204483**

54 Título: **Procedimiento de preparación de vino utilizando biopelículas bacterianas**

30 Prioridad:

10.10.2014 FR 1459736

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

26.12.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE (50.0%)
Maison de l'Université, Esplanade Erasme
21000 Dijon, FR y
INSTITUT NATIONAL SUPÉRIEUR DES
SCIENCES AGRONOMIQUES, DE
L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUZZO, JEAN;
WEIDMANN-DESROCHE, STÉPHANIE;
BASTARD, ALEXANDRE;
COELHO, CHRISTIAN y
GOUGEON, RÉGIS**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 736 131 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de vino utilizando biopelículas bacterianas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de vinos que comprende el inicio de la fermentación maloláctica por inoculación con bacterias lácticas del género *Oenococcus*, en forma de biopelícula.

10 **Estado de la técnica**

En la actualidad, en el campo de la enología moderna, el control de las diferentes etapas de la elaboración del vino necesita la utilización de fermentos de levaduras para la fermentación alcohólica y bacterianos para la fermentación maloláctica. La fermentación maloláctica interviene en general después de la fermentación alcohólica. Consiste en una transformación del ácido málico en ácido láctico por medio de bacterias denominadas bacterias lácticas. La fermentación maloláctica se traduce por una disminución de la acidez que permite una estabilización y una suavización del vino, así como el mantenimiento de una calidad constante de un año a otro.

Puesto que la fermentación maloláctica influye en las cualidades organolépticas de los vinos, debe ser controlada rigurosamente. Al poder iniciarse la fermentación espontánea en cualquier momento del proceso, se han desarrollado unos medios para iniciar esta fermentación en el momento oportuno. Así, se han desarrollado unas bacterias lácticas denominadas "listas para el uso". Estas bacterias permiten mejorar el control de la conducta de la fermentación maloláctica y producir unos vinos de calidad constante con una cierta tipicidad que responde a la demanda de los consumidores. *Oenococcus oeni* es la especie bacteriana utilizada más frecuentemente y la más adecuada para realizar la fermentación maloláctica. Así, con respecto a una fermentación maloláctica aleatoria realizada con bacterias lácticas indígenas, la siembra bacteriana presenta numerosas ventajas.

Sin embargo, siendo las condiciones fisicoquímicas del vino (pH ácido, fuerte contenido en etanol, presencia de sulfito, baja temperatura, carencia nutricional) desfavorables a la implantación de estos fermentos lácticos durante la inoculación, fue necesario elaborar unos protocolos industriales de pre-aclimatación a las condiciones del vino para paliar estos problemas con el fin de optimizar la supervivencia y el reinicio del crecimiento de las bacterias en el vino después de la inoculación directa.

Por ejemplo, la patente WO 2007/063228 describe un procedimiento de predicción de la viabilidad, de la vitalidad y de la estabilidad de bacterias destinadas a ser utilizadas en entornos estresantes.

La patente FR 2 858 074 describe también un procedimiento de control de la fermentación maloláctica en los vinos por inoculación directa de cepas de bacterias lácticas capaces de desarrollarse en un medio que contiene alcohol.

En particular, la compañía Lallemant S.A.S. utiliza unos protocolos de pre-aclimatación denominados MBR[®] o 1-STEP[®]. La fermentación maloláctica se realiza frecuentemente en barricas. Los fermentos malolácticos se introducen en ellas en forma congelada o liofilizada y se desarrollan en forma planctónica. Las cepas bacterianas así aclimatadas siguen siendo costosas para el vinicultor.

Continúa por lo tanto existiendo la necesidad de realizar un procedimiento fácil de utilizar que permita iniciar la fermentación, en particular la fermentación maloláctica, de manera reproducible y a menor coste. De manera ventajosa, el procedimiento permitirá modular las propiedades organolépticas de las bebidas fermentadas así preparadas.

50 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un vino que comprende el inicio de la fermentación por inoculación de la bebida fermentable con unas bacterias de fermentación del género *Oenococcus* en forma de biopelícula.

55 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa la supervivencia de las células de *O. oeni* en función del tiempo en un medio de crecimiento (MRSm) modificado por adición de etanol y disminución del pH a 3,0 con el fin de generar unas condiciones estresantes.

La figura 2A representa la actividad maloláctica de las células de *O. oeni* cultivadas antes o bien en biopelícula (curva con cuadrados), o bien planctónica (curva con círculos) e incubadas en un jugo de uva fermentado estandarizado con un 12% de etanol, 4 g/l de ácido L-málico, pH 3,5.

La figura 2B representa la actividad maloláctica de las células de *O. oeni* cultivadas antes o bien en biopelícula

(curva con cuadrados), o bien planctónica (curva con círculos), e incubadas en un jugo de uva fermentado estandarizado con un 12% de etanol, 4 g/l de ácido L-málico, pH 3,2

La figura 3 representa las dosificaciones (concentración en µg/l) de 6 aromas marcadores de madera (desde arriba a la izquierda hasta abajo a la derecha: Furfural, Vainillina, Guayacol, Eugenol, cis-Whiskylactona, trans-Whiskylactona) en unos vinos de diferentes condiciones:

Barra de la izquierda: "roble" (contacto madera-vino, sin actividad microbiológica),

Barra central: "FML + roble" (fermentación maloláctica por unas bacterias planctónicas durante el tiempo de contacto madera-vino),

Barra de la derecha: "biopelícula" (biopelícula formada sobre madera de roble, efectuando la fermentación maloláctica, liberando unos aromas a madera en el vino).

Las diferencias significativas ($P=0,05$) entre las condiciones se mencionan con letras diferentes.

La figura 4 representa el análisis en componentes principales (84%) de la proyección del conjunto de datos de las dosificaciones de los 6 aromas marcadores de madera en unos vinos de diferentes condiciones: "roble" (contacto madera-vino, sin actividad microbiológica), "FML + roble" (fermentación maloláctica realizada por unas bacterias planctónicas durante el tiempo de contacto madera-vino), "biopelícula" (biopelícula formada sobre madera de roble, efectuando la fermentación maloláctica, liberando aromas a madera en el vino).

La figura 5 representa la medición del color por los parámetros $L^*a^*b^*$ (respectivamente histogramas blanco, negro y gris) de los cuatro vinos de diferentes condiciones (de la izquierda a la derecha):

"Vino" (vista inicial antes del experimento),

"Roble" (contacto madera-vino, sin actividad microbiológica),

"FML + roble" (fermentación maloláctica realizada por bacterias planctónicas durante el tiempo de contacto madera-vino),

"Biopelícula" (biopelícula formada sobre madera de roble, efectuando la fermentación maloláctica, liberando unos aromas a madera en el vino).

Las diferencias significativas ($P=0,05$) entre las condiciones se mencionan mediante unas letras diferentes.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han puesto en evidencia que la inoculación de bebidas fermentables con bacterias de fermentación en forma de biopelícula permite iniciar la fermentación de manera reproducible, a menor coste y sin dificultad de realización. En particular, los inventores han puesto en evidencia que la inoculación de bebidas fermentables con bacterias lácticas en forma de biopelícula permite iniciar la fermentación maloláctica de manera reproducible, a menor coste y sin dificultad de realización. De manera ventajosa, en algunos modos de realización, la inoculación de bebidas fermentables con bacterias lácticas en forma de biopelícula permite modular las propiedades organolépticas de las bebidas fermentadas así preparadas.

La presente descripción se refiere así a un procedimiento de preparación de una bebida fermentada que comprende el inicio de la fermentación por inoculación de la bebida fermentable con unas bacterias de fermentación en forma de biopelícula. En particular, la presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de una bebida fermentada que comprende el inicio de la fermentación maloláctica por inoculación de la bebida fermentable con unas bacterias lácticas en forma de biopelícula.

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un vino que comprende el inicio de la fermentación por inoculación de la bebida fermentable con bacterias de fermentación del género *Oenococcus* en forma de biopelícula.

El vino se puede seleccionar de entre los vinos tintos, los vinos blancos, los vinos rosados y los champanes. En algunos modos de realización, el procedimiento de la presente invención comprende la inoculación de la bebida fermentable con una combinación de bacterias de fermentación y de levaduras de fermentación en forma de biopelícula. Se debe observar que la biopelícula comprende las bacterias y las levaduras de fermentación en combinación. Este tipo de biopelícula se denomina "mixta". Las bacterias de fermentación pertenecen al género *Oenococcus*. Las levaduras pueden ser seleccionadas de entre las cepas que pertenecen al género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* o sus combinaciones. La co-inoculación permite ventajosamente iniciar la sucesión de la fermentación alcohólica y

de la fermentación maloláctica. Puede permitir también desarrollar los sabores del vino producido.

Así, en el procedimiento de la presente invención, la fermentación se puede iniciar por inoculación del vino con bacterias de fermentación, que pueden ser de la misma cepa o ser una combinación de dos o más cepas de la misma especie, en forma de biopelícula o se puede iniciar por inoculación con bacterias y levaduras de fermentación, estando las bacterias y las levaduras en combinación en forma de una biopelícula. Dichas biopelículas se denominan "biopelículas mixtas" (combinaciones de bacterias y de levadura).

Las bacterias de fermentación en forma de biopelícula, así como las levaduras cuando están presentes, tienen la ventaja de ser más resistentes a los estreses (pH bajo, fuerte porcentaje de etanol; por ejemplo para el vino, pH inferior a 3,5, concentración en etanol superior o igual al 12% en volumen, etc.) con respecto a las bacterias y, llegado el caso, levaduras, que no se presentan en una organización de este tipo. Parece por lo tanto más necesario pre-aclimatar las bacterias a las condiciones fisicoquímicas de las bebidas a fermentar, lo cual permite reducir considerablemente los costes relacionados con la preparación de bacterias, opcionalmente en combinación con levaduras "listas para el uso".

Las biopelículas son unas estructuras tridimensionales constituidas por unas poblaciones bacterianas incluidas en una matriz exopolimérica (polisacáridos, polipéptidos, ácidos nucleicos). Se desarrollan sobre diferentes tipos de soporte. Frecuentemente consideradas como nefastas debido a que pueden constituir un depósito de microorganismos y ser la fuente de contaminaciones recurrentes del medio ambiente, las biopelículas están, hasta ahora, todavía poco aprovechadas. La adhesión de las bacterias en forma de biopelículas se describe en un campo muy general en el extracto de Lengeler, J.W., "Biology of the prokaryotes", páginas 723-762, 1999.

De manera general, la formación de biopelículas resulta de un proceso dinámico y complejo. La biopelícula se constituye en varias etapas desde la adhesión inicial a un soporte hasta la formación de una estructura tridimensional que puede constituir un verdadero ecosistema que asegura unas funciones diversas. La matriz exopolimérica es un elemento clave de la biopelícula y constituye una verdadera barrera física y biológica que protege las bacterias de los estreses medioambientales (agentes antimicrobianos, estreses ácidos, térmicos, etc.) pero también desempeña el papel de filtro alimentando a la biopelícula con nutrientes. Las bacterias presentes en la biopelícula se benefician de este entorno propicio para proliferar y desarrollar un fenotipo "biopelícula", que les confiere una resistencia muy elevada al estrés y unas funcionalidades específicas (Rieu *et al.*, 2014).

La biopelícula se puede preparar por incubación de microorganismos en un medio favorable a su crecimiento, en presencia del soporte sólido. El tiempo de crecimiento puede depender de la especie y dentro de una especie de la cepa utilizada. Por ejemplo, en el caso de la cepa *O. oeni* ATCC BBA-1163, la incubación dura como máximo 7 días en medio MRS modificado.

Los inventores han mostrado que las bacterias de fermentación en forma de biopelícula, en particular las células de *O. oeni* cultivadas en biopelícula, presentan una resistencia incrementada al estrés (pH bajo, fuerte porcentaje de etanol; por ejemplo para el vino, pH inferior a 3,5, concentración de etanol superior o igual al 12% en volumen, etc.) con respecto a las células cultivadas en medio líquido. Esta resistencia al estrés incrementada les permite resistir a las condiciones fisicoquímicas desfavorables que pueden encontrarse durante la preparación de las bebidas fermentadas, en particular el vino.

Por otro lado, los rendimientos malolácticos de las bacterias en forma de biopelícula son superiores a los de bacterias comúnmente cultivadas planctónicamente.

El fenotipo adquirido por las bacterias durante el crecimiento en biopelícula les confiere esta resistencia que conduce a mejores rendimientos para utilizar el malato y por lo tanto realizar la fermentación maloláctica del vino en un tiempo más corto.

Así, las bacterias y levaduras en forma de biopelícula presentan una resistencia incrementada al estrés. Por otro lado, los constituyentes de la matriz exopolimérica de la biopelícula pueden permitir ventajosamente modular las cualidades organolépticas y sabores de la bebida fermentada preparada. Así, el procedimiento de la presente invención puede permitir la preparación y la modulación de las cualidades organolépticas de una bebida fermentada por inoculación de la bebida fermentable con unas bacterias de fermentación, y eventualmente levaduras, en forma de biopelícula. En particular, el procedimiento de la presente invención puede permitir modular la transferencia de las moléculas aromáticas de la madera hacia la bebida fermentada y/o modular la transferencia de los pigmentos de la madera hacia la bebida fermentada.

Como los constituyentes de la matriz exopolimérica de la biopelícula pueden, como tales, modular las cualidades organolépticas de las bebidas (fermentadas o no), éstos pueden ser utilizados, después de la extracción de la biopelícula, en unos procedimientos para modular las cualidades organolépticas de las bebidas. Así, la presente invención se refiere asimismo a la utilización de los constituyentes, en particular los exopolisacáridos, de la matriz exopolimérica de una biopelícula de bacterias, y eventualmente de levaduras, para modular las cualidades organolépticas de una bebida.

Las bacterias de fermentación en forma de biopelícula o las combinaciones de bacterias y levaduras de fermentación en forma de biopelícula pueden ser inoculadas en forma desenganchada del soporte, es decir después del desenganche del soporte que ha permitido el desarrollo de la biopelícula, o en una forma adherente al soporte, es decir todavía unidas al soporte que ha permitido el desarrollo de la biopelícula. El soporte puede ser cualquier soporte abiótico adecuado. Por ejemplo, Nel *et al.* (Am. J. Enol. Vitic. 2002, 53, 191-196) describen unas biopelículas de *Oenococcus oeni* sobre una superficie de acero inoxidable utilizado, por inoculación de las biopelículas de un mosto de Chardonnay. En el marco de la presente invención, el soporte se puede seleccionar en particular de entre la madera, muy particularmente seleccionar de entre las esencias de madera utilizadas como contenedor de producto líquido fermentado, el corcho, el acero inoxidable, el poliestireno, la silicona o los compuestos de polietileno. El soporte de madera podrá presentarse en diferentes formas, por ejemplos virutas de madera. Cuando el soporte es la madera, éste puede estar calentado o no. El soporte se presenta típicamente en forma de plaquetas (paralelepípedos) o de granulados.

Las bacterias de fermentación en forma de biopelícula o las combinaciones de bacterias y levaduras de fermentación en forma de biopelícula, desenganchada del soporte o adherentes, pueden presentarse en diferentes formas que preservan su viabilidad y vitalidad, tales como al vacío, congeladas o liofilizadas.

Las bacterias de fermentación, o las combinaciones de bacterias y levaduras de fermentación desenganchadas de la biopelícula pueden, en particular, presentarse en forma congelada o en forma liofilizada.

Las bacterias de fermentación, o las combinaciones de bacterias y levaduras de fermentación en biopelícula (adherentes) pueden presentarse en forma congelada, en forma liofilizada, al vacío, bajo atmósfera controlada o también en forma nativa.

La matriz exopolimérica purificada de la biopelícula puede presentarse en forma congelada, liofilizada, al vacío, bajo atmósfera inerte, o en forma nativa, y puede ser añadida para desarrollar las cualidades organolépticas de las bebidas fermentadas o no fermentadas.

El experto en la materia sabrá determinar la cantidad de bacterias de fermentación que se debe inocular con el fin de iniciar la fermentación, variando esta cantidad en función de la naturaleza de la bebida a fermentar y de las bacterias de fermentación seleccionadas.

Típicamente, se emplea un mínimo de 10^6 a 10^7 UFC/ml para iniciar la fermentación maloláctica durante la preparación de los vinos. De manera ventajosa, cuando el soporte es madera y las bacterias, eventualmente en combinación con levaduras, se inoculan en forma adherente al soporte, la inoculación puede permitir modular las propiedades organolépticas de las bebidas fermentadas preparadas.

Es bien conocido que durante el envejecimiento del vino en bodega, tienen lugar unas transferencias de la madera hacia el vino, pero también del vino hacia la madera. Las cantidades y los compuestos que migran dependen de las características de la madera (especie, condiciones de secado, tratamiento térmico, número de utilización, etc.) y del vino (pH, cepas utilizadas, levaduras, bacterias, composición química, etc.). La extracción de compuestos de la madera por el vino es el objeto de numerosas investigaciones. La mejor comprensión de este fenómeno permite que el maestro bodeguero determine la duración de la crianza en bodega. La simple extracción de los compuestos aromáticos (volátiles y polifenoles) y de los taninos de la madera añade riqueza y complejidad a los aromas de los vinos (Díaz-Plaza *et al.*, 2002, Perez-Prieto *et al.*, 2002; Fernandez de Simón *et al.*, 2003). En la madera de roble se ha identificado una gran variedad de compuestos aromáticos que pertenecen a diferentes familias químicas (Cadahía *et al.*, 2003 ; Fernandez de Simón *et al.*, 2006). Los elagitaninos (taninos de la madera) tienen un papel importante como antioxidantes, y gracias a su capacidad para consumir grandes cantidades de oxígeno, regularán el procedimiento de oxidación del vino. La extracción de los principales compuestos volátiles que proceden de la degradación de los componentes de la madera durante la maduración y el calentamiento puede aumentar la complejidad aromática de los vinos envejecidos en bodega (Cadahía *et al.*, 2003; Fernandez de Simón *et al.*, 2006). Después de su extracción, estos compuestos sufren una serie de modificaciones bioquímicas que tienen un impacto sobre las propiedades sensoriales del vino.

Tabla 1: descriptores de olor de diferentes extractos de madera.

Compuestos de madera de roble	Descripciones olfativas
Whisky lactona	Vainillina, aroma a madera, clavo, coco
Furfural	Ligeramente tostado, caramelo
5-metilfurfural	Especiado, tostado, dulce
Guayacol	Especiado, tostado, ahumado/quemado
Eugenol	Especiado, clavo, canela
Isoeugenol	Especiado, clavo, aroma a madera
Vainillina	Dulce, vainilla

Las virutas de madera y los “staves” (trozos de duelas), son alternativas a la utilización de las barricas, pero no están permitidas en todas las legislaciones. Las virutas de madera se utilizan principalmente para acelerar la elaboración del vino por la adquisición de notas de aroma a madera, ya que este formato aumenta las superficies de intercambio, permitiendo unas transferencias más rápidas y más importantes para la misma masa de madera (Fernández de Simón *et al.*, 2010).

La inoculación de bacterias en forma adherente a un soporte de madera permite desarrollar así las propiedades organolépticas de las bebidas preparadas, en particular de los vinos, a la manera de las virutas de madera utilizadas como alternativa a la utilización de las barricas.

La presente descripción se refiere asimismo a una bebida fermentada susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente. Este tipo de bebidas pueden presentar unas propiedades organolépticas distintivas.

Ejemplos

Cepa bacteriana

Para todos los experimentos, la cepa utilizada es *Oenococcus oeni* ATCC BBA-1163.

Los medios de cultivo de las bacterias utilizadas en este estudio son los siguientes:

MRSm: 52 g/l MRS (Conda) al que se añade: 10 g/l de fructosa; 8 g/l de ácido (D-L)málico. El pH se ajusta a 4,8.

MRSstress: MRSm al que se añade un 13% de etanol, pH ajustado a 3,0.

Vino: jugo de uva blanca comercial fermentado gracias a una LSA (levadura seca activa), y después se estandarizan sus parámetros: pH a 3,2 o 3,5; ácido L-málico a 4 g/l; etanol al 12% en volumen. El vino se filtra después a 0,22 µm.

1. Supervivencia de las células en condición de estrés ácido y en presencia de etanol en función de las condiciones de cultivo biopelícula o planctónica.

Las células planctónicas proceden de un cultivo de 24h en MRSm a 28°C. La biopelícula se obtiene por un cultivo de 1 semana en MRSm sobre muestra de acero (2,5*2,5 cm) a 28°C.

Las células sésiles (biopelícula) se desenganchan mecánicamente del acero e se incuban en condiciones de estrés (Medio MRSstress). Las células vivas y cultivables se enumeran sobre gelosa MRSm después de 0, 1, 4 y 24h de incubación en MRSstress.

Los resultados se presentan en la figura 1. Cuadrado: cinética de supervivencia de las células planctónicas; círculo: cinética de supervivencia de las células desenganchadas de una biopelícula sobre acero (2 semanas). La incubación tiene lugar en MRSstress (13% de etanol, pH 3).

Las condiciones de estrés utilizadas en este experimento corresponden a un entorno extremadamente estresante para la bacteria que puede corresponder a las condiciones presentes en algunos vinos. Las células planctónicas sembradas a 10^7 UFC/ml en este medio no sobreviven, con una mortalidad total al final de 4 horas. Las células cultivadas antes en biopelícula tienen una pérdida de un log al final de 4 horas de incubación. Además, la viabilidad se mantiene constante sobre 24h.

Este primer experimento muestra que las células de *O. oeni* cultivadas en biopelículas adquieren una resistencia al estrés que les confiere la capacidad de sobrevivir a los estreses encontrados en el vino, siendo estas condiciones de estrés normalmente letales para unas células cultivadas en medio líquido (planctónico).

2. Seguimiento de la fermentación maloláctica realizada con células *O. oeni* cultivadas en biopelícula o planctónicamente.

Las células planctónicas se cultivan en MRSm a 28°C. La biopelícula se obtiene mediante un cultivo de 7 días en MRSm sobre muestra de madera (2,5*2,5). En el caso de las biopelículas, el medio se renueva una vez a la mitad del tiempo (3,5 d). La fermentación maloláctica se realiza por la siembra directa del cultivo planctónico ($8 \cdot 10^7$ UFC/ml) en 20 ml de vino o inmersión de la biopelícula sobre muestra de madera ($5 \cdot 10^7$ UFC/ml) en el mismo volumen.

Los resultados se presentan en las figuras 2A y 2B.

Las condiciones utilizadas en este caso son representativas del medio del vino. A pH 2,5, la descarboxilación del ácido málico por las células planctónicas es efectiva pero incompleta con, al cabo de 14 días, una concentración residual de ácido málico de aproximadamente 1,5 g/l. Para el vino sintético a pH 3,2, las condiciones parecen demasiado drásticas y la baja capacidad de fermentación no permite consumir el ácido málico con una concentración residual al final de la fermentación de 3 g/l. Los recuentos de estas bacterias en los diferentes tiempos de la incubación han permitido mostrar una mortalidad completa de las células al cabo de los 4 días, lo cual explica la interrupción del consumo del malato a partir de este tiempo para las células planctónicas.

Por el contrario, las células de *O. oeni* cultivadas sobre muestra de madera son capaces de terminar la fermentación maloláctica (consumo completo del malato) en 7 días para el vino sintético a pH 3,5 y en 14 días para el vino sintético a pH 3,2. La cinética de degradación es rápida y eficaz y demuestra la buena actividad metabólica de las bacterias en biopelícula sobre muestra de madera.

Este experimento permite concluir que la bacteria *O. oeni* cultivada en biopelícula sobre muestra de madera es metabólicamente activa y capaz de realizar la fermentación maloláctica en condiciones que imitan el vino y en presencia de estrés. Cabe señalar en este caso que:

- el cultivo en biopelícula no necesita pre-aclimatación de las bacterias en condiciones de estrés.
- los rendimientos malolácticos de estas bacterias en biopelícula son superiores a los de bacterias habitualmente cultivadas planctónicamente.

Es el fenotipo adquirido por las bacterias durante el crecimiento en biopelícula que confiere esta resistencia que conduce a mejores rendimientos para utilizar el malato y, por lo tanto, realizar la fermentación maloláctica del vino en un tiempo más corto.

3. Influencia de biopelícula en los intercambios madera-vino:

* Condiciones de estrés fisicoquímico: pH<3,5; etanol≥12% en volumen

* Resultados de las cualidades organolépticas:

Para evaluar la influencia de las biopelículas en los intercambios madera-vino, se han comparado 3 condiciones: (i) unas muestras de roble sumergidas en el vino, denominada "roble", (ii) una fermentación maloláctica del vino realizada por bacterias planctónicas en presencia de muestras de roble, denominada "FML + roble", (iii) una biopelícula de *O. oeni* sobre las muestras de roble capaz de realizar la FML del vino, denominada "biopelícula".

Al cabo de un mes de crianza (contacto entre la madera y el vino) se han analizado seis moléculas aromáticas características de la madera en los vinos producidos en las 3 condiciones anteriores; estas moléculas aromáticas son el furfural (almendra), la vainillina (vainilla), el guayacol (ahumado), el eugenol (clavo) y las cis y trans whisky lactonas (coco). (Figura 3).

Se han efectuado tres repeticiones biológicas y dos técnicas.

Un ensayo estadístico ANOVA seguido del ensayo post hoc Tukey HSD se ha realizado sobre los datos para determinar las diferencias significativas entre los grupos (las diferencias se representan por letras diferentes: P=0,05).

La condición "biopelícula" es diferente de las otras dos condiciones para el furfural, la vainillina y el guayacol. La biopelícula ha reducido la extracción de estos tres aromas en el vino.

Asimismo, la condición "biopelícula" da una concentración más baja de eugenol y de cis whisky lactona que la condición "FML+roble".

La condición "biopelícula" mejora la extracción de la trans whisky lactona con respecto a la condición sin actividad microbiológica "roble", pero no es significativamente diferente de la condición "FML+roble".

El análisis en componentes principales del conjunto de datos de los análisis de aromas muestra que se tiene en cuenta un 84% de la variabilidad por los dos componentes (figura 4). Existe una fuerte correlación del primer componente (61,31%) con la vainillina, el furfural, el guayacol y el eugenol. Las trans y cis-whisky lactona están muy correlacionadas con el componente 2 (22,72%). La separación de los datos observada muestra que los datos de la condición "biopelícula" están aislados de los datos de "roble" y "FML+roble" por el componente 1, que representa un 61,31% de la variabilidad. Existe por lo tanto una fuerte diferencia estadística entre estas condiciones.

La biopelícula ha modulado por lo tanto las transferencias de moléculas aromáticas de la madera hacia el vino.

El color del vino de estas mismas muestras se ha analizado por espectrofotometría (parámetros $L^*a^*b^*$)(figura 5). El vino blanco inicial es coloreado por contacto con la madera, lo cual se muestra por el aumento de los parámetros a^* (rojo) y b^* (amarillo) y la disminución de L^* (claridad) entre “vino” y “roble”. La actividad de fermentación de las bacterias planctónicas en “FML+roble” no modifica significativamente estos parámetros.

Por el contrario, la “biopelícula sobre roble” limita la coloración, el vino obtenido es menos naranja, (a^* y b^*) y pierde menos claridad (L^*).

La biopelícula ha modulado por lo tanto las transferencias de pigmentos de la madera hacia el vino.

Referencias bibliográficas

Cadahía, E., Fernández de Simón, B., y Jalocha, J. (2003). Volatile Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods after Natural Seasoning and Toasting. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5923-5932.

Díaz-Plaza, EM., Reyero, JR., Pardo, F., Alonso, GL., Salinas, MR. (2002). Influence of Oak Wood on the Aromatic Composition and Quality of Wines with Different Tannin Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (9), 2622-2626

Fernandez de Simón B., Hernández, T., Cadahía, E., Dueñas, M., y Estrella, I. (2003). Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Eur Food Res Technol* 216, 150-156.

Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Poveda, P., y Broto, M. (2006). Chemical Characterization of Oak Heartwood from Spanish Forests of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, Low Molecular Weight Phenolic, and Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8314-8321.

Fernandez de Simon, B., Cadahia, E., Muino, I., Del Alamo, M., & Nevares, I. 2010. Volatile Composition of Toasted Oak Chips and Staves and of Red Wine Aged with Them. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2), 157-165.

Nel, H.A., Bauer, R., Wolfaardt, G.M., y Dicks, L.M.T. (2002). Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 191-196.

Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F., y Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3272-3276.

Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., Guzzo Jean. (2014). The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell. Microbiol.*

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de preparación de un vino que comprende el inicio de la fermentación por inoculación del vino con unas bacterias de fermentación del género *Oenococcus* en forma de biopelícula.
2. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1, en el que el vino es inoculado además con unas levaduras de fermentación, estando las bacterias y levaduras de fermentación en combinación en forma de una biopelícula.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fermentación es una fermentación maloláctica y las bacterias de fermentación son unas bacterias lácticas en forma de biopelícula.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 3, en el que las levaduras de fermentación se seleccionan de entre las cepas que pertenecen al género *Sacharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* o sus combinaciones.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las bacterias de fermentación en forma de biopelícula o la combinación de las bacterias y levaduras de fermentación en forma de biopelícula son inoculadas en una forma desenganchada del soporte, o en una forma adherente al soporte.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el soporte se selecciona de entre la madera, preferentemente las esencias de madera utilizadas como contenedor de producto líquido fermentado, el corcho, el acero inoxidable, el poliestireno, la silicona o los compuestos de polietileno.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que las bacterias de fermentación en forma de biopelícula, o la combinación de las bacterias y levaduras de fermentación en forma de biopelícula, antes de la inoculación, se presentan en forma congelada, al vacío o en forma liofilizada.
- 30 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de bacterias inoculadas varía de 10^6 a 10^7 UFC/ml.

FIG. 1

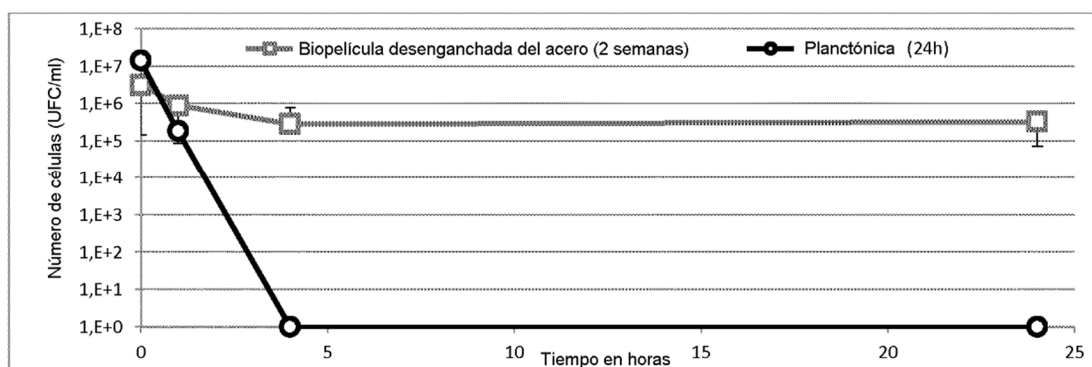


FIG. 2A

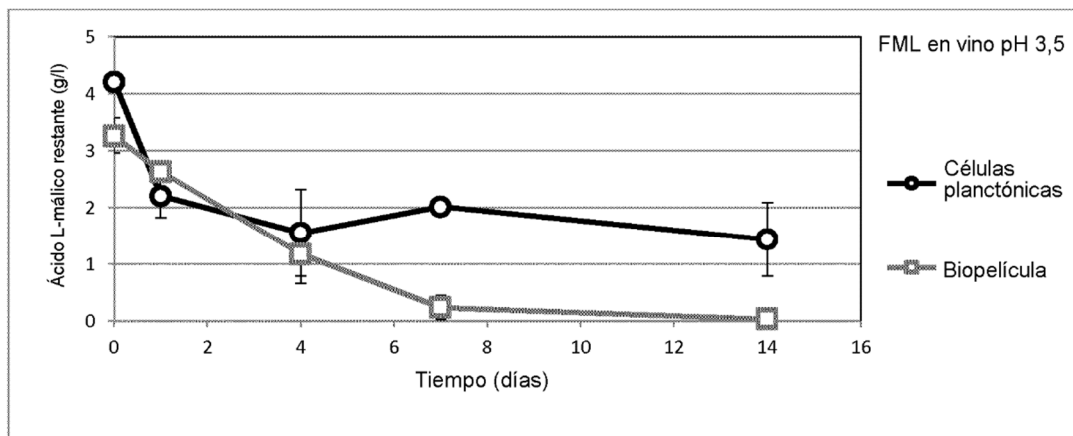


FIG. 2B

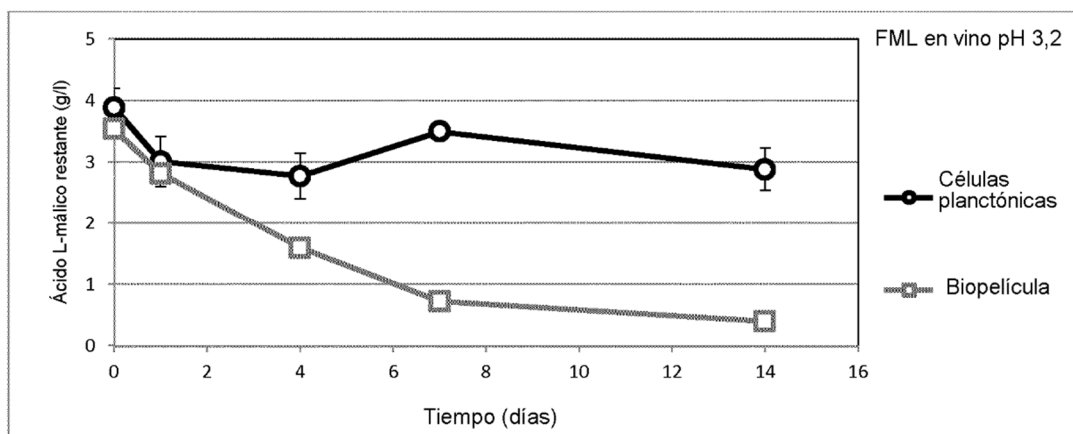


FIG. 3

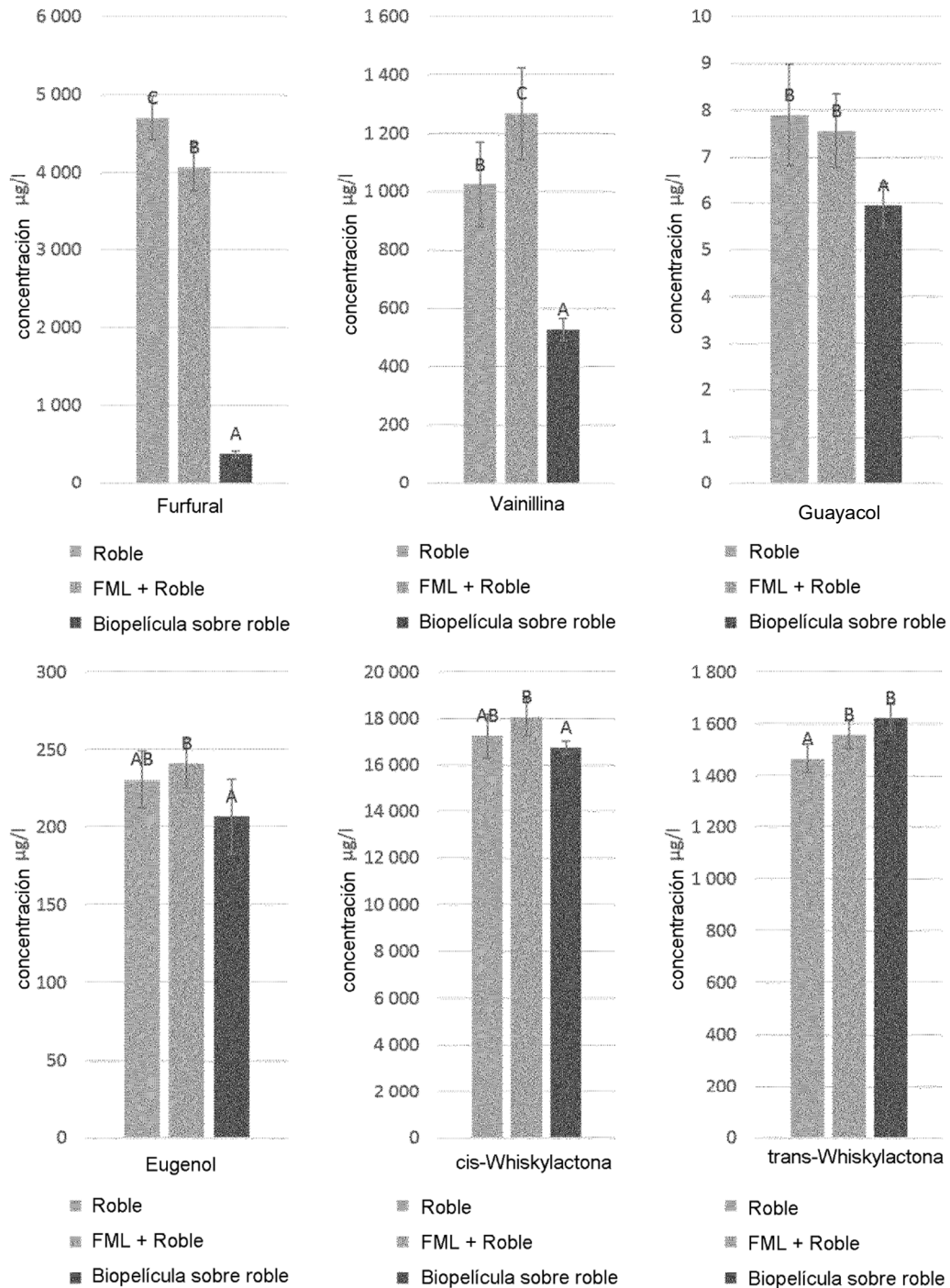


FIG. 4

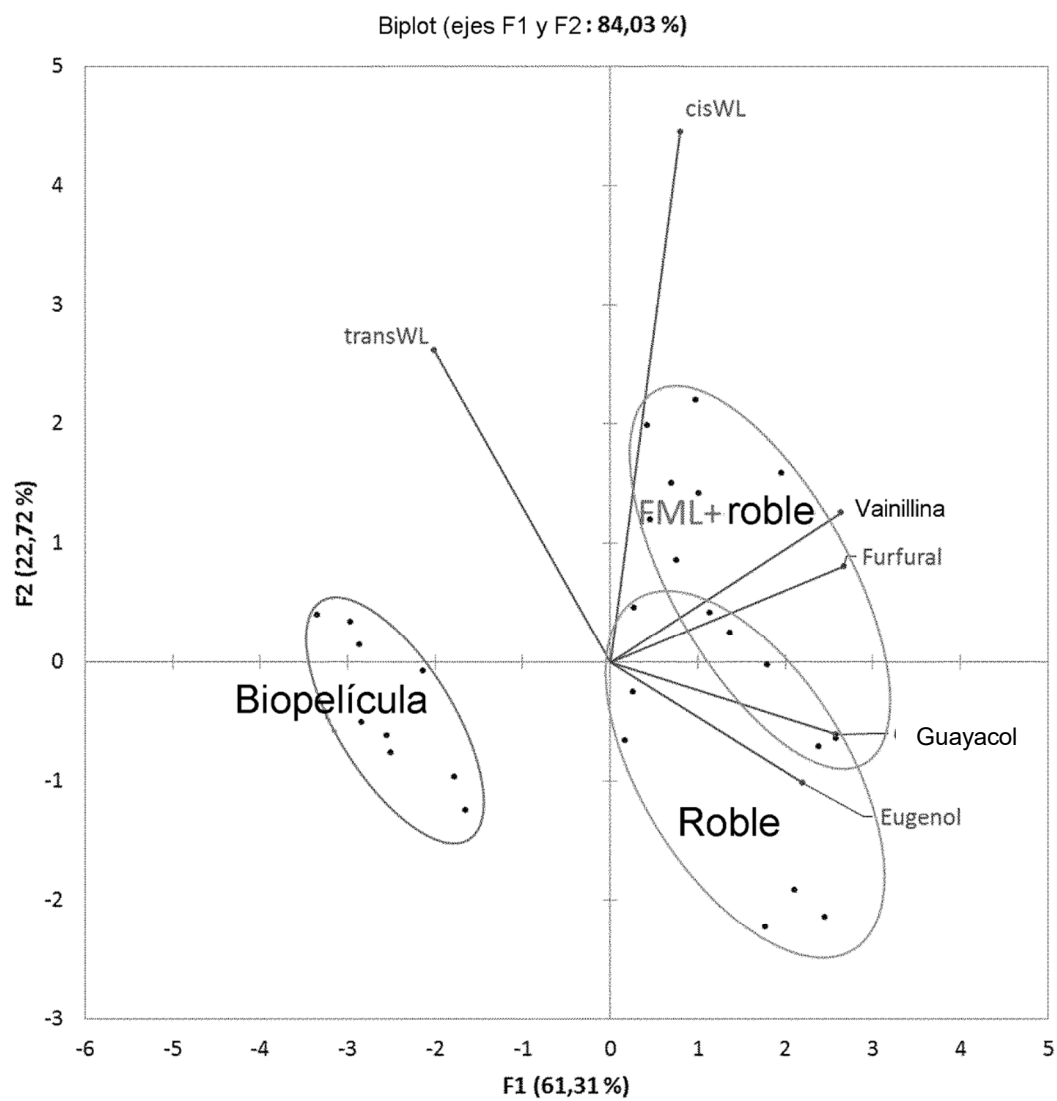


FIG. 5

