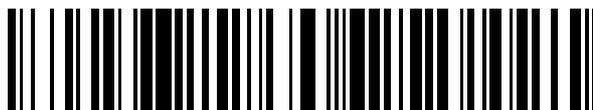


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 624**

51 Int. Cl.:

**C12G 3/02** (2009.01)  
**C12C 5/00** (2006.01)  
**C12G 1/02** (2006.01)  
**C12C 5/02** (2006.01)  
**C12G 1/04** (2006.01)  
**C12G 3/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2017 E 17180844 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3269797**

54 Título: **Procedimiento de producción de una bebida fermentada**

30 Prioridad:

**13.07.2016 ZA 201604801**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**STELLENBOSCH UNIVERSITY (100.0%)  
Admin B, Victoria Street Stellenbosch  
Western Cape Province 7600, ZA**

72 Inventor/es:

**DU TOIT, WESSEL JOHANNES y  
VANNEVEL, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

**MORENO NOGALES, Ángeles**

**ES 2 770 624 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 producción de una bebida fermentada.

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para producir vino. La invención concierne a las reivindicaciones adjuntas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El perfil aromático de una bebida fermentada se considera un factor importante para determinar su percepción por parte del consumidor de la misma. Esto es particularmente relevante en el caso de los vinos derivados de la uva.

10 El perfil aromático del vino es el resultado de un complejo proceso de desarrollo del aroma que tiene numerosas variables y aportes tanto del viñedo como de la bodega. Estas variables incluyen el cultivar de uva particular, el terreno, la cepa particular de levadura responsable de la fermentación y los diversos procedimientos empleados por el enólogo, por nombrar solo algunos.

15 Sauvignon Blanc es un cultivar de uva que ha sido, y sigue siendo, objeto de una considerable investigación. Dos clases de compuestos que se consideran clave para determinar el aroma de Sauvignon Blanc son las metoxipirazinas y los tioles varietales. Los aromas verdes o de pimiento de Sauvignon Blanc se pueden atribuir a las metoxipirazinas, que son compuestos estables. Los tioles varietales están presentes en las uvas como precursores inodoros y se liberan por enzimas en la boca o por levaduras durante la fermentación. Se cree que estos compuestos volátiles son responsables de los aromas afrutado, a tallo, a sudor y a orina de gato asociados con Sauvignon Blanc, siendo el aroma afrutado el elemento aromático deseable. A este respecto, los tioles varietales 3-mercaptohexanol (3MH) y acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) son compuestos notables.

20 Se cree que el tiol volátil 3MH es responsable de los aromas de maracuyá, pomelo y cítricos en general, mientras que se cree que 3MHA es responsable de los aromas de maracuyá, grosella espinosa, guayaba y otros aromas de frutas tropicales en niveles más bajos.

25 Si bien estos compuestos contribuyen significativamente al perfil aromático de Sauvignon Blanc, también contribuyen al de otros cultivares de vino, incluidos Chenin Blanc, Riesling, Pinot Gris, Gewürztraminer, Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz y Garnacha.

Hasta la fecha, los complejos procesos implicados en el desarrollo de los perfiles aromáticos de los vinos no se comprenden completamente. Los procedimientos para producir un perfil aromático deseado en el producto final son limitados y siguen siendo un tema importante de investigación.

30 El documento EP2554650A1 divulga un procedimiento para producir una bebida alcohólica que tiene un sabor afrutado. El procedimiento incluye el burbujeo de una corriente de gas que contiene sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) en zumo de uva antes de la inoculación por la levadura, y/o durante la fermentación. Este procedimiento es desventajoso en la medida en que el H<sub>2</sub>S es un veneno altamente tóxico de amplio espectro. El peligro se ve agravado por el hecho de que la inhalación de H<sub>2</sub>S en concentraciones de 100-150 partes por millón (ppm)

35 incapacita el sentido del olfato y por lo tanto también la indicación de peligro. Por lo tanto, este procedimiento puede requerir equipo de seguridad adicional. Además, puede ser problemático controlar con precisión la concentración del H<sub>2</sub>S captado por la mezcla fermentable.

40 El documento WO2010/061575A1 describe un promotor para la fermentación a baja temperatura de levadura. El promotor es un producto de digestión de la β-conglicinina derivada de la soja. El promotor resuelve el problema de la disminución de la eficiencia de fermentación debido a una desaceleración en la actividad de proliferación de la levadura cuando la levadura se fermenta a baja temperatura para la producción de una bebida alcohólica espumosa. Como fuente de nitrógeno se usan una sustancia inorgánica como el sulfato de amonio y una materia orgánica como un aminoácido y una proteína.

45 La publicación de Michael J. Harsch et al titulada "New Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol in Grape Juice: Thiol-Forming Potential and Kinetics during Early Stages of Must Fermentation" demuestra que el suministro de una fuente externa de sulfuro de hidrógeno al zumo de uva aumenta enormemente su potencial de formación de tiol. La publicación describe además el descubrimiento de (E)-2-hexen-1-ol como un nuevo precursor de tiol adicional y demuestra que posee, junto con (E)-2-hexanal, un inmenso potencial de formación de tiol durante la fermentación.

50 El documento JPS5651756B describe la preparación de vino de frutas con una fragancia de fruta fresca mejorada mediante la adición de aldehído 6C y/o alcohol 6C a las materias primas o a la fermentación de las uvas. El documento US 2013/0273197A1 se refiere a cepas de levadura y a la selección de cepas de levadura particulares y a su combinación para producir vinos con un perfil de sabor alterado y tioles aumentados en el producto de fermentación.

La invención divulgada en el presente documento pretende abordar algunos de los inconvenientes mencionados anteriormente, al menos en cierta medida.

### SUMARIO DE LA INVENCION

- 5 De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar vino que tiene un perfil aromático modulado, incluyendo el procedimiento: preparar una mezcla fermentable y someter la mezcla fermentable a fermentación, caracterizado porque se introduce una solución acuosa de sulfuro de amonio en la mezcla fermentable para obtener una concentración predeterminada de entre 1,5 y 50 mg/l de sulfuro de amonio en la mezcla fermentable antes de la fermentación.
- 10 Un rasgo adicional de la invención proporciona que el procedimiento incluya la etapa adicional de permitir entre aproximadamente 1 y 24 horas, preferiblemente aproximadamente 24 horas, de tiempo de contacto entre la mezcla fermentable y el sulfuro de amonio antes de someter la mezcla fermentable a fermentación.
- 15 Aún otros rasgos de la invención proporcionan un aldehído C6, un alcohol C6 o una combinación de los mismos para introducir en la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación; que el aldehído C6 sea (*E*)-2-hexenal; que el (*E*)-2-hexenal se introduzca en la mezcla fermentable en una cantidad para obtener una concentración de entre aproximadamente 0,5 y 3 mg/l del mismo en la mezcla fermentable; que el alcohol C6 sea (*E*)-2-hexenol; y que el (*E*)-2-hexenol se introduzca en la mezcla fermentable en una cantidad para obtener una concentración de entre aproximadamente 7 y 15 mg/l del mismo en la mezcla fermentable.
- 20 Todavía otros rasgos de la invención proporcionan que la mezcla fermentable sea zumo de uva o mosto; que el zumo de uva sea zumo de uva blanca o zumo de uva tinta; que el zumo de uva sea zumo de uvas blancas o tintas de la especie *Vitis vinifera*; que el zumo de uva sea zumo de uvas Sauvignon Blanc; y que el zumo de uva sea turbio.
- En una realización en la que la mezcla fermentable es zumo de uva blanca o tinta, se introduce el aldehído C6, un alcohol C6 o una combinación de los mismos en la mezcla fermentable mediante la introducción de hojas de vid, preferiblemente hojas de vid al menos parcialmente trituradas.
- 25 Un rasgo adicional de la invención proporciona la etapa adicional de sacudir la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación para obtener una distribución de aditivos sustancialmente uniforme en la mezcla fermentable.
- Todavía otras características de la invención proporcionan la etapa adicional de introducir una mezcla de levadura rehidratada en la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación; y que la mezcla de levadura rehidratada incluya levadura de vino seca activa y un nutriente de rehidratación de levadura.
- 30 Se describirá ahora una realización de la invención, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos.

### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

En los dibujos:

- 35 la Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para preparar vino que tiene un perfil aromático modulado;
- las Figuras 2 a 5 se relacionan con un primer experimento y son gráficos de barras que representan las concentraciones de tioles varietales, 3MH y 3MHA, en la mezcla fermentada después de llevar a cabo el procedimiento de la Figura 1 en cuatro tipos diferentes de mezclas fermentables, etiquetadas S1, S2, S3 y S4, a las que se han añadido 0, 3,1 y 6,2 mg/l de sulfuro de amonio antes de la fermentación;
- 40 las Figuras 6 a 8 se relacionan con un segundo experimento y son gráficos de barras que muestran las concentraciones de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de las mezclas fermentables S1, S3 y S4 que contienen 0, 1,5, 3,1, 6,2, 12,4 y 24,8 mg/l de sulfuro de amonio, respectivamente;
- 45 las Figuras 9 a 11 se refieren a un tercer experimento y son gráficos de barras que muestran las concentraciones de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de las mezclas fermentables S1, S3 y S4 que contenían cero aditivos (control), 6,2 mg/l de sulfuro de amonio, 6,2 mg/l de sulfuro de amonio más (*E*)-2-hexenal 1,5 mg/l y sulfuro de amonio 6,2 mg/l más (*E*)-2-hexanol 10 mg/l;
- 50 la Figura 12 se relaciona con un cuarto experimento y es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de mezclas fermentables con solo sulfuro de amonio, solo hojas de vid y sulfuro de amonio más hojas de vid;

- la Figura 13 se relaciona con un quinto experimento y es un gráfico de barras que muestra la concentración de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de mezclas fermentables que contenían cero aditivos (control), sulfuro de amonio 3,1 mg/l, sulfuro de amonio 3,1 mg/l más (*E*)-2-hexanol 10 mg/l y solo (*E*)-2-hexanol 10 mg/l;
- 5 la Figura 14 se relaciona con el quinto experimento y es un gráfico de barras que muestra los resultados sensoriales de los componentes aromáticos percibidos de las muestras de bebidas fermentadas de la Figura 13;
- la Figura 15 se relaciona con un sexto experimento y es un gráfico de barras que muestra la concentración de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de mezclas fermentables que contienen sulfuro de amonio 0 o 3,1 mg/l y en las que se permitieron tiempos de contacto de 1 hora, 24 horas y 48 horas, respectivamente, antes de la fermentación; y
- 10 las Figuras 16 a 17 se relacionan con un séptimo experimento y son gráficos de barras que muestran la concentración de 3MH y 3MHA en bebidas fermentadas después de la fermentación de mezclas fermentables que son turbias, semiturbias o no turbias con o sin sulfuro de amonio 3,1 mg/l y permitiendo tiempos de contacto ya sea de 1 o 24 horas.
- 15

### DESCRIPCIÓN DETALLADA CON REFERENCIA A LOS DIBUJOS

Se proporciona un procedimiento para preparar vino que tiene un perfil aromático modulado. En particular, el procedimiento es para preparar vino que tiene una concentración modulada o variada de odorantes de impacto o volátiles, más específicamente tioles varietales tales como 3MH y 3MHA. En efecto, la intensidad de los aromas frutales o tropicales experimentados en el consumo de la bebida fermentada se ve afectada. En general, la intensidad de los aromas frutales o tropicales aumenta con el procedimiento.

20

El procedimiento para preparar vino que tiene un perfil aromático modulado incluye preparar una mezcla fermentable, introducir sulfuro de amonio como aditivo en la mezcla fermentable para obtener una concentración predeterminada del sulfuro de amonio en la mezcla fermentable y someter entonces la mezcla fermentable a fermentación.

25

El sulfuro de amonio se añade para obtener una concentración de entre aproximadamente 1,5 y 50 mg/l, preferiblemente entre aproximadamente 1,5 y 6,5 mg/l, más preferiblemente entre aproximadamente 1,5 y 3 mg/l en la mezcla fermentable o entre aproximadamente 3 y 50 mg/l, preferiblemente entre aproximadamente 3 y 6,5 mg/l en la mezcla fermentable. La concentración predeterminada se seleccionará de antemano y la cantidad de sulfuro de amonio que se añade a la mezcla fermentable se calculará en función del volumen de la mezcla fermentable. Se puede seleccionar una concentración basada en la concentración deseada de uno o más tioles varietales en la bebida fermentada producida de acuerdo con el procedimiento.

30

Se puede permitir un intervalo de entre 1 hora y 24 horas, preferiblemente aproximadamente 24 horas, después de la adición de sulfuro de amonio a la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación. Este intervalo proporciona un período de tiempo de contacto entre la mezcla fermentable y el sulfuro de amonio.

35

Se ha encontrado que la adición de productos volátiles de hojas verdes, en particular aldehídos y alcoholes C6, potencia aún más el efecto del sulfuro de amonio sobre el perfil aromático de una bebida fermentada cuando se añade a la mezcla fermentable en combinación con sulfuro de amonio. Los aldehídos C6, los alcoholes C6 o una combinación de los mismos pueden así introducirse en la mezcla fermentable como un segundo aditivo junto con sulfuro de amonio como primer aditivo. En particular, se puede añadir (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenol o una combinación de los mismos a la mezcla fermentable como un segundo aditivo antes de la fermentación. Las concentraciones de (*E*)-2-hexenal o (*E*)-2-hexenol añadidas a la mezcla fermentable pueden depender del tipo de mezcla fermentable usada y de la cantidad de estos tipos de compuestos que puedan estar ya presentes o normalmente están presentes en el tipo seleccionado de mezcla fermentable. Se puede introducir (*E*)-2-hexenal en la mezcla fermentable para obtener una concentración predeterminada de entre aproximadamente 0,5 y 3 mg/l. Se puede introducir (*E*)-2-hexenol en la mezcla fermentable para obtener una concentración predeterminada de entre aproximadamente 7 y 15 mg/l. Se pueden añadir (*E*)-2-hexenal y (*E*)-2-hexenol a la mezcla fermentable en combinación en los mismos intervalos de concentración dados anteriormente.

40

45

Se ha encontrado que la adición de aldehídos C6, alcoholes C6 o una combinación de los mismos a la mezcla fermentable (en ausencia de sulfuro de amonio) antes de someter la mezcla fermentable a la fermentación también modula el perfil aromático de la bebida fermentada, aunque en menor medida. Estos compuestos pueden derivar de hojas de vid o pueden añadirse aldehídos C6, alcoholes C6 seleccionados o combinaciones de los mismos, tales como (*E*)-2-hexenal y (*E*)-2-hexenol a la mezcla de fermentación en concentraciones predeterminadas tales como las concentraciones mencionadas anteriormente.

50

La mezcla fermentable puede ser zumo de uva o mosto. El zumo de uva puede ser zumo de uvas blancas o uvas tintas, particularmente de la especie *Vitis vinifera*. En una realización preferida, el zumo de uva es zumo de uvas Sauvignon Blanc y preferiblemente zumo turbio u opaco.

55

5 Se puede introducir una combinación de aldehídos y alcoholes C6 que incluye (*E*)-2-hexenal y/o (*E*)-2-hexenol en la mezcla fermentable mediante la introducción de hojas de vid en la mezcla. Esto es particularmente conveniente cuando la mezcla fermentable deriva del zumo de uva blanca o de uva tinta. Cuando se usan las hojas de vid, puede ser preferible que estén al menos parcialmente trituradas o fragmentadas para ayudar a la liberación más efectiva de los productos volátiles de la hoja verde, tales como los aldehídos C6 y los alcoholes C6, así como los ésteres C6 contenidos en las mismas. Se puede usar cualquier procedimiento conveniente para lograr esto.

10 La mezcla fermentable también puede sacudirse antes de someterla a fermentación. Esto puede ayudar a obtener una distribución de aditivos sustancialmente uniforme, particularmente cuando se añaden hojas de vid. Se puede usar cualquier forma adecuada de agitación, incluida la agitación mecánica por medio de un impulsor o dispositivo similar.

Se puede añadir una mezcla de levadura rehidratada a la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación. Esto puede ocurrir de cualquier manera adecuada y la cantidad añadida puede calcularse en función de los requisitos de dosificación conocidos. La mezcla de levadura rehidratada puede incluir levadura de vino seca activa y un nutriente de rehidratación de levadura.

15 La figura 1 ilustra un diagrama de flujo de un procedimiento (100) para producir vino que tiene un perfil aromático modulado de acuerdo con una realización de la invención. El procedimiento (100) incluye la etapa de preparar (110) una mezcla fermentable. En esta realización, la mezcla fermentable es zumo extraído de la especie de uva *Vitis vinifera* por medio de prensado. Más específicamente, la mezcla fermentable es zumo extraído de uvas Sauvignon Blanc, que es una clasificación más baja de la especie *Vitis vinifera*. El zumo se mantiene a una temperatura nominal de aproximadamente 15 °C. Luego, se introduce un aditivo (120) en el zumo. En la presente realización, el aditivo es una solución acuosa de sulfuro de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S. La cantidad de aditivo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S introducido en el zumo se mide para obtener una concentración predeterminada del mismo en el zumo. En esta realización, la concentración predeterminada está entre aproximadamente 1,5 mg/l y 50 mg/l. La mezcla fermentable se agita ligeramente (130) para obtener una distribución de aditivos uniforme en la misma.

25 A continuación, se introduce levadura de vino seca rehidratada (140) en la mezcla fermentable. Una persona experta en la técnica relevante conocerá las maneras en que esto se puede realizar. La mezcla fermentable se deja fermentar (150) en seco. Posteriormente, la mezcla fermentada se procesa adicionalmente (160), por ejemplo, la mezcla fermentada se filtra y se embotella, según sea apropiado o deseado por el experto.

#### SECCION EXPERIMENTAL

30 Las Figuras 2 a 5 muestran los resultados de un primer experimento (experimento 1) y son gráficos de barras que representan las concentraciones de tioles varietales, 3MH y 3MHA en la mezcla fermentada obtenida al llevar a cabo el procedimiento (100) de la Figura 1 en cuatro diferentes tipos de mezclas fermentables que contienen diferentes concentraciones de sulfuro de amonio. El experimento se realizó con uvas Sauvignon Blanc de la cosecha de 2015 que se obtuvieron de cuatro granjas vinícolas independientes en la Provincia Occidental del Cabo de Sudáfrica, cada una con un terreno sustancialmente diferente. Se prensaron las uvas de cada granja para obtener el zumo destinado a la fermentación, preparando así la mezcla fermentable. Para cada una de las cuatro mezclas, se realizaron tres conjuntos separados de experimentos.

40 El primer experimento para cada mezcla era un grupo de control en el que no se introdujo ningún aditivo, por lo que la mezcla fermentable tenía una concentración de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S de 0 mg/l. Para el segundo experimento, se introdujo una solución acuosa de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en cada mezcla fermentable para obtener una concentración de 3,1 mg/l. Y, por último, para el tercer experimento, se introdujo una solución acuosa de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en cada mezcla fermentable para obtener una concentración de 6,2 mg/l. Posteriormente se hará referencia a estos conjuntos como las muestras del grupo de control, las muestras de 3,1 mg/l y las muestras de 6,2 mg/l respectivamente.

45 Los experimentos se realizaron por triplicado para evitar un posible conjunto de resultados anómalos. Se usó una combinación de muestras de 700 ml, 2 l y 4 l. Cada muestra que contiene aditivo se removió o agitó ligeramente después de la introducción del aditivo para obtener una distribución sustancialmente uniforme en toda la mezcla. Posteriormente, se introdujo levadura rehidratada en cada muestra. En este experimento, se usó "VIN7", una levadura *Saccharomyces cerevisiae* de Anchor Wine Yeast™, y se rehidrató usando "Go-Ferm Protect Evolution" de Lallemant™. Después de tres días de la inoculación, se introdujo "FERMAID K", también de Lallemant™, en cada muestra como un nutriente de levadura.

50 Las muestras de la mezcla de fermentación se dejaron fermentar en seco, después de lo cual las muestras se enviaron a análisis de laboratorio para obtener lecturas de las concentraciones de 3MH y 3MHA contenidas en las muestras. Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de ultrarresolución (UPLC).

55 La Figura 2 muestra las concentraciones de 3MH y 3MHA para las muestras del grupo de control, las muestras de 3,1 mg/l y las muestras de 6,2 mg/l respectivamente para el Sauvignon Blanc de la primera granja vinícola (S1). Se calculó el valor medio de las tres muestras para cada conjunto. Las muestras del grupo de control arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 442 nanogramos por litro (ng/l) y 65 ng/l, respectivamente. Las muestras de 3,1 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 675 ng/l y 109 ng/l respectivamente.

5 Esto muestra un aumento del 53 % en la concentración de 3MH y un aumento del 70 % en la concentración de 3MHA respectivamente en comparación con el grupo de control. Las muestras de 6,2 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 1446 ng/l y 381 ng/l respectivamente. Este es un aumento del 228 % en la concentración de 3MH y un aumento del 490 % en la concentración de 3MHA respectivamente en comparación con el grupo de control.

10 La Figura 3 muestra los resultados correspondientes para el Sauvignon Blanc de la segunda granja vinícola (S2). El valor medio de las tres muestras para cada conjunto se calculó nuevamente. Las muestras del grupo de control arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 477 ng/l y 110 ng/l respectivamente. Las muestras de 3,1 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 361 ng/l y 101 ng/l respectivamente y las muestras de 6,2 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 672 ng/l y 193 ng/l respectivamente. Aunque las muestras de 3,1 mg/l muestran concentraciones disminuidas, las muestras de 6,2 mg/l nuevamente muestran aumentos en la concentración de 41 % y 75 % para 3MH y 3MHA respectivamente en comparación con el grupo de control.

15 La Figura 4 muestra los resultados correspondientes para el Sauvignon Blanc de la tercera granja vinícola (S3). El valor medio de las tres muestras para cada conjunto se calculó nuevamente. Las muestras del grupo de control arrojan concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 1270 ng/l y 124 ng/l respectivamente. Las muestras de 3,1 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 2407 ng/l y 407 ng/l respectivamente y las muestras de 6,2 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 3516 ng/l y 736 ng/l respectivamente. Este es un aumento del 90 % en la concentración de 3MH y un aumento del 229 % en la concentración de 3MHA respectivamente y un aumento del 176 % en la concentración de 3MH y del 495 % de 3MHA respectivamente, ambos en comparación con el grupo de control.

20 La Figura 5 muestra los resultados correspondientes para el Sauvignon Blanc de la cuarta granja vinícola (S4). El valor medio de las tres muestras para cada conjunto se calculó nuevamente. Las muestras del grupo de control arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 442 ng/l y 65 ng/l respectivamente. Las muestras de 3,1 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 675 ng/l y 109 ng/l respectivamente y las muestras de 6,2 mg/l arrojaron concentraciones promedio de 3MH y 3MHA de 1447 ng/l y 381 ng/l respectivamente. Este es un aumento del 53 % en la concentración de 3MH y un aumento del 69 % en la concentración de 3MHA respectivamente, y un aumento del 228 % en la concentración de 3MH y del 490 % de 3MHA respectivamente, ambos en comparación con el grupo de control.

25 Los resultados del experimento inicial, por lo tanto, indican que el procedimiento descrito anteriormente modula las concentraciones de 3MH y 3MHA en la bebida fermentada, en este caso el vino blanco Sauvignon Blanc, y por lo tanto también modula el perfil aromático de la misma. Más específicamente, indican que un aumento de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  en la mezcla fermentable generalmente da como resultado un aumento de las concentraciones de 3MH y 3MHA en la bebida fermentada resultante.

30 Se realizó un experimento posterior (experimento 2) usando uvas de las granjas vinícolas S1, S3 y S4 para investigar la relación causal mencionada anteriormente y para confirmar si un aumento de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  en la mezcla fermentable generalmente da como resultado un aumento de las concentraciones de 3MH y 3MHA en la bebida fermentada resultante. Los resultados del mismo se muestran en la Tabla 1 a continuación con los gráficos correspondientes que se muestran en las Figuras 6 a 8.

35 40 *Tabla 1: Concentraciones de 3MH y 3MHA con concentraciones crecientes de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  en la mezcla S1 (Figura 6)*

Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	474,60	63,8
1,5	439,31	54,86
3,1	518,92	80,335
6,2	2194,77	510,5
12,4	8831,92	2525,01
24,8	26295,00	10647,33

S3 (Figura 7)		
Concentración de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	528,64	19,43
1,5	359,43	9,78
3,1	421,51	9,87
6,2	598,77	17,30
12,4	945,02	29,30
24,8	2010,82	67,03
S4 (Figura 8)		
Concentración de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	465,59	28,4
1,5	586,60	52,2
3,1	734,76	51,9
6,2	1298,87	127,7
12,4	11396,98	1646,3
24,8	20342,10	4255,9

Los resultados de este experimento indican claramente, y por tanto confirman, que las concentraciones aumentadas de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en una mezcla fermentable generalmente dan como resultado concentraciones aumentadas de 3MH y 3MHA en la bebida fermentada resultante. Los resultados para S1, que se muestran en la Figura 6, muestran aumentos en 3MH de hasta 5400 % y aumentos en 3MHA de hasta 16600 % en comparación con el grupo de control.

Cabe señalar que se sabe que otros compuestos de amonio, tales como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> se usan como fuente de nitrógeno para la asimilación de la levadura durante la fermentación del vino. Estos compuestos de amonio se introducen típicamente en la mezcla fermentable en concentraciones de aproximadamente entre 100 mg/l y 200 mg/l. El uso de estos compuestos de amonio en concentraciones mucho más bajas, como en los experimentos de la presente divulgación (entre aproximadamente 1,5 mg/l y 6,2 mg/l), no serviría como fuentes suficientes de nitrógeno. Por el contrario, el uso de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en concentraciones mucho más altas (que la de los otros compuestos de amonio que se usan como fuentes de nitrógeno), como mínimo, daría como resultado un vino con un alto grado de aromas indeseables o reductores, incluido el de los huevos podridos.

Se realizó un experimento adicional (experimento 3) con uvas de las granjas vinícolas S1, S3 y S4 en el que se introdujo un segundo aditivo o precursor adicional en la mezcla fermentable antes de la fermentación. El experimento se realizó con un grupo de control, en el que no se introdujo ningún aditivo precursor, un primer grupo en el que solo se introdujo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en una concentración de 6,2 mg/l, un segundo grupo que incluía además (*E*)-2-hexenal en una concentración de 1,5 mg/l y un tercer grupo en el que el (*E*)-2-hexenal se sustituyó por (*E*)-2-hexenol en concentraciones de 10 mg/l. En todos los grupos 1, 2 y 3, por lo tanto, estaba presente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en la mezcla fermentable.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 2 a continuación con los gráficos correspondientes que se muestran en las Figuras 9 a 11. Estos resultados indican que la adición de (*E*)-2-hexenal (denominado "hexenal" en las Figuras 9 a 11) y (*E*)-2-hexenol (denominado hexenol en las Figuras 9 a 11) a la mezcla fermentable de hecho moduló el perfil aromático de la bebida fermentada, en esta realización vino. Además, en al menos un experimento, la adición adicional de ambos (*E*)-2-hexenal y (*E*)-2-hexenol dio como resultado un aumento de las concentraciones de 3MH y 3MHA (incrementos de 2500 % y 5500 % respectivamente). Esto indica que tuvo un efecto sinérgico con el sulfuro de amonio al aumentar la concentración de tioles varietales, aumentando así la intensidad de los aromas frutales en el vino.

Tabla 2: Concentraciones de 3MH y 3MHA con precursores seleccionados

S1 (Figura 9)		
Precursor de concentración [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	993,75	210,09
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S	3094,16	899,33
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 1,5 (E)-2-hexenal	9629,17	3848,16
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 10 (E)-2-hexenol	26284,02	11804,22
S3 (Figura 10)		
Precursor de concentración [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	391,04	135,49
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S	6039,16	2729,88
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 1,5 (E)-2-hexenal	5246,29	2394,64
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 10 (E)-2-hexenol	6762,49	3276,49
S4 (Figura 11)		
Precursor de concentración [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
0	604,27	58,0
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S	1409,59	204,0
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 1,5 (E)-2-hexenal	1939,68	180,1
6,2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S + 10 (E)-2-hexenol	7034,87	1584,1

El experimento anterior se extendió aún más (experimento 4) utilizando las hojas de la vid de la uva particular. Este experimento posterior sirvió para investigar si al menos se podían observar efectos similares con el uso de aldehídos y alcoholes C6 de origen natural como (E)-2-hexenal y (E)-2-hexenol derivados de hojas de vid en comparación con los resultados donde estos compuestos se introdujeron artificialmente como aditivos.

5

Este experimento (experimento 4) se realizó con un primer grupo en el que solo se introdujo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en una concentración de 6,2 mg/l, un segundo grupo en el que se introdujeron hojas de la vid particular en una proporción de 10 gramos por litro (g/l), y un tercer grupo en el que se introdujeron (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S y las hojas en combinación, usando las mismas concentraciones y proporciones. Cada grupo se repitió permitiendo tiempos de contacto variables con las pieles de las uvas: sin contacto con la piel, 6 horas de contacto con la piel y 12 horas de contacto con la piel.

10

Los resultados de este experimento (experimento 4) se muestran en la Tabla 3 a continuación con el gráfico correspondiente que se muestra en la Figura 12.

Tabla 3: Concentraciones de 3MH y 3MHA con precursores seleccionados

Precursor [Concentración]	Contacto con la piel [h]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [6,2 mg/l]	0	12082	2617,40
	6	5589	1052,36
	12	2793	715,81
Hojas [10 g/l]	0	1894	383,97

Precursor [Concentración]	Contacto con la piel [h]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
	6	2706	166,08
	12	1368	52,91
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [6,2 mg/l] + Hojas [10 g/l]	0	16554	3296,83
	6	5815	784,95
	12	3345	325,92

5 Estos resultados indican que se pueden observar efectos similares cuando se usan hojas de vid como fuente de aldehídos C6 y alcoholes C6, incluidos (*E*)-2-hexenal y (*E*)-2-hexenol. Al menos un resultado indicó un aumento dramático en la concentración de 3MH y 3MHA en la bebida fermentada cuando se usa junto con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en el procedimiento descrito anteriormente.

Este resultado es sorprendente, ya que generalmente se cree que las hojas tienen un efecto indeseable en el vino y generalmente se eliminan antes del prensado.

10 Para comprobar los componentes aromáticos percibidos para el usuario, se realizó un experimento sensorial (experimento 5). Se entrenaron diez catadores para identificar descriptores aromáticos tales como guayaba, dulce de plátano, manzana amarilla, hoja de tomate y vegetales cocidos. Luego se pidió a los catadores que calificaran la intensidad de cada uno de estos descriptores en cuatro vinos diferentes que se produjeron usando el procedimiento descrito anteriormente y utilizando precursores variables como se describió anteriormente. Las muestras se presentaron a ciegas a los catadores y consistieron en un grupo de control en el que no se introdujeron precursores, un primer grupo en el que se introdujo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S en una concentración de 3,1 mg/l, un segundo grupo en el que se introdujeron combinaciones de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S y (*E*)-2-hexenol en concentraciones de 3,1 y 10 mg/l respectivamente, y un tercer grupo en el que solo se introdujo (*E*)-2-hexenol en una concentración de aproximadamente 10 mg/l.

20 La Figura 13 muestra la concentración de 3MH y 3MHA en las muestras de vino resultantes. La Figura 14 indica una calificación promedio de 100 para cada muestra según lo indicado por los catadores. Los catadores calificaron como porcentaje la intensidad percibida de cada uno de los descriptores aromáticos, que consisten en guayaba, dulce de plátano, manzana amarilla, hoja de tomate y vegetales cocidos. Los resultados indican que existe una correlación entre la concentración de 3MH en el vino y el perfil aromático percibido. Esto es más evidente por la intensidad percibida de la guayaba, que sigue una tendencia similar a la concentración de 3MH en la muestra relevante.

25 En los experimentos descritos anteriormente, la adición de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S era seguida inmediatamente o poco después por la inoculación, sometiendo así la mezcla fermentable a fermentación. Se realizaron experimentos adicionales para investigar si un mayor tiempo de contacto entre el aditivo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S y la mezcla fermentable antes de la fermentación tenía influencia sobre las concentraciones de 3MH y 3MHA en el vino resultante.

30 Además, el zumo de uva a menudo se clarifica antes de la fermentación alcohólica. Las razones para esto pueden incluir la eliminación de partículas no deseadas de la piel, partículas del tallo, residuos de carne, semillas, polvo y levaduras y bacterias no deseadas que se originan en el viñedo. La opacidad del zumo se denomina turbidez del mismo. El grado de claridad del zumo o la no turbidez requerida es un parámetro considerado por el enólogo, ya que una clarificación excesiva también puede conducir a resultados de fermentación indeseables. Una forma natural de clarificar el zumo es permitir que las partículas que causan la turbidez se depositen en el fondo del líquido.

35 La Figura 15 muestra los resultados experimentales de un sexto experimento realizado usando zumo de Sauvignon Blanc claro (sustancialmente no turbio) en el que se permitió un tiempo de contacto de la mezcla fermentable con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S de 1 hora, 24 horas y 48 horas respectivamente antes de someter la mezcla a la fermentación. Los resultados de las muestras sin aditivo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S se proporcionan como muestras de control. Los datos de estos experimentos se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones de 3MH y 3MHA después de variar el tiempo de contacto con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S

Precursor de concentración [mg/l]	Tiempo de contacto [h]	Concentración de 3MHA [ng/l]	Concentración de 3MH [ng/l]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [3,1 mg/l]	1	845,6	4262,6
	24	2218,2	6441,9
	48	831,8	3240,5

Precursor de concentración [mg/l]	Tiempo de contacto [h]	Concentración de 3MHA [ng/l]	Concentración de 3MH [ng/l]
Cero (muestra de control)	1	446,7	167,6
	24	461,9	207,0
	48	453,3	224,6

A partir de los datos que se muestran en la Tabla 4 y la Figura 15, se puede observar que un tiempo de contacto de 24 horas entre  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  y la mezcla fermentable antes de la inoculación producía las mayores concentraciones de 3MH y 3MHA en el vino resultante.

- 5 A continuación, se investigó el efecto de la turbidez variable de la mezcla fermentable en combinación con un tiempo de contacto de 24 horas entre la mezcla fermentable y  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  sobre las concentraciones de 3MH y 3MHA en el vino resultante en un séptimo experimento.

10 Los experimentos se realizaron con zumo de Sauvignon Blanc de dos granjas diferentes. En cada caso, se usaron un zumo turbio, un zumo semiturbio y un zumo sustancialmente no turbio, a cada uno de los cuales se les permitió 1 hora y 24 horas de contacto con  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  respectivamente. Las muestras a las que no se añadió  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  se usaron como muestras de control. La Tabla 5 muestra los datos de este experimento usando el zumo de una granja y la Tabla 6 los datos de este experimento usando el zumo de la otra de las dos granjas. Las Figuras 16 y 17 muestran gráficos correspondientes a los datos de la Tabla 5 y la Tabla 6, respectivamente.

15 *Tabla 5: Concentraciones de 3MH y 3MHA después de variar el tiempo de contacto con  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  y variar la turbidez usando zumo de una granja*

Claridad	Tiempo de contacto	Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
Turbio	24 h	3,1	4533,374	543,763
		0	842,618	479,339
	1 h	3,1	2948,29	286,629
		0		
Intermedio (semiturbio)	24 h	3,1	2474,362	435,466
		0	879,079	389,835
	1 h	3,1	1971	331
		0	640,2	418
No turbio	24 h	3,1	1613,365	363,524
		0	422,454	409,709
	1 h	3,1	1270,531	376,46
		0	408,883	452,567

*Tabla 6: Concentraciones de 3MH y 3MHA después de variar el tiempo de contacto con  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  y variar la turbidez usando zumo de otra granja*

Claridad	Tiempo de contacto	Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
Turbio	24 h	3,1	6155,184	422,374
		0	696,0341	145,48
	1 h	3,1	4619,775	387,234
		0	1238,04	179,571

Claridad	Tiempo de contacto	Concentración de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S [mg/l]	Concentración de 3MH [ng/l]	Concentración de 3MHA [ng/l]
Intermedio (semiturbio)	24 h	3,1	4200,93	1049,752
		0	528,5764	174,983
	1 h	3,1	3802,806	825,972
		0	1102,073	287,772
No turbio	24 h	3,1	6441,892	2218,215
		0	461,9239	206,986
	1 h	3,1	4262,64	845,671
		0	446,7337	167,568

5 Los resultados de la Tabla 5 muestran las mayores concentraciones de 3MH y 3MHA en el vino resultante en el caso del zumo turbio y la menor en el zumo sustancialmente no turbio. Los resultados usando el zumo de la segunda de estas granjas parecen no ser concluyentes. En ambos casos, sin embargo, se puede observar un claro aumento de la concentración en el 3MH y 3MHA resultantes en los casos en que se permitieron 24 horas de tiempo de contacto con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S antes de la inoculación.

10 Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar vino en el que los aromas frutales o tropicales tienen mayor intensidad en comparación con las muestras de control debido al hecho de que contiene una mayor concentración de tioles varietales tales como 3MH y 3MHA. Los expertos en la materia entenderán que la concentración de sulfuro de amonio añadido a la mezcla fermentable puede variar dependiendo de la medida en que el experto desee modular el perfil aromático del vino, es decir, de acuerdo con la concentración deseada de tioles varietales en el vino. El tiempo de contacto de la mezcla fermentable con sulfuro de amonio también se puede variar para obtener una concentración preseleccionada de tioles varietales en el vino. Cuando se desea una concentración relativamente alta de los mismos, la mezcla fermentable tendrá un tiempo de contacto de aproximadamente 24 horas. Otras formas en que se puede aumentar la concentración de tioles varietales en la bebida fermentada incluyen la adición de aldehídos C6, alcoholes C6 o combinaciones de los mismos a la mezcla fermentable junto con el sulfuro de amonio, antes de la fermentación. Estos pueden ser de origen natural y derivar de hojas de vid o incluso pieles de uva, o pueden usarse aldehídos C6 y alcoholes C6 específicos tales como (*E*)-2-hexanol y (*E*)-2-hexanol. Los expertos en la materia seleccionarían una concentración de aldehídos C6, alcoholes C6 o combinaciones de los mismos en función de la concentración deseada de tioles varietales en el producto final, sin exceder sustancialmente las cantidades de estos tipos de compuestos que normalmente pueden estar presentes o consumirse en un tipo particular de mezcla fermentable.

25 A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contenido requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" o variaciones como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un entero o grupo de enteros establecido, pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de enteros.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para preparar vino que tiene un perfil aromático modulado, incluyendo el procedimiento: preparar una mezcla fermentable y someter la mezcla fermentable a fermentación, **caracterizado porque** se introduce una solución acuosa de sulfuro de amonio en la mezcla fermentable para obtener una concentración predeterminada de entre 1,5 y 50 mg/l de sulfuro de amonio en la mezcla fermentable antes de la fermentación.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento incluye además la etapa adicional de permitir entre 1 hora y 24 horas de tiempo de contacto entre la mezcla fermentable y el sulfuro de amonio antes de someter la mezcla fermentable a fermentación.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se introduce un aldehído C6, un alcohol C6 o una combinación de los mismos en la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el aldehído C6 es (*E*)-2-hexenal.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el (*E*)-2-hexenal se introduce en la mezcla fermentable para obtener una concentración de entre 0,5 y 3 mg/l del mismo en la mezcla fermentable.
- 15 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el alcohol C6 es (*E*)-2-hexenol.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el (*E*)-2-hexenol se introduce en la mezcla fermentable para obtener una concentración de entre 7 y 15 mg/l del mismo en la mezcla fermentable.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla fermentable es zumo de uva o mosto.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el zumo de uva es zumo de uva blanca o zumo de uva tinta.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el zumo de uva es zumo de la especie de uva *Vitis vinifera*.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que se introduce el aldehído C6, alcohol C6 o una combinación de los mismos en la mezcla fermentable mediante la introducción de hojas de vid, preferiblemente hojas de vid al menos parcialmente trituradas.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye además la etapa adicional de agitar la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación.
- 30 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye además la etapa adicional de introducir una mezcla de levadura rehidratada en la mezcla fermentable antes de someter la mezcla fermentable a fermentación y en el que la mezcla de levadura rehidratada incluye levadura de vino seca activa y un nutriente de rehidratación de levadura.

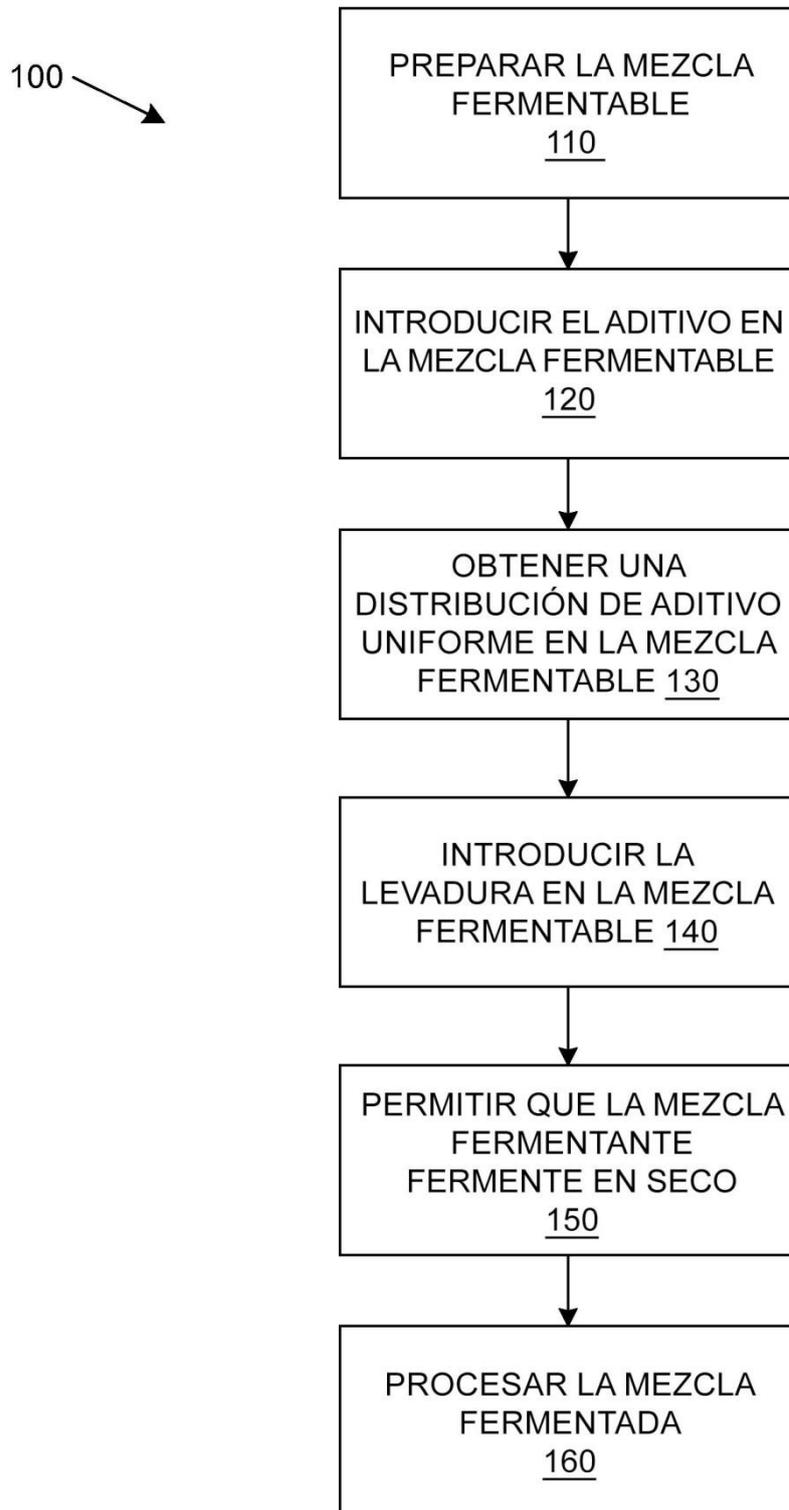


Figura 1

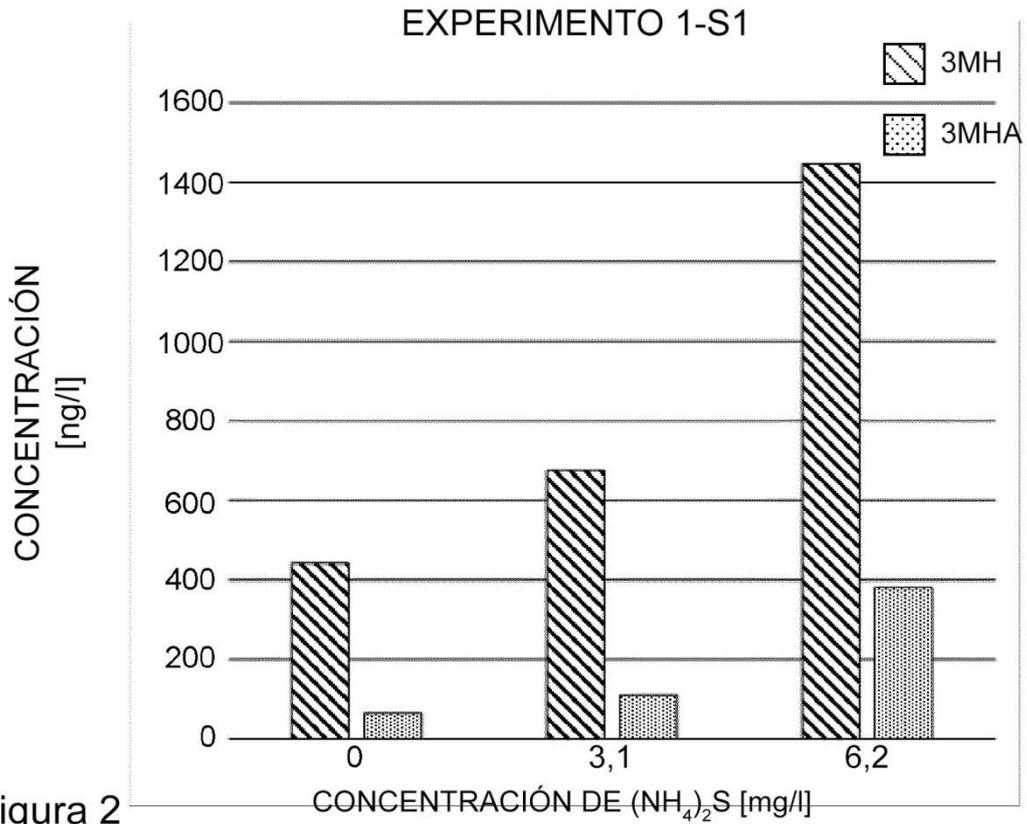


Figura 2

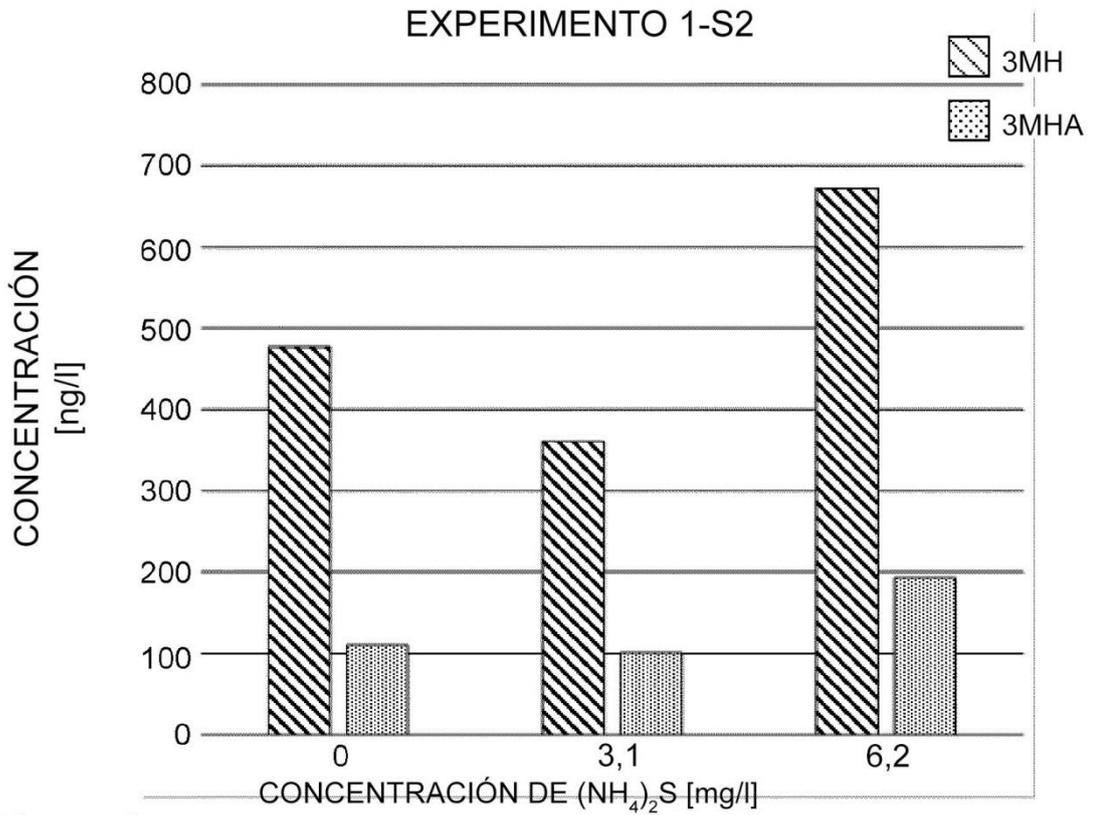


Figura 3

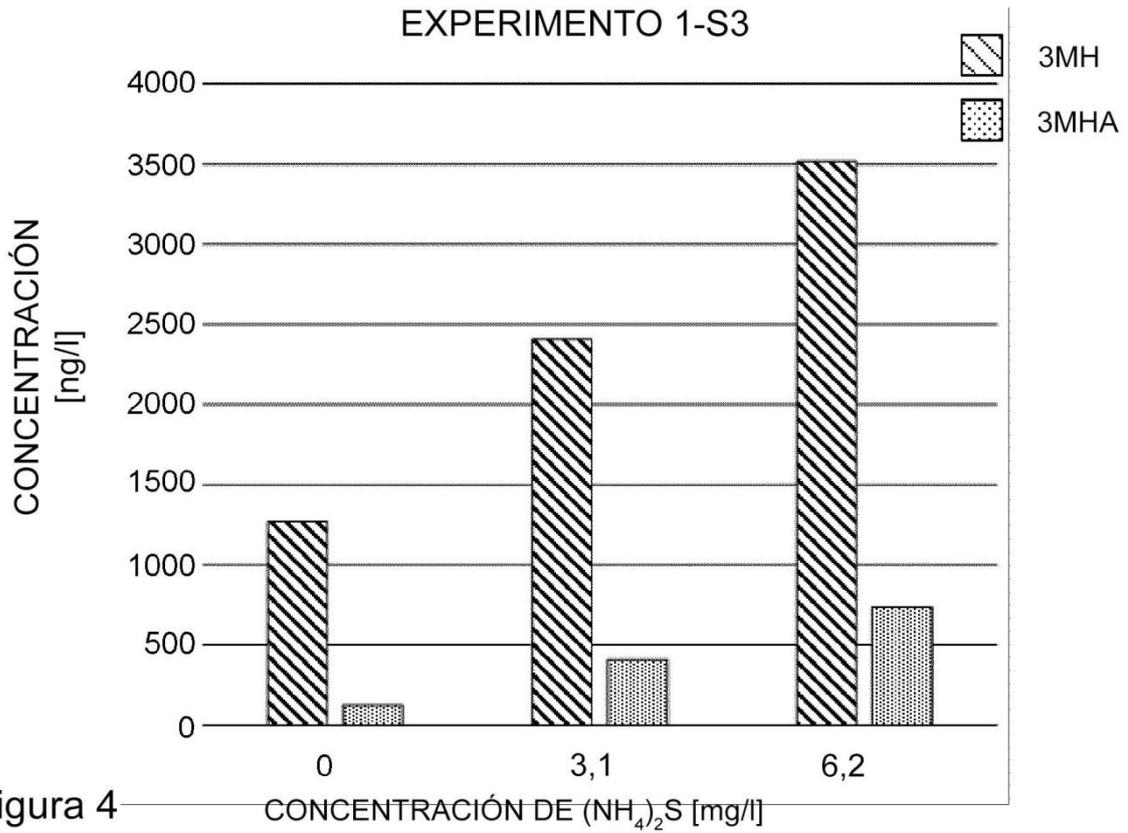


Figura 4

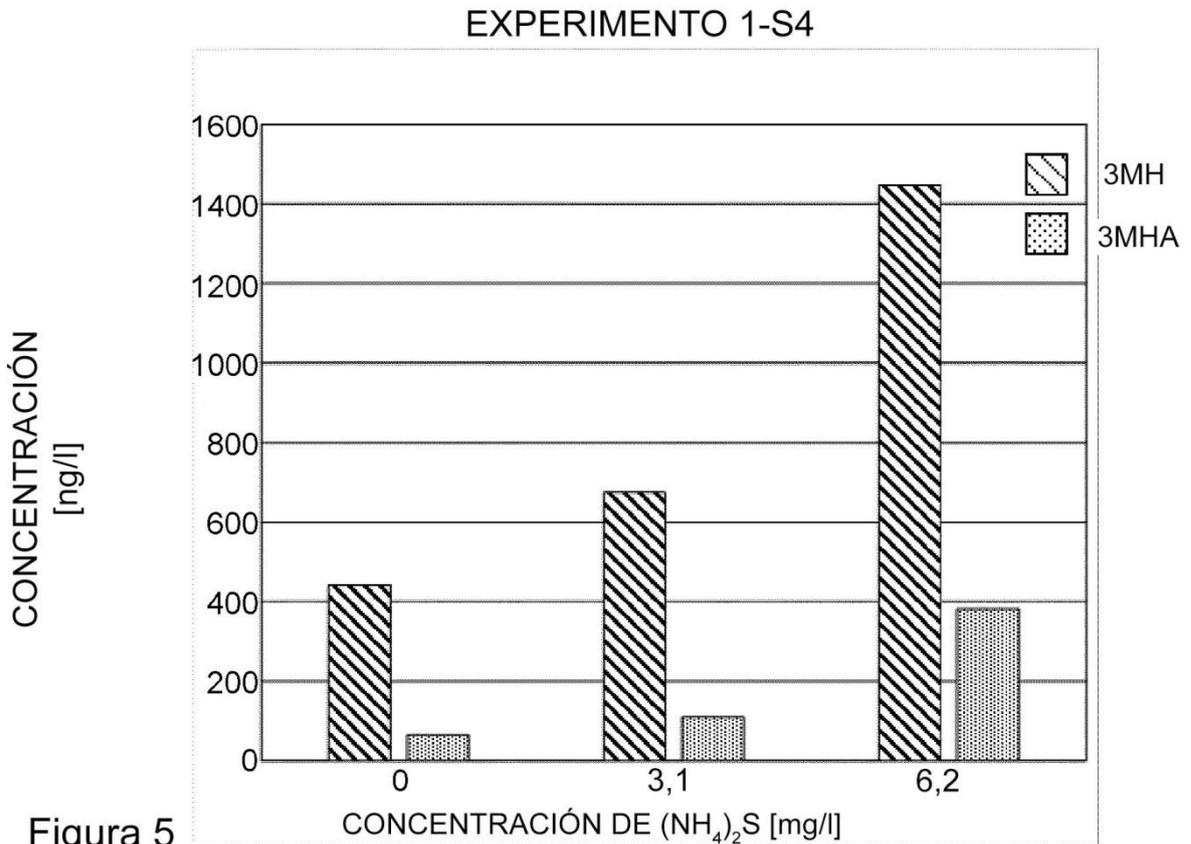


Figura 5

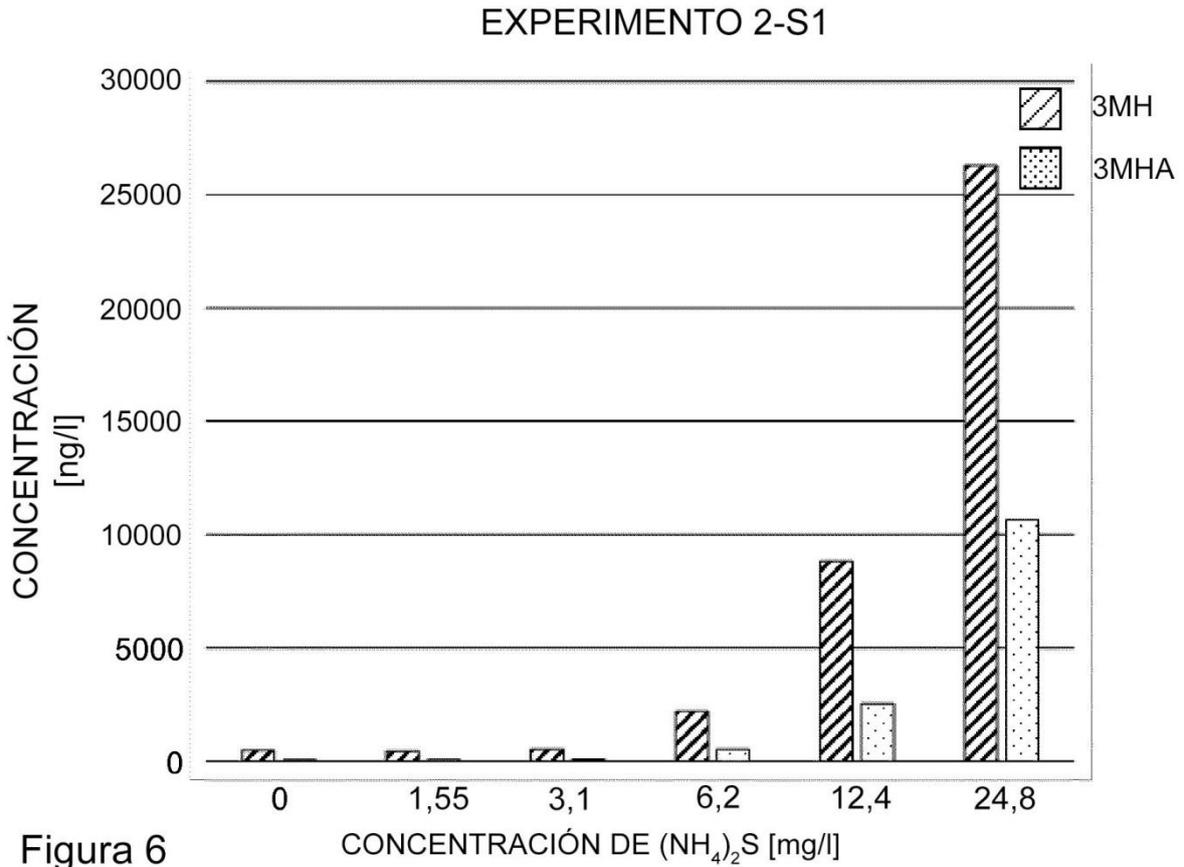


Figura 6

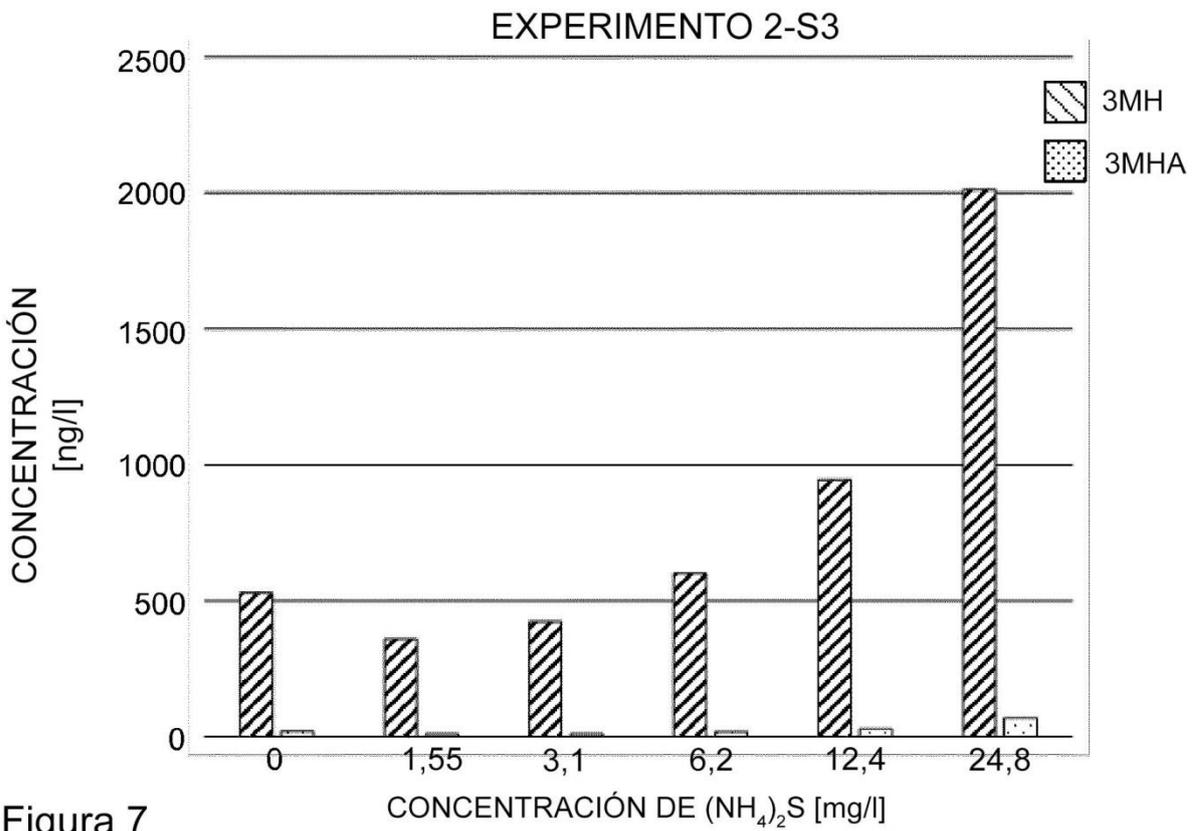


Figura 7

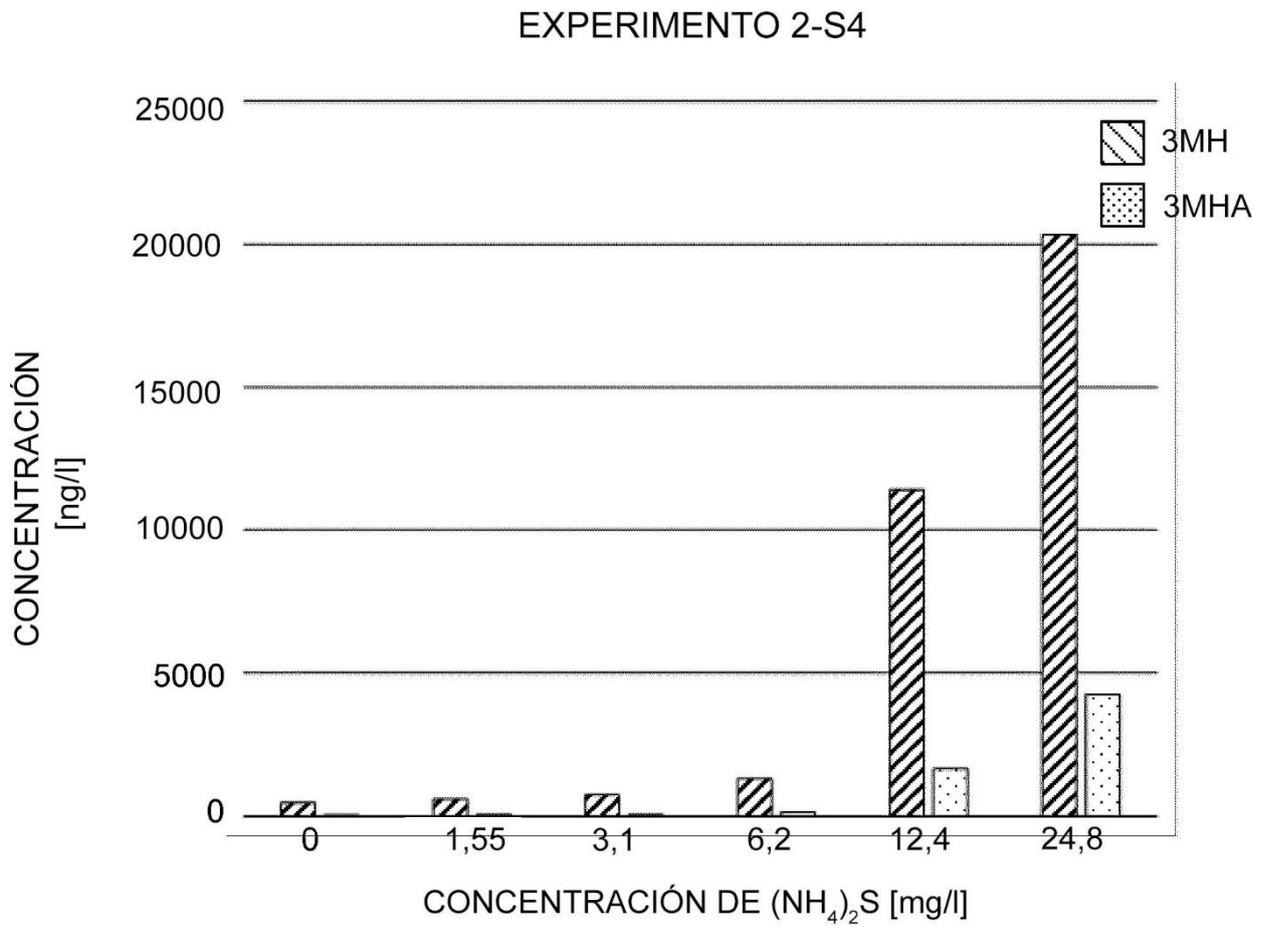
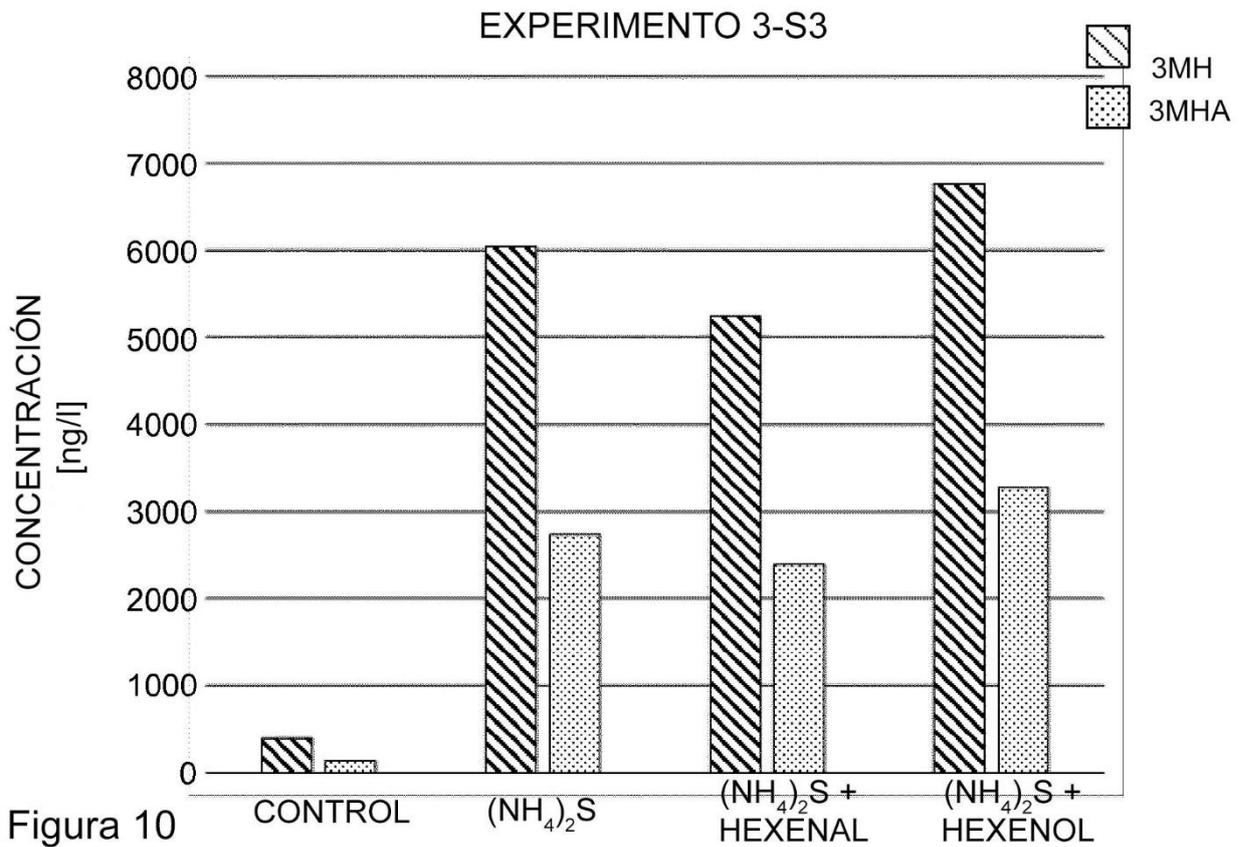
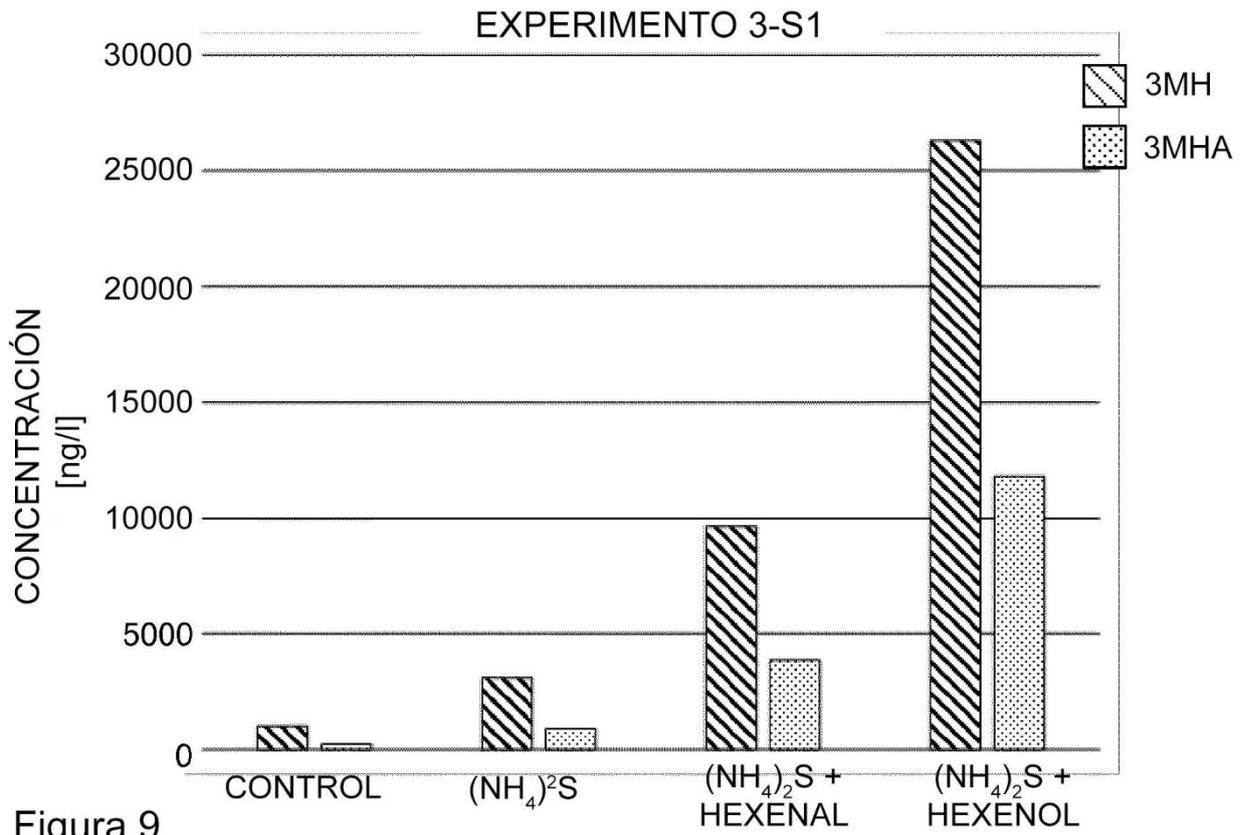
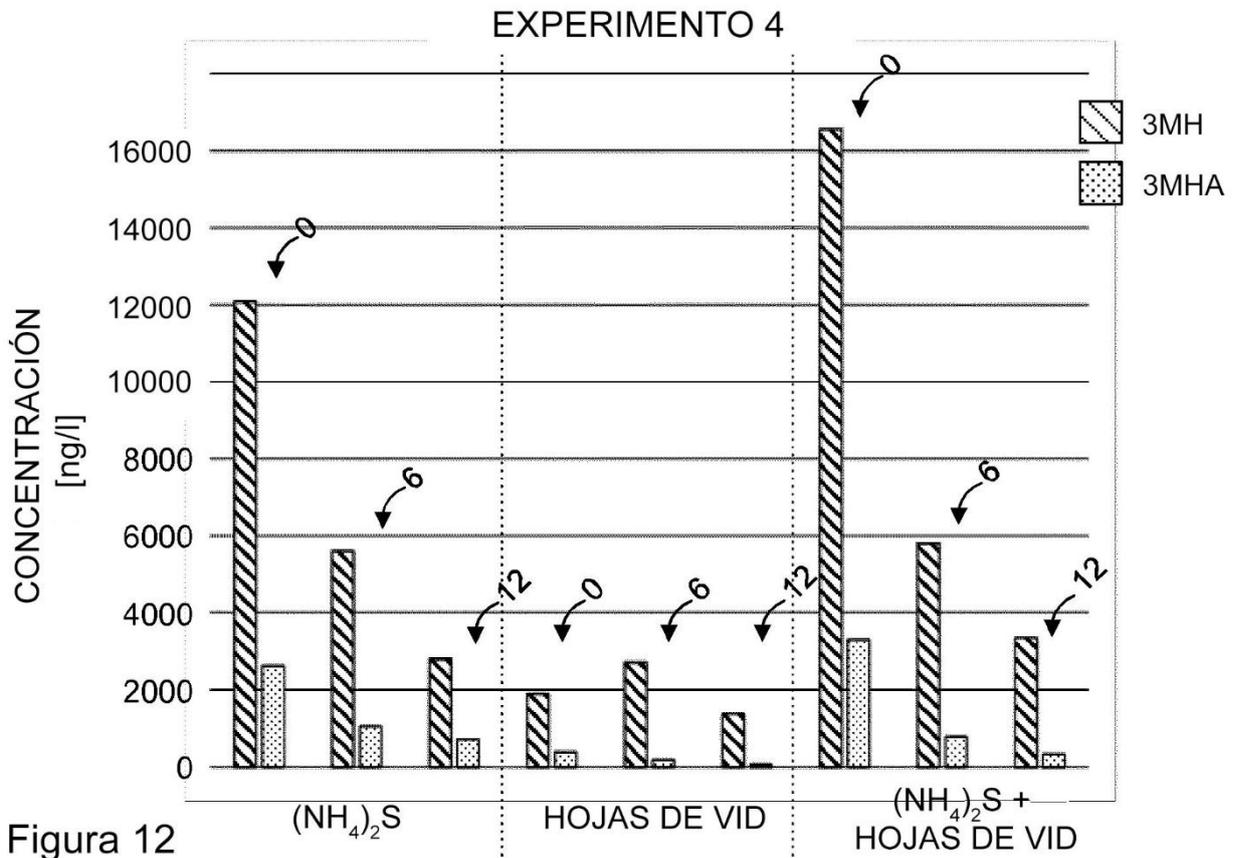
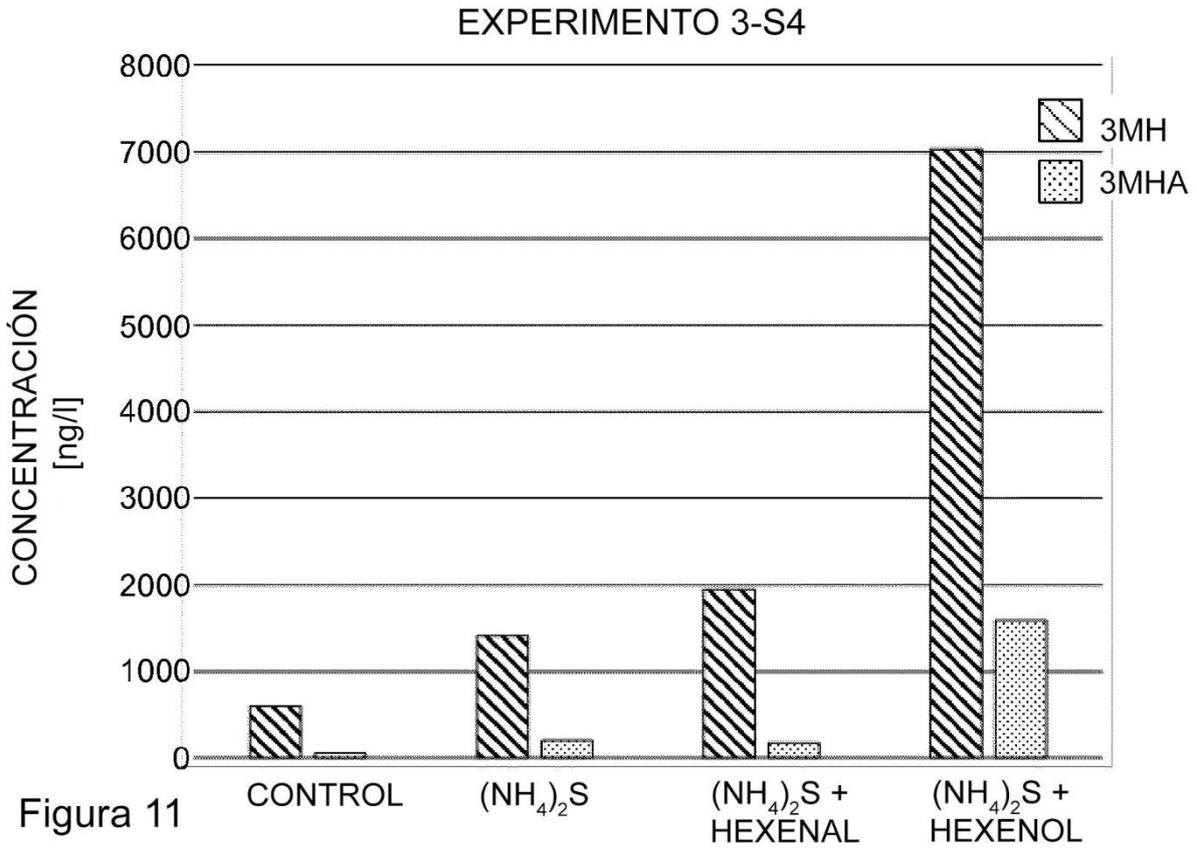


Figura 8





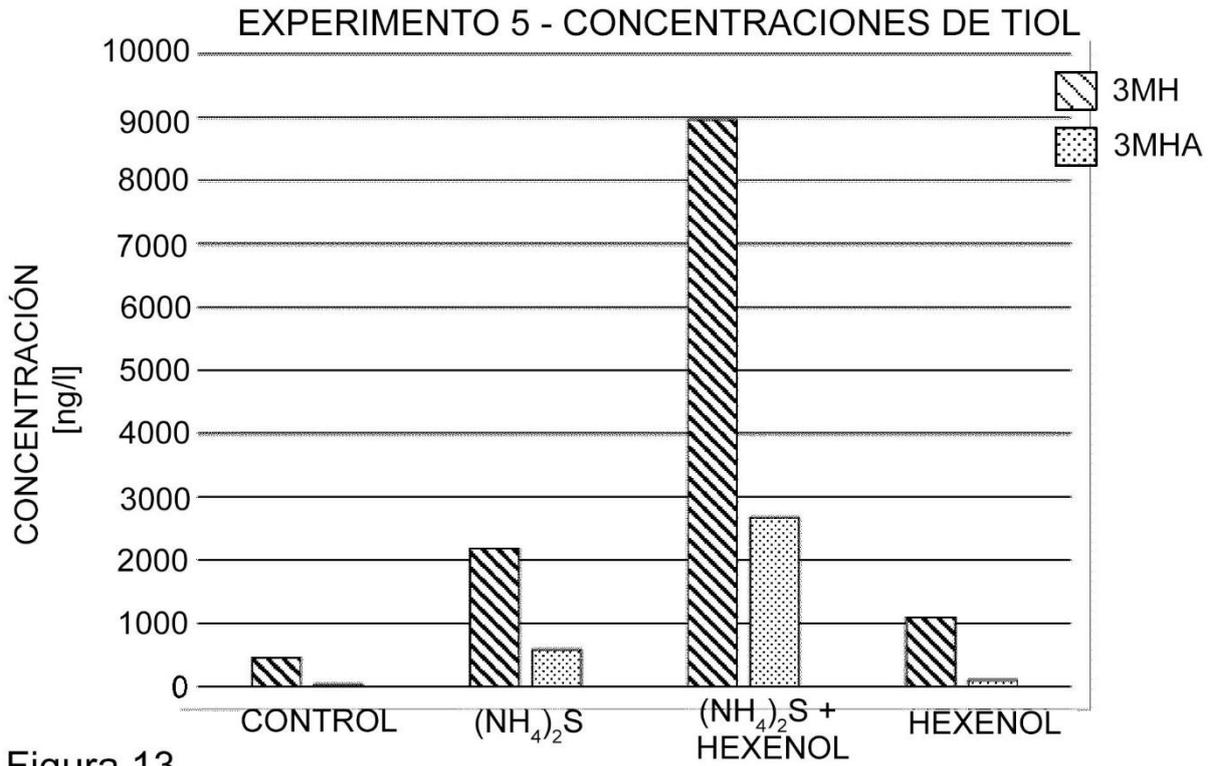


Figura 13

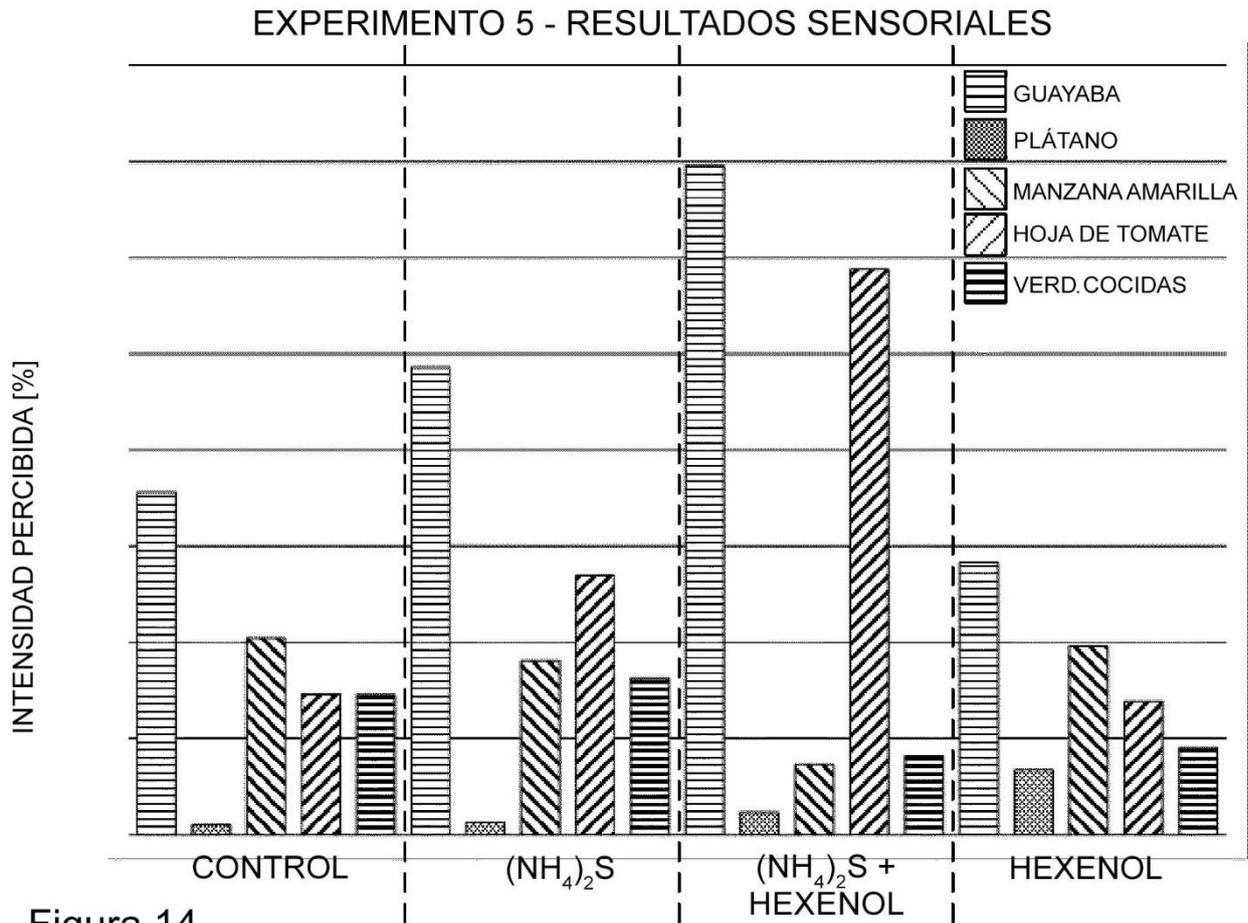


Figura 14

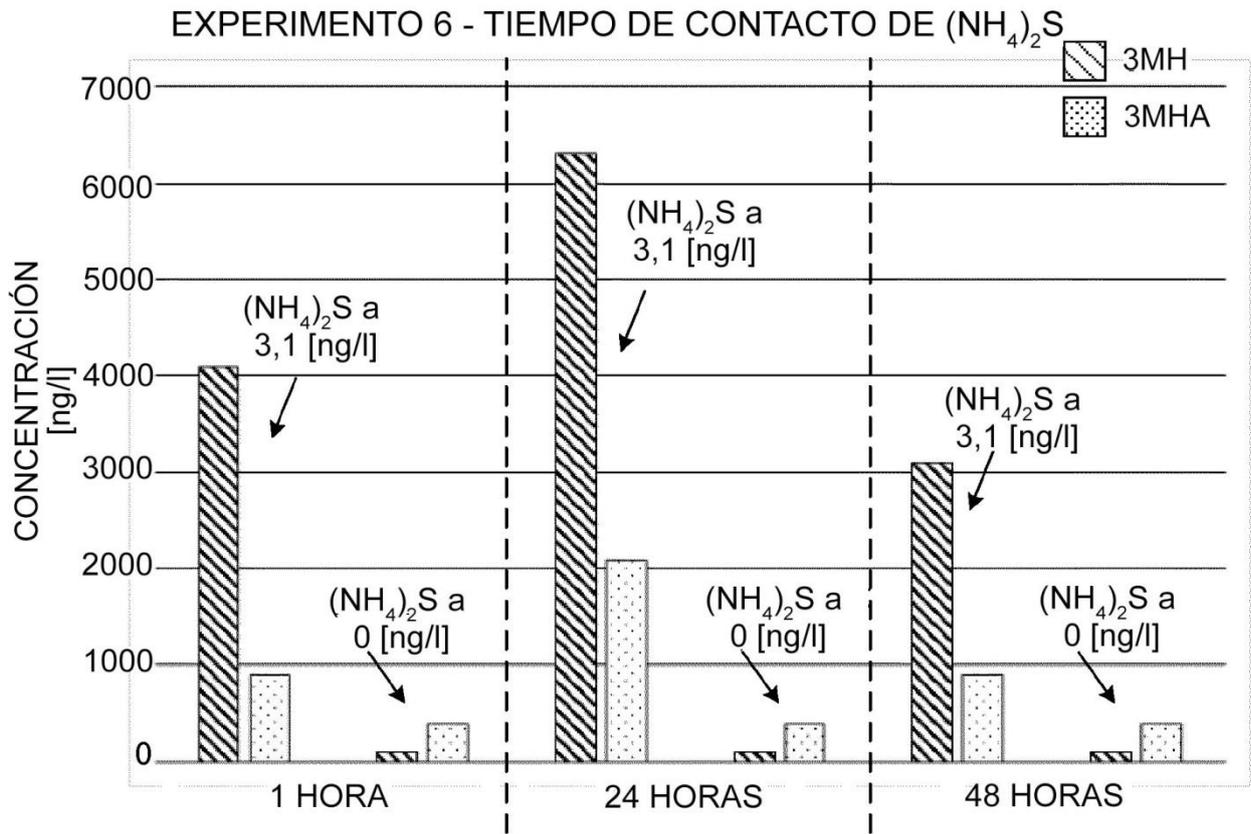


Figura 15

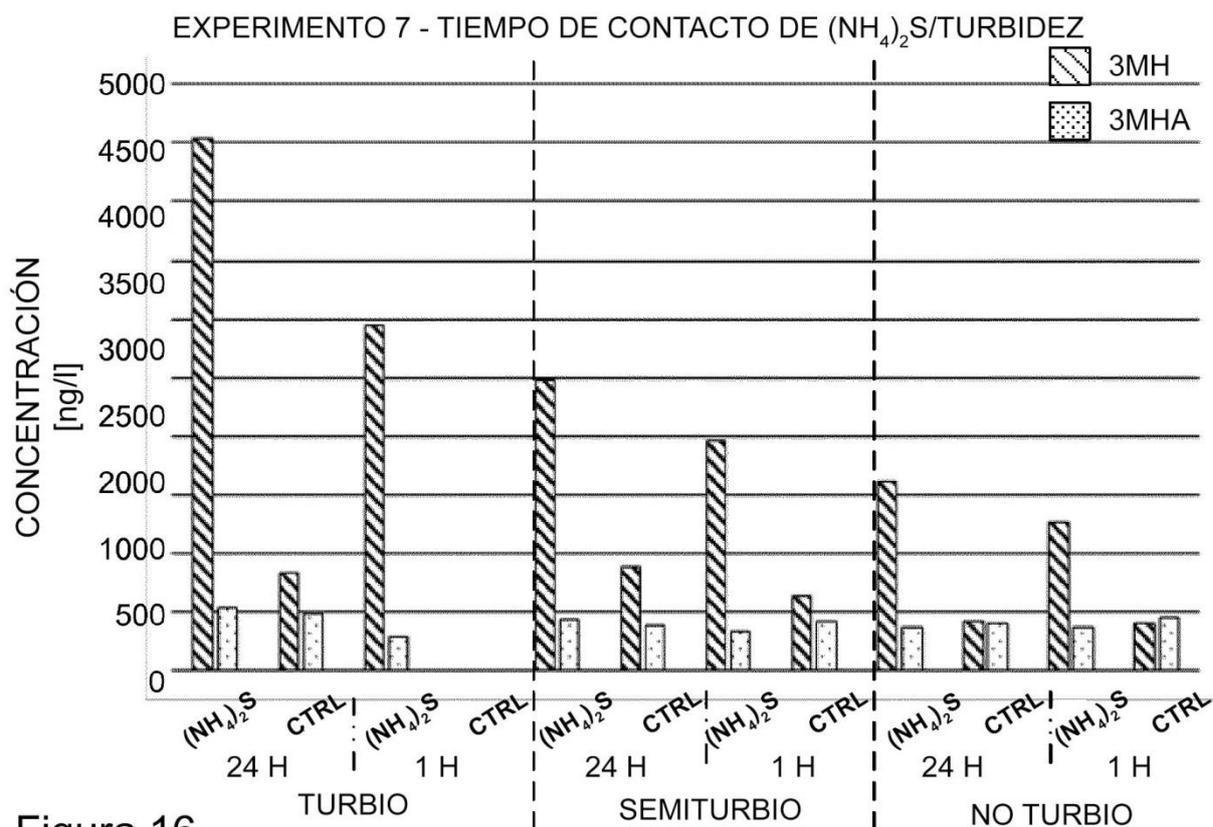


Figura 16

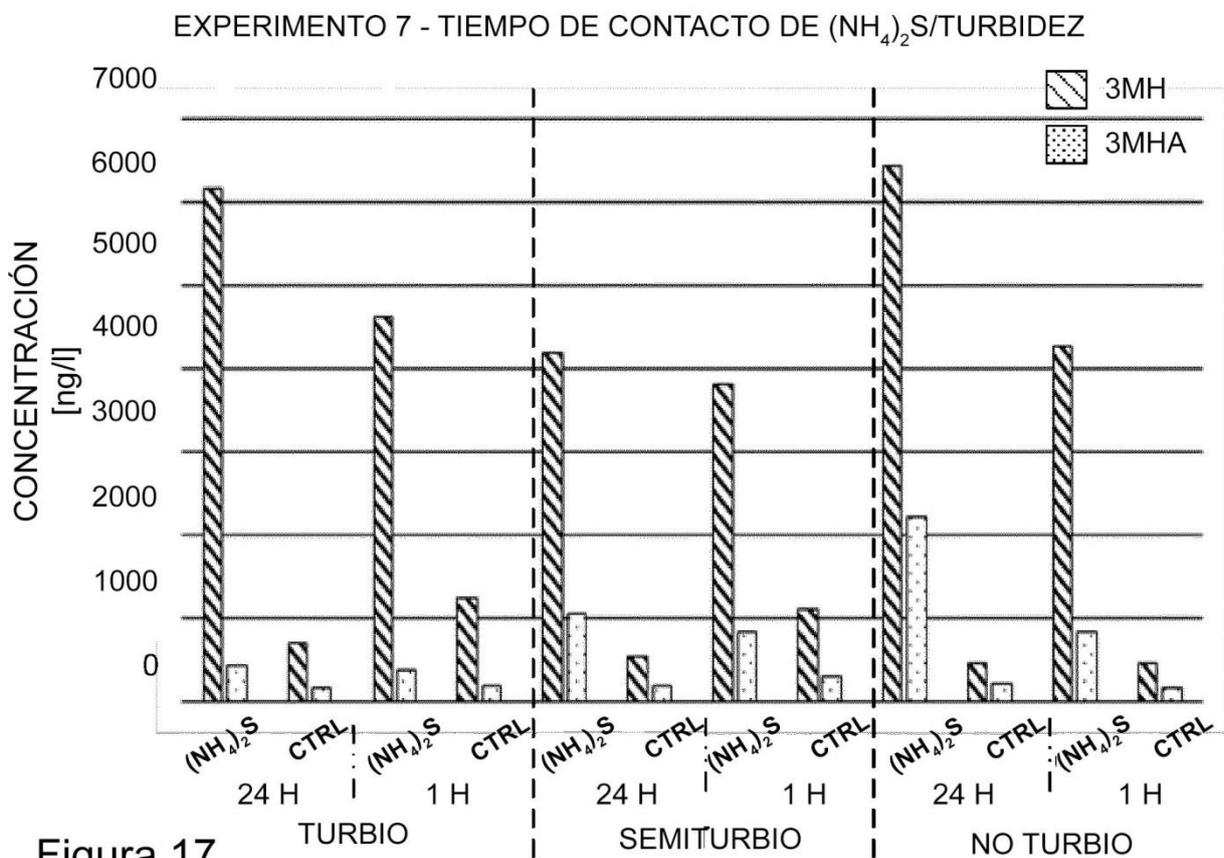


Figura 17