

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 843**

21 Número de solicitud: 201031705

51 Int. Cl.:

**C12G 3/02** (2006.01)

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12R 1/84** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **19.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**14.06.2012**

71 Solicitante/s:  
**GRUPO HESPÉRIDES BIOTECH, S.L.**  
**Crta. Utrera km. 1**  
**Universidad Pablo de Olavide**  
**41013 Sevilla, ES y**  
**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

72 Inventor/es:  
**BARRERA GARCÍA, Juan Alberto;**  
**CORDÓN TOLEDANO, Juan Diego;**  
**CORONEL DOMÍNGUEZ, Antonio Jesús;**  
**FERNÁNDEZ ZABALA, Cristóbal y**  
**SANTOS OCAÑA, Carlos**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

54 Título: **CEPA DE PICHIA KLUYVERI Y SUS APLICACIONES.**

57 Resumen:

La invención se relaciona con una cepa de *Pichia kluiveri*, con capacidad para fermentar los azúcares reductores presentes en el zumo de naranja, así como con un método de crecimiento de dicho microorganismo, con su empleo en la producción de una bebida de baja graduación alcohólica y con unas propiedades organolépticas óptimas para su consumo y con dicho producto derivado de la fermentación utilizando la cepa de *Pichia kluiveri*.

ES 2 382 843 A1

DESCRIPCIÓN

**CEPA DE *PICHIA KLUYVERI* Y SUS APLICACIONES**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención se relaciona con una cepa de *Pichia kluyveri*, con capacidad para  
5 fermentar de forma natural el zumo de naranja, y con su empleo en la producción de una  
bebida de baja graduación alcohólica.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La fermentación alcohólica es quizás el primer proceso biotecnológico llevado a  
10 cabo por el hombre. Aunque en un primer momento se utilizó como método de  
conservación de frutas, con el paso de los años se fue consolidando como un método  
para obtener bebidas alcohólicas tales como los vinos. En general cuando se habla de  
bebidas producidas por fermentación de zumos de fruta se hace referencia al vino  
obtenido a partir de zumo de uva.

15 La mayor parte del vino se elabora a partir de uvas y, a menos que se especifique  
otra fuente, la palabra vino se refiere al producto que resulta de la fermentación del jugo  
de uva (Brown et al., 1989. 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England).  
La manufactura de vinos de otras frutas distintas de la uva es muy popular en muchos  
países del norte europeo, donde las condiciones climáticas impiden el desarrollo de la  
20 vitivinicultura, especialmente en Polonia, Rusia y Alemania. En Gran Bretaña sólo una  
pequeña cantidad de vinos de otras frutas es producida a escala comercial, pero es muy  
común la elaboración casera artesanal.

Tradicionalmente para la fermentación de mostos de diferentes frutas se utilizan  
las poblaciones de levaduras existentes en el ecosistema del que se obtienen los frutos.  
25 Durante el proceso de fermentación se produce una evolución de las poblaciones  
microbianas en la que unas sustituyen a otras, a medida que la composición química del  
medio fermentado va cambiando. En el caso concreto de la fermentación de la naranja,  
el proceso presenta una diferencia fundamental y un problema adicional, con respecto a  
otros mostos de otras frutas. La diferencia estriba en que durante las primeras fases de la  
30 fermentación, *Lactobacillus* desplaza al resto de microorganismos, dando lugar a una  
fuerte acumulación de ácido láctico, lo cual proporciona al producto un olor y sabor  
desagradable. La fermentación espontánea de zumo de naranja, por tanto, no da lugar a

un producto con las propiedades organolépticas de los obtenidos a partir de otros mostos como uva, manzana, cebada, etc.

Las especies de levadura más abundantes presentes en el zumo de naranja son, por este orden, las siguientes *Hanseniaspora uvarum* (27%), *Hanseniaspora*  
5 *occidentalis* (15%), *Pichia kluyveri* (9%), *Candida intermedia* (7%) y *Candida parapsilosis* (6%) (Arias et al. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68:1955-1961).

En concreto, *Pichia* es un género de la familia *Saccharomycetaceae* con células esféricas, elípticas u oblongas. Existen 91 especies del género *Pichia* y en concreto  
10 dentro de la especie *P. kluyveri* existen tres variedades, *eremophila*, *cephalocereana* y *kluyveri* (Phaff, Starmer y Tredeick-Kline, 1987, Studies Mycol 30:412). Los miembros del género *Pichia* no son capaces de fermentar ni asimilar lactosa. En cuanto a la fermentación de otros carbohidratos, es variable según la especie. En concreto, *Pichia kluyveri* es capaz de fermentar glucosa, pero no galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y  
15 trehalosa. Especies del género *Pichia*, tal como *P. kluyveri* y *P. fermentans* causan el deterioro de algunas frutas, como peras, tomates, naranjas, etc.

Hay antecedentes bibliográficos de producción de zumos de cítricos fermentados, que datan de hace muchos años, tales como los de Hendrickson y Kesterson (1965) (Agric. Exp. Sta. Bull. 698: 64-66) citando un trabajo de von  
20 Loesecke de 1936, que describen diversos productos derivados de la manufactura de los cítricos, entre ellos vinos de pomelo y naranja. En este último caso, se describe que, si bien el jugo de estos cítricos puede ser convertido en vino de sabor y aroma agradables, se requiere la adición de azúcar y condiciones de elaboración cuidadosamente controladas. Braverman (Composición y tecnología química. Madrid: Aguilar. 1952)  
25 menciona y describe los pasos para obtener los «vinos de agrios», a los cuales define como productos obtenidos por fermentación con levaduras vínicas, de zumos procedentes de frutas maduras de las variedades menos ácidas, adicionadas de azúcar, con el fin de obtener vinos de más cuerpo y menos ácidos. Los conocimientos científicos más actualizados que se tienen sobre la elaboración de vinos cítricos  
30 provienen de Turquía y de otros países asiáticos (China, Japón, Corea). Entre ellos, se pueden citar los estudios sobre la producción de vino de naranja realizados por Arici-Oe et al. (1994) (Gida 19, 2:113-117) en China, el aislamiento e identificación de levaduras

para la producción de vino de naranja de Young-Hwan et al. (1997) (Korean J. Food Sci. Technol. 29, 3: 588-594) en Corea y estudios básicos de las técnicas de producción de vino de naranja de You-Young y Guo-Qing (2000) (J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci. 26, 5: 513-515) en China.

5           Asimismo, se ha descrito un procedimiento para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que implica un proceso de fermentación mediante el empleo de levaduras alcohólicas (ES 2164565). En particular, las levaduras utilizadas pertenecen a los géneros *Hanseniospora* y *Saccharomyces*. Además, también se ha descrito un procedimiento de fermentación del zumo de naranja natural en el que se  
10          utilizan dos cepas de levaduras, que se añaden al zumo de naranja de manera secuencial. En concreto, dichas levaduras son *Pichia fermentans* CECT 11773 y *Saccharomyces cerevisiae*.

          Por tanto, a pesar de que se han descrito algunos microorganismos con capacidad de fermentar el zumo de naranja, existe la necesidad de desarrollar un  
15          procedimiento a partir del cual se obtenga una bebida con mejores propiedades organolépticas y menor graduación alcohólica.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

          Los inventores han identificado una cepa de levadura de la especie *Pichia*  
20          *kluveri* que posee la capacidad de llevar a cabo la fermentación del zumo de naranja, dando lugar a una bebida derivada de zumo de naranja, con unas propiedades organolépticas muy buenas para su consumo, así como una baja graduación alcohólica de alrededor de un 2,5%. Un cultivo de dicho aislado de *P. kluveri* fue depositado el día 12 de mayo de 2010 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el  
25          número de acceso CECT 13055.

          La presencia de una concentración adecuada de pulpa en el zumo de naranja de origen representa una ventaja, ya que constituye un reservorio de oxígeno para la levadura, que es necesario en las primeras etapas de la fermentación, así como también aporta una gran cantidad de nutrientes. Por otro lado, la capacidad de la cepa de  
30          levadura de la invención de fermentar únicamente los azúcares reductores presentes en el zumo, da lugar a un producto final que contiene azúcares no reductores, tal como sacarosa, que hace que su sabor sea muy agradable.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pichia kluyveri*, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 13055, con capacidad de fermentar glucosa y/o fructosa o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad. Un cultivo y un  
5 medio de cultivo de dicho microorganismo constituyen aspectos adicionales de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicho microorganismo o de dicho cultivo para llevar a cabo fermentación alcohólica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de crecimiento de  
10 dicho microorganismo que comprende inocular dicho microorganismo en un medio que comprende zumo de naranja.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que comprende la inoculación de dicho microorganismo o de un cultivo del mismo en un medio de cultivo que comprende  
15 zumo de naranja, bajo condiciones que permitan la fermentación de los azúcares reductores del zumo de naranja.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto derivado del zumo de naranja que presenta una concentración de etanol entre 0,1 y 3,4%, obtenible mediante un método que comprende inocular dicho microorganismo en un medio de cultivo que  
20 comprende zumo de naranja, bajo condiciones que permitan la fermentación de los azúcares reductores presentes en el zumo de naranja.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** muestra la evolución del crecimiento de la cepa de levadura 4N187  
25 (CECT 13055) en diferentes medios, representando el tiempo de crecimiento en días frente a la densidad óptica medida a 660 nm. YPD: medio rico con glucosa; YPE: medio rico con etanol; YPG: medio rico con glicerol; 25% zumo: medio que comprende 25% de zumo de naranja en agua; zumo: 100% de zumo de naranja.

La **Figura 2** representa la evolución de la concentración de los azúcares totales  
30 consumidos (g/l) durante la fermentación para la cepa de levadura 4N187 (CECT 13055).

La **Figura 3** representa la evolución de la concentración de los azúcares reductores (g/l) disponibles en el medio de cultivo durante la fermentación para la cepa de levadura 4N187 (CECT 13055).

La **Figura 4** representa la evolución de la concentración de etanol (% v/v) a lo largo del tiempo de fermentación para la cepa de levadura 4N187 (CECT 13055).

La **Figura 5** representa la evolución de los grados Brix a lo largo del tiempo de fermentación para la cepa de levadura 4N187 (CECT 13055).

La **Figura 6** representa la evolución de la concentración de los azúcares reductores (g/l) disponibles en el medio de cultivo durante los primeros cinco días de fermentación para las diferentes cepas de levaduras: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179, *P. fermentans*, *S. cerevisiae*, *S. carlbengensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

La **Figura 7** representa la evolución de la concentración de los azúcares no reductores (g/l), en concreto sacarosa, disponibles en el medio de cultivo durante la fermentación para diferentes levaduras del género *Pichia*: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179 y *P. fermentans*.

La **Figura 8** representa la evolución de la concentración de los azúcares no reductores (g/l), en concreto sacarosa, disponibles en el medio de cultivo durante la fermentación para diferentes levaduras del género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. carlbengensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

La **Figura 9** representa la evolución de la concentración de los azúcares no reductores (g/l) disponibles en el medio de cultivo durante la fermentación para las diferentes cepas de levaduras: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179, *P. fermentans*, *S. cerevisiae*, *S. carlbengensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

La **Figura 10** representa la evolución de la concentración de etanol (% v/v) generado durante la fermentación para las diferentes cepas de levaduras: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179, *P. fermentans*, *S. cerevisiae*, *S. carlbengensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

La **Figura 11** representa la evolución de la concentración de etanol (% v/v) generado durante la fermentación en agitación para las diferentes cepas del género *Pichia*: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179 y *P. fermentans*.

La **Figura 12** representa la evolución de la concentración de etanol (% v/v) generado durante la fermentación para las diferentes cepas del género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. carlbengensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

La **Figura 13** representa la evolución de la concentración de etanol (% v/v) generado durante la fermentación sin agitación para las diferentes cepas del género *Pichia*: *P. kluyveri* 4N187 (CECT 13055), *P. kluyveri* 4N179 y *P. fermentans*.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se relaciona, en general, con un microorganismo con capacidad de fermentar azúcares reductores, en concreto, glucosa y/o fructosa, tal como se pone de manifiesto en el Ejemplo 3, en donde se puede observar que, tras la fermentación, la concentración de azúcares reductores es prácticamente cero.

#### Microorganismo de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo, en adelante microorganismo de la invención, de la especie *Pichia kluyveri* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 13055, con capacidad de fermentar glucosa y/o fructosa o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad.

Tal como aquí se utiliza, la expresión “capacidad de fermentar glucosa y/o fructosa” significa que el microorganismo de la invención es capaz de llevar a cabo un proceso de fermentación de dichos azúcares reductores. Por fermentación, se entiende un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, en el que el producto final es un compuesto orgánico. En concreto, el microorganismo de la invención presenta la capacidad de fermentar azúcares reductores, tal como glucosa y/o fructosa, mediante el proceso de fermentación alcohólica, en la que el microorganismo de la invención procesa dichos hidratos de carbono para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y moléculas de ATP que consume el propio microorganismo en su metabolismo celular energético anaeróbico.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “azúcares o hidratos de carbono reductores” se refiere a aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas. Dichos azúcares reductores provocan la alteración de las proteínas mediante la reacción

de glucosilación no enzimática también denominada reacción de Maillard o glicación. Ejemplos ilustrativos, aunque no limitativos, de azúcares reductores, incluyen tanto monosacáridos como polisacáridos, tales como la glucosa, fructosa, gliceraldehído, galactosa, lactosa y maltosa. En concreto, el microorganismo de la invención es capaz  
5 de fermentar glucosa y/o fructosa.

En una realización particular, el microorganismo de la invención, además de ser capaz de fermentar azúcares reductores, no presenta la capacidad de fermentar azúcares no reductores. Tal como se observa en el Ejemplo 3, la cepa 4N187 de *P. kluyveri* (CECT 13055) no es capaz de fermentar azúcares no reductores, tal como la sacarosa,  
10 obteniéndose un producto final al que no es necesario añadir edulcorantes, debido a la concentración de sacarosa presente.

En una realización particular, el microorganismo de la invención es un mutante de dicha cepa *Pichia kluyveri* (CECT 13055), que mantiene la capacidad de fermentar glucosa y/o fructosa. Tal como se utiliza en la presente invención, el término “mutante”  
15 incluye cualquier individuo u organismo resultante de una mutación o modificación genética en el genoma de dicho organismo. Dicho organismo conserva la capacidad de fermentar azúcares reductores, en concreto de fermentar glucosa y/o fructosa.

La capacidad de un microorganismo o de un mutante de dicho microorganismo de fermentar azúcares reductores, en concreto glucosa y fructosa, se puede determinar  
20 haciendo crecer dicho microorganismo en un medio que comprenda dichos azúcares reductores y comprobando al final de la fermentación si dichos azúcares reductores (glucosa y/o fructosa) han desaparecido del medio o bien han disminuido considerablemente. Métodos adecuados para la determinación de azúcares reductores incluyen el método calorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G. L.  
25 1959. Anal. Chem, 31; 426-428), la utilización del reactivo de Fehling, métodos cromatográficos, etc. En una realización preferida, la determinación de azúcares reductores se realiza mediante ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS).

El microorganismo de la invención se puede cultivar en cualquier medio adecuado para levaduras. Tal como entenderá el experto en la materia, dicho medio de  
30 cultivo puede ser YPD, YPG, YPE o cualquier otro medio de cultivo. Las condiciones de cultivo del microorganismo de la invención en cualquier medio de cultivo son preferiblemente entre 15 y 35°C. Ventajosamente, dicho cultivo se crece en agitación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro del microorganismo de la invención, en adelante cultivo de la invención. El microorganismo de la invención se puede cultivar para obtener un cultivo puro en un medio estándar para cualquier levadura, tal como un medio rico con glucosa (YPD): 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y 20 g de glucosa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un medio de cultivo del microorganismo de la invención que comprende zumo de naranja. El zumo natural de naranja se obtiene por rotura de las bolsas mesocárpicas del fruto y extracción del jugo en un proceso que industrialmente se desarrolla rompiendo suavemente la cáscara para que los aceites esenciales no se mezclen con el zumo. Este producto tiene entre un 0,1% y un 20% en volumen v/v de pulpa, dependiendo de la maquinaria utilizada para su extracción. El pH está alrededor de 3,5, siendo este parámetro muy dependiente de la zona ecológica de origen de la fruta y de su estado de maduración.

La composición aproximada del medio de cultivo que comprende zumo de naranja de partida es preferentemente la siguiente:

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Sólidos solubles y ácidos orgánicos | 11 ± 1 °BRIX                            |
| pH                                  | 3,5 ± 0,5                               |
| % pulpa                             | Entre 0,1 y 20 % v/v                    |
| Azúcares Totales                    | 40 - 120 g/l                            |
| Reductores                          | 30 - 60 g/l                             |
| Glucosa                             | 15 - 30 g/l                             |
| Fructosa                            | 15 - 30 g/l                             |
| No reductores                       | 30 - 60 g/l                             |
| Acidez total                        | 0,8 ± 0,2 g ácido cítrico anhidro/100ml |

La composición del zumo de naranja varía según la localización geográfica del cultivo de naranjas, la época del año y la variedad de naranja, ya que todos son dependientes del grado de madurez de la fruta. La variedad de cítrico que se puede utilizar para producir el zumo de naranja utilizado como medio de cultivo incluyen, aunque no se limitan, las siguientes variedades: navelina, navelate, salustiana, pomelo y naranja amarga.

El origen del zumo de naranja para el cultivo del microorganismo de la invención puede ser de zumo de naranja fresco, pasteurizado, congelado o concentrado. En caso de ser zumo concentrado, se usa agua hasta alcanzar los valores deseados y si es necesario, se procede a la rectificación para enmarcarlo en los parámetros deseados para la fermentación indicados en la tabla anterior, principalmente la concentración de azúcares reductores. En una realización particular, el zumo de naranja es estable microbiológicamente. Para ello se procede a la pasteurización del medio de cultivo que comprende zumo de naranja. En una realización particular, si es necesario, se procede a la rectificación del medio de cultivo, añadiendo azúcares o modificando el pH.

10 Dicho medio de cultivo puede ser zumo de naranja puro o bien combinado con agua. La proporción de agua y zumo de naranja puede ser 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, hasta 1:10 e incluso mayor. Asimismo, puede ser una proporción en la que haya más cantidad de agua que zumo de naranja, tal como 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, e incluso mayor. En el caso de que el medio de cultivo no sea zumo de naranja puro, puede ser necesaria la adición de azúcares reductores, tal como glucosa y/o fructosa de manera que la fuente de carbono no resulte limitante, por ejemplo entre un 0,2 y 5%. En una realización preferida, la cantidad de glucosa y/o fructosa a añadir es hasta un 1% (p/v) final.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención o del cultivo según la invención para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Tal como se ha descrito anteriormente, el término fermentación alcohólica se utiliza para describir aquel proceso de fermentación en el que el microorganismo de la invención procesa hidratos de carbono para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y moléculas de ATP que consume el propio microorganismo en su metabolismo celular energético anaeróbico. En una realización particular el microorganismo de la invención es capaz de fermentar azúcares reductores. En una realización aún más preferida dichos azúcares reductores son glucosa y/o fructosa.

#### Método de crecimiento del microorganismo de la invención

30 Los inventores han puesto de manifiesto que el microorganismo de la invención es capaz de crecer en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja de una manera similar a como lo hace en un medio rico, tal como YPD, tal como se muestra en

el Ejemplo 2 y en la Figura 1. Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un método de crecimiento del microorganismo de la invención o del cultivo de la invención, en adelante primer método de la invención, que comprende inocular dicho microorganismo en un medio que comprende zumo de naranja.

5 El primer método de la invención comprende la etapa de inocular el microorganismo de la invención en un medio que comprende zumo de naranja. Un experto en la materia conoce ampliamente las técnicas de inoculación de una levadura en un medio de cultivo. Las condiciones de cultivo del primer método de la invención las determinará un experto en la materia y también son ampliamente conocidas para  
10 levaduras. Preferiblemente el microorganismo de la invención se cultiva en agitación y a una temperatura entre 15 y 35°C. Aún más preferiblemente dicha temperatura es de 30°C. Ventajosamente el microorganismo de la invención se cultiva con una agitación de alrededor de 220 rpm.

El primer método de la invención comprende la etapa de inocular el  
15 microorganismo de la invención, en primer lugar a pequeña escala y en pequeño volumen (preinóculo) y, una vez alcanzada suficiente biomasa, transferir dicho microorganismo a un cultivo a mayor escala. Se parte de un preinóculo puro del microorganismo de la invención que se cultiva en agitación a una temperatura entre 15 y 35°C, preferiblemente dicha temperatura es de 30°C, con una agitación de 220 rpm. El  
20 medio de cultivo utilizado para el preinóculo puede ser un medio rico en glucosa, tal como el YPD (2% de peptona, 2% de glucosa y 1% de extracto de levadura) o bien YPG (2% de peptona, 2% de glicerol y 1% de extracto de levadura). Asimismo, el preinóculo se puede cultivar directamente en un medio que comprende zumo de naranja, de manera que se reduzca la fase de adaptación al medio de cultivo final, así como en  
25 un medio que comprende zumo de naranja diluido al 25% en agua. En una realización preferida el preinóculo se cultiva en un medio que comprende 25% (v/v) de zumo de naranja, 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa o fructosa) y 75% de agua.

Posteriormente, tras haber conseguido suficiente biomasa en el preinóculo y que dicho preinóculo se encuentre en fase exponencial, se transfiere al medio de cultivo  
30 definitivo a mayor escala que comprende zumo de naranja. El preinóculo se puede añadir directamente al medio de cultivo definitivo o puede ser necesario proceder previamente a una centrifugación. En el caso de que el preinóculo se haya crecido en un

medio diferente al zumo de naranja, tal como YPD, YPE o YPG, es conveniente proceder a una centrifugación y a diferentes lavados, con el fin de eliminar la mayor parte de ese medio. En una realización particular, la carga de inoculación del cultivo está comprendida entre 0,05 y 0,2 unidades de absorbancia por mililitro medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. En una realización preferida, dicho valor de absorbancia es de 0,1 unidades de absorbancia por mililitro, que corresponde a  $1 \cdot 10^5$  células/ml. Esta relación se hace efectiva si el preinóculo se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

Las condiciones de cultivo en un medio que comprende zumo de naranja las determinará un experto en la materia. Preferiblemente el microorganismo de la invención se cultiva en agitación y a una temperatura entre 15 y 35°C. Más preferiblemente dicha temperatura es de 30°C y la agitación de 220 rpm.

Métodos para determinar si el microorganismo está creciendo adecuadamente en el medio que comprende zumo de naranja son aquellos en los que se determina la biomasa celular antes del crecimiento y después de un tiempo adecuado de crecimiento y se compara dicha biomasa celular antes y después. Para la determinación de la biomasa, y por tanto, conocer si el método de crecimiento ha ido bien, un experto en la materia conoce los diferentes métodos que existen, tal como la determinación de la densidad óptica a 660 nm del cultivo en el que está creciendo el microorganismo de la invención.

#### Método para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja, en adelante segundo método de la invención, que comprende la inoculación del microorganismo de la invención o del cultivo de la invención en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, bajo condiciones que permiten la fermentación de los azúcares reductores presentes en el zumo de naranja.

Dicho método comprende varias etapas:

(i) La primera etapa consiste en la inoculación del microorganismo de la invención. Dicha etapa es común al primer método de la invención y se hace referencia aquí a dicho método para la descripción de los detalles del segundo método de la

invención. Brevemente, en primer lugar se crece un preinóculo a una temperatura de 15 a 35°C, preferiblemente de 30°C en un volumen pequeño para obtener biomasa suficiente y posteriormente se transfiere a un volumen mayor de medio de cultivo. En una realización preferida, el preinóculo se cultiva en un medio que comprende 25%  
5 (v/v) de zumo de naranja, 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa y/o fructosa) y 75% de agua.

(ii) Tras haber obtenido biomasa suficiente a partir del crecimiento del preinóculo, se transfiere el cultivo del preinóculo a un medio que comprende zumo de naranja en un recipiente adecuado para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica.  
10 El preinóculo se puede añadir directamente al medio de cultivo definitivo o puede ser necesario proceder previamente a una centrifugación. En el caso de que el preinóculo se haya crecido en un medio diferente al zumo de naranja, tal como YPD, YPE o YPG, es conveniente proceder a una centrifugación y a diferentes lavados, con el fin de eliminar la mayor parte de ese medio. En una realización particular, la carga de inoculación del  
15 cultivo está comprendida entre 0,05 y 0,2 unidades de absorbancia por mililitro medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. En una realización preferida, dicho valor de absorbancia es de 0,1 unidades de absorbancia por mililitro, que corresponde a  $1 \cdot 10^5$  células/ml. Esta relación se hace efectiva si el preinóculo se encuentra en fase exponencial de crecimiento. El recipiente en el que se va a llevar a  
20 cabo la fermentación puede ser un tanque, una botella o un matraz, y el cultivo se mantiene en condiciones anaeróbicas o con aire en el cuello de cabeza. En dichos recipientes se permite la salida del gas producido, pero no la entrada de aire. En una realización preferida, el cultivo se agita de manera puntual o bien de manera continua o se permite la recirculación de la parte inferior a la parte superior del caldo de  
25 fermentación, con el fin de homogeneizar el cultivo. Debido a la presencia de pulpa, durante la sedimentación se arrastran las levaduras y se experimenta un gradiente de concentración de microorganismos dándose la mayor concentración de éstos en la parte inferior del fermentador. Por tanto, la homogenización del caldo de fermentación mediante agitación permite que la levadura fermente en las regiones del fermentador en  
30 las que se encuentra una mayor cantidad de pulpa, lo que reduce el carácter amargo que aporta la fermentación de la pulpa. El movimiento puede realizarse por agitación continua (palas en el interior del fermentador o agitación orbital) o por recirculación de

la fracción inferior del fermentador para su deposición en la parte superior. La agitación durante el proceso de fermentación se realiza de forma constante y en un rango de 60 a 150 rpm para la correcta homogenización del contenido, preferiblemente dicha agitación es de 110 rpm. La ventaja que presenta la agitación a lo largo de la fermentación es la homogenización del contenido físico-químico y microbiológico en el fermentador. Se ha de realizar con la mínima aireación del caldo de fermentación para minimizar los efectos del oxígeno sobre los antioxidantes o metabolismo de las levaduras. El contacto de los antioxidantes contenidos en el fermento con el oxígeno reduce el carácter nutricional de mismo. Los efectos que produce el oxígeno en contacto con la levadura es el cambio metabólico desde la fermentación (metabolismo de interés) al metabolismo respiratorio (no interesa en este procedimiento).

En una realización particular, el microorganismo de la invención se puede combinar junto con otras levaduras que también participen o ayuden en la fermentación, bien de manera secuencial o bien inoculadas al mismo tiempo. Dichas levaduras son levaduras conocidas en el estado de la técnica que son capaces de fermentar cualquier azúcar, tanto azúcares reductores como no reductores y que son capaces de generar un producto final de baja graduación alcohólica y buenas propiedades organolépticas.

El tiempo de fermentación lo determina un experto en la materia y es directamente proporcional a la concentración de azúcares fermentables por la levadura en el medio e inversamente proporcional a la temperatura. En una realización particular la temperatura adecuada para la fermentación es de 15 a 35°C. Preferiblemente, la temperatura de fermentación es de 20°C durante 3-4 días. Una vez que tiene lugar el agotamiento parcial o total de los azúcares reductores presentes en el medio de cultivo y la producción de etanol y otros compuestos aromatizantes, la fermentación se da por terminada. La concentración de etanol presente en el producto final fermentado varía según la concentración de azúcares reductores presentes en el zumo de partida, pero oscila entre 0,1 y 3,4% v/v. Debido a que se experimenta una fermentación parcial de los azúcares, no es necesaria la adición de sacarosa como edulcorante.

(iii) Una vez terminado el proceso de fermentación se puede llevar a cabo opcionalmente la eliminación de los sólidos en suspensión, como las levaduras y los restos de pulpa. Para ello, se pueden llevar a cabo, de forma individual o combinada las siguientes etapas:

(a) Centrifugación de 5 minutos a 3000 g, provocando la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad y reteniendo el sobrenadante.

5 (b) Decantación a 4°C durante 1 a 10 días y descartar el precipitado. La decantación es un método físico de separación de mezclas heterogéneas, en la cual se separan las partículas más densas de las menos densas. En caso de que se lleve a cabo este paso, no es necesaria una maduración posterior.

10 (c) Clarificación con una sustancia con propiedades clarificantes, tal como bentonita, gelatina u otro compuesto. Se descarta el precipitado. Se trata de un procedimiento modificado de la decantación en el que se adicionan compuestos floculantes, capaces de unirse a los sólidos incrementando su densidad y facilitando su sedimentación.

15 (d) Filtración tangencial con filtros de 0,2-0,45  $\mu\text{m}$ , con una presión de aspiración a 2 bares y presión de salida a 0,5 bares. Se recupera el efluente. La filtración tangencial se caracteriza por una circulación rápida del líquido tangencialmente a una membrana o filtro. Así, al tiempo que se efectúa la filtración, se autolimpia la membrana, lo que permite trabajar en continuo con características de funcionamiento estables (composición, caudal...). El permeado retenido se pasteuriza, lo que consigue, por un lado eliminar los microorganismos y por otro degradar parcialmente los restos de pulpa y conseguir un producto más atractivo para su consumo, ya que las fases líquida y sólida están menos diferenciadas. Finalmente se mezclan el efluente con el permeado, obteniendo un producto estéril, que contiene pectinas que estabilizan la espuma, así como antioxidantes, aromas, sabor y color agradables. Las pectinas presentes en la pulpa hacen que se necesite una menor cantidad de  $\text{CO}_2$  para la carbonatación, debido a que las pectinas mejoran la estabilidad.

20

25

Si se llevan a cabo las etapas (a), (b) y/o (c) para la eliminación de sólidos, es preferible proceder a un paso de pasteurización posterior para eliminar la carga microbiológica. Sin embargo, la etapa (d) de filtración tangencial con filtros de tamaño 0,2-0,45  $\mu\text{m}$  también elimina microorganismos, por lo que el producto final ya estaría esterilizado y no sería necesaria la etapa de pasteurización posterior. En una realización preferida, se realiza la operación de decantación (b) y después una pasteurización. En

30

una realización aún más preferida, la pasteurización consiste en un calentamiento rápido y en mantener una meseta de 2 minutos a 75°C seguido de un enfriamiento “flash”.

(iv) Una vez eliminados los sólidos, se puede proceder a una etapa de maduración, en la que se conserva el producto fermentado entre 2 y 6°C de 1 a 10 días, con el fin de eliminar determinados compuestos volátiles y sólidos decantables a dicha temperatura. Este paso tiene como finalidad eliminar los sólidos que formarían precipitados a la temperatura de ingesta de la bebida. En el caso de que se desee, se pueden añadir diferentes compuestos que aporten estabilidad física al producto, tal como antioxidantes, como el ácido ascórbico, que está incluido de manera natural en el zumo de naranja de origen.

(v) Por último, se puede llevar a cabo un paso de gasificación o carbonatación, que consiste en la adición de anhídrido carbónico hasta alcanzar en equilibrio una presión entre 0,1 y 2,5 bares (0,1-2,5 x 10<sup>5</sup> Pa), preferentemente de 0,44 bares (0,44 x 10<sup>5</sup> Pa). Se realiza a una temperatura entre 1 y 20°C, preferentemente a 4°C y en un recipiente específico para la gasificación. Con esta presión se alcanza preferentemente una relación de 2 volúmenes de CO<sub>2</sub> por cada volumen de bebida. Se espera a que se equilibre el intercambio gaseoso entre las fases (líquido-gas) y si es necesario, se adiciona más CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la presión de alrededor de 0,44 bares. El tiempo de carbonatación dependerá del tipo de recipiente sobre el que se realice, ya que influye el área de intercambio líquido/gas y será el tiempo suficiente para que se alcance la presión de equilibrio deseada. En una realización preferida, para una carbonatación más eficiente, se deja carbonatando 24 horas a 4°C, con el mayor área de intercambio posible.

En el caso de que el producto final se esterilice, dicho producto se puede conservar a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado de meses, sin problemas de contaminación. La comercialización del producto sin dependencia de la cadena de frío reduce los costes de explotación incrementando la posibilidad de una mejor comercialización y distribución.

El segundo método de la invención da lugar a un producto derivado del zumo de naranja diferente a los descritos en el estado de la técnica y con unas propiedades organolépticas adecuadas y muy buenas para su consumo. Así, en un último aspecto, la invención se relaciona con un producto derivado del zumo de naranja que presenta una

concentración de etanol entre 0,1 y 3,4%, producido mediante el segundo método de la invención. Preferiblemente la concentración de etanol final es de 2,5%. Debido a que se emplea un zumo de naranja con una concentración de 7 a 15% v/v de pulpa, las características finales del producto son adecuadas para su consumo, ya que no es demasiado amargo.

El término “producto derivado del zumo de naranja” se refiere a un producto generado a partir de la fermentación alcohólica de zumo de naranja por parte del microorganismo de la invención y que presenta una concentración de etanol comprendida entre 0,1 y 3,4% (v/v).

El producto final obtenido comprende azúcares no reductores, tal como sacarosa, a una concentración preferida de 50 g/l, por lo que no es necesario añadir edulcorantes.

Asimismo, se pueden añadir al producto final obtenido a partir del segundo método de la invención compuestos adicionales, como aromatizantes, acidulantes, colorantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, espesantes, estabilizantes de la pulpa, aditivos para mejorar las propiedades del producto o cualquier otro compuesto de interés para la industria que aumente el valor de dicho producto. Compuestos adecuados para la adición en el producto final incluyen, aunque no se limitan, a taurina, cafeína, teofilina, pectina, gomas, carboximetilcelulosa (CMC), carragenanos, almidón o derivados, celulosa, ácido algínico, alginato sódico, alginato potásico, alginato amónico, alginato cálcico, alginato de propilenglicol, ácido sórbico, sorbato sódico, sorbato potásico, sorbato cálcico, ácido benzoico o benzoatos, sulfitos, ácido ascórbico o ascorbatos, tocoferoles, ácido láctico o lactatos, ácido cítrico o citratos, ácido tartárico o tartratos y ácido fosfórico o fosfatos o polifosfatos.

En una realización particular, las características del producto final son las siguientes:

|  |   |
|--|---|
| <b>Sólidos solubles y ácidos orgánicos</b> | Inicial hasta 7 °BRIX                     |
| <b>pH</b>                                  | 3,5 ± 0,5                                 |
| <b>% pulpa</b>                             | Depende del tratamiento post-fermentativo |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Azúcares Totales</b> | 30 - 90 g/l                             |
| <b>Reductores</b>       | Hasta 30 g/l                            |
| <b>Glucosa</b>          | Hasta 15 g/l                            |
| <b>Fructosa</b>         | Hasta 15 g/l                            |
| <b>No reductores</b>    | 30 - 60 g/l                             |
| <b>Acidez total</b>     | 0,8 ± 0,2 g ácido cítrico anhidro/100ml |
| <b>Etanol</b>           | 0,1-3,4% v/v                            |

Los compuestos volátiles mayoritarios presentes en el producto derivado del zumo de naranja son preferiblemente los siguientes:

| <b>Compuesto</b>  | <b>Concentración media (mg/l)</b> |
|-------------------|-----------------------------------|
| Acetaldehido      | 5,65                              |
| Metil acetato     | 0,54                              |
| Acetato de etilo  | 501,95                            |
| Metanol           | 37,65                             |
| 1-Propanol        | 27,23                             |
| Isobutanol        | 39,07                             |
| Isoamil acetato   | 9,04                              |
| 2-Metil-1-butanol | 11,15                             |
| 3-Metil-1-butanol | 30,75                             |

5

A continuación se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención; no obstante, no se deben considerar como limitativos del objeto de la invención.

10

### **EJEMPLO 1**

#### **Aislamiento y caracterización de *Pichia kluyveri* (CECT 13055)**

#### **I. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### *Fruta*

Para la búsqueda de levaduras del entorno cítrico, se tomaron muestras de diferentes variedades de cítricos: Navelina, Navelate, Salustiana, Pomelo y Naranja amarga.

Todas las frutas se tomaron de la Vega del Guadalquivir (Sevilla), entorno con mayor cantidad y variedad de cítricos de la zona de experimentación. Las regiones

sobre las que se tomaron las muestras estuvieron 30 días sin tratamiento químico alguno que limitase el espontáneo desarrollo de la microbiota del entorno.

Se tomaron tres tipos de muestras:

- (1) Naranjas completas,
- 5 (2) Naranjas a las que 7 días antes se les habían practicado escisiones en la piel, y
- (3) Naranjas en estadio de podredumbre espontánea depositadas en el suelo.

#### Medios de cultivo

10 Las muestras fueron cultivadas en placas con un medio que permite el crecimiento de cualquier levadura que sobre él se deposite. Se trata de un medio rico que emplea como fuente de carbono la glucosa y cuya composición es la siguiente:

Para un volumen total de 1.000 ml: 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de agar y 20 g de fuente de carbono (glucosa). Posteriormente se sometió  
15 a autoclavado para su esterilización. Se dosificó en cada placa petri 20 ml del medio anterior en condiciones de esterilidad.

#### Cultivo de las muestras en las placas

Sobre las muestras frutales recibidas en el laboratorio se procedió al cultivo de  
20 diferentes regiones sobre placas con medio de cultivo. Así, según el tipo de muestra se procedió de la siguiente manera:

- Naranjas completas: Se pasaron palillos de dientes estériles por la cáscara de la naranja y se depositaron sobre la placa con el medio de cultivo. También se abrieron las piezas de fruta y se frotó con nuevos palillos la región entre la corteza y  
25 la pulpa (región comprendida entre el epicarpo y mesocarpo). Con una micropipeta se tomaron pequeños volúmenes de zumo, pinchados directamente del mesocarpo, y se sembraron sobre las placas.
- Naranjas a las que 7 días antes se les habían practicado escisiones en la piel: Se pasaron palillos de dientes estériles por la cáscara de la naranja y por las escisiones  
30 practicadas, y se depositaron sobre la placa con el medio de cultivo. También se abrieron las piezas de fruta y se frotaron con nuevos palillos por la región entre la corteza y la pulpa (región comprendida entre el epicarpo y mesocarpo). Con una

micropipeta se tomaron pequeños volúmenes de zumo, pinchados directamente del mesocarpo, y se sembraron sobre las placas.

- Naranjas en estadio de podredumbre espontánea depositadas en el suelo: Se pasaron palillos de dientes estériles por la cáscara de la naranja y se depositaron sobre la placa con el medio de cultivo. Con una micropipeta se tomaron pequeños volúmenes de zumo, pinchados directamente del mesocarpo, y se sembraron sobre las placas.

## II. RESULTADOS

### 10 Identificación de las cepas de levaduras

Sobre todas las placas ensayadas, un total de 50, se realizó una búsqueda de aquellas levaduras que fueron capaces de desarrollarse. Sobre las placas crecieron además de levaduras, otros hongos y bacterias.

Se realizó un primer cribado visual sobre las placas en busca de colonias de levaduras (más blancas y menos brillantes que las bacterianas). Una vez seleccionadas aquellas colonias que visualmente se identificaron como levaduras o que surgían dudas, se procedió a visualizar las colonias por microscopía para cerciorarse de que se trataban realmente de microorganismos de interés. Las levaduras presentan mayor tamaño que las bacterias, además de tener una morfología más redondeada y ser capaces de replicarse por gemación.

Las cepas de levaduras que se identificaron se sembraron en nuevas placas para su purificación y mantenimiento para posteriores ensayos.

### Selección de la levadura de interés

25 Sobre la batería total de levaduras obtenidas del proceso de aislado e identificación, se ensayaron fermentaciones de zumo de naranja en pequeño volumen (250 ml) a diferentes tiempos y se descartaron si presentaban un perfil organoléptico desfavorable para un total de 8 catadores.

De todo el proceso de aislado e identificación de cepas levaduriformes, se obtuvieron un total de 9 colonias de microorganismos, sobre los que se ensayaron las fermentaciones y catas.

Tras el cribado por cata se obtuvieron dos levaduras (cepa 4N179 y 4N187) que ofrecían muy buen perfil organoléptico. Dichas cepas de levadura se enviaron a la Colección Española de Cultivos Tipo para su identificación molecular. El informe indicó que ambas levaduras pertenecían a la misma especie (*Pichia kluyveri*).

5 Sobre estas dos cepas de levaduras se llevaron a cabo fermentaciones en paralelo y en diferentes condiciones, siendo la cepa 4N187 de *Pichia kluyveri* (CECT 13055) la que resultó en un producto más constante y homogéneo, y por ello, se seleccionó como la mejor levadura para llevar a cabo la fermentación de zumo de naranja y los posteriores estudios.

10 Por otro lado, para determinar las propiedades fisicoquímicas de la levadura se ha estudiado su crecimiento en distintos medios, ya que es preciso conocer las necesidades bioquímicas para el crecimiento de la levadura y partir de una materia prima idónea para el metabolismo de las levaduras. Algunos de los estudios fueron: crecimiento en distintos medios conteniendo cada uno de los cuales fuentes de  
15 nitrógeno o carbono distintos, medios enriquecidos, medios con componentes para impedir el crecimiento de otros microorganismos (metabisulfito potásico).

#### Análisis taxonómico de *Pichia kluyveri*

20 Entre los principales análisis que se realizaron de forma rutinaria para la caracterización de levaduras están los relacionados con la utilización de compuestos hidrocarbonatados: fermentación de azúcares, asimilación de azúcares y asimilación de alcoholes.

Los resultados de estos análisis para *Pichia kluyveri* fueron los siguientes:

| <b>Asimilación</b> |   |                             |   |
|--------------------|---|-----------------------------|---|
| Glucosa            | + | N-acetil-D-glucosamina      | n |
| Galactosa          | - | Metanol                     | - |
| L-sorbosa          | - | Etanol                      | + |
| Sacarosa           | - | Glicerol                    | + |
| Maltosa            | - | Eritritol                   | - |
| Celobiosa          | - | Ribitol                     | - |
| Trehalosa          | - | Galactitol                  | - |
| Lactosa            | - | D-manitol                   | - |
| Melobiosa          | - | D-glucocitol                | - |
| Rafinosa           | - | $\alpha$ -metil-D-glucosido | - |

|                 |   |                |     |
|-----------------|---|----------------|-----|
| Melicitosa      | - | Salicina       | -   |
| Insulina        | - | D-gluconato    | -   |
| Almidón soluble | - | DL-lactato     | +/w |
| D-xilosa        | v | Succinato      | +/w |
| L-arabinosa     | - | Citrato        | w/- |
| D-arabinosa     | - | Inositol       | -   |
| D-ribosa        | - | Hexadecano     | -   |
| L-ramnosa       | - | Nitrato        | -   |
| D-glucosamina   | n | Vitamina libre | -   |

(+), positivo; (-), negativo; w, débil; v, variable (+/-, w/-); n, sin datos

A continuación se muestran los resultados de otros análisis de asimilación y determinación de otras características, tales como su capacidad de crecimiento a 5 distintas temperaturas o el tipo de Co-Q.

| <b>FERMENTACIÓN</b>                                      | <i>P. kluyveri var. kluyveri</i> |
|--|----------------------------------|
| Glucosa  | +                                |
| Galactosa  | -                                |
| Sacarosa   | -                                |
| Maltosa  | -                                |
| Lactosa  | -                                |
| Rafinosa   | -                                |
| Trehalosa  | -                                |
| D-glucitol   | -                                |
| D-glucitol   | -                                |
| <b>REACCIONES DE ASIMILACIÓN Y OTRAS CARACTERÍSTICAS</b> | <i>P. kluyveri var. kluyveri</i> |
| Glucosa  | +                                |
| Galactosa  | -                                |
| L-sorbosa  | -                                |
| Sacarosa   | -                                |
| Maltosa  | -                                |
| Celobiosa  | -                                |
| Trehalosa  | -                                |
| Lactosa  | -                                |
| Melobiosa  | -                                |
| Rafinosa   | -                                |
| Melicitosa   | -                                |
| Inulina  | -                                |
| L-arabinosa  | -                                |
| D-arabinosa  | -                                |
| D-ribosa   | -                                |
| L-ramnosa  | -                                |

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| D-glucosamina                 | +      |
| N-acetil-D-glucosamina        | +      |
| Metanol                       | -      |
| Etanol                        | +      |
| Glicerol                      | +      |
| Eritritol                     | -      |
| Ribitol                       | -      |
| Galactiol                     | -      |
| D-manitol                     | -      |
| D-glucitol                    | -      |
| $\alpha$ -metil-D-glucosido   | -      |
| Salicina                      | -      |
| D-gluconato                   | -      |
| Citrato                       | v      |
| Inositol                      | -      |
| Hexadecano                    | -      |
| Nitrato                       | -      |
| Nitrito                       | n      |
| Vitamina libre                | -      |
| 2-Keto-D-gluconato            | -      |
| 5-Keto-D-gluconato            | -      |
| Ácido sacárico                | -      |
| Xilitol                       | n      |
| L-arabinitol                  | n      |
| Arbutina                      | n      |
| 1,2 diol-propano              | n      |
| 2,3 diol-butano               | n      |
| Cadaverina                    | n      |
| Creatina                      | n      |
| L-lisina                      | n      |
| Etilamina                     | n      |
| 50% glucosa                   | n      |
| 10% NaCl/5% glucosa           | +      |
| Formación de almidón          | -      |
| Ureasa                        | n      |
| Crecimiento a 19°C            | +      |
| Crecimiento a 25°C            | +      |
| Crecimiento a 34°C            | n      |
| Crecimiento a 37°C            | v      |
| Crecimiento a 40°C            | n      |
| Componente principal del Co-Q | Co-Q 7 |

(+), positivo; (-), negativo; w, débil; v, variable (+/-, w/-); n, sin datos

## EJEMPLO 2

**Fermentación alcohólica de zumo de naranja por *Pichia kluyveri* (CECT 13055)**

**I. MATERIALES Y MÉTODOS**

Medio de cultivo

5 Las fermentaciones se realizaron en recipientes estériles. El procedimiento de esterilizado se realizó por autoclavado por calor o bien empleando agentes químicos para tal fin. Los agentes químicos empleados fueron lejía (hipoclorito sódico) al 50% en agua o etanol al 70% en agua y previo a la fermentación se realizó un aclarado para la eliminación de estos agentes.

10 Como recipientes se emplearon botellines comerciales de 250 ml, barriles de aluminio de 5 l, recipientes de polipropileno de diferentes volúmenes y matraces de laboratorio también de diferentes volúmenes, según la necesidad.

El zumo del que se partió contenía una cantidad mínima de microorganismos para descartar la proliferación de organismos no deseados que modificaran el proceso de fermentación y por ende el producto final. En concreto, se partió de un zumo de 15 de naranja sin microorganismos obtenido por un procedimiento de pasteurización.

En el zumo de naranja de origen, se midieron los siguientes parámetros: sólidos solubles y ácidos orgánicos, pH, porcentaje de pulpa, azúcares reductores y no reductores y acidez total. Dichos parámetros, que tenían que estar dentro de unos 20 intervalos para considerar la materia prima adecuada para la fermentación, se describen a continuación:

|  |  |
|--|--|
| <b>Sólidos solubles y ácidos orgánicos</b> | 11 ± 1 °BRIX                             |
| <b>pH</b>                                  | 3,5 ± 0,5                                |
| <b>% pulpa</b>                             | 7-15% v/v                                |
| <b>Azúcares Totales</b>                    | 40-120 g/l                               |
| <b>Reductores</b>                          | 30-60 g/l                                |
| <b>Glucosa</b>                             | 15-30 g/l                                |
| <b>Fructosa</b>                            | 15-30 g/l                                |
| <b>No reductores</b>                       | 30-60 g/l                                |
| <b>Acidez total</b>                        | 0,8 ± 0,2 g ácido cítrico anhidro/ 100ml |

Estos parámetros varían según la localización geográfica del cultivo, época del año y variedad del cítrico, ya que todos son dependientes del grado de madurez de la fruta. Por lo tanto, cuando fue necesario, se procedió a la rectificación de la materia prima hasta llegar los parámetros deseados descritos en la tabla anterior.

5 Los grados BRIX se midieron por refractometría empleando un refractómetro portátil, con una escala de 0 hasta 32 °BRIX. El porcentaje de pulpa se determinó añadiendo 10 ml de zumo homogeneizado por agitación en un tubo de 15 ml graduado y centrifugando durante 10 minutos a 3000 rpm. El porcentaje de pulpa se determinó según la cantidad de pulpa precipitada y se cuantificó por la graduación del tubo.

10 La determinación de azúcares reductores se realizó mediante la utilización del método calorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). La determinación de azúcares no reductores se llevó a cabo mediante una hidrólisis ácida de la sacarosa y una vez hidrolizado, se cuantificó como un azúcar reductor, tal como se ha descrito anteriormente.

15 La acidez se determinó mediante una valoración con hidróxido sódico (0,1 N) empleando como indicador la fenolftaleína.

El cultivo se realizó en un medio rico en azúcares reductores elaborado con zumo de naranja, que contenía un 25% (v/v) de zumo de naranja centrifugado 5 minutos a 3000 rpm, 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa o fructosa) y 75% de agua. El medio de cultivo contenía al menos 20 g/l de azúcares reductores que son los asimilables por la levadura. No fue necesario aportar ninguna fuente de nitrógeno, ya que el zumo de naranja aportaba dichos nutrientes. El medio de cultivo fue esterilizado por calor en un autoclave, con una meseta de temperatura de 121°C durante 20 minutos para evitar contaminación y obtener un preinóculo puro que sólo contuviera la cepa de interés.

### Fermentación

Se partió de un preinóculo puro de la cepa de levadura CECT 13055, dicho preinóculo se incubó en agitación, a 220 rpm, a 30°C en el medio de cultivo descrito anteriormente.

Asimismo, se ensayaron otros medios de cultivos para el desarrollo del cultivo iniciador, tal como un medio rico con glucosa como fuente de carbono, un medio rico

con glicerol como fuente de carbono, un medio rico con etanol como fuente de carbono y zumo de naranja sin diluir.

Tras probar las diferentes cargas de inoculación, la carga de inoculación óptima en el cultivo correspondió al rango de absorbancia medida a 660 nm de 0,05 a 0,2. 0,1  
5 unidades de absorbancia por mililitro corresponden aproximadamente al orden de  $1 \cdot 10^5$  células viables por mililitro. Esta relación se hace efectiva si en el momento de la transferencia del preinóculo éste se encuentra en fase exponencial de crecimiento. Por encima de 0,2 el resultado era similar al obtenido con una absorbancia de 0,1. Sin embargo, por debajo de 0,05 el proceso de fermentación era casi inexistente y se  
10 prolongaba mucho en el tiempo.

El zumo junto a la levadura se introdujo en un fermentador en condiciones anaerobias o con aire en el cuello de cabeza, en proporción variable, que puede ir desde el 60 hasta el 95% de volumen de zumo/volumen del fermentador. En este tipo de recipientes se permitía la salida de gas pero no la entrada, y en caso de entrar algo de  
15 aire, éste es estéril para impedir la contaminación con otros microorganismos, para lo que se empleó una válvula u otro dispositivo tipo airlock.

La fermentación se llevó a cabo en condiciones no estáticas, con movimiento de la matriz. El movimiento se realizó de dos maneras: por agitación continua (palas en el interior del fermentador o con agitación orbital) y por recirculación de la fracción  
20 inferior del fermentador para su deposición en la parte superior. La agitación durante el proceso de fermentación se realizó de forma constante a 110 rpm. Para la recirculación, se tomó la muestra de la zona inferior del fermentador y con una bomba de fluidos se remontó a la parte superior del fermentador donde se depositó. De este modo, se consiguió homogeneizar el contenido. La tasa de recirculación fue variable según el tipo  
25 de fermentador ya que se buscaba la correcta homogeneización del contenido.

El tiempo de fermentación es directamente proporcional a la concentración de azúcares fermentables por la levadura en el medio, e inversamente proporcional a la temperatura. Así, la temperatura óptima para la fermentación fue de 20°C y con una duración de 3 días. En este tiempo tuvo lugar el agotamiento parcial de los azúcares  
30 fermentables presentes y la producción de etanol y otros compuestos aromatizantes que supusieron un producto totalmente diferenciado del zumo de naranja de partida. La concentración de etanol presente en el fermento fue variable según la concentración de

azúcares reductores presentes en el zumo de partida, pero la cantidad de etanol oscilaba entre 0,1-3,4% v/v. Para la determinación de la concentración de etanol se utilizó el kit enzimático (Alcohol deshidrogenasa) producido por ROCHE y comercializado por R-Biopharm, Cat. No. 10 176 290 035. El etanol se puede oxidar a acetaldehído por el NAD en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) para producir NADH. El NADH producido se determinó espectrofotométricamente a 334, 340 ó 360 nm. Mediante la determinación del NADH se determinó de manera indirecta la concentración de etanol. Para la identificación de los demás alcoholes volátiles se empleó cromatografía de gases.

10 Sobre el producto final se realizó un perfil de compuestos volátiles (aromas) mediante cromatografía de gases/masas con un inyector especial capaz de tomar la fracción gaseosa que contenía los aromas.

Tratamiento post-fermentativo

15 Para el tratamiento post-fermentativo se probaron las siguientes operaciones de forma individual o en combinación:

- (1) Centrifugación de 5 minutos a 3000 g y eliminación del precipitado.
- (2) Decantación a 4°C de 1 a 10 días y eliminación del precipitado para eliminar los sólidos sedimentados.
- 20 (3) Clarificación con una sustancia capaz de unirse a los sólidos incrementando su densidad y facilitando su sedimentación (bentonita, gelatina u otro compuesto) y eliminación del precipitado.
- (4) Filtración tangencial de 0,2-0,45  $\mu\text{m}$ , con una presión de aspiración a 2 bares ( $2 \times 10^5 \text{ Pa}$ ) y presión de salida a 0,5 bares ( $0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$ ) y reteniendo el efluente.
- 25 (5) Pasteurización.

Se ha experimentado que todos los tratamientos, excepto en el caso de la fermentación tangencial y pasteurización, no aportan estabilidad microbiológica al fermento, por lo tanto se descartaron como tratamientos post-fermentativos únicos, pero se podrían utilizar en combinación con otros tratamientos.

30 Como tratamientos post-fermentativos más idóneos, se concluyó que la decantación seguida de una pasteurización eran los tratamientos más óptimos, debido a

que aportaban estabilidad al producto final sin modificar sus propiedades organolépticas.

Con la decantación se consiguieron eliminar la mayor parte de los sólidos (pulpa) y levaduras. Se realizó en frío para limitar que se siguiera produciendo la fermentación, además de precipitar la mayoría de los sólidos decantables a esta temperatura.

Con la pasteurización se consiguió la estabilidad microbiológica y se interrumpió el proceso fermentativo, incluso a temperatura ambiente. Esto permite comercializar el producto sin necesidad de mantener una cadena de frío. La pasteurización necesaria para aportar estabilidad consistió en un calentamiento rápido y en mantener una meseta de 2 minutos a 75°C seguido de un enfriamiento “flash”.

### Carbonatación

El proceso se llevó a cabo a 4°C y en un recipiente específico para la gasificación. Consistió en la adición de anhídrido carbónico hasta alcanzar en equilibrio una presión específica de 0,44 bares ( $0,44 \times 10^5$  Pa). Con esta presión se alcanzó una relación de 2 volúmenes de CO<sub>2</sub> por cada volumen de bebida. El procedimiento consistió en añadir el CO<sub>2</sub> y esperar a que se equilibrara el intercambio gaseoso entre las fases (líquido-gas) y si era necesario, se añadía más CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la presión de 0,44 bares ( $0,44 \times 10^5$  Pa). Para una carbonatación más eficiente, se dejó carbonatando 24 horas a 4°C, con el mayor área de intercambio posible.

El procedimiento de carbonatación favoreció las propiedades organolépticas del producto final al aportar un fuerte carácter refrescante, además de hacer más atractivo el producto por la formación de una capa de espuma superior.

25

## **II. RESULTADOS**

Las curvas de crecimiento para la cepa de levadura CECT 13055 en los diferentes medios de cultivo en la fase exponencial se muestran en la Figura 1.

Los medios en los que el cultivo tarda más en alcanzar la fase exponencial son el zumo de naranja y el medio que tiene como medio de cultivo glicerol (YPG). El medio que emplea como fuente de carbono etanol (YPE) tiene una fase exponencial muy pronunciada, pero ligeramente más retrasada en el tiempo que YPD y el medio con un

30

25% de zumo. Hay que tener en cuenta que el medio de cultivo que usa como fuente de carbono etanol es el más caro de todos, por lo que no es conveniente utilizarlo en el proceso de fermentación.

5 Aquellos medios en los que se experimenta antes la fase exponencial son el medio con un 25% de zumo de naranja y aquel que tiene como fuente de carbono glucosa (YPD). Tal como se puede observar en la Figura 1, la curva de crecimiento para estos dos medios es similar.

10 Tras esta comparación de crecimiento en los diferentes medios, se consideró como medio más óptimo para el cultivo del preinóculo aquel que contenía un 25% de zumo de naranja y ligeramente enriquecido con azúcares reductores (25% (v/v) de zumo de naranja, 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa o fructosa) y 75% de agua). Las razones por las que se considera este medio como el más adecuado son que es el más económico, se alcanza la fase estacionaria en menor tiempo, la densidad óptica máxima alcanzada es aceptable, y además, reduce el tiempo de adaptación del microorganismo

15 al medio de fermentación y no es necesario realizar lavados del cultivo al cambiar de preinóculo al cultivo. Debido a que se produce el preinóculo en un medio similar al zumo de naranja, no es necesaria la adaptación del microorganismo desde el crecimiento en el preinóculo hasta el crecimiento en zumo de naranja para llevar a cabo la fermentación.

20 El producto final tras la fermentación presenta las siguientes características:

|  |   |
|--|---|
| <b>Sólidos solubles y ácidos orgánicos</b> | 7 °BRIX                                   |
| <b>pH</b>                                  | 3,5 ± 0,5                                 |
| <b>% pulpa</b>                             | Depende del tratamiento post-fermentativo |
| <b>Azúcares Totales</b>                    | 30-90 g/l                                 |
| <b>Reductores</b>                          | 30 g/l                                    |
| <b>Glucosa</b>                             | 15 g/l                                    |
| <b>Fructosa</b>                            | 15 g/l                                    |
| <b>No reductores</b>                       | 30-60 g/l                                 |
| <b>Acidez total</b>                        | 0,8 ± 0,2 g ácido cítrico anhidro/100ml   |
| <b>Etanol</b>                              | 3,5% v/v                                  |

En cuanto a los compuestos volátiles mayoritarios presentes en el producto derivado del zumo de naranja son preferiblemente los siguientes:

| <b>Compuesto</b>  | <b>Concentración media (mg/l)</b> |
|-------------------|-----------------------------------|
| Acetaldehído      | 5,65                              |
| Metil acetato     | 0,54                              |
| Acetato etilo     | 501,95                            |
| Metanol           | 37,65                             |
| 1-Propanol        | 27,23                             |
| Isobutanol        | 39,07                             |
| Isoamil acetato   | 9,04                              |
| 2-Metil-1-butanol | 11,15                             |
| 3-Metil-1-butanol | 30,75                             |

Entre los compuestos mencionados, los de mayor interés organoléptico para constituir aromas frutales son: acetaldehído (aroma a manzana madura), acetato de etilo (aroma a piña), isobutanol, acetato de isoamilo (aroma a plátano), metanol (aroma frutal) y 1-propanol (acético).

En las Figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra gráficamente la evolución durante el proceso fermentativo de los azúcares, de la concentración de etanol y de los grados Brix al utilizar en la fermentación la cepa de levadura de la invención.

Se puede observar en la Figura 2 que a partir del tercer día de fermentación, se han consumido aproximadamente el 60% de los azúcares presentes en el medio de cultivo, cantidad que no aumenta a mayor tiempo de fermentación. En concreto, la concentración de azúcares no reductores presentes en el medio a fermentar (sacarosa), permanece invariable durante el procedimiento fermentativo, ya que la cepa de levadura no es capaz de consumir dichos azúcares, siendo la concentración inicial y final para la sacarosa de 48 g/l. Sin embargo, tal como se puede observar en la Figura 3, la concentración de azúcares reductores disponibles disminuye drásticamente al cabo de los 4 días de comenzar la fermentación, hasta agotarse prácticamente. En cuanto a la concentración de etanol, en la Figura 4 se puede observar cómo a partir de los 4 días la concentración de etanol se mantiene invariable, es decir, se mantiene aproximadamente a 3,5%. Por último, los grados Brix, que miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido disminuyen con el tiempo de fermentación, de manera que en origen el zumo de naranja a fermentar presentaba 11 °Brix y tras cuatro días de fermentación dicho valor estaba alrededor de 7 °Brix.

Tanto la acidez como el pH permanecieron invariables durante el proceso fermentativo. La acidez se mantiene en torno a 0,8 g de ácido cítrico anhidro/ 100ml y el pH alrededor de 3,5. Aunque se experimentan ligeras fluctuaciones, no sigue ninguna tendencia. Probablemente se deba a que el zumo que se fermenta ya presenta un pH ácido, y no es necesario que la levadura lo modifique para adecuarse a él.

### EJEMPLO 3

#### Comparación de la fermentación llevada a cabo por diferentes levaduras

Se realizó un estudio comparativo de fermentación en agitación de zumo de naranja con diferentes cepas de levaduras. En concreto, dichas cepas de levadura fueron las siguientes:

- 4N187: Cepa de levadura de *Pichia kluyveri* aislada del entorno natural de los cítricos, depositada con el número de CECT 13055.
- 4N179: Cepa de levadura de *Pichia kluyveri* aislada del entorno natural de los cítricos.
- *Pichia fermentans*
- *Sacchromyces cerevisiae*: levadura tradicionalmente empleada para fermentación alcohólica en enología, cervecería y panificación.
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*: levadura tradicionalmente empleada para fermentación alcohólica en enología y cervecería.
- *Saccharomyces carlsbergensis*: levadura tradicionalmente empleada para fermentación alcohólica en cervecería.

Se muestran datos de comparación de estas cepas en fermentación con agitación (110 rpm.). Las fermentaciones se realizaron a 20°C y se ensayaron durante 15 días. Los parámetros evaluados a lo largo de las fermentaciones fueron azúcares totales (reductores y no reductores), etanol y acidez.

#### Azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores, tales como glucosa y fructosa, disminuyen a lo largo del tiempo de fermentación en todas las cepas. Debido a que a partir del día 5 ya se han consumido la totalidad de azúcares reductores, en la Figura 6

se muestra un gráfico sólo con los 6 primeros días de fermentación. A día 2 tras la fermentación, las cepas con una mayor capacidad de metabolización de azúcares reductores son *S. carlsbergensis* y *S. cerevisiae*, manteniendo las demás cepas valores similares. A día 3, los valores de azúcares reductores están comprendidos entre 0 y 10 g/l para todas las cepas excepto para *P. fermentans* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*. A día 4 la concentración de azúcares reductores para todas las cepas es prácticamente 0.

#### Acidez

Se analizó la acidez del fermento a lo largo del procedimiento, que permaneció invariable durante la fermentación e independiente de si el procedimiento transcurrió en agitación o estático.

#### Azúcares no reductores

En las Figuras 7, 8 y 9 se muestra la evolución durante la fermentación de un azúcar no reductor, tal como la sacarosa. La sacarosa es un azúcar no fermentable por las cepas del género *Pichia*, pero sí por el resto de las cepas.

Tal como se puede observar en la Figura 7, las dos cepas de *P. kluyveri* (4N187 y 4N179) presentan un perfil de consumo de azúcares no reductores muy similar. La concentración de sacarosa permanece prácticamente invariable durante el procedimiento fermentativo para estas cepas, las pequeñas fluctuaciones derivan posiblemente del muestreo y el procedimiento de cuantificación. En caso de influir en el metabolismo de la cepa, se observaría una clara tendencia durante la fermentación. De este ensayo se extrae la incapacidad de la cepa de levadura de *P. kluyveri* de metabolizar la sacarosa en agitación.

En cuanto a la evolución de la concentración de sacarosa en las cepas de *Saccharomyces*, tal como se observa en la Figura 8, la concentración de sacarosa para estas tres cepas a día 6 es prácticamente 0. Es decir, a partir del día 6 no quedan azúcares fermentables en el caldo de fermentación, al tener la capacidad de metabolizar la sacarosa.

En la Figura 9 se muestra una comparación de la evolución de la concentración de sacarosa en todas las cepas de levadura ensayadas. Se observa la diferencia entre las cepas del género *Pichia* (4N187, 4N179 y *P. fermentans*) que no metabolizan la sacarosa, frente a las del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus*) que sí son capaces de degradarla. Dentro del género

*Saccharomyces*, la más retardada es *S. cerevisiae* var. *bayanus* y la que presenta una mayor actividad es *S. cerevisiae*.

### Etanol

La evolución para la producción de etanol, al igual que el consumo de azúcares no reductores (sacarosa) sigue dos patrones diferenciados según el género de la cepa de levadura empelada, ya sean para las cepas del género *Pichia* como para las cepas del género *Saccharomyces*. En el caso de las levaduras del género *Saccharomyces* se obtienen mayores niveles de producción de etanol, algo razonable ya que se metaboliza la sacarosa (Figura 10 y Figura 12).

Tanto la cepa 4N187 como la cepa 4N179 siguen el mismo patrón de comportamiento en cuanto a la producción de etanol (Figura 11). Se observa diferencia respecto a *P. fermentans* en cuanto a la producción de alcohol, ya que ésta, a partir del día 8 es capaz de producir un grado alcohólico más que *P. kluyveri*. *P. fermentans* también es la más retardada de las tres en cuanto a la producción de etanol, este dato valida que también sea la más lenta metabolizando los azúcares reductores. No se observa una tendencia de metabolizar etanol por parte de las cepas, aunque sí pequeñas fluctuaciones. La menor producción de etanol de las cepas 4N187 y 4N179 de *P. kluyveri* con respecto a la cepa de *P. fermentans* se ve más acentuada cuando se cultivan las levaduras sin agitación (Figura 13), en donde a 7 días de fermentación mediante las cepas de *P. kluyveri* se obtiene una concentración de etanol muy baja, de 1%, mientras que con la cepa de *P. fermentans* la concentración de etanol es de 2,2%.

En cuanto a las cepas de *Saccharomyces*, para todas las cepas, se define el día 4 como aquel en el que se alcanzan los mayores niveles de etanol. Pasado este día, para las cepas *carlsbergensis* y *S. cerevisiae* var. *bayanus* se observa una ligera tendencia de disminución de estos valores, posiblemente debido a la metabolización de etanol por parte de la levadura al agotarse los azúcares como fuente de carbono o por volatilidad del etanol, ya que el proceso se realiza en agitación. Sin embargo, se descarta la volatilidad, ya que para *S. cerevisiae*, que se encuentra en las mismas condiciones, no se observa. Para *S. cerevisiae*, se alcanza un mayor grado alcohólico, y pasado el día 4, no se observa ninguna tendencia de degradación, aunque sí pequeñas fluctuaciones posiblemente debidas al procedimiento de determinación y muestreo.

## CONCLUSIONES

Las cepas del género *Pichia* no son capaces de degradar la sacarosa presente en el zumo de naranja, en contraposición con las cepas del género *Sacharomyces* que sí son capaces de metabolizarlo.

5           En cuanto a la metabolización de los azúcares reductores (glucosa + fructosa), las seis cepas siguen un mismo patrón, observándose que a 3 días las concentraciones están comprendidas entre 0 y 10 g/l y para los 4 días de fermentación ya se han agotado.

          Al agotarse los azúcares asimilables por las cepas del género *S. cerevisiae* var. *bayanus* y *S. carlsbergensis*, los niveles de etanol van disminuyendo.

10           Las cepas del género *Pichia* son capaces de alcanzar en tres días 2,5% de etanol y mantener azúcares residuales, siendo la mayor parte sacarosa (no metabolizable) y algunos residuos de azúcares reductores. Los niveles de azúcares son suficientes como para no tener que adicionar edulcorantes.

          Las cepas 4N187 y 4N179 de *P. kluyveri* son las cepas que mejores propiedades  
15 organolépticas aportan al producto final, además de presentar menor concentración de etanol. Para el caso de *P. fermentans*, a pesar de comportarse de manera similar que las cepas 4N187 y 4N179 de *P. kluyveri*, el producto final es parecido al obtenido por fermentación con *Saccharomyces*, y no presenta propiedades organolépticas óptimas para su consumo. Asimismo, en el producto final obtenido a partir de *P. fermentans* es  
20 necesario añadir sacarosa, ya que dicha levadura es capaz de consumir sacarosa y el contenido en etanol es mayor que para las cepas 4N187 y 4N179.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo de la especie *Pichia kluyveri* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 13055, con capacidad de fermentar glucosa y/o fructosa o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad.
2. Un cultivo biológicamente puro del microorganismo según la reivindicación 1.
- 10 3. Un medio de cultivo del microorganismo según la reivindicación 1 que comprende zumo de naranja.
4. Un medio de cultivo según la reivindicación 3 que comprende 25% (v/v) de zumo de naranja y 1% (p/v) de una fuente de carbono.
5. Un medio de cultivo según la reivindicación 4 en donde la fuente de carbono es glucosa y/o fructosa.
- 15 6. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o del cultivo según la reivindicación 2 para llevar a cabo fermentación alcohólica.
7. Un método de crecimiento del microorganismo según la reivindicación 1 o del cultivo según la reivindicación 2 que comprende inocular dicho
- 20 microorganismo en un medio que comprende zumo de naranja.
8. Un método para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que comprende la inoculación del microorganismo según la reivindicación 1 o del cultivo según la reivindicación 2 en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, bajo condiciones que permitan la fermentación
- 25 de los azúcares reductores presentes en el zumo de naranja.
9. Método según la reivindicación 8 en donde la fermentación tiene lugar entre 15 y 35 °C.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 en donde la fermentación tiene lugar durante 3 a 7 días.
- 30 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde la fermentación tiene lugar a 20°C durante 3 días.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en donde la fermentación tiene lugar en agitación o por recirculación.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en donde después del proceso de fermentación se lleva a cabo una decantación de sólidos y pasteurización.
- 5
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 en donde adicionalmente se lleva a cabo una etapa de carbonatación.
15. Producto derivado del zumo de naranja que presenta una concentración de etanol entre 0,1 y 3,4% (v/v), obtenible mediante el método según la reivindicación 8.
- 10
16. Producto según la reivindicación 15 en donde la concentración de etanol es de 2,5% (v/v).
17. Producto según la reivindicación 15 que comprende adicionalmente un compuesto seleccionado del grupo formado por aromatizantes, acidulantes, colorantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, espesantes, estabilizantes y compuestos para mejorar las propiedades del producto de interés para la industria.
- 15
18. Producto según la reivindicación 15 que comprende al menos un azúcar no reductor.
- 20
19. Producto según la reivindicación 18 en donde el azúcar no reductor es sacarosa.

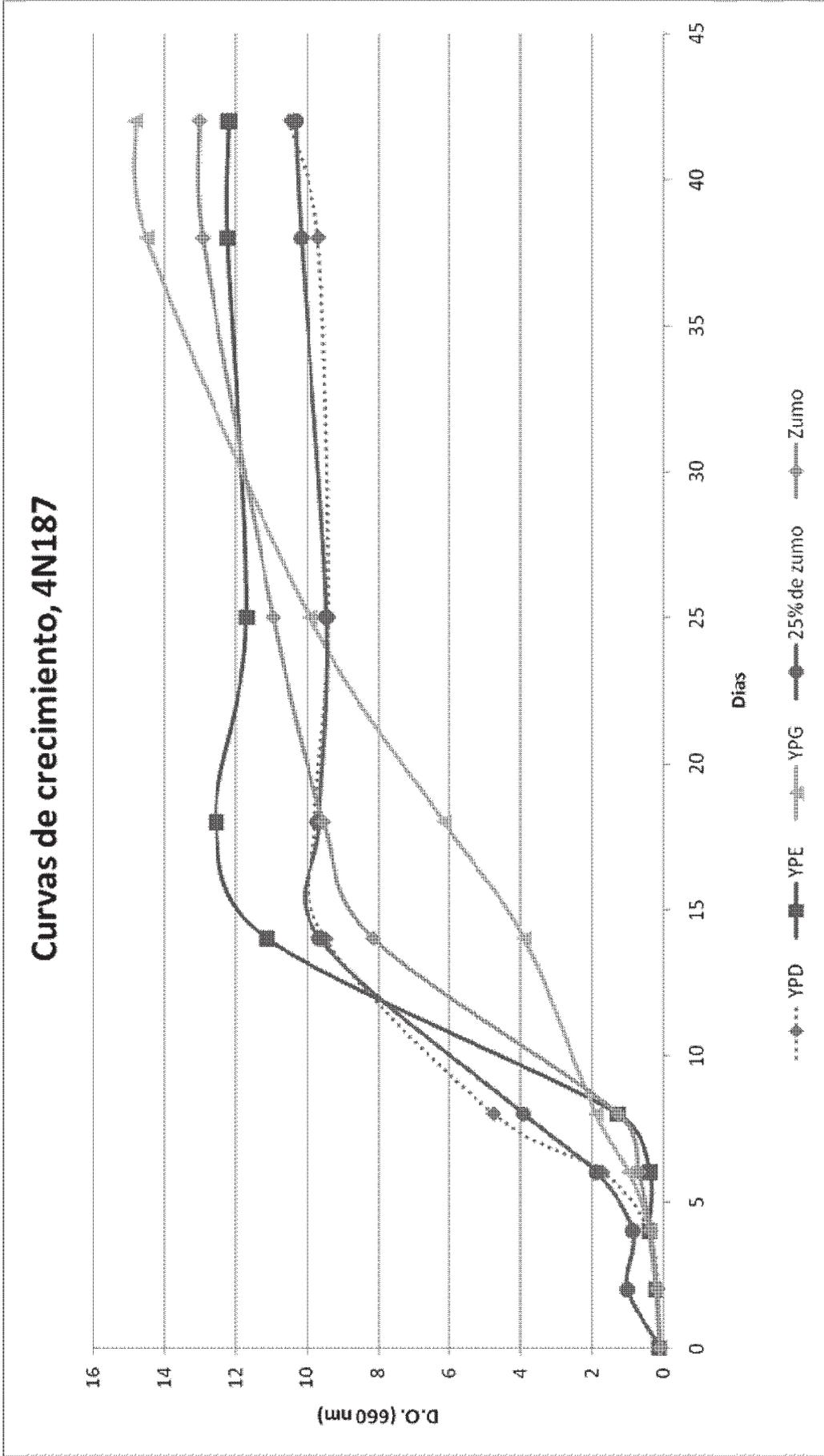
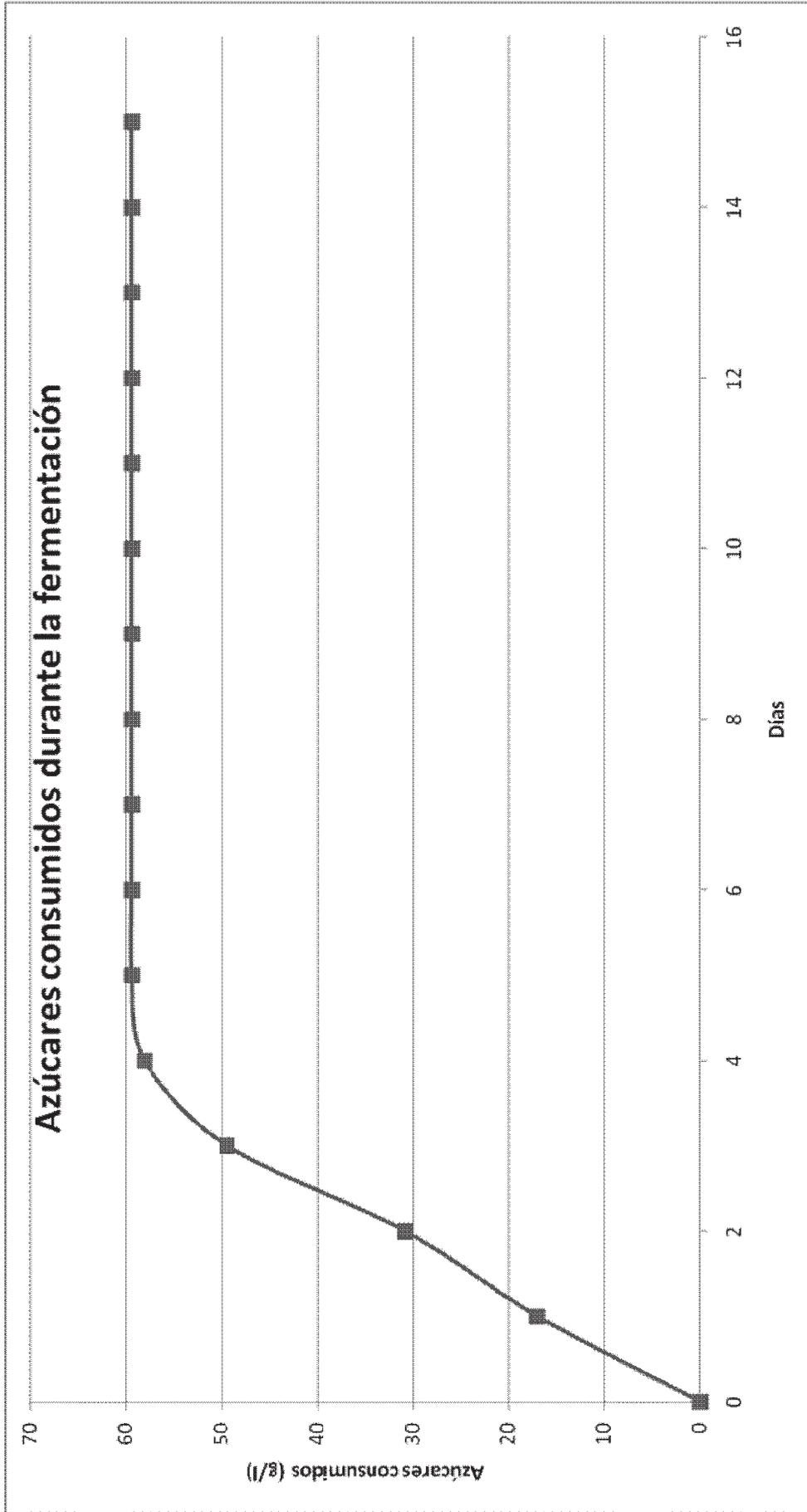


FIGURA I



**FIGURA 2**

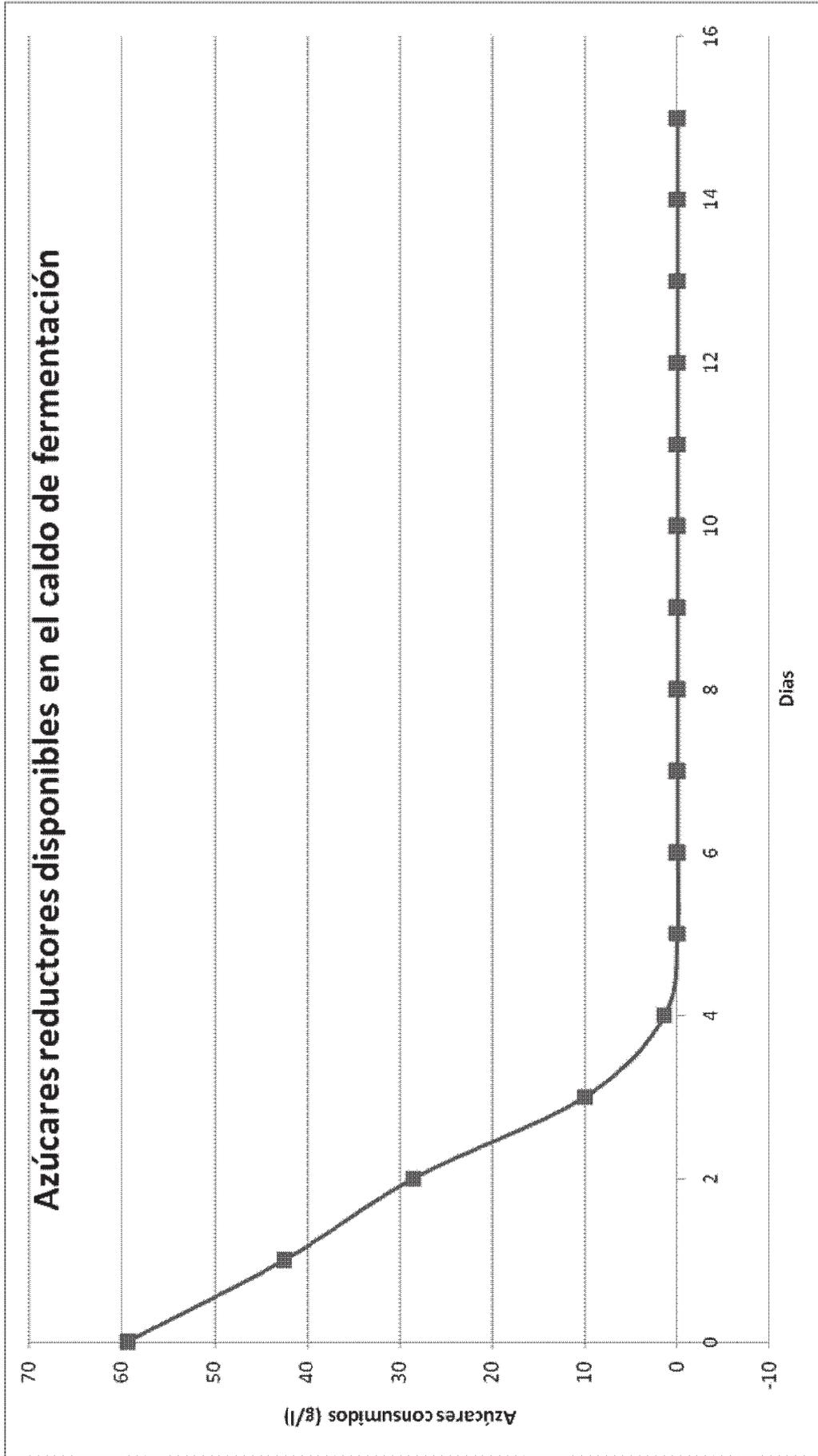


FIGURA 3

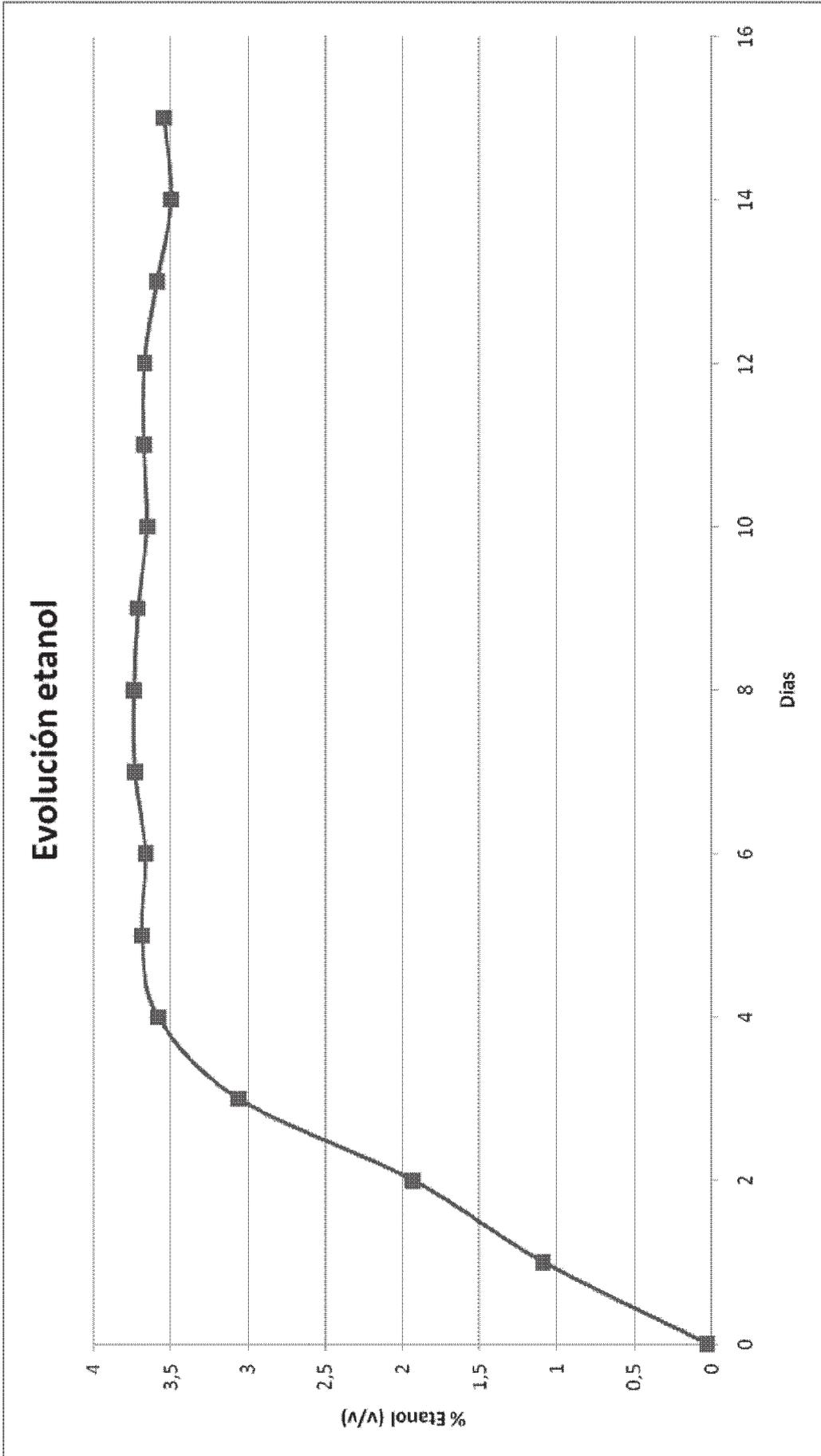


FIGURA 4

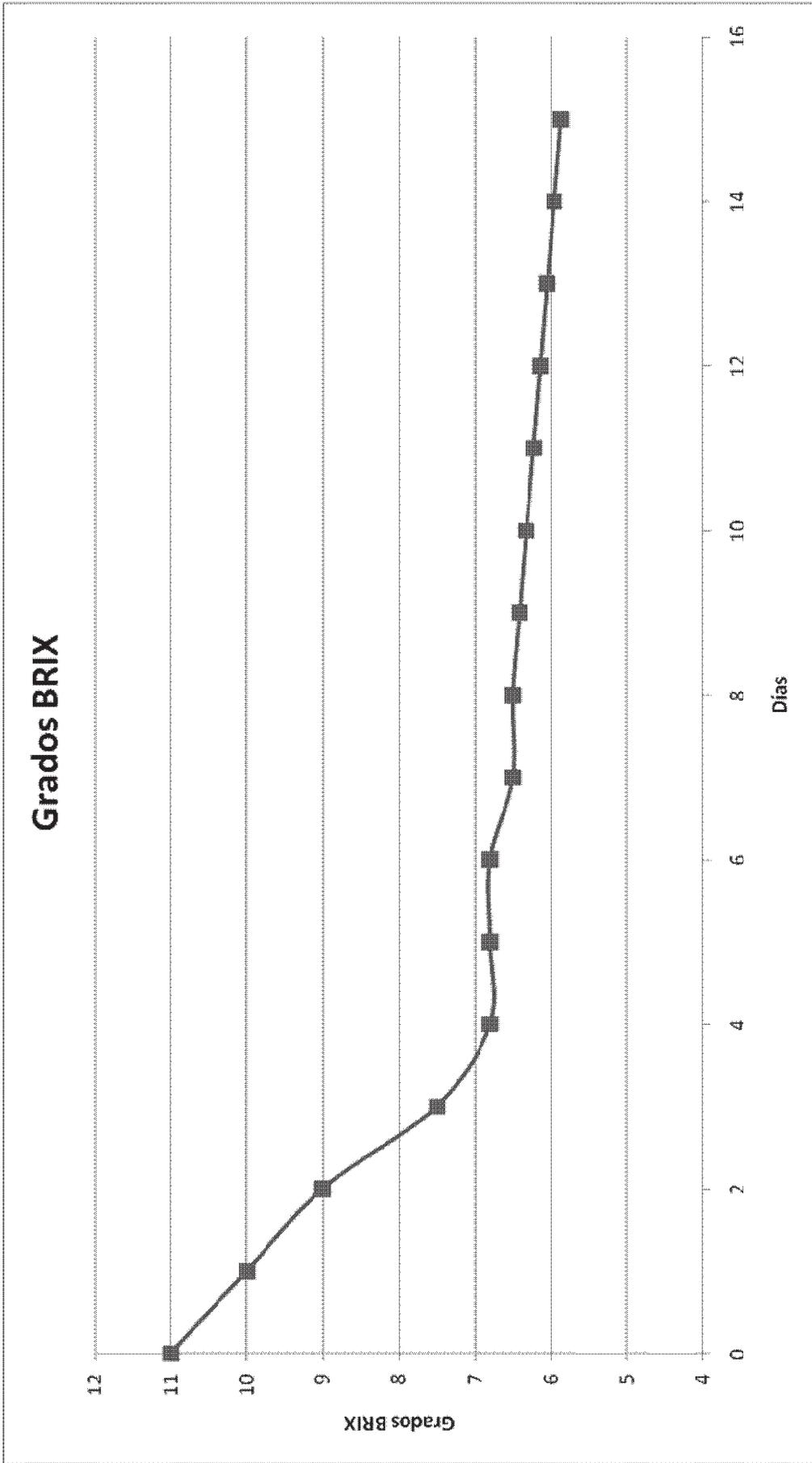


FIGURA 5

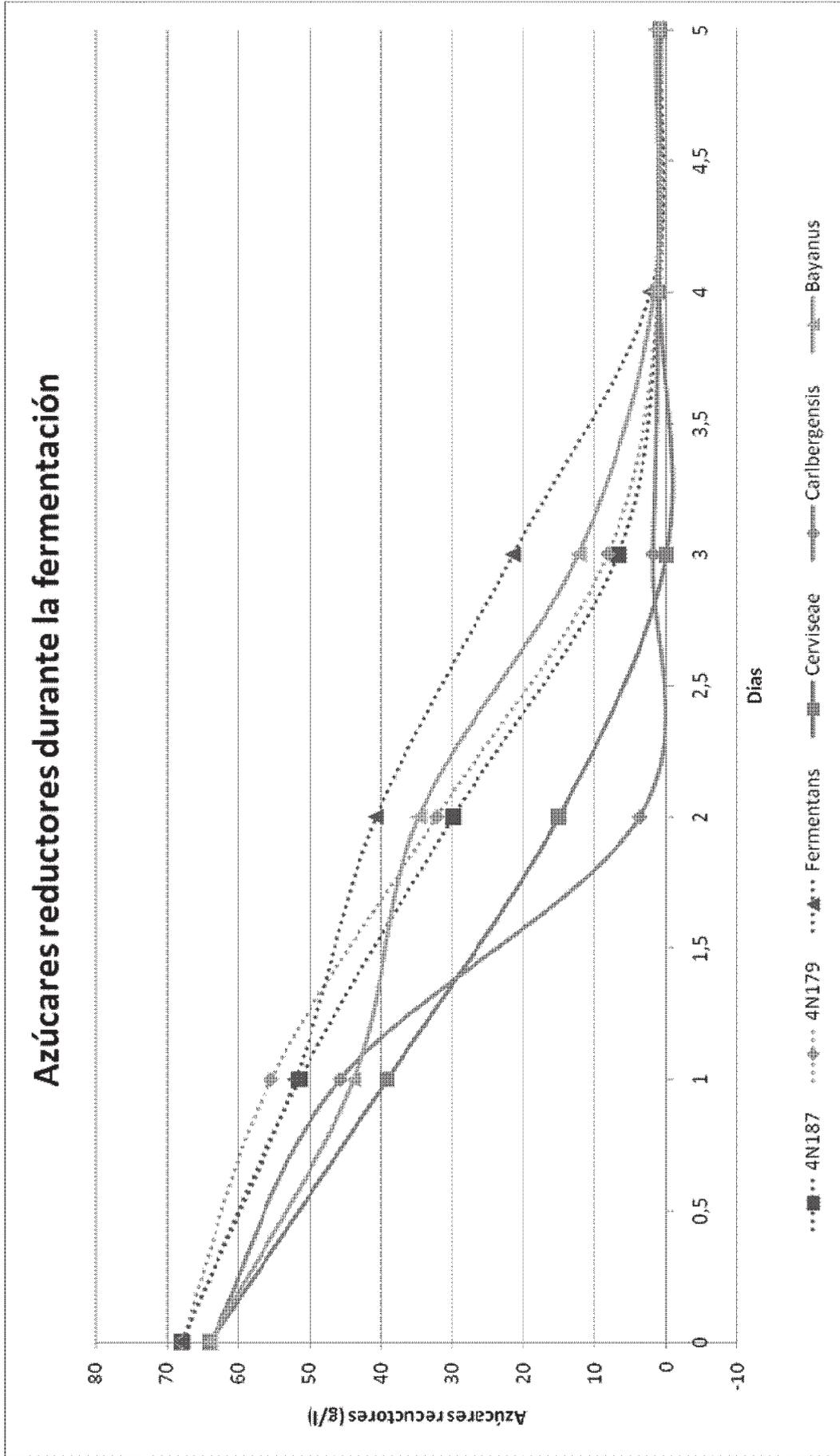


FIGURA 6

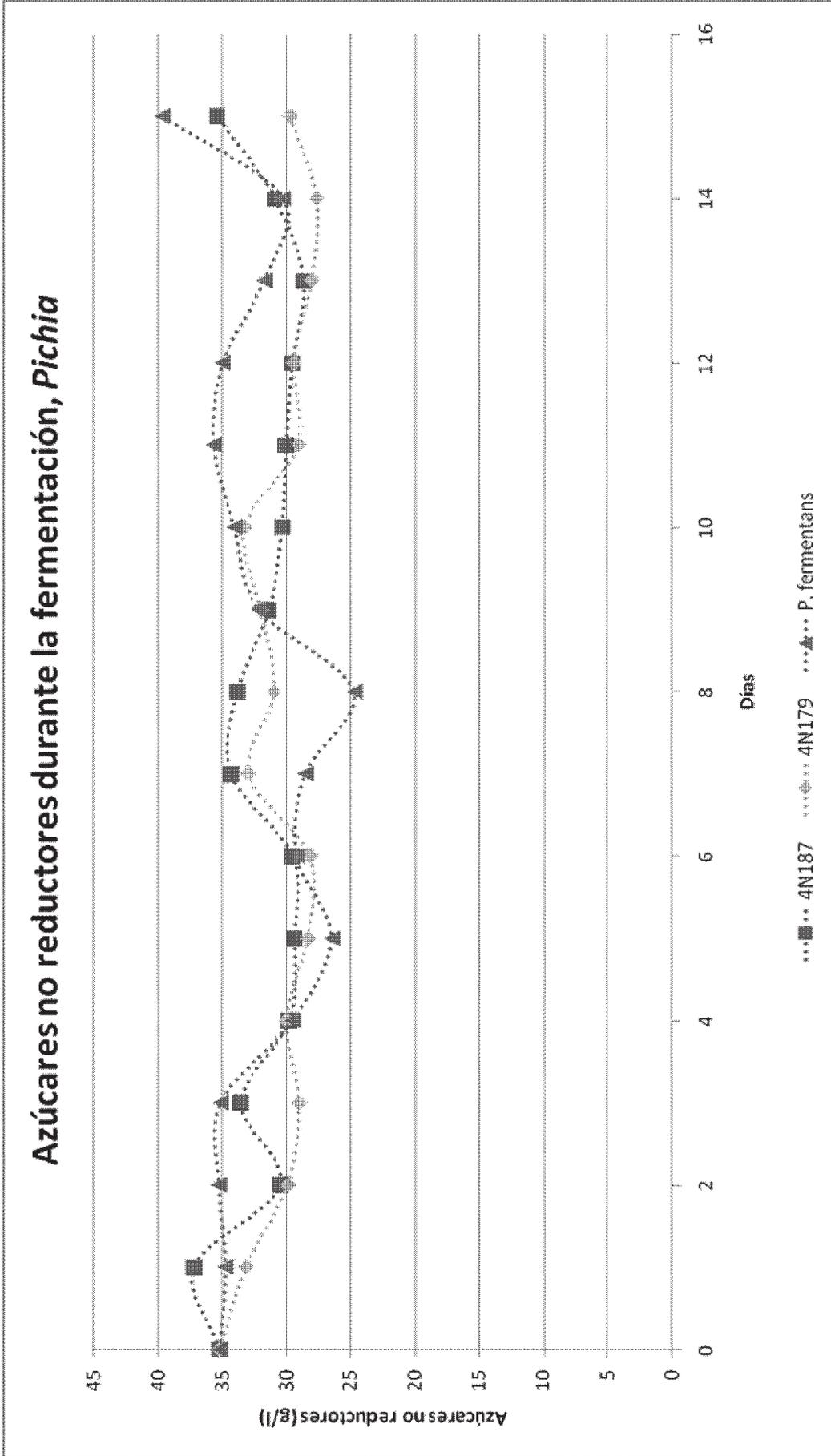


FIGURA 7

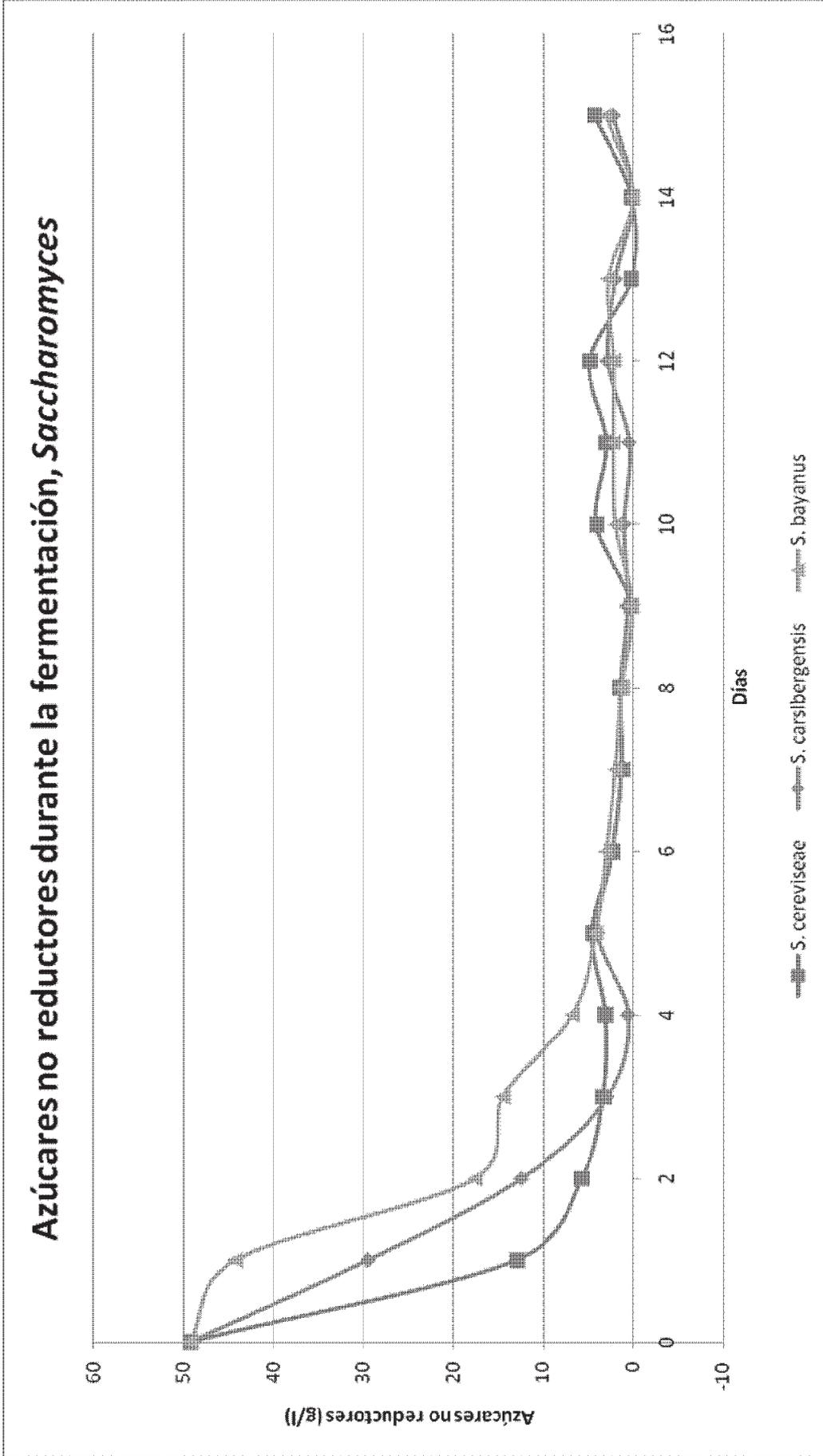


FIGURA 8

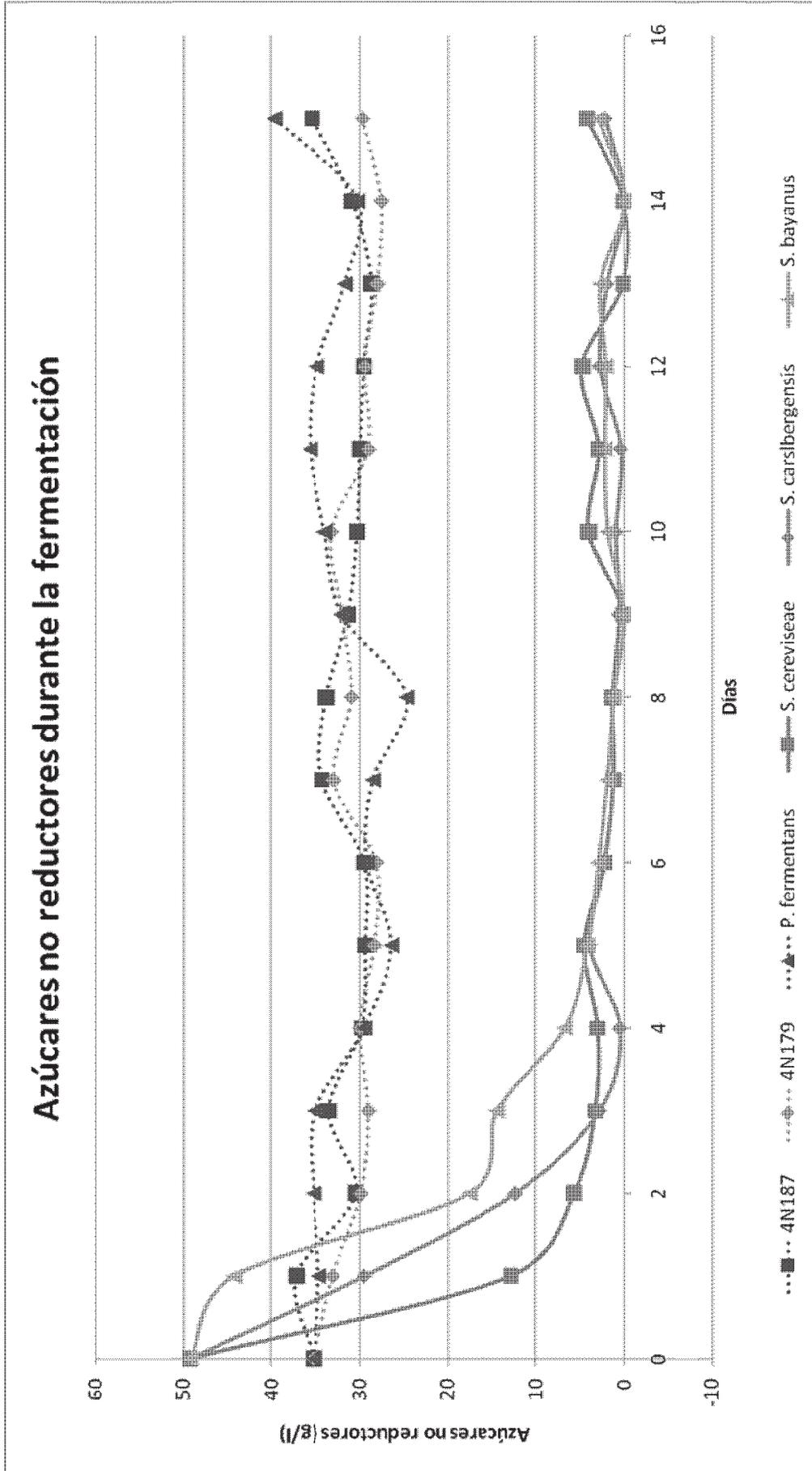


FIGURA 9

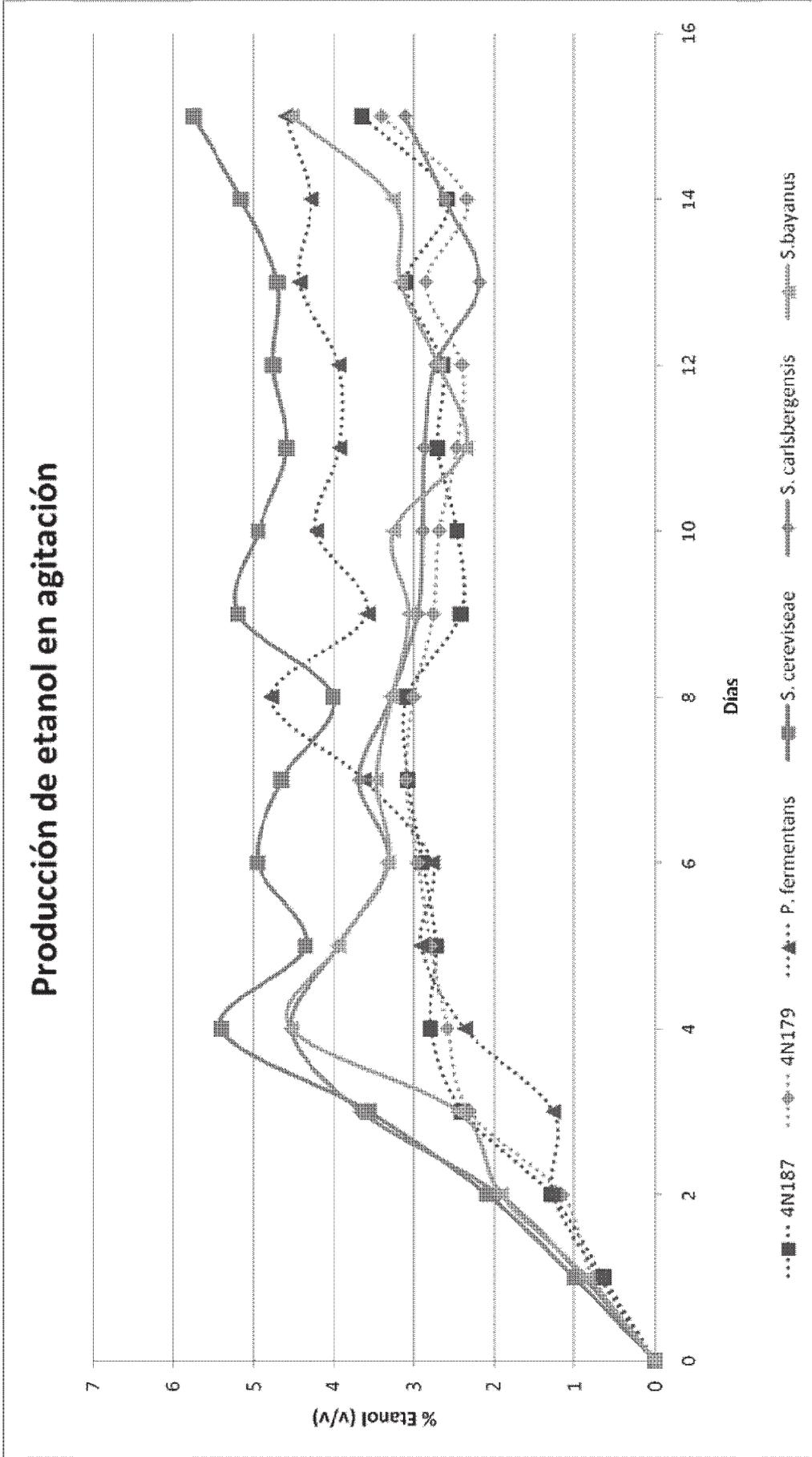


FIGURA 10

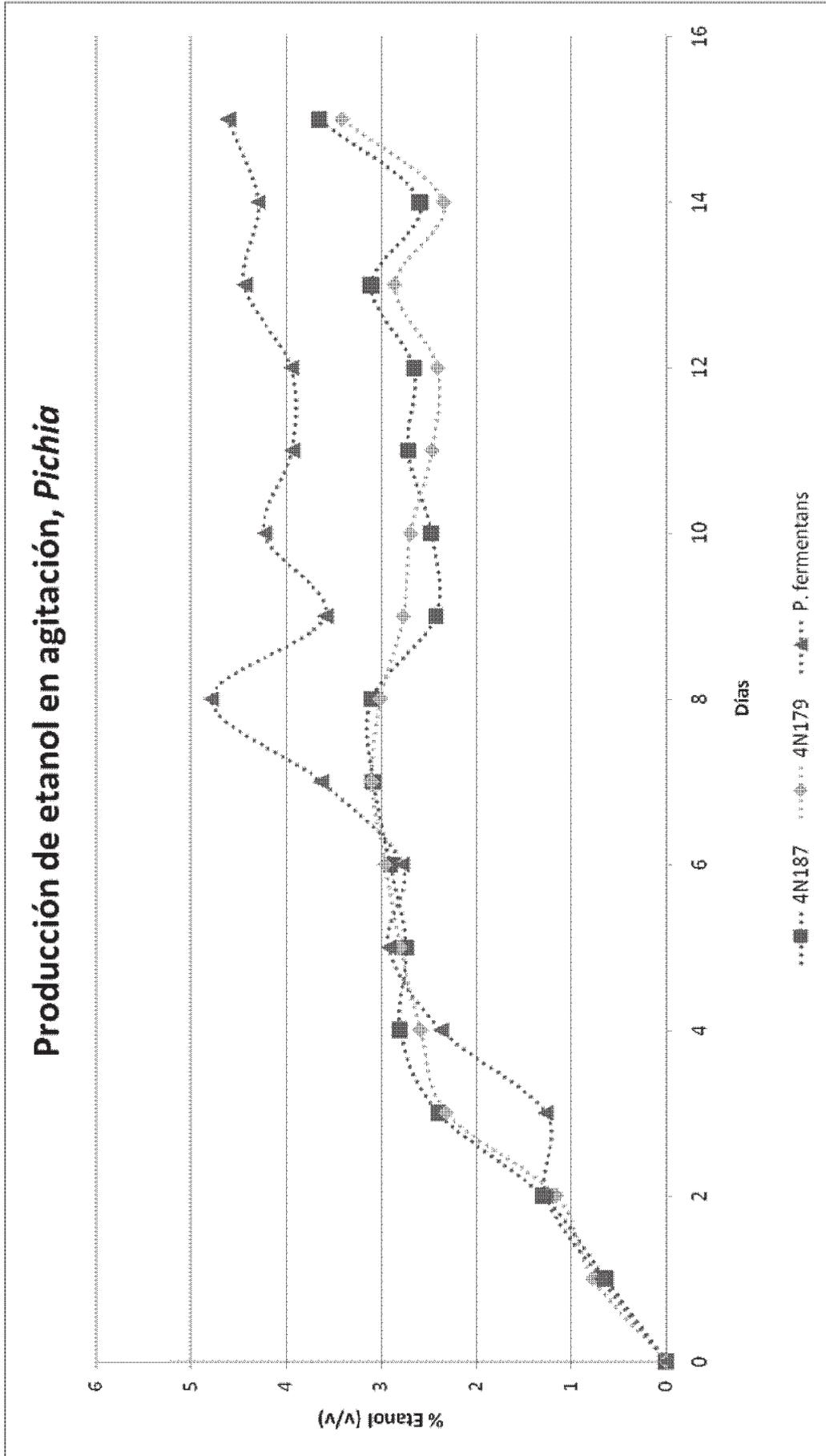


FIGURA 11

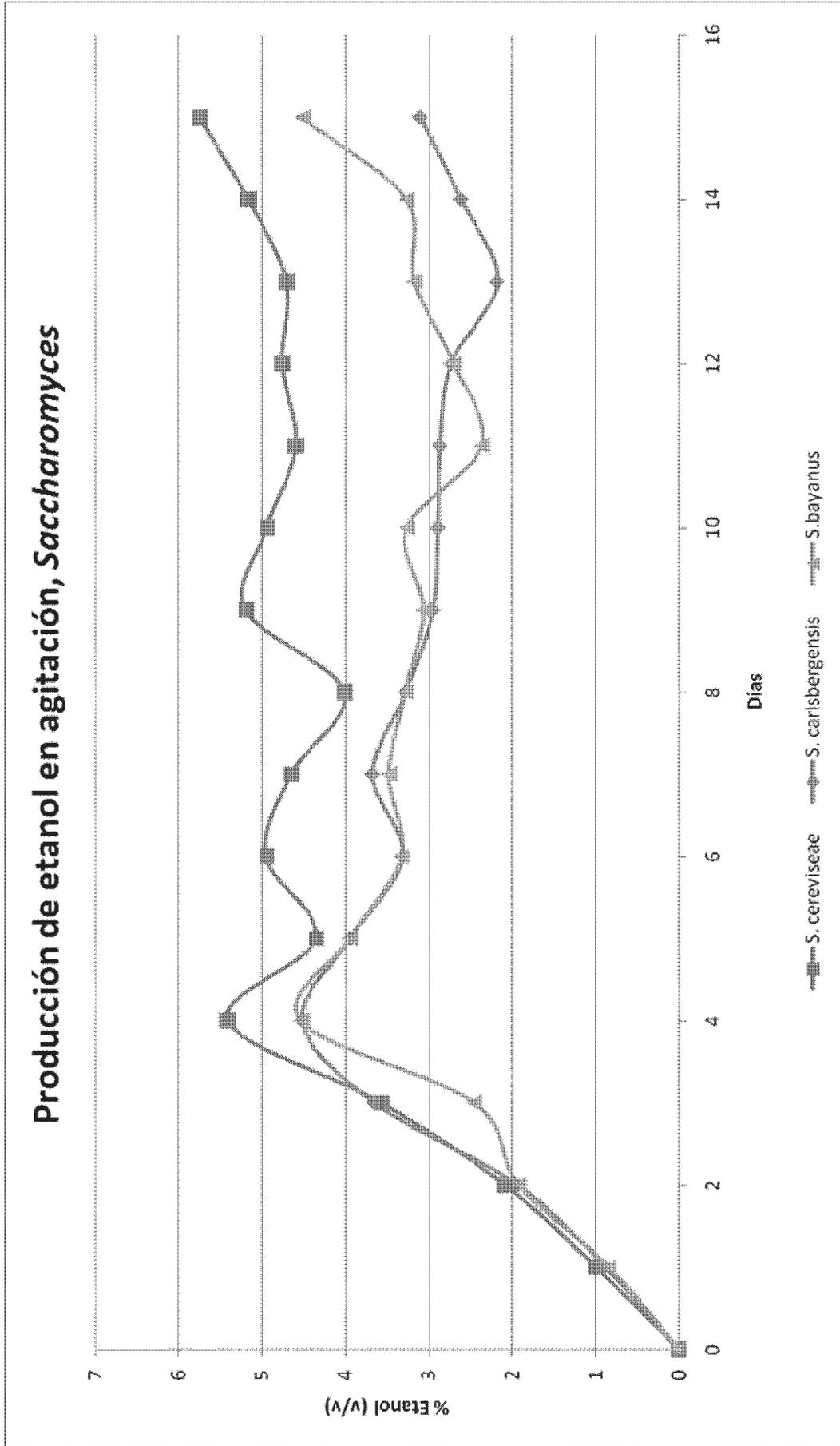


FIGURA 12

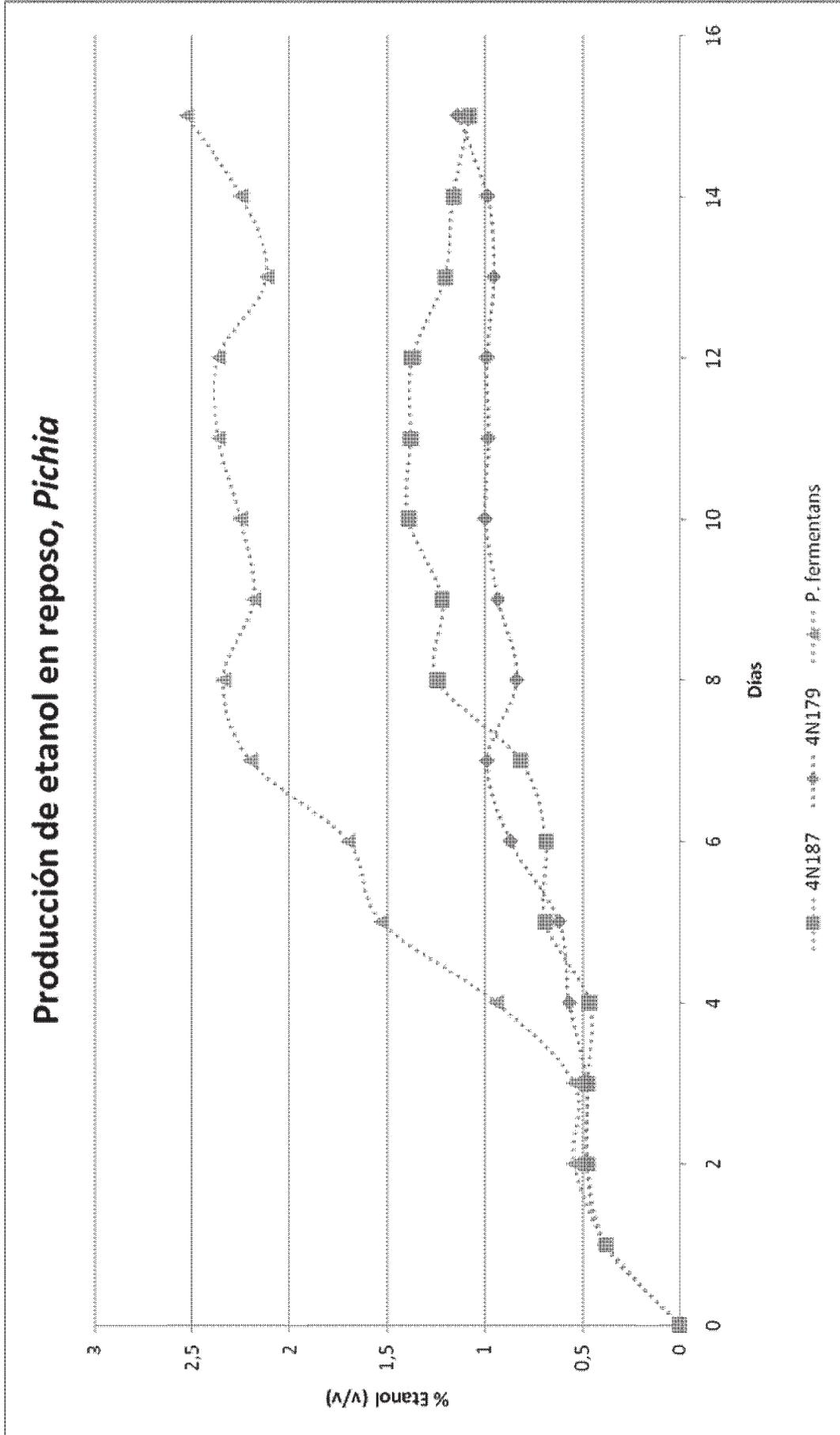


FIGURA 13



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031705

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | ES 2222091 A1 (UNIV ALMERIA) 16.01.2005, todo el documento.                       | 8-19                       |
| A         | WO 2009110807 A1 (AUCKLAND UNISERVICES LTD et al.) 11.09.2009, todo el documento. | 1-19                       |
| A         | ES 2164565 A1 (MINGORANCE CAZORLA LIDIA et al.) 16.02.2002, todo el documento.    | 8-19                       |
| A         | WO 2007141420 A2 (TERRAS JEAN-LOUIS) 13.12.2007, todo el documento.               | 8-19                       |
| A         | US 2002172738 A1 (YOUNG THOMAS B) 21.11.2002, todo el documento.                  | 8-19                       |
| A         | FR 2657878 A1 (ROSE ROLAND) 09.08.1991, todo el documento.                        | 8-19                       |

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  
29.02.2012

Examinador  
A. Maquedano Herrero

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12G3/02** (2006.01)

**C12N1/16** (2006.01)

**C12R1/84** (2006.01)

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

C12G, C12N, C12R

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, BIOSIS, XPESP, CA, FSTA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.02.2012

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-19 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-19 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

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       | ES 2222091 A1 (UNIV ALMERIA)                       | 16.01.2005        |
| D02       | WO 2009110807 A1 (AUCKLAND UNISERVICES LTD et al.) | 11.09.2009        |
| D03       | ES 2164565 A1 (MINGORANCE CAZORLA LIDIA et al.)    | 16.02.2002        |
| D04       | WO 2007141420 A2 (TERRAS JEAN-LOUIS)               | 13.12.2007        |
| D05       | US 2002172738 A1 (YOUNG THOMAS B)                  | 21.11.2002        |
| D06       | FR 2657878 A1 (ROSE ROLAND)                        | 09.08.1991        |

**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**

La solicitud reivindica un microorganismo de la especie *Pichia kluyveri* (levadura) depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de acceso 13055. Este microorganismo tiene la particularidad de poder fermentar azúcares reductores, como la glucosa y la fructosa, mientras que es incapaz de hacerlo en el caso de los azúcares no reductores como la sacarosa. Este hecho es muy importante en el desarrollo de la invención, como se verá más adelante.

La solicitud reivindica, asimismo, un procedimiento para obtener una bebida de baja graduación alcohólica obtenida mediante fermentación de zumo de naranja por el microorganismo mencionado más arriba. También reivindica el producto obtenido. Un factor clave en esta bebida es su contenido en sacarosa no añadida. Esto se debe a la característica del microorganismo ya apuntada anteriormente de carecer de la capacidad de fermentar los azúcares no reductores. De esta forma, esta levadura produce, mediante la fermentación de la glucosa y/o fructosa contenida en el zumo de partida una bebida con bajo contenido en alcohol, pero dulce por su contenido natural en sacarosa.

D01-D06 representan el estado de la técnica anterior. Se refieren a métodos de elaboración de bebidas alcohólicas a partir de zumo de naranja mediante fermentación por microorganismos. Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha utilizado una levadura de la especie *Pichia kluyveri*. Es decir, que el estado de la técnica anterior no anticipa el contenido de la solicitud, ni de lo revelado en D01-D06 se infiere conocimiento alguno a partir del cual, un experto en la materia podría llegar al contenido de la invención.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-19 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/ de 1986.