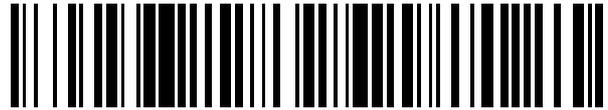


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 276**

21 Número de solicitud: 201930003

51 Int. Cl.:

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.01.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.07.2020**

71 Solicitantes:

**PAGO DE CARRAOVEJAS, S.L. (100.0%)**

**Camino de Carraovejas, s/n  
47300 PEÑAFIEL (Valladolid) ES**

72 Inventor/es:

**NAVASCUÉS LÓPEZ-CORDÓN, Eva**

74 Agente/Representante:

**TORO GORDILLO, Ignacio**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE HISTAMINA EN VINOS**

57 Resumen:

Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos.

La invención consiste en un proceso a través del cual, seleccionando una serie de poblaciones de bacterias lácticas, con un determinado medio de cultivo y siendo aplicadas en un momento concreto de la producción del vino en la bodega, se consigue rebajar drásticamente la presencia de histamina de sus vinos, evitando reacciones alérgicas indeseables, entre ellas dolor de cabeza y malestar general, en orden a favorecer la inocuidad y seguridad alimentaria del vino. Para ello, se utilizan cepas pertenecientes a la especie *Oenococcus oeni*, que se cultivan produciéndose mediante un escalado de volúmenes, las cuales se inoculan, durante la fermentación alcohólica del vino y/o al final de dicho proceso de fermentación.

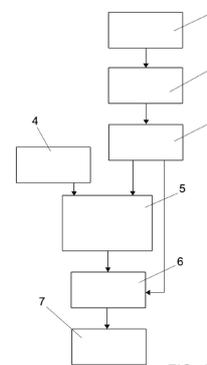


FIG. 1

**DESCRIPCIÓN**

**PROCEDIMIENTO PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE HISTAMINA EN VINOS**

**5 OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento que ha sido especialmente concebido para reducir el contenido de histamina en vinos, concretamente en vinos tintos, evitando reacciones alérgicas indeseables, entre ellas dolor de cabeza y  
10 malestar general.

El objeto de la invención es proporcionar un procedimiento mediante el cual se evita la producción de aminas biógenas, concretamente histamina en el proceso de elaboración del vino, mejorando la implantación de las cepas autóctonas  
15 seleccionadas no histaminogénicas, incluso en condiciones no favorables para el desarrollo de estos cultivos, como alta graduación alcohólica y pH mayor que 3,5 e índice de polifenoles elevado.

Es igualmente objeto de la invención acentuar el perfil aromático varietal, evitando

producción de compuestos como el diacetilo, que aporta notas lácteas y mantecosas, así como asegurar la consecución de la fermentación alcohólica y maloláctica en un tiempo corto, permitiendo una mayor estabilidad microbiológica, que a su vez reduce las necesidades de adición de sulfitos de los vinos.

5

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Durante la elaboración del vino se generan aminas biógenas resultado de la transformación de los aminoácidos por la acción de bacterias lácticas pertenecientes a diferentes géneros y especies, ligadas a la fermentación maloláctica. Esta fermentación sucede de manera natural en la mayor parte de los vinos tintos de calidad y aporta estabilidad y mejora sensorial al transformar el ácido málico en láctico, mucho más elegante a los sentidos.

15 De entre todas las aminas biógenas, la histamina es responsable de reacciones alérgicas tales como vasodilatación de capilares, bajada de la tensión arterial, aceleración de los latidos del corazón, enrojecimiento de la piel, estimulación de la secreción gástrica, dificultades respiratorias, así como su efecto más conocido, el dolor de cabeza tras la ingesta de vino.

Durante los últimos años se ha observado un incremento de la presencia de histamina en los vinos. Esto se debe, en parte, a que su producción se ve indirectamente afectada por los fenómenos asociados al cambio climático: mayor azúcar presente en las bayas de uva, que supone un mayor contenido de alcohol de los vinos, presencia de azúcares residuales y menor acidez titulable.

Algunas de estas consecuencias son, por ejemplo, el incremento del pH y la disminución de la acidez de los vinos, siendo factores favorables para el crecimiento de bacterias lácticas y la síntesis de histamina.

10

Sin embargo, no todas las bacterias lácticas tienen la misma capacidad de síntesis de estos compuestos, existen importantes variaciones en función de la especie y, sobre todo, de la cepa.

## 15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento que se preconiza permite reducir sensiblemente el contenido de histaminas en vinos, acentuando el perfil aromático varietal, evitando adicionalmente la producción de compuestos como el diacetilo, y asegurando la consecución de la

fermentación alcohólica y maloláctica en un tiempo corto.

Para ello, el proceso parte de la selección de cepas de bacterias, que experimental y contrastadamente hayan demostrado que no realizan consumo de azúcares durante su aplicación en fermentación alcohólica y su empleo no eleva los niveles de ácido acético del vino.

De forma más concreta se seleccionaron las cepas de *Oenococcus oeni* CECT 9749, CECT 9750 y CECT 9751.

10

Estas cepas, por desplazamiento competitivo, impiden el crecimiento de las que sí son productoras de histaminas, reduciendo, e incluso eliminando, la producción de histamina.

15

El uso concreto de este tipo de cepas facilita el desarrollo de la fermentación maloláctica, ya que las condiciones del mosto son más favorables al desarrollo de las bacterias lácticas que las del vino. De esta manera, a lo largo de la fermentación alcohólica las bacterias se van aclimatando progresivamente a las condiciones adversas al medio.

Paralelamente, el empleo de este tipo de cepas previene posibles alteraciones microbiológicas derivadas del tiempo que tarda en desarrollarse la fermentación maloláctica después de fermentación alcohólica, intervalo en el que el vino está  
5 desprotegido de sulfuroso. Por tanto, limita la incidencia de alteraciones por *Brettanomyces*, y disminuye el riesgo de génesis de aminas biógenas por bacterias lácticas indígenas. De igual forma, la dosis de sulfuroso (sulfitos) necesaria para la estabilización microbiológica de los vinos es sustancialmente inferior.

10 Tras la selección de dichas cepas, se procede a la producción del cultivo de las mismas, en un medio a base de agua destilada, vino blanco ecológico, mosto blanco concentrado ecológico, zumo de tomate, extracto de levadura, ácido málico y Tween  
80, producción que se lleva a cabo mediante un escalado de volúmenes con sus correspondientes controles de calidad.

15

Posteriormente, el cultivo de bacterias lácticas se inocular en los correspondientes depósitos de vino, en el proceso de fermentación del vino, preferentemente 48 horas después, pudiéndose aplicar directamente sobre el sombrero, no siendo necesario  
homogeneizar.

Este proceso, podría repetirse o realizarse también, si se estima necesario, una vez finalizada la fermentación alcohólica.

- 5 De esta forma, y tal y como se ha dicho con anterioridad, se consigue reducir drásticamente la concentración de aminas biógenas, en concreto histamina, en el vino obtenido, resultando por tanto un vino más saludable, inocuo y seguro desde el punto de vista alimentario. También la reducción sustancial de sulfuroso necesario para la estabilización microbiológica que supone este procedimiento, colabora en
- 10 este concepto de vinos mas saludables apra el consumo.

## **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar y con objeto
- 15 de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de planos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra un diagrama de bloques de la secuencia operativa de un procedimiento para reducir el contenido de histaminas en vinos realizado de acuerdo con el objeto de la presente invención.

5 La figura 2.- Muestra el contenido de histamina en en vinos a lo largo de su crianza, cuando a éstos se les inocula o no cultivos de las cepas de *Oenococcus oeni*, figura en la que:

- MB= meses de barrica.
- 10
- Co-inoculado: aplicación del cultivo en fermentación alcohólica.
  - Inoculado: aplicación del cultivo al final de la fermentación alcohólica.
  - No inoculado: adquisición del cultivo por mezcla de vinos.
  - Implantado: presencia del cultivo en las del 80% de los aislamientos.

## 15 REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A la vista de las figuras reseñadas, puede observarse como el procedimiento de la invención parte de la selección (1) de cepas de bacterias que no realizan consumo de azúcares durante su aplicación en fermentación alcohólica y su empleo no eleva

los niveles de ácido acético del vino, concretamente cualquiera de las cepas de *Oenococcus oeni* CECT 9749, CECT 9750 y CECT 9751.

Tal y como se ha dicho anteriormente, estas cepas, por desplazamiento competitivo, impiden el crecimiento de las que sí son productoras de histaminas, reduciendo, e incluso eliminando, la producción de histamina.

Tras la selección de dichas cepas, las mismas se guardan glicerizadas.

En cuanto al glicerizado, donde se mantienen las cepas glicerizadas, se prepara al 30% (30g glicerina+100mL H<sub>2</sub>O destilada)

Se pone 0.5mL de glicerina+0.5mL de R30 con población elevada de bacterias.

Se guarda en congelación (-20°C).

Antes de la vendimia se procede a la producción del cultivo (2) de las mismas.

Para dicha producción el medio que se utiliza para la producción de BL es denominado R30 y presenta la siguiente composición (ingredientes de mayor a menor):

- Agua destilada.
  - Vino blanco ecológico.
  - Mosto blanco ecológico.
- 5
- Zumo de tomate.
  - Extracto de levadura.
  - Ácido málico D-L.
  - Tween 80.
- 10
- La producción se lleva a cabo haciendo un escalado de volúmenes:
- Se parte de un cultivo glicerinado del que se toman 100µl que nos sirven como inóculo para sembrar la primera escala en un volumen de 10ml de medio R30.
- 15
- En total hay 5 escalados, del cultivo de 10mL se pasa a un volumen de 50ml de medio R30, éste a un volumen de 0.5L de medio R30. La escala de 0.5L se pasa a un volumen de 8L, y ésta a un volumen final de unos 85-90L.

- Cada escalado de la producción se incuba a 28°C (aprox), hasta alcanzar la población máxima de bacterias lácticas ( $\sim 1 \cdot 10^9$  ufc/ml), lo que lleva unos 4-5 días.
- Cuando se alcanza la población máxima, ese volumen sirve como inóculo para el siguiente escalado.

5

Todas las escalas de volumen de producción llevan asociados unos controles tales como controles de pureza, esterilidad, controles enzimáticos, control de recuento totales, control de viabilidad, control de etanol y control de identificación de la cepa producida.

10

Una vez obtenido el cultivo de bacterias lácticas, este se inocula (3) al depósito (5) de fermentación, en una fase posterior (preferentemente 48 horas después) al inicio de la fermentación de la uva (4) en dicho depósito (5).

15

Para realizar la inoculación bacteria en cofermentación con la levadura, es decir sobre la uva o mosto, el sulfitado de la vendimia no debe exceder de 8 g/hL. Antes de añadir las bacterias, hay que asegurar la ausencia de SO<sub>2</sub> libre.

En el caso de que se realice siembra de levadura fermentativa (*Saccharomyces cerevisiae*) es importante la elección de la cepa levadura para favorecer la coexistencia de las dos especies de microorganismos en el vino.

Para ello, se recomienda emplear cepas de levadura:

- 5           - poco exigentes en nitrógeno
- no productoras de SO<sub>2</sub>

Para el buen desarrollo del cultivo bacteriano, el desarrollo regular y completo de la fermentación alcohólica es esencial para evitar ralentizaciones y paradas. Para  
10 prevenir cualquier alteración de la cinética fermentativa, y que las levaduras estén en condiciones óptimas, es necesario corregir el nitrógeno asimilable de la siguiente forma:

- Añadir un nutriente orgánico al inicio que completa las carencias del mosto,  
15 prepara la levadura para la fase final de fermentación y evita subidas de temperatura que en casos de inoculación son especialmente nocivas.

- Si fuera necesario, añadir un nutriente complejo a 1/3 de fermentación alcohólica.

El proceso deberá llevarse a cabo a una temperatura controlada, entre 22-24°C, siempre por debajo de 28°C y evitar los choques térmicos.

Así pues, y como es convencional, en el proceso de fermentación se corrige el SO<sub>2</sub> en función del pH y estado sanitario: entre 3 y 8g/hl. Nunca más de 8g/Hl, inoculando la levadura en una proporción del orden de 20g/Hl, empleando activadores orgánicos en el encubado en una proporción de 20-30g/Hl.

Una vez comprobado que el SO<sub>2</sub> libre es cero, se lleva a cabo la inoculación (3) o siembra del cultivo líquido de la bacteria láctica, mediante aplicación directa.

Esta se puede realizar directamente sobre el sombrero, no siendo necesario homogeneizar, controlando la temperatura como se ha dicho con anterioridad, y si fuera necesario aplicando una fase de nutrición a 1/3-de FA, con un nutriente complejo en una proporción de 10-30g/Hl.

Se llevará a cabo el control de densidad y ácido málico durante todo el proceso, y se comprobará el contenido de ácido málico.

Si la fermentación maloláctica termina antes del consumo total de azúcares, será  
5 preciso sulfitar a dosis de 2g/hl.

Finalmente, si la fermentación maloláctica termina después de la fermentación  
alcohólica, se procederá al proceso de trasegado, completando el depósito y  
continuando la fermentación maloláctica, procediéndose a sulfitar cuando ésta  
10 termine.

Así pues, se lleva a cabo un proceso de cofermentación (6) finalizado el cual se  
obtiene el producto final (7), un vino con una reducida concentración de histaminas.

15 Para realizar la inoculación bacteria con posteridad a la fermentación alcohólica,  
sobre el vino descubado y trasegado se inocula el cultivo (3) al depósito (6) de  
fermentación maloláctica que contiene el vino procedente de fermentación  
alcohólica, descubado y trasegado. Así pues, se lleva a cabo un proceso de  
fermentación maloláctica (6) finalizado el cual se obtiene el producto final (7), un vino

con una reducida concentración de histaminas.

A la vista del proceso descrito, y de acuerdo con la figura 2, puede observarse los cambios en la concentración de histaminas en función de los meses de barrica de diferentes vinos de vendimia, tratados con cultivos y sin cultivos bacterianos. En el caso del empleo de los cultivos bacterianos la presencia de histamina es escasa (más de diez veces inferior a la obtenida sin cultivos bacterianos) y estable a lo largo de los doce meses de crianza en barrica.

## REIVINDICACIONES

1ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos, concretamente en vinos tintos, caracterizado porque en el mismo se establecen las siguientes fases

5 operativas:

- Selección de cepas de bacterias que no realizan consumo de azúcares durante su aplicación en fermentación alcohólica y su empleo no eleva los niveles de ácido acético del vino, concretamente cualquiera de las cepas de  
10 *Oenococcus oeni* CECT 9749, CECT 9750 y/o CECT 9751.
  
- Producción del cultivo de cepas de *Oenococcus oeni* CECT 9749, CECT 9750 y CECT 9751, mediante un proceso de escalado de volúmenes, obteniéndose una preparación glicerinada con una población elevada de  
15 bacterias.
  
- Inoculación del cultivo obtenido en los correspondientes depósitos de fermentación del vino.

2ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos, según reivindicación 1ª, caracterizado porque la inoculación del producto obtenido en los correspondientes depósitos de fermentación del vino se lleva a cabo al final del proceso de la fermentación alcohólica.

5

3ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histaminas en vinos, según reivindicación 1ª, caracterizado porque la inoculación del producto obtenido en los correspondientes depósitos de fermentación del vino se lleva a cabo durante el proceso de la fermentación alcohólica, tras el proceso de inoculación de la cepa de

10 levadura.

4ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos, según reivindicación 1ª, caracterizado porque la producción del cultivo de cepas de *Oenococcus oeni* CECT 9749, CECT 9750 y CECT 9751, se lleva a cabo en un

15 medio a base de agua destilada, vino blanco ecológico, mosto blanco concentrado ecológico, zumo de tomate, extracto de levadura, ácido málico y Tween 80.

5ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos, según reivindicaciones 1ª y 3ª, caracterizado porque la inoculación del cultivo de las cepas

de *Oenococcus oeni* en los correspondientes depósitos de fermentación del vino, se lleva a cabo al menos 48 después del proceso de inoculación de la cepa de levadura.

- 5 6ª.- Procedimiento para reducir el contenido de histamina en vinos, según reivindicación 1ª, caracterizado porque la inoculación del cultivo de las cepas de *Oenococcus oeni* en los correspondientes depósitos de fermentación del vino, se lleva a cabo de forma directa sobre el sombrero del vino sin necesidad de homogeneización.

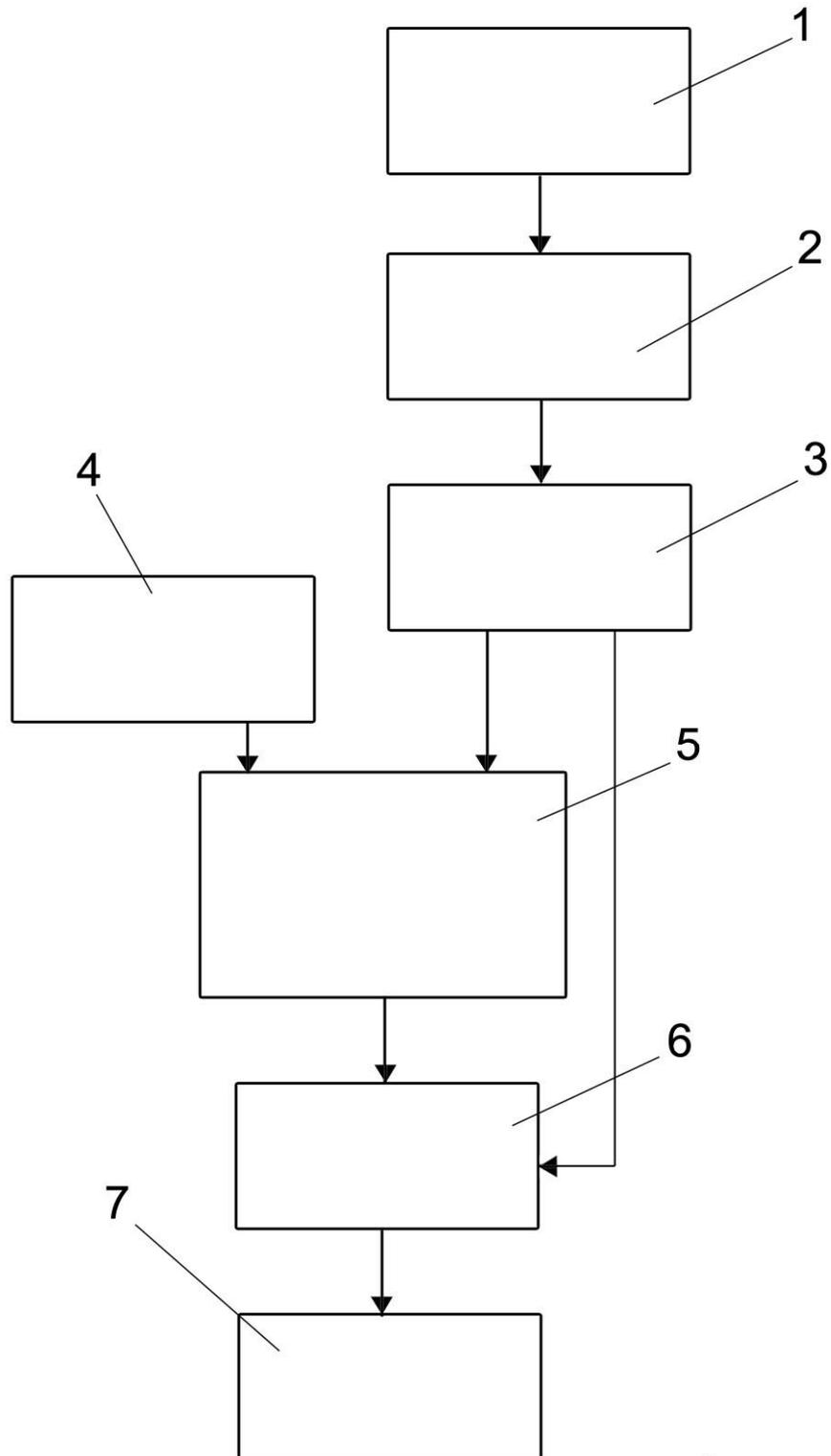


FIG. 1

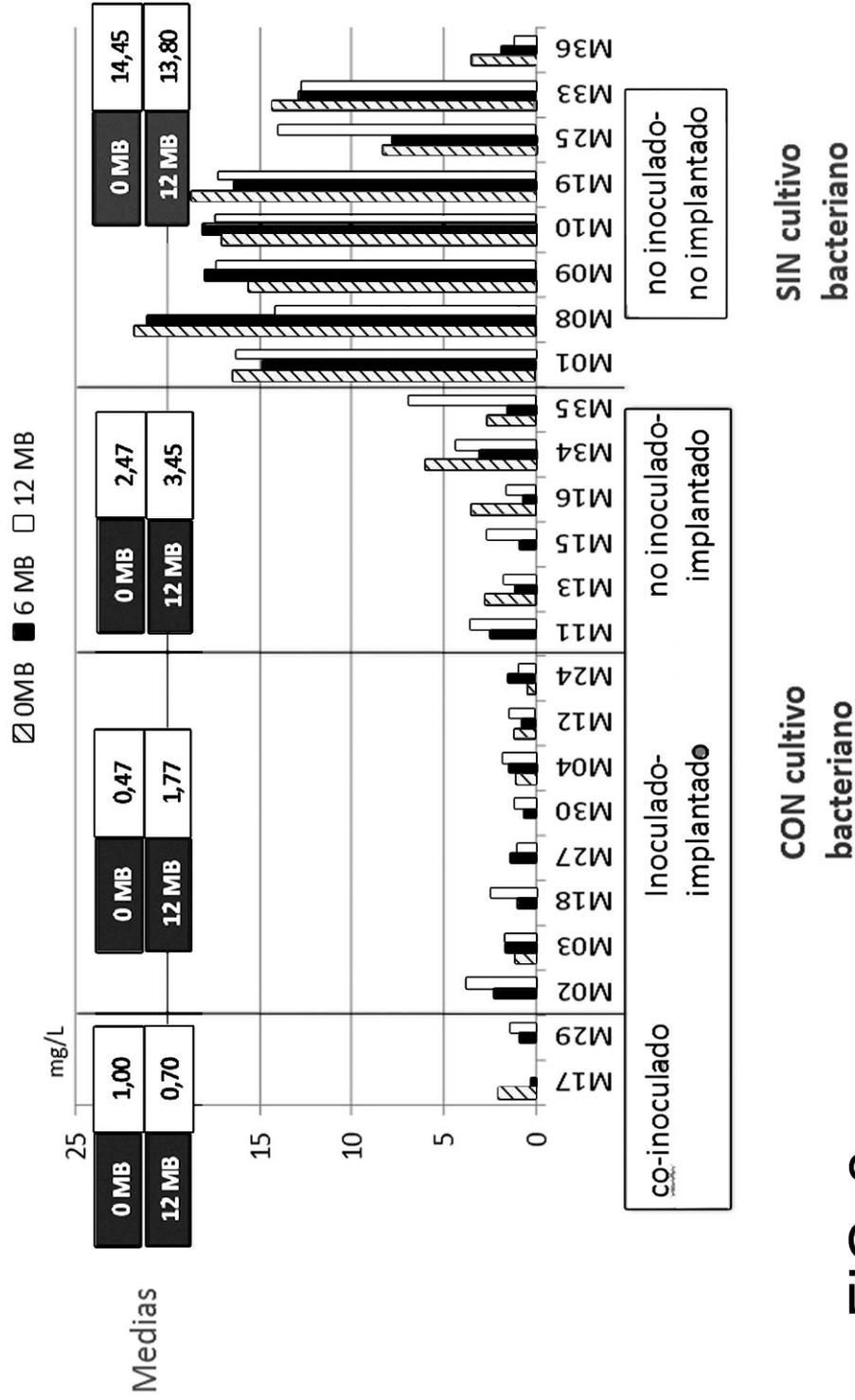


FIG. 2



- ②1 N.º solicitud: 201930003  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 03.01.2019  
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12G1/022** (2006.01)  
**C12N1/20** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MASQUÉ, M.C. et al. Coinoculation of yeasts and lactic acid bacteria for the organoleptic improvement of wines and for the reduction of biogenic amine production during the malolactic fermentation. Internet Journal of Viticulture and Oenology, 2008, vol. 9. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 29/03/2019] URL: <a href="https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto6243-01-1.pdf">https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto6243-01-1.pdf</a>	1-6
A	BERBEGAL C. et al. Lowering histamine formation in a red Ribera del Duero wine (Spain) by using an indigenous <i>O.oeni</i> strain as a malolactic starter. International Journal of Food Microbiology, 2016, vol. 244, ISSN 0168-1605, DOI: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.013. páginas 11- 18, Apartado 2.2.	1-6
A	BERBEGAL C. et al. A novel culture medium for <i>Oenococcus oeni</i> malolactic starter production. Food Science and Technology, 2015. vol. 64, Nº 1,ISSN 0023-6438(print) ISSN 1096-1127(electronic), DOI: doi:10.1016/j.lwt.2015.05.020, páginas 25-31, Tabla 2.	4
X	ES 2386713 A1 (UNIV CASTILLA LA MANCHA et al.) 28/08/2012, página 4, líneas 11-página 5, línea 22, página 6, líneas 30-página 7, línea 10, página 8, líneas 9-19.	1-6
X	ZAPPAROLI G et al. Bacterial Inoculation Strategies for the Achievement of Malolactic Fermentation in High-alcohol Wines. South African Journal of Enology and Viticulture, 2009, vol. 30 (1), ISSN 0253-939X. páginas 49-55, Tabla 2, discusión.	1-6
X	GUZZON et al. Together is better. Experience of simultaneous fermentation of yeast and bacteria as a possible strategy to prevent stuck fermentation in difficult wines. Wine Studies, 2015, vol. 4:4941, Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 29/03/2019] páginas 1-5 URL: <a href="https://www.pagepressjournals.org/index.php/wine/article/view/ws.2015.4941">https://www.pagepressjournals.org/index.php/wine/article/view/ws.2015.4941</a> figura 2, tabla 3.	1-6

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  
01.04.2019

Examinador  
A. I. Polo Diez

Página  
1/3



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201930003  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.01.2019  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12G1/022** (2006.01)  
**C12N1/20** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GAROFALO C et al. Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. Journal of Applied Microbiology, 2015, vol. 118 (6), ISSN 1364-5072(print) ISSN 1365-2672(electronic), DOI: doi:10.1111/jam.12789, páginas 1395-1408 discusión, tabla 4.	1-6
A	SMIT ANITA YOLANDI et al. Managing your wine fermentation to reduce the risk of biogenic amine formation. Frontiers in Microbiology, 2012, vol. 3, article No.: 76, ISSN 1664-302X(print) ISSN 1664-302X(electronic), DOI: doi:10.3389/fmicb.2012.00076, páginas 1-9. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 29/03/2019] <a href="https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00076/full">https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00076/full</a>	1-6

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**  
01.04.2019

**Examinador**  
A. I. Polo Diez

**Página**  
2/3

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

C12G, C12N

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, INTERNET, BIOSIS, CAPLUS, MEDLINE, FSTA, EMBASE, BD-TXTE