

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
24 de mayo de 2012 (24.05.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/066176 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12G 3/02 (2006.01) *C12R 1/84* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070793

(22) Fecha de presentación internacional:
18 de noviembre de 2011 (18.11.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031705
19 de noviembre de 2010 (19.11.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE [ES/ES]; Ctra. de Utrera, km. 1, Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación, Edificio Francisco de Miranda nº 9, E-41013 Sevilla (ES). **GRUPO HESPÉRIDES BIOTECH, S.L.** [ES/ES]; Ctra. Utrera km.1, (Universidad Pablo de Olavide), E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BARRERA GARCÍA, Juan Alberto** [ES/ES]; Grupo Herpérides Biotech, S.L., Ctra. Utrera km.1, (Universidad Pablo de Olavide), E-41013 Sevilla (ES). **CORDÓN TOLEDANO, Juan Diego** [ES/ES]; Grupo Herpérides Biotech, S.L., Ctra. Utrera km.1, (Universidad Pablo de Olavide), E-41013 Sevilla (ES). **CORONEL DOMÍNGUEZ, Antonio Jesús** [ES/ES]; Grupo Herpérides Biotech, S.L., Ctra. Utrera km.1, (Universidad Pablo de Olavide), E-41013 Sevilla (ES). **FERNÁNDEZ ZABALA, Cristóbal** [ES/ES]; Grupo Herpérides Biotech, S.L., Ctra. Utrera km.1, (Universidad Pablo de Olavide), E-41013 Sevilla (ES). **SANTOS OCAÑA, Carlos** [ES/ES]; Universidad Pablo De Olavide, Ctra. de Utrera, km. 1, Oficina de

Transferencia de Resultados de Investigación, Edificio Francisco de Miranda nº 9, E-41013 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16 D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con (una) indicación(es) relativa(s) a material biológico depositado en virtud de lo dispuesto en la Regla 13bis, aparte de la descripción (Reglas 13bis.4(d)(i) y 48.2(a)(viii))

(54) Title: *PICHIA KLUYVERI* STRAIN AND USES THEREOF

(54) Título : CEPA DE *PICHIA KLUYVERI* Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a *Pichia kluyveri* strain that can ferment the reducing sugars present in orange juice, to a method for growing said microorganism, to the use thereof in the production of a drink having a low alcohol content and optimum organoleptic properties for consumption, and to the product derived from fermentation using the *Pichia kluyveri* strain.

(57) Resumen: La invención se relaciona con una cepa de *Pichia kluyveri*, 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 kluyveri*.



WO 2012/066176 A1

CEPA DE *PICHIA KLUYVERI* Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCION

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 INVENCION

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 Tredick-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 *kluyveri* 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, entre 0,1% y 3,4% (v/v), típicamente de alrededor de un 2,5%. Un cultivo de dicho aislado de *P. kluyveri* fue depositado el día 12 de mayo de 2010 en la Colección
25 Española de Cultivos Tipo (CECT) con el 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, necesario en las primeras etapas de la fermentación, y, además, aporta una gran cantidad de nutrientes. Por otro lado, la capacidad de la cepa de levadura de la
30 invención de fermentar únicamente los azúcares reductores presentes en el zumo, da lugar a un producto final que contiene azúcares no reductores, por ejemplo, sacarosa, lo 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 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 una fermentación alcohólica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de crecimiento de 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 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 contiene una concentración de etanol comprendida entre 0,1% y 3,4% (v/v), obtenible mediante un método que comprende inocular dicho microorganismo en un medio de cultivo que 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 (CECT 13055) en diferentes medios, representando el tiempo de crecimiento en horas 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 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 (°Bx) 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, tales como glucosa y/o fructosa, mediante el proceso de fermentación alcohólica, en el que el microorganismo de la invención procesa dichos hidratos de carbono para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y moléculas de adenosín trifosfato (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 una 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 de fermentar glucosa y/o fructosa.

En una realización particular, el microorganismo de la invención, además de ser capaz de fermentar azúcares reductores, no tiene (carece de) la capacidad de fermentar azúcares no reductores. Tal como se observa en el Ejemplo 3, la cepa 4N187 de *P. kluyveri* (CECT 13055) es incapaz de fermentar azúcares no reductores, por ejemplo, sacarosa, 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” 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/o fructosa, se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, haciendo crecer dicho microorganismo en un medio que comprende dichos azúcares reductores (glucosa y/o fructosa) y comprobando al final de la fermentación si dichos azúcares reductores han desaparecido del medio o si la cantidad inicial de los mismos ha disminuido. Métodos adecuados para la determinación de azúcares reductores incluyen el método calorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G. L. 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 el método calorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

El microorganismo de la invención se puede cultivar en cualquier medio adecuado para levaduras. Como entenderá el experto en la materia, dicho medio de

cultivo comprende los nutrientes necesarios para permitir, bajo condiciones apropiadas (e.g., temperatura, etc.), el crecimiento de dicho microorganismo de la invención; el medio de cultivo puede encontrarse en estado sólido, semisólido y líquido. En una realización particular, dicho medio de cultivo es un medio rico con glucosa (YPD), un medio rico con etanol (YPE), un medio rico con glicerol (YPG), o cualquier otro medio de cultivo adecuado conocido por los técnicos en la materia. El microorganismo de la invención puede ser cultivado en cualquier medio de cultivo apropiado para el crecimiento de dicho microorganismo bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, a una temperatura comprendida, preferentemente, entre 15°C y 35°C, ventajosamente, en agitación, por ejemplo, entre 10 y 300 revoluciones por minuto (rpm).

Con el fin de obtener un cultivo biológicamente puro de un microorganismo de la invención, en una realización particular, dicho microorganismo se puede cultivar en un medio de cultivo apropiado para levaduras, por ejemplo, un medio rico con glucosa (YPD) [20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y 20 g de glucosa].

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro del microorganismo de la invención, en adelante “cultivo de la invención”. Dicho cultivo biológicamente puro de dicho microorganismo de la invención puede obtenerse por métodos convencionales tal como se ha mencionado previamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un medio de cultivo del microorganismo de la invención que comprende zumo de naranja, en adelante “medio de cultivo que comprende zumo de naranja”. El zumo (o jugo) de naranja es un zumo de frutas en forma de líquido obtenido al exprimir el interior de la naranjas (*Citrus sinensis*). 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 0,1% y 20% en volumen (v/v) de pulpa, dependiendo de la maquinaria utilizada para su extracción. El pH del zumo de naranja está comprendido entre 3 y 4, típicamente 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 del medio de cultivo que comprende zumo de naranja puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la

composición aproximada de dicho medio de cultivo que comprende zumo de naranja (de partida) comprende, preferentemente:

Sólidos solubles y ácidos orgánicos	11 ± 1 °Bx
pH	$3,5 \pm 0,5$
% 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	$0,8 \pm 0,2$ g ácido cítrico anhidro/100 ml

- 5 El experto en la materia entenderá que la composición concreta del zumo de naranja variará, entre otros factores, en función de la localización geográfica del cultivo de naranjas, la época del año y la variedad de naranja, etc., ya que todos son dependientes del grado de madurez de la fruta. A modo ilustrativo, no limitativo, la variedad de cítrico que se puede utilizar para producir el zumo de naranja utilizado
- 10 como medio de cultivo incluye las variedades navelina, navelate, salustiana, pomelo, naranja amarga, etc.

- El zumo de naranja a utilizar en el medio de cultivo que comprende zumo de naranja para el cultivo de un microorganismo de la invención puede tener un origen variado. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho zumo de naranja a utilizar en el medio
- 15 de cultivo que comprende zumo de naranja puede proceder de zumo de naranja fresco, zumo de naranja pasteurizado, zumo de naranja congelado, zumo de naranja concentrado, etc. En caso de que el zumo de naranja proceda de un zumo de naranja concentrado, se puede diluir mediante la adición de agua hasta alcanzar los valores deseados de los distintos parámetros considerados, y, si es necesario, se puede proceder
- 20 a su 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 microbiológicamente estable; para ello, dicho medio de cultivo que comprende zumo de naranja puede ser sometido a un

proceso térmico para reducir los agentes patógenos que pudiera contener, por ejemplo, a un proceso de pasteurización. En otra realización particular, si es necesario, se procede a la rectificación del medio de cultivo que comprende zumo de naranja, añadiendo azúcares y/o modificando el pH.

- 5 En una realización particular, dicho medio de cultivo que comprende zumo de naranja está compuesto total, o sustancialmente, por zumo de naranja. En otra realización particular, dicho medio de cultivo que comprende zumo de naranja comprende zumo de naranja en combinación con agua. En este último caso, la proporción agua:zumo de naranja, en volumen, puede variar dentro de un amplio
- 10 intervalo; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha proporción agua:zumo de naranja es de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 (v:v) e incluso mayor. Alternativamente, puede suceder que el agua se encuentre en mayor proporción que el zumo de naranja, por ejemplo, en una proporción agua:zumo de naranja de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 (v:v) e incluso mayor. En caso de que el medio de cultivo
- 15 que comprende zumo de naranja no sea un zumo de naranja puro o sustancialmente puro, puede ser necesaria la adición de azúcares reductores, tales como glucosa y/o fructosa, de manera que la fuente de carbono no resulte limitante. La cantidad de azúcares reductores a añadir, en ese caso, puede variar dentro de un amplio intervalo; en general, se puede añadir uno o más de dichos azúcares reductores hasta alcanzar una
- 20 concentración final comprendida entre 0,2% y 5% (p/v); en una realización particular, se añade glucosa y/o fructosa hasta alcanzar una concentración final de un 1% (p/v) aproximadamente.

- En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, o del cultivo de la invención, para llevar a cabo una fermentación alcohólica.
- 25 Tal como aquí se utiliza, el término “fermentación alcohólica” (también denominada fermentación del etanol o incluso fermentación etílica) se refiere, en general, a un proceso biológico de fermentación en ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos (en particular, en este caso, microorganismos de la invención) que procesan hidratos de carbono (e.g., glucosa y/o fructosa) para obtener como
- 30 productos finales etanol, CO₂ y ATP que, en general, consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. En una realización particular, el microorganismo de la invención, o un cultivo de la invención, se utiliza

para procesar, en ausencia de aire, uno o más azúcares reductores, por ejemplo, glucosa y/o fructosa.

Método de crecimiento del microorganismo de la invención

5 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, como por ejemplo, YPD, tal como se muestra en el Ejemplo 2 y en la Figura 1.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método de
10 crecimiento de un microorganismo de la invención, o de un cultivo de la invención, en adelante “primer método de la invención”, que comprende inocular dicho microorganismo o cultivo en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja.

El experto en la materia conoce ampliamente las técnicas de inoculación de una levadura (microorganismo de la invención) en un medio de cultivo.

15 Una vez inoculado el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, el primer método de la invención incluye, además, su cultivo para que tenga lugar el crecimiento del microorganismo de la invención. Las condiciones necesarias para el cultivo del microorganismo de la invención (*Pichia kluyveri*) son ampliamente conocidas y/o pueden ser determinadas fácilmente por un
20 experto en la materia. Ventajosamente, el microorganismo de la invención se cultiva a una temperatura comprendida entre 15°C y 35°C, preferentemente a unos 30°C aproximadamente. Asimismo, ventajosamente, el microorganismo de la invención se cultiva en agitación; aunque la agitación puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, dicho microorganismo de la invención se cultiva con una
25 agitación comprendida entre 10 y 300 rpm, preferentemente, entre 100 y 250 rpm, típicamente alrededor de 220 rpm aproximadamente.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende una etapa previa de inocular el microorganismo de la invención, en primer lugar, a un medio de cultivo apropiado, a pequeña escala y en pequeño volumen (preinóculo), y, una vez
30 alcanzada suficiente biomasa, transferir dicho microorganismo de la invención a un medio de cultivo que comprende zumo de naranja a mayor escala. Para ello, en general, se parte de un preinóculo puro del microorganismo de la invención que se cultiva en las

condiciones apropiadas, por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 15°C y 35°C, preferentemente, a 30°C aproximadamente, en agitación, con una agitación comprendida entre 10 y 300 rpm, preferentemente entre 100 y 250 rpm, ventajosamente alrededor de 220 rpm. Aunque prácticamente cualquier medio de cultivo adecuado para el crecimiento de la invención puede ser utilizado como medio de cultivo para el preinóculo, en una realización particular, dicho medio de cultivo utilizado para el preinóculo es YPD (2% de peptona, 2% de glucosa y 1% de extracto de levadura) o YPG (2% de peptona, 2% de glicerol y 1% de extracto de levadura). Alternativamente, en otra realización particular, dicho preinóculo se puede inocular y cultivar directamente en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, de manera que se reduzca la fase de adaptación al medio de cultivo final. Asimismo, en otra realización particular, dicho preinóculo se puede inocular y cultivar en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja diluido al 25% en agua. En una realización particular y preferida, el preinóculo se cultiva en un medio de cultivo que comprende aproximadamente 25% (v/v) de zumo de naranja, aproximadamente 75% (v/v) de agua, y aproximadamente 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa y/o fructosa).

Posteriormente, tras haber conseguido suficiente biomasa en el preinóculo y que dicho preinóculo se encuentre en fase exponencial, se transfiere al medio de cultivo que comprende zumo de naranja definitivo para su cultivo a mayor escala. El preinóculo se puede añadir directamente al medio de cultivo que comprende zumo de naranja definitivo o, alternativamente, en ocasiones, puede ser necesario someter previamente dicho preinóculo a una centrifugación, tal como sucede, por ejemplo cuando el preinóculo se ha crecido en un medio de cultivo diferente al medio de cultivo que comprende zumo de naranja, tal como YPD, YPE o YPG; en este caso, resulta conveniente someter el producto a centrifugación y a diferentes lavados, con el fin de eliminar la mayor parte de dicho medio de cultivo (YPD, YPE o YPG).

En una realización particular, la carga de inoculación del cultivo está comprendida entre 0,05 y 0,2 unidades de absorbancia por mililitro (UA/ml) medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. En una realización preferida, dicho valor de absorbancia es de 0,1 UA/ml, que corresponde a 1×10^5 células/ml aproximadamente. Esta relación se hace efectiva si el preinóculo se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

Las condiciones concretas de cultivo de un microorganismo de la invención (*P. kluyveri*) en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja son conocidas o las puede determinar fácilmente un experto en la materia. Preferiblemente, el microorganismo de la invención se cultiva a una temperatura comprendida entre 15°C y 35°C, preferentemente, a 30°C aproximadamente, en agitación, con una agitación comprendida entre 10 y 300 rpm, preferentemente entre 100 y 250 rpm, ventajosamente alrededor de 220 rpm.

Métodos para determinar si el microorganismo de la invención está creciendo adecuadamente en el medio de cultivo que comprende zumo de naranja incluyen aquellos métodos 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 determinar la biomasa, y, por tanto, conocer si el método de crecimiento ha funcionado, el experto en la materia conoce diferentes métodos pertenecientes al estado de la técnica, tales 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 de un microorganismo de la invención, o de un 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. La puesta en práctica de dicho segundo método de la invención comprende la realización de varias etapas, las cuales se irán describiendo a continuación.

En una primera etapa [etapa (i)] el segundo método de la invención comprende la inoculación de un microorganismo de la invención, o de un cultivo de la invención, en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja. Dicha etapa (i) es común al primer método de la invención, por lo que sus características relativas al microorganismo (o cultivo), medio de cultivo que comprende zumo de naranja e inoculación se incorporan aquí por referencia en todo lo que sea aplicable al segundo método de la invención. Brevemente, en una realización particular, se crece, en primer lugar, un preinóculo de un microorganismo de la invención en un medio de cultivo

apropiado, a una temperatura comprendida entre 15°C y 35°C, preferiblemente a 30°C aproximadamente, opcionalmente en agitación, en un volumen pequeño para obtener biomasa suficiente, y, posteriormente, se transfiere a un volumen mayor de medio de cultivo. En una realización particular, dicho medio de cultivo es un medio de cultivo
5 que comprende zumo de naranja. En otra realización particular, dicho preinóculo se cultiva en un medio de cultivo que comprende aproximadamente 25% (v/v) de zumo de naranja, aproximadamente 75% (v/v) de agua y 1% (p/v) de una fuente de carbono (glucosa y/o fructosa).

Una vez que se ha obtenido biomasa suficiente a partir del crecimiento del
10 preinóculo, el cultivo del preinóculo se transfiere a un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, en un recipiente adecuado para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica [etapa (ii)]. El preinóculo se puede añadir directamente al medio de cultivo que comprende zumo de naranja definitivo o bien, en ocasiones, puede ser necesario someterlo previamente a un tratamiento previo, por ejemplo, centrifugación. En general,
15 cuando el preinóculo se ha crecido en un medio de cultivo diferente a un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, tal como YPD, YPE o YPG, es conveniente someter el preinóculo a un tratamiento que normalmente comprende una centrifugación y diferentes lavados, con el fin de eliminar la mayor parte de dicho medio. En una realización particular, la carga de inoculación del cultivo está comprendida entre 0,05 y
20 0,2 UA/ml, determinado por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. En una realización preferida, dicho valor de absorbancia es de 0,1 UA/ml, que corresponde a aproximadamente 1×10^5 células/ml. Esta relación se hace efectiva si el preinóculo se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

El recipiente que comprende el medio de cultivo que comprende zumo de
25 naranja al que se le ha transferido el cultivo del preinóculo es un recipiente adecuado para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica. En una realización particular, dicho recipiente en el que se lleva a cabo la fermentación alcohólica es un tanque, una botella o un matraz, y el cultivo se mantiene en condiciones anaeróbicas, o, alternativamente, con aire, preferentemente estéril, en el cuello de cabeza. En una realización particular,
30 dicho recipiente está configurado de manera que se permite la salida del gas producido, pero no la entrada de aire, mientras que, en otra realización particular, dicho recipiente está configurado de manera que se permite la entrada de aire estéril. En una realización

preferida, el cultivo se agita de manera puntual o bien de manera continua o bien se permite la recirculación de la parte inferior a la parte superior del caldo de fermentación (cultivo), o bien se incorpora una corriente de aire estéril, con el fin de homogeneizar el cultivo, lo que posibilita, entre otras cosas, aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes. Debido a la presencia de pulpa, durante la sedimentación se arrastran los microorganismos de la invención y se experimenta un gradiente de concentración de dichos microorganismos encontrándose la mayor concentración de éstos en la parte inferior del recipiente (e.g., fermentador). Por tanto, la homogenización del caldo de fermentación (cultivo) por métodos convencionales, tales como métodos que limitan la sedimentación mediante, por ejemplo, técnicas que aporten movimiento al caldo de fermentación o cultivo (e.g., agitación, recirculación, incorporación de una corriente de aire estéril, etc.), permite que el microorganismo de la invención fermente en las regiones del recipiente (e.g., fermentador) en las que se encuentra la mayor cantidad de pulpa, siendo en la fermentación de zumos con mayor cantidad de pulpa donde se aumenta el carácter amargo, es decir, en general, cuanto mayor es el porcentaje de pulpa, mayor es el amargor que se alcanza tras la fermentación. En una realización particular, dicho movimiento puede realizarse mediante agitación, por ejemplo, agitación continua (e.g., mediante el empleo de palas en el interior del fermentador, agitación orbital, etc.), o por recirculación de la fracción inferior del fermentador para su deposición en la parte superior, o mediante incorporación de aire estéril, etc. En una realización particular y preferida, la agitación, durante el proceso de fermentación alcohólica, se realiza de forma constante, dentro de un intervalo que puede variar ampliamente, por ejemplo, a modo ilustrativo, no limitativo, entre 60 y 150 rpm, preferentemente 100 rpm, para conseguir una correcta homogenización del contenido. La agitación a lo largo de la fermentación alcohólica proporciona, entre otras ventajas, la homogenización del contenido físico-químico y microbiológico en el fermentador. Ventajosamente, se debe realizar con la mínima aireación posible 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 del mismo. Los efectos que produce el oxígeno en contacto con la levadura implican un 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; 5 dichas levaduras pueden ser inoculadas secuencialmente o bien al mismo tiempo que el microorganismo de la invención. Dichas levaduras pueden ser levaduras conocidas en el estado de la técnica capaces de fermentar cualquier azúcar, tanto azúcares reductores como no reductores, y capaces de generar un producto final de baja graduación alcohólica y buenas propiedades organolépticas.

10 El tiempo que dura la fermentación alcohólica puede ser determinado por un experto en la materia y es directamente proporcional a la concentración de azúcares fermentables por el microorganismo de la invención presente en el medio e inversamente proporcional a la temperatura. En una realización particular, la temperatura adecuada para llevar a cabo la fermentación alcohólica mediante un 15 microorganismo de la invención está comprendido entre 15°C y 35°C, preferentemente entre 20°C y 30°C. Bajo estas condiciones, se puede mantener la fermentación alcohólica durante un periodo de tiempo que puede variar dentro de un amplio intervalo, generalmente del orden de horas a días; a modo ilustrativo, no limitativo, en las condiciones indicadas, se puede mantener la fermentación alcohólica durante un periodo 20 de tiempo comprendido entre 1 hora y 20 días, típicamente entre 12 horas y 10 días, habitualmente entre 1 día y 5 días, por ejemplo, durante 1, 2, 3, 4 ó 5 días. Una vez que se produce el agotamiento parcial o total de los azúcares reductores presentes en el medio de cultivo y se ha producido etanol y, opcionalmente, otros compuestos aromatizantes, la fermentación alcohólica se da por terminada. La concentración de 25 etanol presente en el producto final fermentado puede variar dentro de un amplio intervalo, en función, entre otros factores, de la concentración de azúcares reductores presentes en el zumo de naranja de partida presente en el medio de cultivo; no obstante, en una realización particular, la concentración de etanol presente en el producto final fermentado está comprendida entre 0,1% y 3,4% (v/v). Debido a que se suele 30 experimentar una fermentación parcial de los azúcares, en general, no resulta necesaria la adición de sacarosa u otros edulcorantes al producto final.

Una vez terminado el proceso de fermentación alcohólica, el producto resultante de la etapa (ii) [producto fermentado] se puede someter, opcionalmente, a un tratamiento para retirar o eliminar, total o parcialmente, los sólidos en suspensión eventualmente presentes en dicho producto [etapa (iii)]. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de sólidos en suspensión eventualmente presentes en el producto resultante de la etapa (ii) incluyen microorganismos de la invención (y, opcionalmente levaduras coadyuvantes que hubieran podido ser añadidas), restos de pulpa [etapa (iii)]. La retirada o eliminación, total o parcial, de dichos sólidos en suspensión puede llevarse a cabo por cualquier técnica convencional conocida por los técnicos en la materia. En una realización particular, dicha retirada o eliminación, parcial o total, de dichos sólidos en suspensión se puede llevar a cabo mediante la aplicación, de forma individual o combinada, de los siguientes tratamientos:

(a) Centrifugación, con el fin de provocar la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad y retener el sobrenadante; en una realización particular, dicha centrifugación es una centrifugación industrial cuyas condiciones pueden ser seleccionadas por un experto en la materia para optimizar el resultado y pueden variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 1.000 g y 10.000 g, típicamente alrededor de 5.000 g aproximadamente, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 30 minutos; en otra realización particular, dicha centrifugación se lleva a cabo a 3.000 g durante 5 minutos aproximadamente.

(b) Decantación y descarte del 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 método, no es necesaria una maduración posterior. Ventajosamente, la decantación se realiza en frío, típicamente a una temperatura comprendida entre 1°C y 8°C, preferiblemente a 4°C aproximadamente, durante un periodo de tiempo variable, normalmente del orden de horas a días, por ejemplo, comprendido entre 1 hora y 15 días); no obstante, en una realización particular, dicha decantación se realiza a 4°C aproximadamente, durante un periodo de tiempo comprendido entre 12 horas y 10 días.

(c) Clarificación con una sustancia con propiedades clarificantes, tal como bentonita, gelatina, o cualquier otro compuesto apropiado, tal como un compuesto

floculante apropiado, y descarte del precipitado. Este método puede ser considerado como una modificación del método de decantación en el que se adicionan compuestos floculantes, capaces de unirse a los sólidos incrementando su densidad y facilitando su sedimentación.

- 5 (d) Filtración tangencial con filtros de 0,2-0,45 μm , con una presión de aspiración a 2 bares (2×10^5 Pa) y presión de salida a 0,5 bares ($0,5 \times 10^5$ Pa). Mediante este proceso se recupera el efluente. La filtración tangencial se caracteriza por una circulación rápida del líquido tangencialmente a una membrana o filtro. De este modo, al tiempo que se efectúa la filtración, se autolimpia la membrana, lo que
- 10 permite trabajar en continuo con características de funcionamiento estables (composición, caudal, etc.). El permeado retenido se puede pasteurizar, con lo que se 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,
- 15 se mezclan el efluente con el permeado, obteniéndose 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 CO_2 para la carbonatación, debido a que las pectinas mejoran la estabilidad.

- 20 Si se llevan a cabo los tratamientos (a), (b) y/o (c) arriba mencionados para la retirada o eliminación, total o parcial, de sólidos en suspensión, resulta ventajoso someter el producto resultante a un tratamiento de pasteurización posterior para eliminar la carga microbiológica. Sin embargo, el tratamiento (d), filtración tangencial con filtros de 0,2-0,45 μm , también elimina microorganismos, por lo que el producto final ya
- 25 estaría esterilizado y no sería necesaria la etapa de pasteurización posterior. En una realización preferida, se realiza el tratamiento de decantación (b) y, a continuación, una pasteurización. La pasteurización consiste en un proceso térmico realizado sobre productos que comprenden una fase líquida, con el fin de reducir los agentes patógenos que puedan contener. Las condiciones de la pasteurización pueden variar dentro de un
- 30 cierto intervalo; así, en una realización particular, dicha pasteurización se lleva a cabo mediante un calentamiento rápido a una temperatura comprendida entre 70°C y 80°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 segundos y 120 segundos, seguido

de un enfriamiento “flash”; a modo ilustrativo, no limitativo, en una realización concreta, dicha pasteurización se lleva a cabo mediante un calentamiento rápido a una temperatura comprendida entre 78°C y 80°C, durante aproximadamente 30 segundos, seguido de un enfriamiento “flash”, o, alternativamente, mediante un calentamiento
5 rápido a 70°C-75°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 15 segundos y 30 segundos, seguido de un enfriamiento “flash”.

Una vez retirados o eliminados, total o parcialmente, los sólidos, se puede someter el producto obtenido en la etapa (iii) a un tratamiento de maduración [etapa (iv)], en el que se conserva el producto fermentado en frío, es decir, a una temperatura
10 comprendida entre 1°C y 8°C, típicamente entre 2°C y 6°C, por ejemplo, alrededor de 4°C aproximadamente, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 10 días, con el fin de eliminar determinados compuestos volátiles y sólidos decantables a dicha temperatura. Este tratamiento tiene como finalidad eliminar los sólidos que formarían precipitados a la temperatura de ingesta de la bebida. En caso de que se desee, se
15 pueden añadir diferentes compuestos que aporten diferentes propiedades y/o características, tal como se menciona más adelante.

El fermento o producto fermentado madurado obtenido tras el tratamiento de maduración previo [etapa (iv)], si se desea, puede ser sometido a un proceso de aditivación y homogeneización [etapa (v)] para conseguir la estabilidad física deseada
20 (suspensión de partículas que tienden a precipitar) y evitar, reducir o minimizar los cambios de color por oxidación en el producto final durante su vida útil, sin provocar modificaciones importantes en las características organolépticas (e.g., sabor, viscosidad, etc.)

La estabilidad física del producto obtenido en la etapa (iv) puede conseguirse
25 mediante la adición de un estabilizante físico, apto para uso alimentario, que aporte estabilidad física al producto final limitando la sedimentación de los sólidos eventualmente presentes en dicho producto final; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos estabilizantes físicos, aptos para uso alimentario, incluyen gomas, por ejemplo, goma gelana (E-418), pectinas (E-440), etc. En general, estos aditivos
30 persiguen que no se formen posos en el producto final por precipitación de los sólidos (e.g., restos de pulpa, etc.). La concentración de estabilizante físico en el producto obtenido en la etapa (iv) o en el producto final, en caso de que se añada, puede variar

dentro de un amplio intervalo, generalmente entre 0,01% y 1% (p/v), típicamente alrededor de 0,4% (p/v).

Asimismo, el oscurecimiento o pardeamiento del producto obtenido en la etapa (iv), o del producto opcionalmente estabilizado físicamente como se ha mencionado
5 previamente, o del producto final puede ser evitado, reducido o minimizado, si se desea, mediante la adición de un antioxidante apropiado, tal como un antioxidante de uso alimentario; prácticamente cualquier antioxidante alimentario que permita evitar, reducir o minimizar dicho oscurecimiento o pardeamiento puede ser utilizado en la
10 puesta en práctica de esta invención; no obstante, en una realización particular, dicho antioxidante se selecciona entre ácido ascórbico, ácido cítrico y sus sales, por ejemplo, citrato sódico, citrato cálcico, etc., ácido tartárico, etc., y sus mezclas. En una realización concreta, dicho antioxidante es ácido ascórbico ya que se encuentra de forma natural en el zumo de naranja. La concentración de antioxidante, en caso de que se añada al menos un antioxidante de uso alimentario para evitar, reducir o minimizar el
15 oscurecimiento o pardeamiento del producto obtenido en la etapa (iv), o del producto opcionalmente estabilizado físicamente, o del producto final, presente en dicho(s) producto(s), puede variar dentro de un amplio intervalo, generalmente entre 0,01% y 2% (p/v), típicamente alrededor de 0,1% (p/v).

Opcionalmente, si se desea, el producto aditivado resultante puede ser sometido
20 a un proceso de agitación para favorecer la homogeneización posterior. En una realización particular, dicha homogeneización se lleva a cabo entre 100 bares (100×10^5 Pa) y 500 bares (250×10^5 Pa), preferentemente a 250 bares (250×10^5 Pa) aproximadamente, para conseguir una correcta dispersión e hidratación de los aditivos incorporados.

25 El producto aditivado y homogeneizado obtenido en la etapa (v) se somete a un tratamiento térmico [etapa (vi)] moderadamente suave, típicamente a una temperatura igual o inferior a 100°C, durante un corto periodo de tiempo, típicamente del orden de segundos, por ejemplo, entre 5 y 120 segundos, normalmente entre 10 y 45 segundos, preferentemente entre 15 y 30 segundos, con el fin de reducir la población microbiana
30 presente en la misma, y, con ello, conseguir la estabilidad microbiológica en el producto final para poder conservarlo a temperatura ambiente. En una realización particular, el producto aditivado y homogeneizado obtenido en la etapa (v) se somete a un

tratamiento térmico (e.g., pasteurización), con una temperatura de mantenimiento comprendida entre 70°C y 80°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 120 segundos, y posterior enfriamiento rápido a temperatura ambiente, ventajosamente a una temperatura comprendida entre 78°C y 80°C, durante aproximadamente 30 segundos, seguido de un enfriamiento rápido hasta alcanzar 20°C aproximadamente. Tras este tratamiento, el valor de letalidad promedio calculado es de 16.

Finalmente, si se desea, el producto aditivado y homogeneizado obtenido en la etapa (v), antes o después del tratamiento térmico de la etapa (vi), puede ser sometido a tratamiento de gasificación o carbonatación [etapa (vii)], que consiste en la adición de anhídrido carbónico hasta alcanzar en equilibrio una presión comprendida entre 0,1 y 2,5 bares ($0,1-2,5 \times 10^5$ Pa), preferentemente de 0,44 bares ($0,44 \times 10^5$ Pa). En una realización particular, este tratamiento se realiza a una temperatura comprendida entre 1°C y 20°C, preferentemente entre 2°C y 8°C, habitualmente a 4°C aproximadamente, en un recipiente específico para la gasificación. Con esta presión se alcanza preferentemente una relación de 2 volúmenes de CO₂ 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 CO₂ hasta alcanzar la presión de alrededor de 0,44 bares ($0,44 \times 10^5$ Pa). 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. Alternativamente, la carbonatación se puede realizar mediante adición de hielo seco (dióxido de carbónico sólido), preferiblemente en una concentración de 1 a 20, preferentemente de 2 a 10, más preferentemente de aproximadamente 6 g de hielo seco/litro de producto.

En el caso de que el producto final (que puede estar carbonatado o no carbonatado) se esterilice, dicho producto se puede conservar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo prolongado, del orden 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 otro aspecto, la invención se relaciona con un producto derivado del zumo de naranja que presenta una
5 concentración de etanol comprendida entre 0,1% y 3,4% (v/v), producido mediante el segundo método de la invención. Preferiblemente la concentración de etanol final en dicho producto derivado del zumo de naranja proporcionado por la invención es de 2,5%. En una realización particular, se emplea un zumo de naranja con una concentración de 7% a 15% (v/v) de pulpa, cuyas características finales del producto
10 son adecuadas para su consumo, ya que no es demasiado amargo.

El término “producto derivado del zumo de naranja”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un producto generado a partir de la fermentación alcohólica de zumo de naranja por parte de un microorganismo de la invención, que presenta una concentración de etanol comprendida entre 0,1% y 3,4% (v/v). En una realización
15 particular, dicho producto comprende azúcares no reductores, tales como sacarosa, a una concentración de 50 g/l aproximadamente, por lo que no es necesario añadir edulcorantes.

Adicionalmente, se pueden añadir a dicho producto compuestos adicionales, tales como aromatizantes, acidulantes, colorantes, conservantes, antioxidantes,
20 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, y cualquiera de sus combinaciones. Compuestos adecuados para la adición en el producto final incluyen, aunque no se limitan, a taurina, cafeína, teofilina, pectina, gomas, carboximetilcelulosa (CMC), carragenanos, almidón
25 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.

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

Sólidos solubles y ácidos orgánicos	Inicial hasta 7 °Bx
pH	3,5 ± 0,5
% pulpa	Depende del tratamiento post-fermentativo
Azúcares Totales	30 - 90 g/l
Reductores	Hasta 30 g/l
Glucosa	Hasta 15 g/l
Fructosa	Hasta 15 g/l
No reductores	30 - 60 g/l
Acidez total	0,8 ± 0,2 g ácido cítrico anhidro/100ml
Etanol	0,1-3,4% v/v

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

Compuesto	Concentración media (mg/l)
Acetaldehído	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)

15

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Fruta

Para la búsqueda de levaduras del entorno cítrico, se tomaron muestras de
5 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
10 que limitase el espontáneo desarrollo de la microbiota del entorno.

Se tomaron tres tipos de muestras:

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

Medios de cultivo

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
20 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
a autoclavado para su esterilización. Se dosificó en cada placa petri 20 ml del medio
anterior en condiciones de esterilidad.

25

Cultivo de las muestras en las placas

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

- 30 - 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

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.

- 5 - 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 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.
- 10 - 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.
- 15

II. RESULTADOS

Identificación de las cepas de levaduras

- 20 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.

- 25 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.

- 30 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

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
5 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
10 ofrecían muy buen perfil organoléptico. Dichas cepas de levadura se enviaron a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) para su identificación molecular. El informe indicó que ambas levaduras pertenecían a la misma especie (*Pichia kluyveri*).

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
15 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.

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
20 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 incluyeron el crecimiento en distintos medios conteniendo cada uno de ellos fuentes de nitrógeno o carbono distintas, medios enriquecidos, medios con componentes para impedir el crecimiento de otros microorganismos (metabisulfito potásico), etc.

25

Análisis taxonómico de *Pichia kluyveri*

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
30 alcoholes.

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

Asimilación			
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	-	α -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.

FERMENTACIÓN	<i>P. kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>
Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	-
Maltosa	-
Lactosa	-
Rafinosa	-
Trehalosa	-
D-glucitol	-
D-glucitol	-
REACCIONES DE ASIMILACIÓN Y OTRAS CARACTERÍSTICAS	<i>P. kluyveri</i> var. <i>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	-
α -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

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

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de cultivo

10 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.

15 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 20 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 25 intervalos para considerar la materia prima adecuada para la fermentación, se describen a continuación:

Sólidos solubles y ácidos orgánicos	11 ± 1 °Bx
pH	3,5 ± 0,5
% pulpa	7-15% 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/ 100 ml

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.

Los grados Brix (°Bx) se midieron por refractometría empleando un refractómetro portátil, con una escala de 0 hasta 32 °Bx. 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.

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.

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.

5 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 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 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 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 inferior del fermentador para su deposición en la parte superior. La agitación durante el proceso de fermentación se realizó de forma constante a 100 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 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 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 dehidrogenasa (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.

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

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

- (1) Centrifugación de 5 minutos a 3.000 g y eliminación del precipitado.
- (2) Decantación a 4°C durante 1 a 10 días y eliminación del precipitado para eliminar los sólidos sedimentados.
- (3) Clarificación con bentonita para incrementar la densidad de los sólidos en suspensión y facilitar su sedimentación y eliminación del precipitado.

(4) Filtración tangencial de 0,2-0,45 μm , 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.

(5) Pasteurización mediante tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 78°C y 80°C, durante diferentes tiempos, entre 10 segundos y 5 minutos.

- 5 (6) Aditivación mediante adición de goma gelana (E-418) y/o pectinas (E-440), a diferentes concentraciones, entre 0,1% y 1% (p/v), para mejorar la estabilidad física del producto final, limitando la separación de fases y/o la oxidación.

Se observó que solo los tratamientos de filtración tangencial (4) y pasteurización (5), aportaban estabilidad microbiológica. El resto de tratamientos post-fermentativos
10 no pueden utilizarse como tratamientos únicos aunque sí pueden utilizarse en combinación con otros tratamientos.

Como tratamientos post-fermentativos más idóneos, se concluyó que la decantación seguida de la aditivación y una pasteurización eran los tratamientos más óptimos, debido a que aportaban estabilidad física y microbiológica al producto final sin
15 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.

20 Con la aditivación se consiguió la estabilidad física del producto.

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
25 en mantener una meseta de 30 segundos a una temperatura comprendida entre 78°C y 80°C seguido de un enfriamiento “flash”.

Carbonatación

El proceso se llevó a cabo a 4°C y en un recipiente específico para la
30 gasificación. Consistió en la adición de anhídrido carbónico hasta alcanzar en equilibrio una presión específica de 0,44 bares ($0,44 \times 10^5 \text{ Pa}$). Con esta presión se alcanzó una relación de 2 volúmenes de CO_2 por cada volumen de bebida. El procedimiento

consistió en añadir el CO₂ y esperar a que se equilibrara el intercambio gaseoso entre las fases (líquido-gas) y si era necesario, se añadía más CO₂ hasta alcanzar la presión de 0,44 bares (0,44 x 10⁵ Pa). Para una carbonatación más eficiente, se dejó carbonatando 24 horas a 4°C, con el mayor área de intercambio posible.

- 5 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.

II. RESULTADOS

- 10 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
15 pronunciada, pero ligeramente más retrasada en el tiempo que YPD y el medio con un 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.

- Aquellos medios en los que se experimenta antes la fase exponencial son el
20 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.

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
25 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
30 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.

El producto final tras la fermentación presenta las siguientes características:

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

5

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

Compuesto	Concentración media (mg/l)
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

10 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 (°Bx) 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 (°Bx), 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 °Bx y tras cuatro días de fermentación dicho valor estaba alrededor de 7 °Bx.

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.

25

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:

- 30 - 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 (100 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.

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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*.

25

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
- 30 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.

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.

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.

- 5 Las cepas 4N187 y 4N179 de *P. kluyveri* son las cepas que mejores propiedades 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
- 10 para su consumo. Asimismo, en el producto final obtenido a partir de *P. fermentans* es 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 de un microorganismo según la reivindicación 1.
- 10 3. Un medio de cultivo que comprende zumo de naranja.
4. 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. Medio de cultivo según la reivindicación 4, en el que la fuente de carbono se selecciona entre glucosa, fructosa y sus mezclas.
- 15 6. Uso de un microorganismo según la reivindicación 1, o de un cultivo según la reivindicación 2, para llevar a cabo una fermentación alcohólica.
7. Un método de crecimiento de un microorganismo según la reivindicación 1, o de un cultivo según la reivindicación 2, que comprende inocular dicho microorganismo en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja.
- 20 8. Un método para la obtención de un producto derivado del zumo de naranja que comprende la inoculación de un microorganismo según la reivindicación 1 o de un cultivo según la reivindicación 2, en un medio de cultivo que comprende zumo de naranja, bajo condiciones que permitan la fermentación de los azúcares reductores presentes en el zumo de naranja.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, en el que la fermentación se realiza a una temperatura comprendida entre 15°C y 35°C.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la fermentación se realiza durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 hora y 20 días.
- 30 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la fermentación se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 5 días.

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

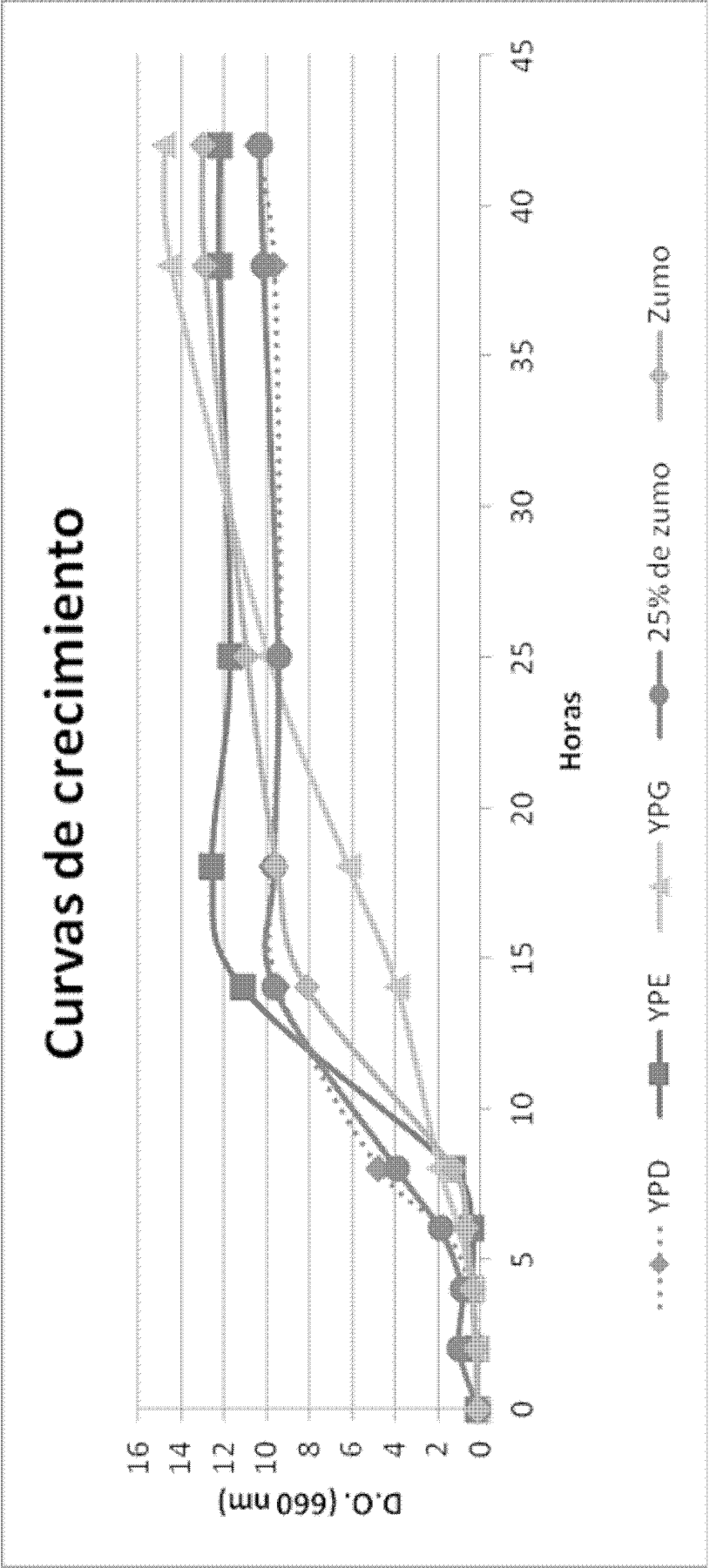


FIGURA 1

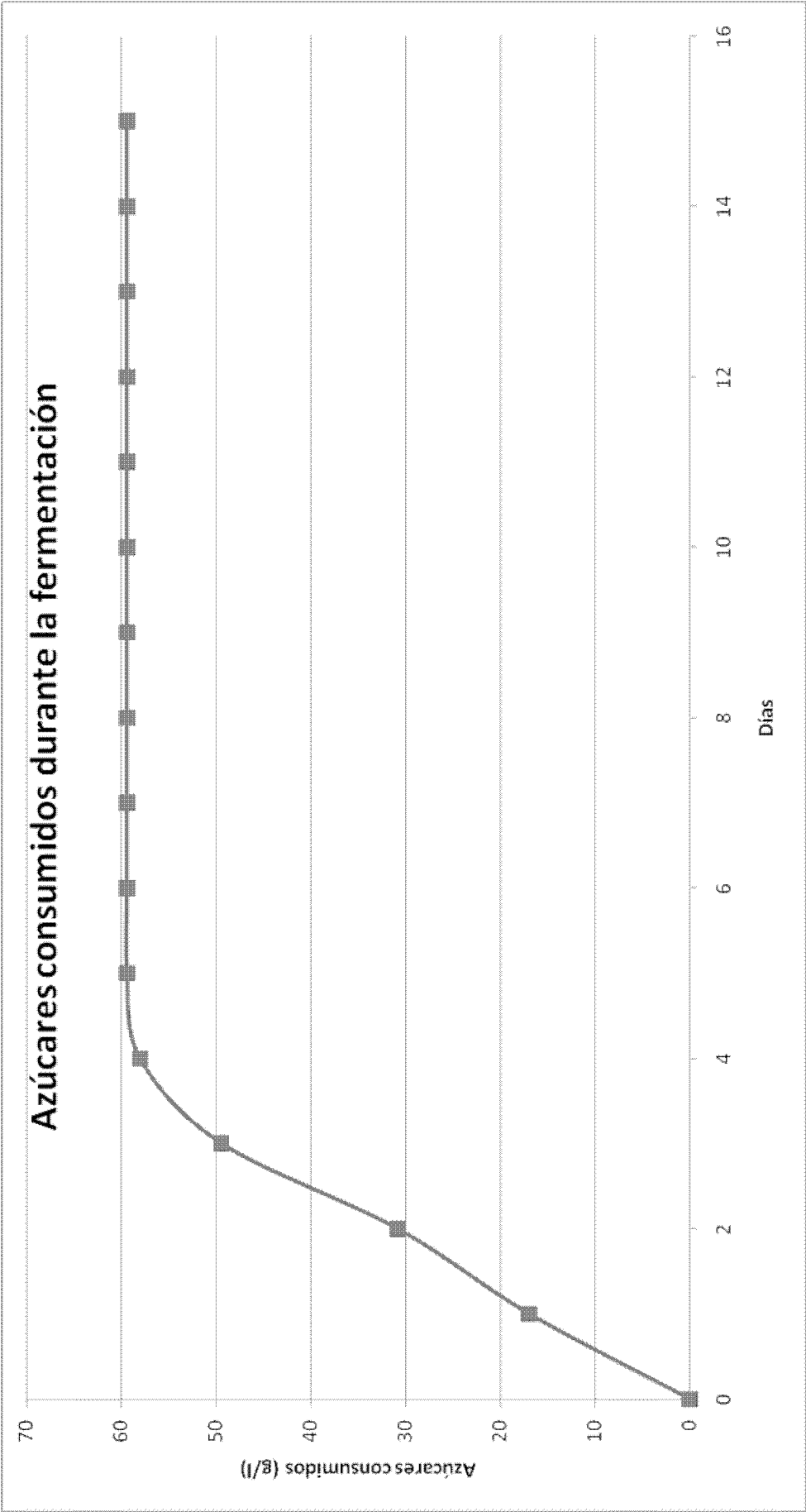


FIGURA 2

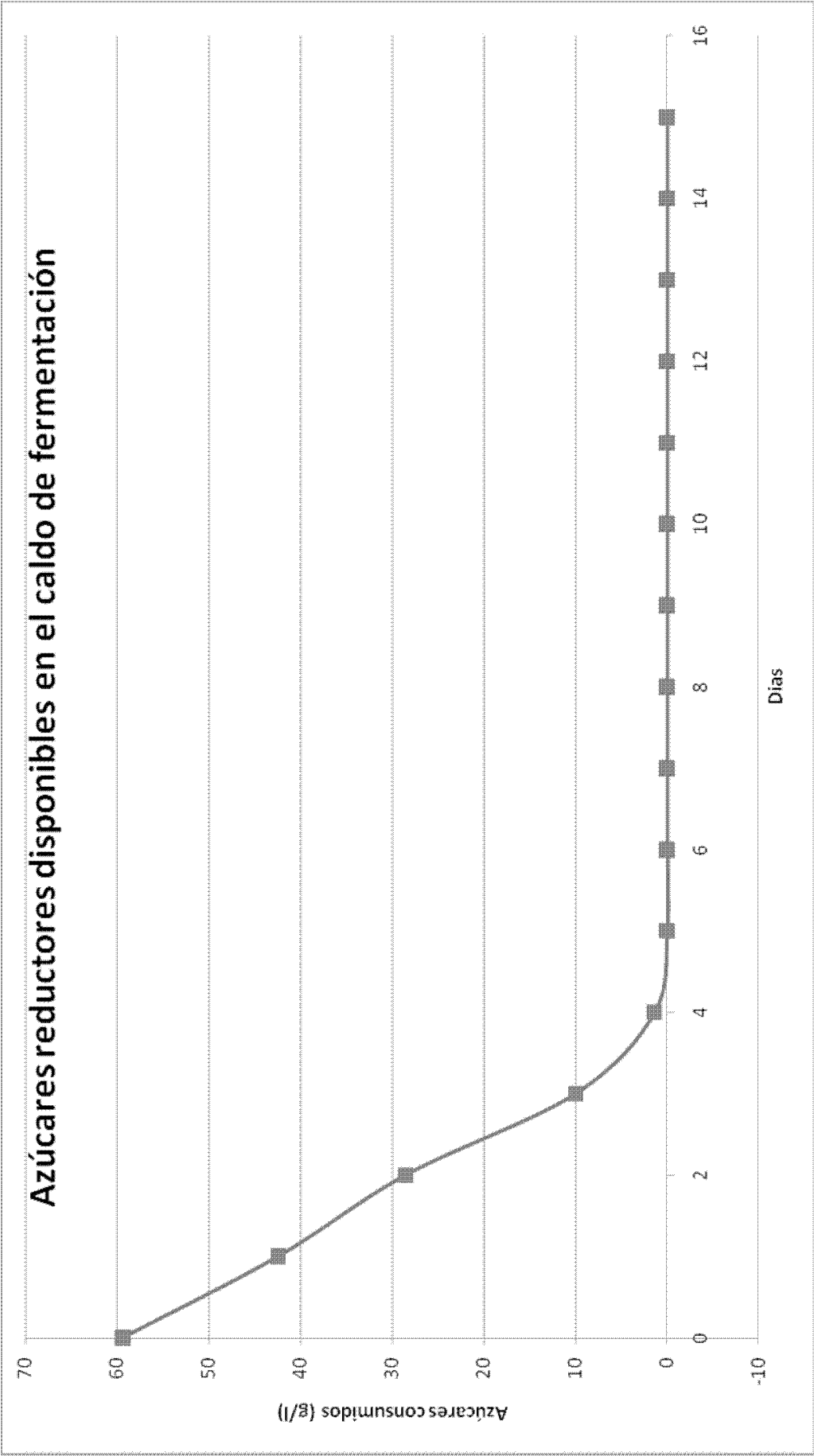


FIGURA 3

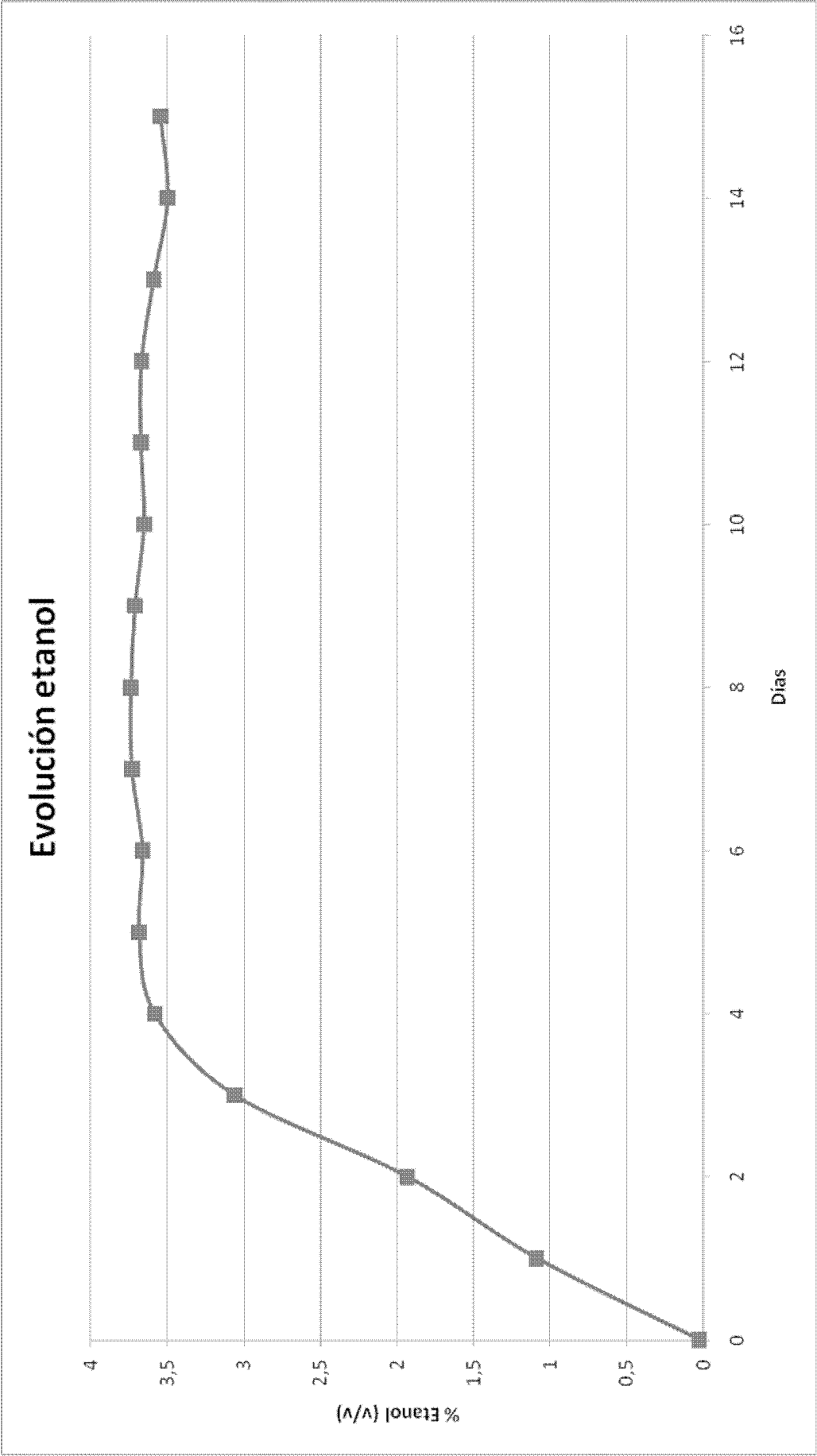


FIGURA 4

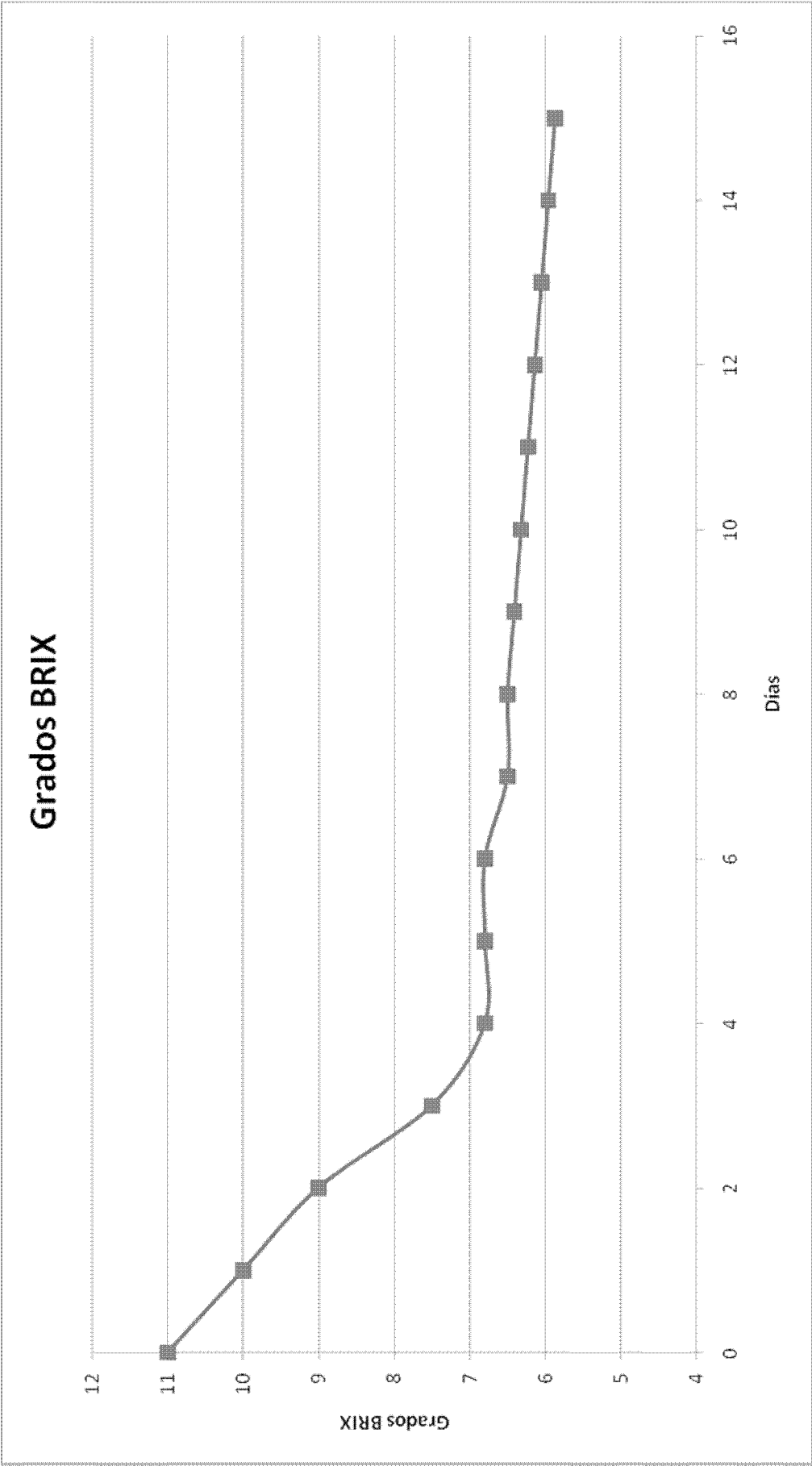


FIGURA 5

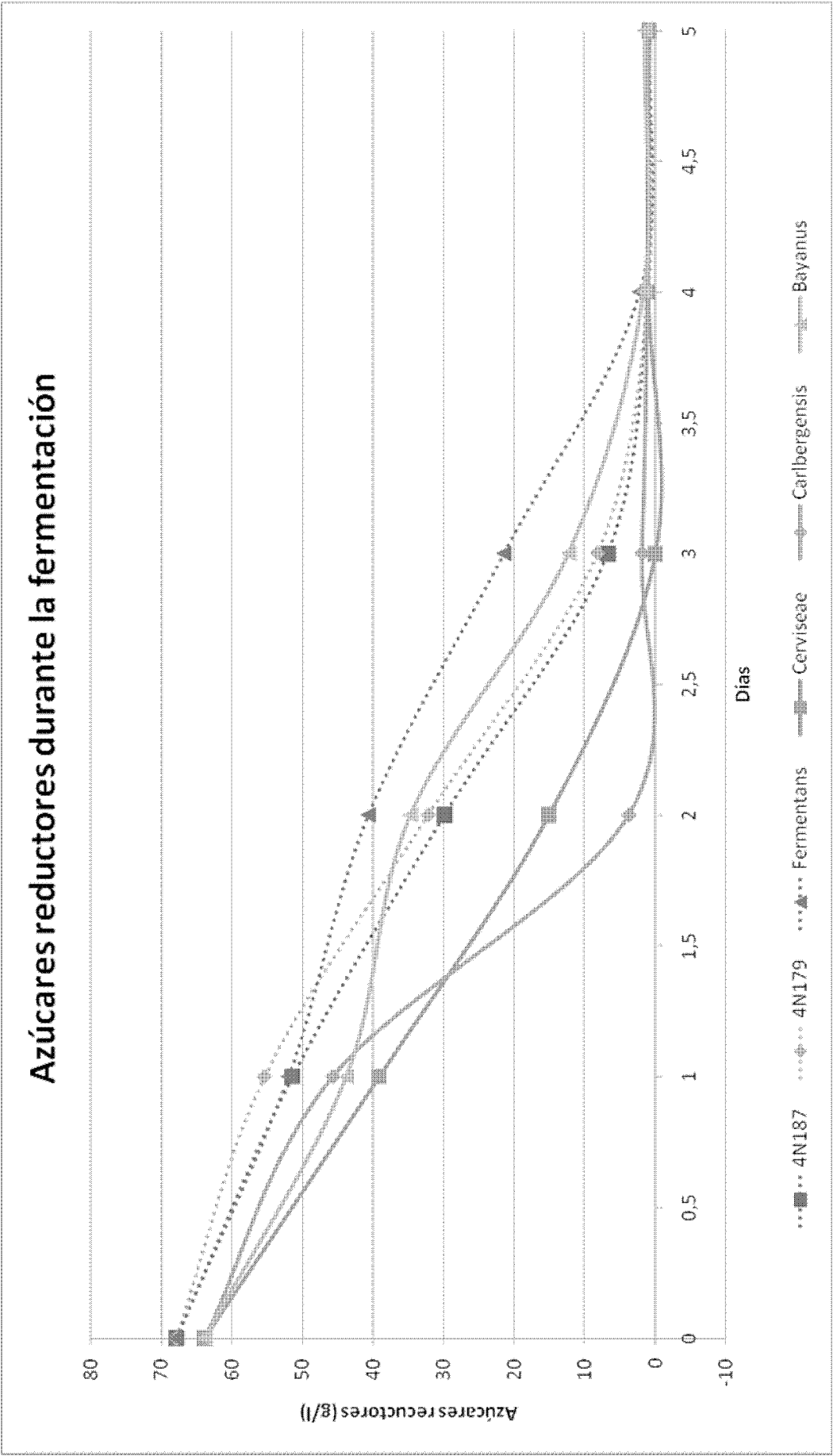


FIGURA 6

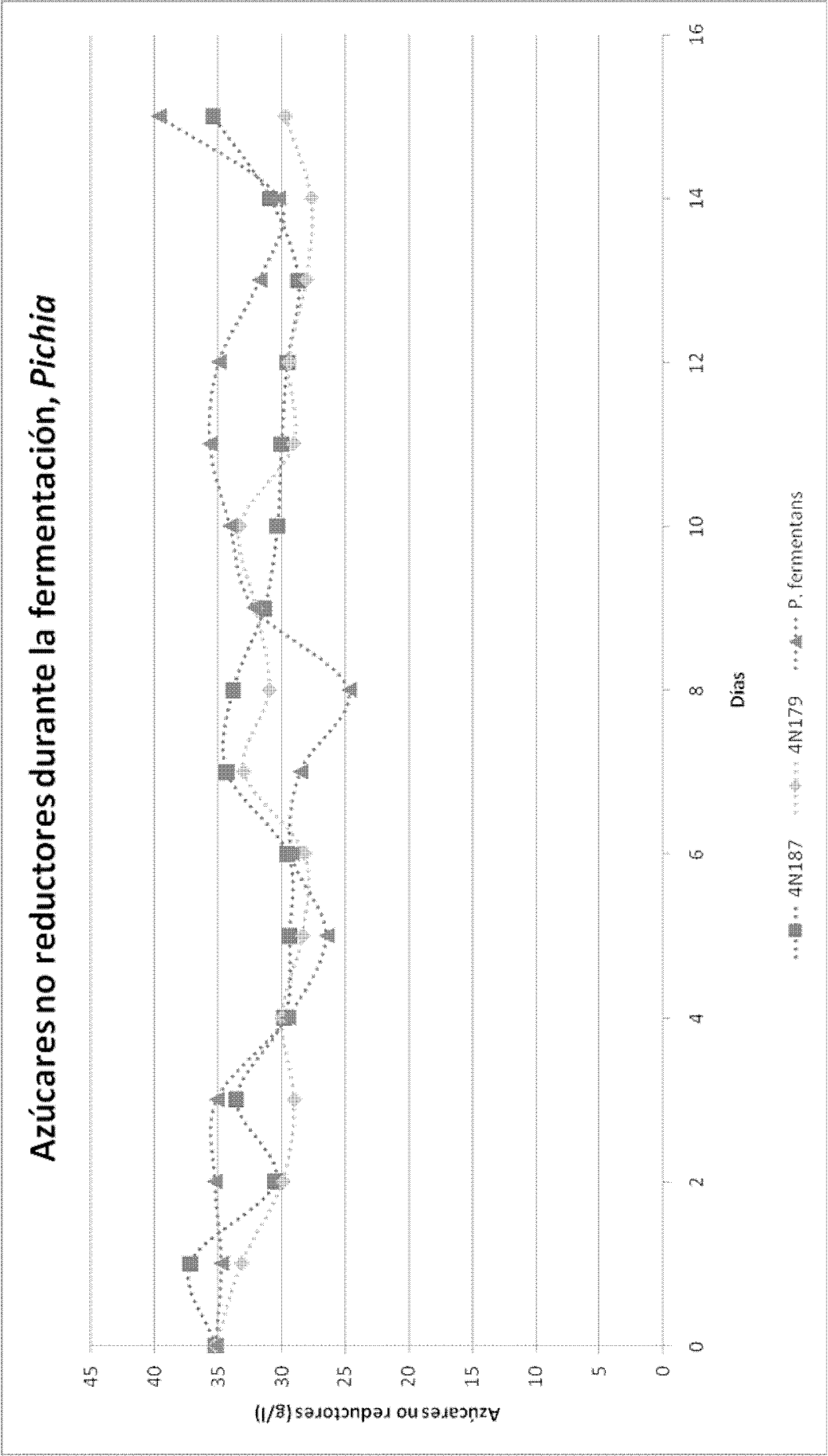


FIGURA 7

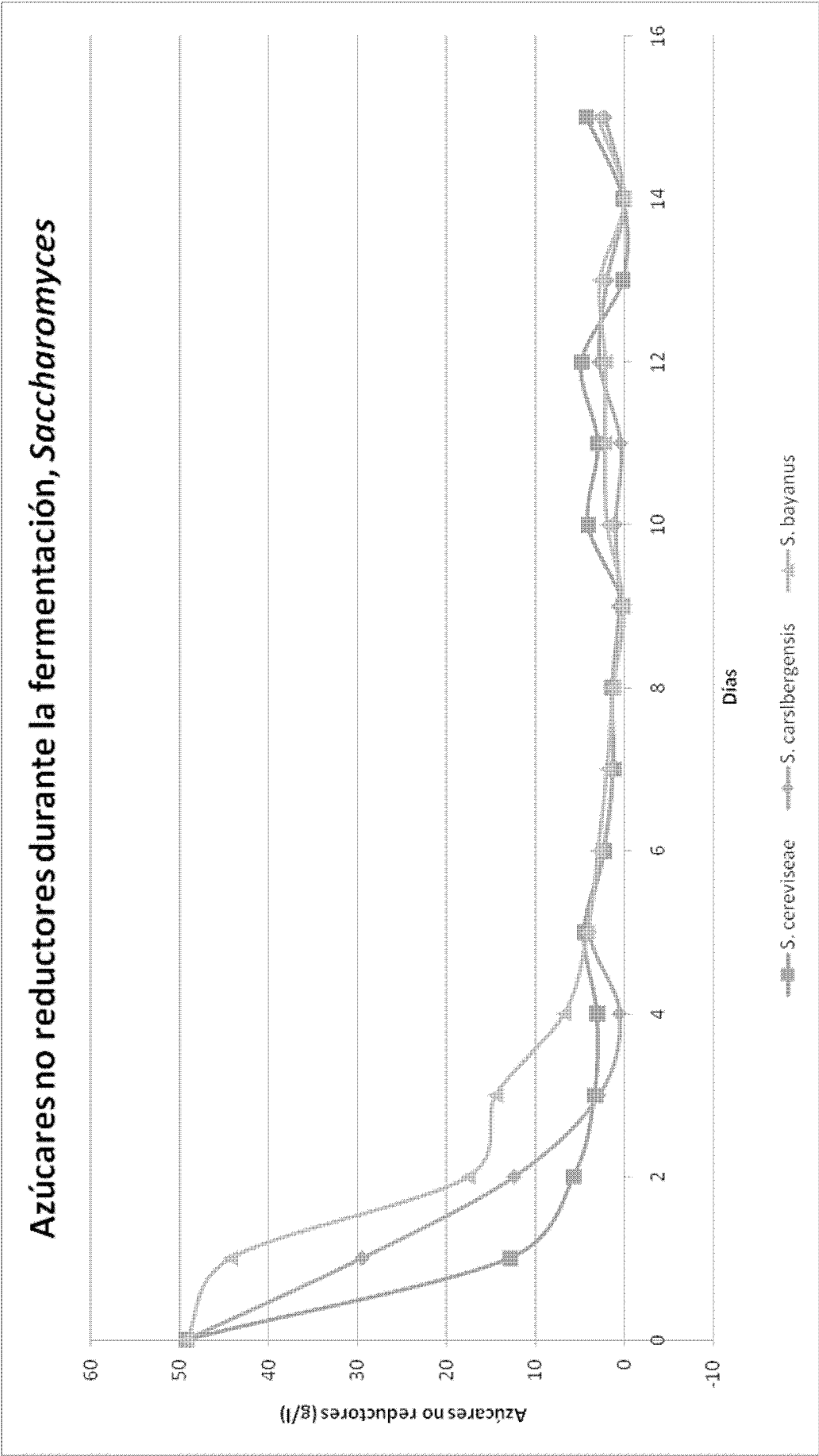


FIGURA 8

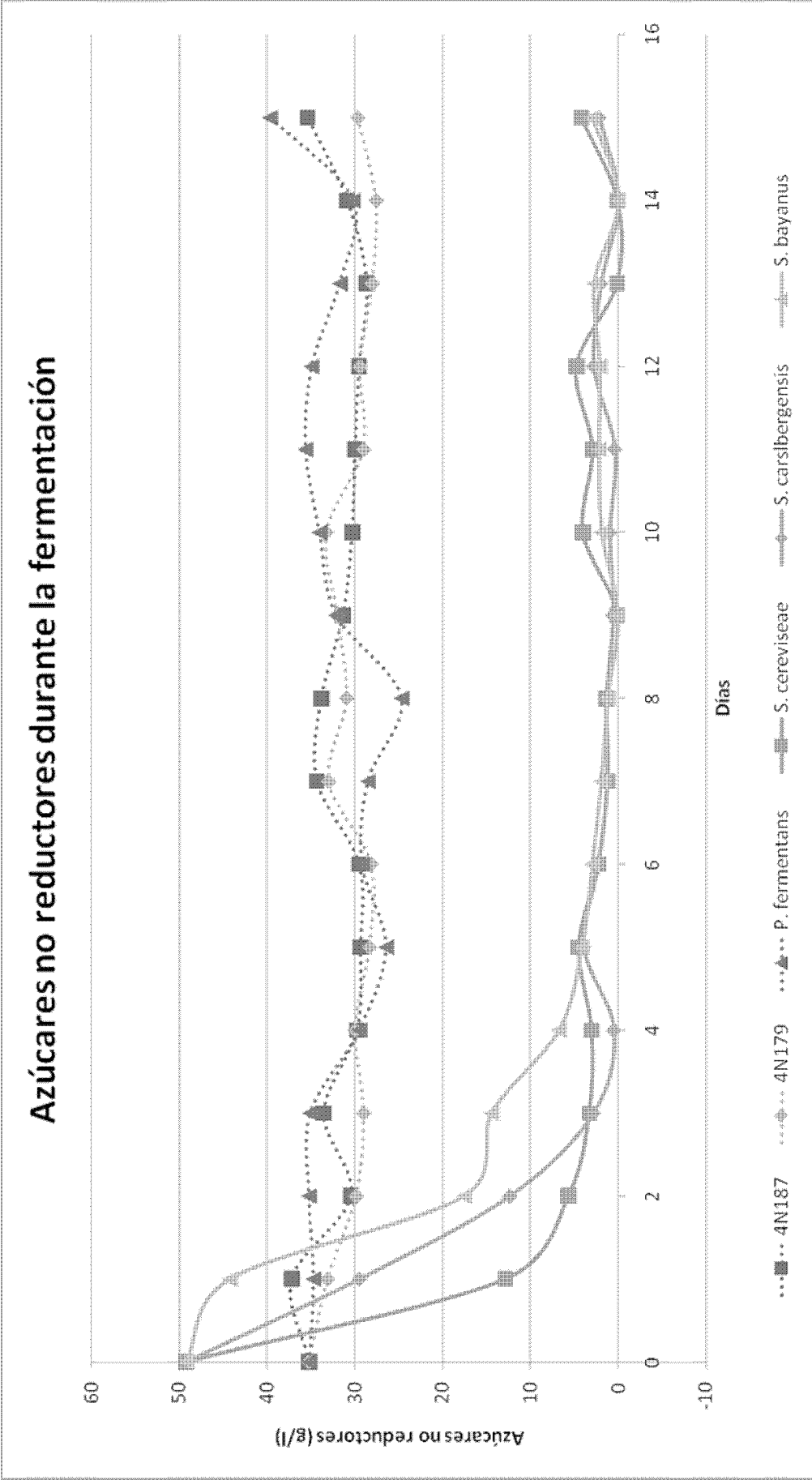


FIGURA 9

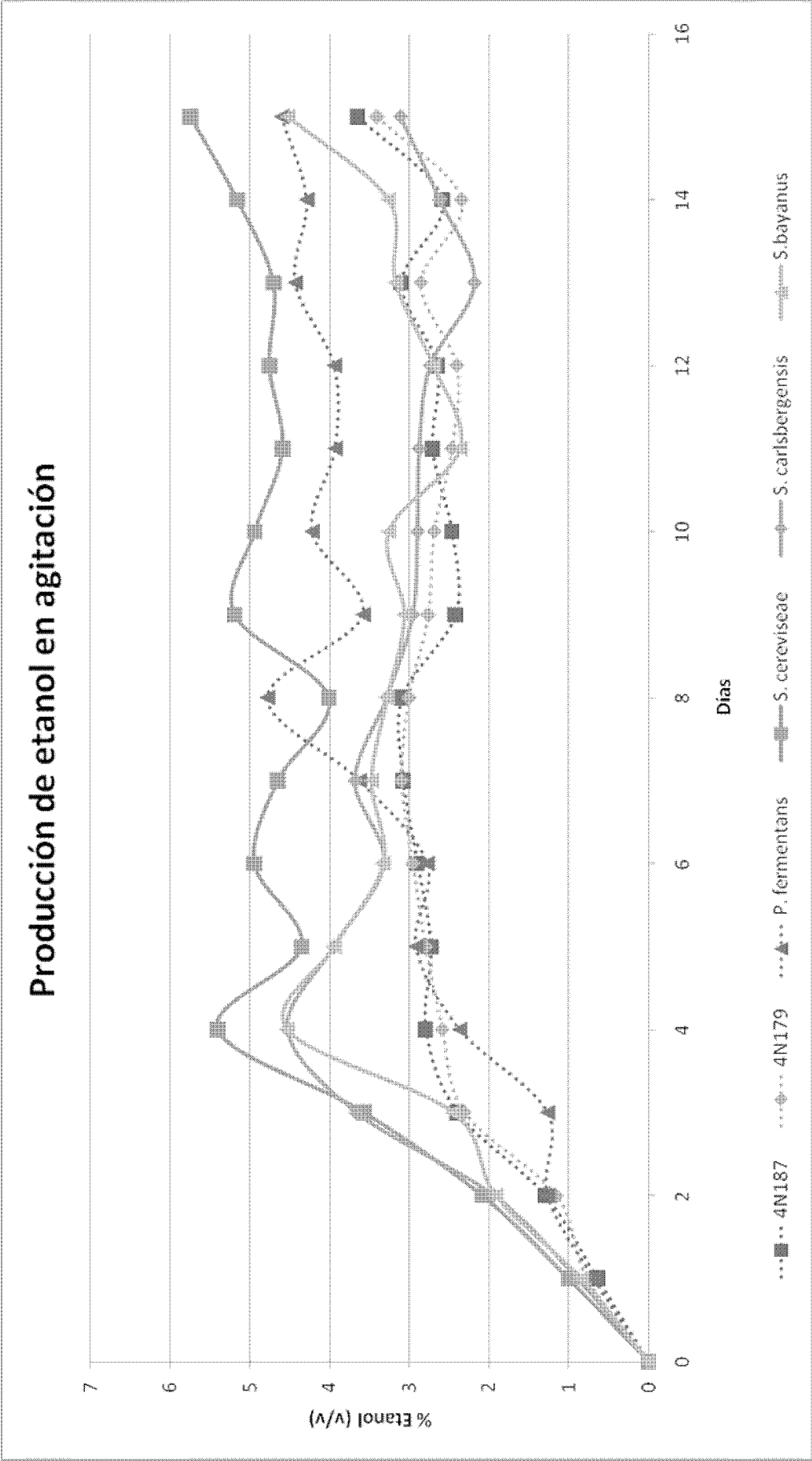


FIGURA 10

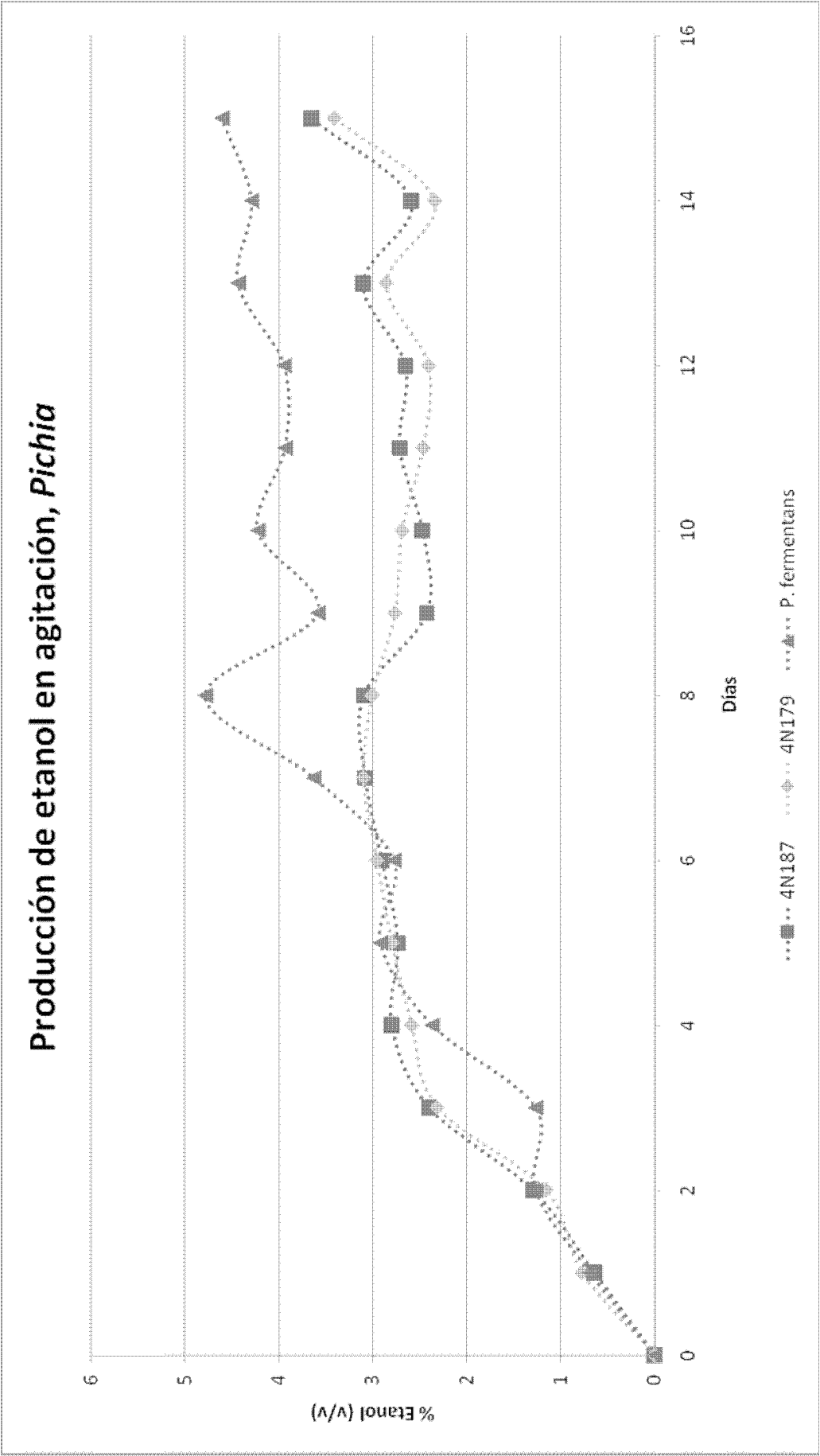


FIGURA 11

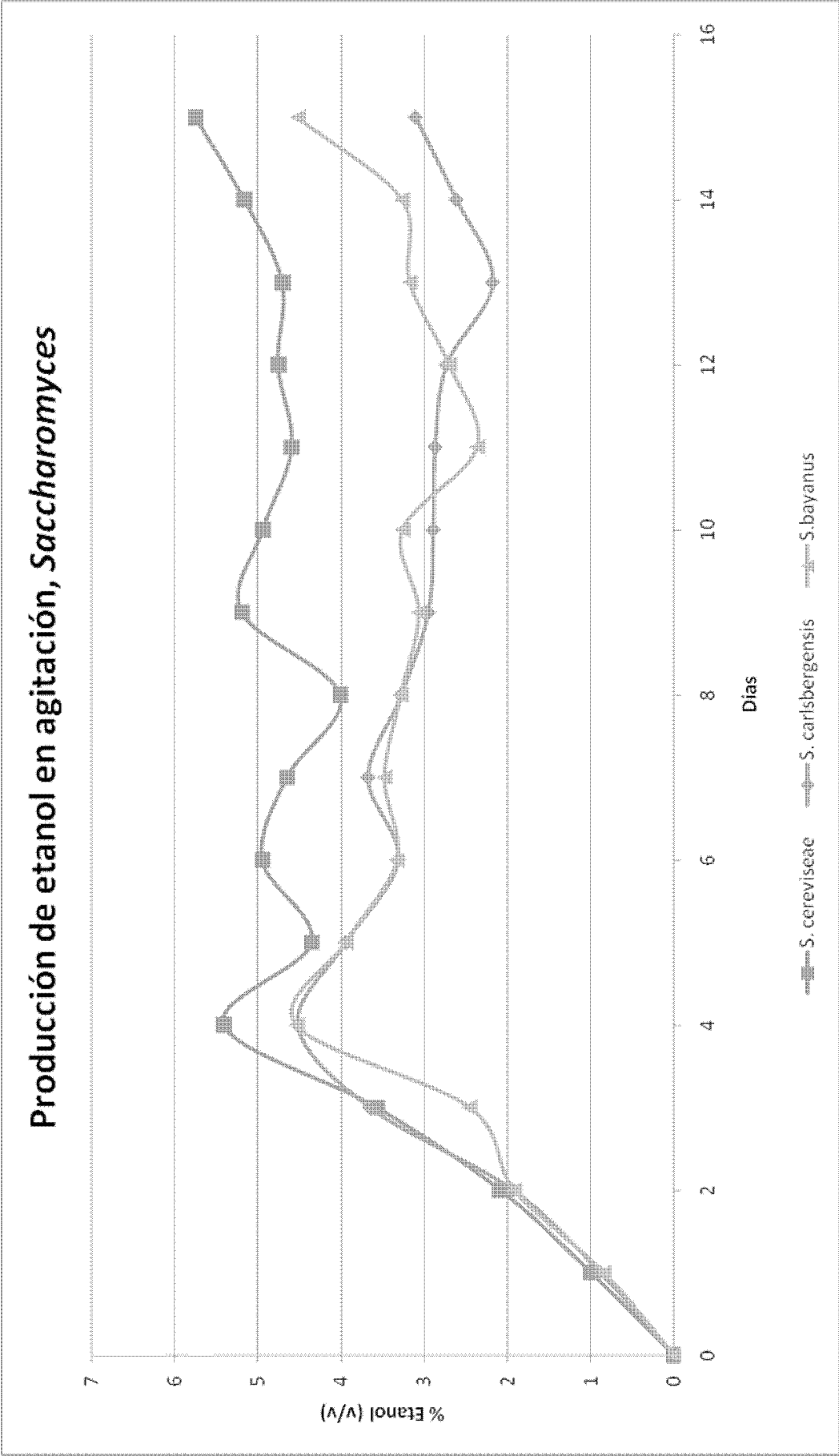


FIGURA 12

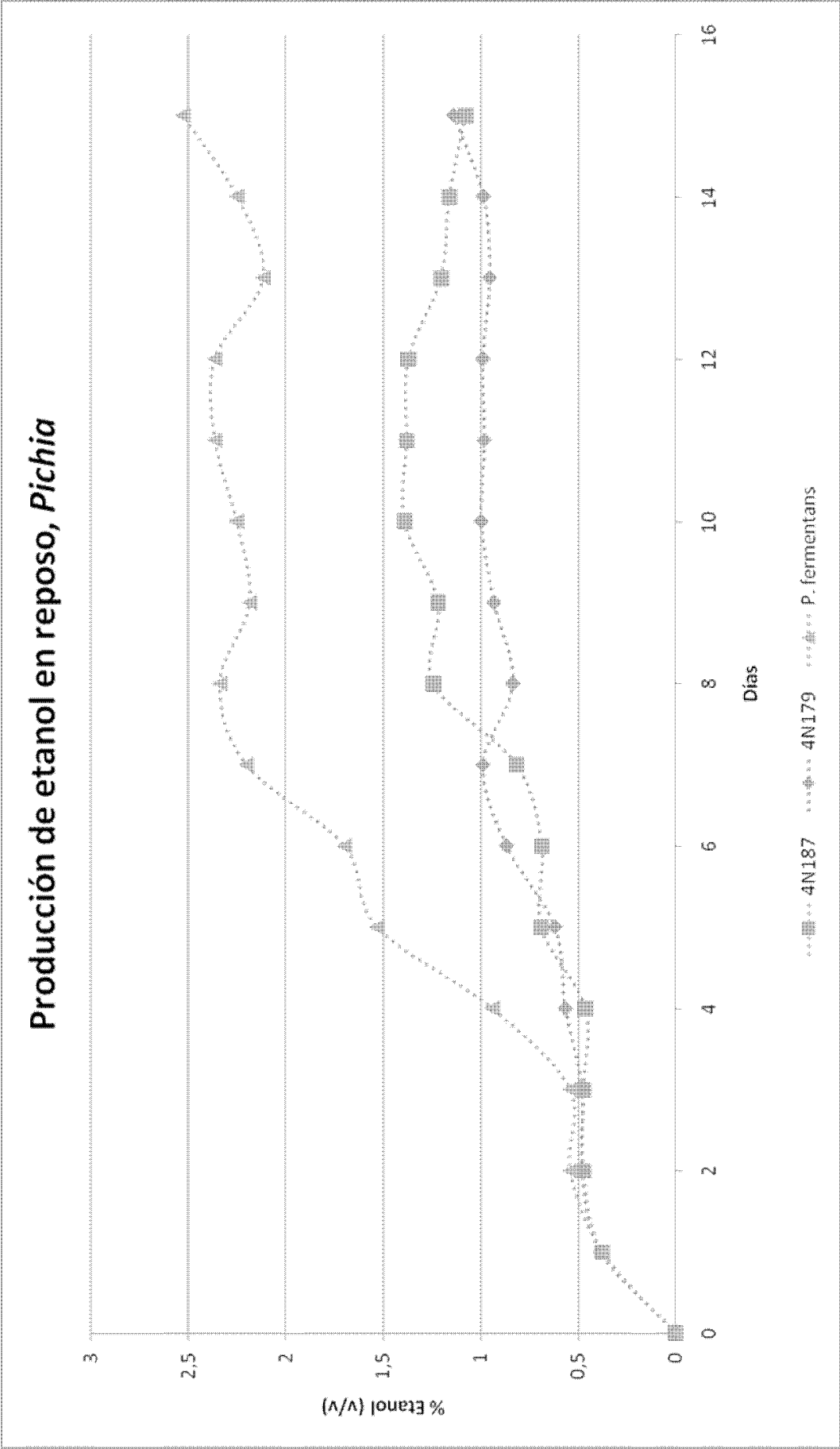


FIGURA 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12G, C12N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, XPESP, CA, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2222091 A1 (UNIV ALMERIA) 16/01/2005, the whole the document.	8-19
A	WO 2009110807 A1 (AUCKLAND UNISERVICES LTD ET AL.) 11/09/2009, the whole document.	1-19
A	ES 2164565 A1 (MINGORANCE CAZORLA LIDIA ET AL.) 16/02/2002, the whole document.	8-19
A	WO 2007141420 A2 (TERRAS JEAN-LOUIS) 13/12/2007, the whole document.	8-19
A	US 2002172738 A1 (YOUNG THOMAS B) 21/11/2002, the whole document.	8-19
A	FR 2657878 A1 (ROSE ROLAND) 09/08/1991, the whole the document.	8-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14/03/2012Date of mailing of the international search report
(22/03/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04Authorized officer
A. Maquedano Herrero

Telephone No. 91 3495474

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070793

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2222091 AB	16.01.2005	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO2009110807 A	11.09.2009	AU2009220314 A	11.09.2009
		EP2268791 A	05.01.2011
		US2011045140 A	24.02.2011
		NZ566518 A	27.05.2011
		CN102083958 A	01.06.2011
-----	-----	-----	-----
ES2164565 AB	16.02.2002	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO2007141420 A	13.12.2007	FR2901963 A	14.12.2007
-----	-----	-----	-----
US2002172738 A	21.11.2002	NONE	
-----	-----	-----	-----
FR2657878 AB	09.08.1991	NONE	
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070793

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12G3/02 (2006.01)

C12N1/16 (2006.01)

C12R1/84 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2011/070793

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12G, C12N, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, XPESP, CA, FSTA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
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

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/03/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de marzo de 2012 (22/03/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Maquedano Herrero

Nº de teléfono 91 3495474

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070793

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2222091 AB	16.01.2005	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
WO2009110807 A	11.09.2009	AU2009220314 A	11.09.2009
		EP2268791 A	05.01.2011
		US2011045140 A	24.02.2011
		NZ566518 A	27.05.2011
		CN102083958 A	01.06.2011
-----	-----	-----	-----
ES2164565 AB	16.02.2002	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
WO2007141420 A	13.12.2007	FR2901963 A	14.12.2007
-----	-----	-----	-----
US2002172738 A	21.11.2002	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
FR2657878 AB	09.08.1991	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12G3/02 (2006.01)

C12N1/16 (2006.01)

C12R1/84 (2006.01)