



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 222 786**

② Número de solicitud: 200202743

⑤ Int. Cl.

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12R 1/84** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.11.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2005**

Fecha de la concesión: **21.02.2006**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2006**

⑰ Titular/es: **Universidad de Almería  
Crta. de Sacramento, s/n  
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Vico, Felipe**

⑳ Agente: **Dávila Baz, Ángel**

② Título: **Procedimiento de fermentación dirigida secuencial, nueva cepa de levadura que interviene en el mismo, y su aplicación industrial.**

③ Resumen:

Procedimiento de fermentación dirigida secuencial, nueva cepa de levadura que interviene en el mismo, y su aplicación industrial.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Pichia fermentans*, CECT 11773, y a la aplicación de un nuevo procedimiento de vinificación mediante fermentación secuencial dirigida, por el cual el mosto es sembrado en tiempos diferentes por dicha cepa y por otra del género *Saccharomyces*. La primera da lugar a la síntesis de una gran cantidad de sustancias aromáticas y saborizantes con baja producción de etanol, que determinarán el aroma del producto final; la segunda levadura se encarga de terminar la fermentación aumentando la cantidad de alcohol acumulado hasta un 12-13% v/v.

ES 2 222 786 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación dirigida secuencial, nueva cepa de levadura que interviene en el mismo, y su aplicación industrial.

La presente invención tiene por objeto una nueva cepa de la levadura *Pichia fermentans*, así como el procedimiento de obtención de la misma, y su aplicación en la producción de vinos.

En concreto atañe, por un lado, a un procedimiento de fermentación dirigida y secuencial para la producción de vino, y por otro, al aislamiento, caracterización y uso de una cepa de levadura específica para la obtención de un producto fuertemente aromatizado, con sus características organolépticas mejoradas y reproducibles.

**Estado de la técnica**

Es bien sabido que las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación etanólica por levaduras han sido uno de los productos biotecnológicos más antiguos. En un principio se obtuvieron como medio de conservación de alimentos líquidos y agua, y después como producto en sí mismo. Tradicionalmente para la fermentación del mosto de uva se utilizan las poblaciones de levaduras que existen en el ecosistema en el que se ha producido la uva o en la propia bodega en la que ésta se transforma; las cuales espontáneamente crecen en el jugo y alteran su composición química. En ambos casos estas poblaciones están sometidas a presiones selectivas, especialmente en regiones con climas extremos como el mediterráneo, que provocan una evolución de las mismas. Por tanto, las levaduras presentes en los frutos no son constantes a través de los años, así como tampoco lo son las características metabólicas de cuya interacción con el mosto se van a producir las características organolépticas del vino resultante. Esta circunstancia da lugar a una variación, no deseada, de la producción de temporada en temporada. Para resolver este problema y también en un intento de obtener un producto parecido al producido en regiones tradicionalmente productoras, los países de nueva tradición vitivinícola iniciaron la fermentación con inóculos de levaduras seleccionadas e importadas de países con tradición muy arraigada.

La siembra del mosto inicial con cepas de levaduras seleccionadas del género *Saccharomyces*, permite independizar el proceso de fermentación de la aparición, por evolución de las poblaciones naturales, de características indeseables en los vinos. Además, esta fermentación dirigida asegura, en la mayoría de los casos, la normalización de la población fermentativa y el mantenimiento de la uniformidad de la calidad del producto final (Kunkee y Goswell. (1977). *Tables wine. Alcoholic beverages. Economic microbiology*. Academic Press, 5-72. Fleet y Heard. (1993). *Wine microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. 27-54). Esta práctica ha sido utilizada con excelentes resultados en países con sistemas de vinificación relativamente recientes y con la necesidad de obtener vinos competitivos y de gran calidad como Estados Unidos, Africa del Sur y Australia (Egli y col. (1998) *J. Applied Microbiology* 85, 779-789). Recientemente, también ha sido introducida en el proceso fermentativo de algunos mostos del marco de Jerez, lo que ha permitido homologar de forma muy específica la calidad de estos caldos (Ibeas y col. (1995) *Alimentación Equipos y Tecnología*. Separata de marzo, 45-49).

Para que la fermentación controlada pueda ser efectiva es necesario que la levadura inoculada se imponga a las silvestres. En una situación natural, sin embargo, la fermentación espontánea implica una sucesión de diferentes tipos de levaduras, que pueden ser muy diferentes entre distintas zonas. Existen estudios que demuestran el desplazamiento de todas las cepas silvestres por la cepa comercial (Querol y col. (1992), *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953. Poblet y col. (2000), *Alimentación Equipos y Tecnología*. Marzo, 95-100).

La mayoría de las levaduras comerciales utilizadas para la fermentación dirigida o controlada son de origen francés. Posiblemente, por el deseo involuntario de alcanzar un vino de calidad comparable a la media de los vinos franceses. Esto da lugar a dos problemas fundamentales. Por una parte, puesto que gran parte de las características organolépticas del vino proceden de la interacción del metabolismo de las levaduras y los componentes químicos del mosto, los vinos pierden personalidad, tendiendo a parecerse todos entre sí. Por otra parte, las levaduras comerciales están seleccionadas en unas condiciones ecológicas que con frecuencia son muy diferentes a las de los vinos de otras regiones, por ejemplo las que tienen climas más cálidos o secos. En estas regiones productoras las levaduras autóctonas suelen competir ventajosamente con las alóctonas, desplazándolas e imponiendo las características derivadas de su metabolismo.

Estos dos tipos de problemas pueden resolverse por el uso, para el proceso de fermentación controlada, de una levadura aislada y seleccionada de la zona vitivinícola específica. Este tipo de levaduras pueden crecer más deprisa que otras levaduras comerciales e incrementar la velocidad de fermentación, ya que están mejor adaptadas a las condiciones específicas por las que deberá pasar el mosto hasta su transformación. Además, teniendo en cuenta que la levadura predominante es la que aporta la mayor cantidad y número de componentes aromáticos del vino (Heart y Fleet, (1986), *Food Technol. Aust.* 38, 1, 22-25), las levaduras autóctonas seleccionadas contribuirán de forma determinante al aroma y sabor del vino y por tanto, a su calidad y valoración sensorial. Con esta práctica el vino tendrá unas propiedades organolépticas distintivas y más relacionadas con su origen geográfico y ecológico. Por tanto, la selección de levaduras autóctonas y el desarrollo de técnicas para su utilización en procesos industriales de fermentación controlada, están centrando muchos esfuerzos (Querol y col. (1992), *J. Food Sci.* 57, 183-185. Degre (1993), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, 421-447).

En el documento de patente ES 2089982, se describe detalladamente el aislamiento y aplicación de una nueva cepa

de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de mostos resistentes al crecimiento adecuado de cepas comerciales. Con este procedimiento se consigue un incremento en la velocidad de fermentación, la desaparición de compuestos indeseables y aumentar la reproducibilidad en la calidad de los vinos tanto blancos como tintos. Resultados semejantes han sido obtenidos en aislamientos de levaduras autóctonas de aplicación óptima en el inóculo y fermentación de mostos de otras zonas (Lema y col. (1996), Am. J. Enol. Vitic., 47, 2, 206-216. Querol y col. (1993) Microbiología SEM 9, 76-82. Lema Costas C. (1997) Viticultura/Enología Profesional. 51, 53-59.).

Desde un punto de vista enológico, se puede esperar que el uso de levaduras indígenas en cultivos puros, para procesos de fermentación dirigida, puede ser la técnica de elección para proporcionar a los vinos su aroma, sabor y propiedades características específicas (Heard G. (1999) Novel yeast in winemaking-looking to the future. Food Australia 51: 247-352). Obviamente es necesario un equilibrio en el uso de levaduras comerciales, puesto que se puede llegar a perder la identidad organoléptica de caldos tradicionales. La necesidad de recuperar los aromas y sabores tradicionales de los vinos en las regiones en las que se ha impuesto la fermentación dirigida con cepas comerciales francesas, ha llevado a establecer programas de aislamiento y obtención de cultivos homogéneos de levaduras autóctonas y rescatarlas para la industria vinícola (Sipiczki y col. (2001), Antonie van Leeuwenhoek 79: 97-105).

La contribución final de las levaduras de la especie *Saccharomyces* ha sido ampliamente estudiada (Gardner y col. (1993), Applied and Environmental Microbiology 59: 2022-2028. Ubeda y col. (1995), Food Science and Technology 28: 584-588. Mortimer y Polsinelli (1999), Research in Microbiology 150, 199-204). *S. cerevisiae* está presente, en baja concentración, en la superficie de la uva y en las primeras etapas de la fermentación, pero es la levadura predominante desde la mitad del proceso hasta el final del mismo, debido a su mayor tolerancia al etanol (Delfini y col. (2001), J. Agric. Food Chem. 49, 11: 5397-5408). Las levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* (levaduras no-*Saccharomyces*, que incluyen géneros como *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulaspota*) están descritas como productoras de un gran número de subproductos de la fermentación, tales como acetaldehído, acetato de etilo, glicerol, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, etc. (Romano y col. (1997), Appl. Environ. Microbiol. 59, 1838-1841). La influencia de estos compuestos en la calidad sensorial ha sido ampliamente estudiada y establecida (Rojas y col. (2001), International J. Food Microbiol. 70, 283-289. Gil y col. (1996), J. Food Sci. 61, 1247-1249. Heard y col. (1986), Food Technol. Aust. 38, 22-25. Lema y col. (1996), Am. J. Enol. Vitic. 47, 2: 206-216). Por tanto, las levaduras no-*Saccharomyces* introducen la dimensión ecológica y la diversidad química de la calidad organoléptica de los vinos (Feet y col. (1993) En Wine: Microbiology and Biotechnology: Harwood Academic Publishers, 27-54, Fernández y col. (1999), FEMS Microbiol. Letters 173, 223-229).

Recientemente, se han realizado intentos para incrementar la influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en el crecimiento poblacional durante la fermentación y mejorar así la calidad de los vinos. Estos estudios incluyen la inmovilización de células de *Candida* con el propósito de incrementar la concentración de glicerol en el vino (Ciani y col. (1996), Applied, Environ. Microbiol. 62, 283-288), co-cultivo de diferentes cepas de *Candida* con diferentes cepas de *Saccharomyces* (Ciani y col. (1998), J. Applied Microbiol. 85, 247-254), co-cultivo de mezclas de *Torulaspota delbrueckii* con *Saccharomyces* (Moreno y col. (1991), J. Industrial Microbiol. 7, 181-190), co-cultivo de mezclas de cepas de *Hanseniaspora uvarum* o *Kloeckera apiculata* con *Saccharomyces* (Gil y col. (1996), J. Food. Science 61, 6: 1247-1249, Erten y col. (2002), World J. Micorbiol. Biotech. 18, 373-378).

Otra estrategia para incrementar el efecto de los subproductos de la fermentación de levaduras no-*Saccharomyces* sobre la calidad final de los vinos ha sido la siembra secuencial del mosto con diferentes levaduras. En el documento de Herraiz y col. (1990) en Am. J. Enol. Vitic., 41,4: 313-318 se comunica la fermentación por siembra secuencial de *Torulaspota delbrueckii* o *Kloeckera apiculata* con *Saccharomyces*. Los perfiles de compuestos volátiles obtenidos en los procesos en los que las dos primeras levaduras fueron inoculadas, mezcladas o separadas, 3 ó 5 días antes de la inoculación con una cepa comercial de *Saccharomyces* fueron claramente distintos y más complejos. Posteriormente se demostró que el metabolismo de *Saccharomyces* se altera cuándo el mosto es sembrado con esta levadura después de haber sido parcialmente fermentado con levaduras no-*Saccharomyces*. Concretamente se observó un fuerte incremento en la producción de n-propanol, a partir de subproductos metabólicos de la levaduras no-*Saccharomyces* (Zaroni y col. (1993) Biotechnol. Letters, 15, 3: 235-238). En esta misma línea, un trabajo posterior (Toro y col. (2002) World J. Microbiol. Biotech. 18, 347-354) ha demostrado la mejora objetiva de la calidad de los vinos obtenidos por fermentación dirigida por siembra secuencial de *Candida cantarellii* y *Saccharomyces*. Desde el punto de vista enológico, una separación entre las dos siembras de 3 días produjo los mejores resultados en el enriquecimiento en subproductos generadores de aromas. El factor limitante de esta estrategia para incrementar la calidad del vino, es la disponibilidad de una cepa no-*Saccharomyces* que disponga de una fuerte capacidad para producir compuestos participantes en las deseables propiedades del producto. En la mayoría de los casos esto no es posible, pues las levaduras no-*Saccharomyces* suelen dar lugar a compuestos característicos de aromas a podredumbre. Además algunos subproductos de estas levaduras pueden ser reutilizados por *Saccharomyces* y formar sustancias indeseables no aceptables en la composición del vino.

La posibilidad de imponer una cepa seleccionada en un proceso fermentativo permite otra aproximación técnica para mejorar las propiedades organolépticas del vino. Así, la selección en el laboratorio de nuevas cepas mediante cruces genéticos clásicos ha sido explorada para el incremento en la producción de terpenos (Javelot y col. (1991) J. Biotechnol. 21: 239-251). Lamentablemente, estos estudios no han tenido unos resultados rápidos y claramente diferenciadores; de tal forma que las nuevas cepas pierden demasiadas características útiles a costa de ganar el carácter de interés.

La tecnología del DNA recombinante también se está aplicando a la mejora de las levaduras vinícolas. En el documento EP103399 se describe el clonaje y utilización del gen de la enzima maloláctica de *Lactobacillus delbrueckii* en cepas de *Saccharomyces*. Las levaduras transformadas con este gen pueden realizar la fermentación maloláctica sin necesidad de la adición de bacterias específicas al fermentador. Otra mejora enológica está comunicada en el documento ES 2059280, en ella se construye un nuevo organismo por transformación de una levadura silvestre con el gen codificante de la  $\beta$ -(1,4)-endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum*. La expresión de este gen en la levadura durante la fermentación permite la liberación de terpenos desde su correspondiente diglucósido, lo que conlleva un incremento del aroma del producto final. Teniendo en cuenta que la utilización de organismos recombinantes para la fabricación de productos destinados al consumo humano está pendiente de aceptación legal en Europa y carece de aceptación social y ecológica, la transformación de levaduras vínicas con nuevos caracteres de interés enológico es solo una estrategia de futuro con improbable aplicación actual.

En la presente invención, se utiliza la evolución natural, que espontáneamente forma organismos con características enológicas de interés, para aislar las levaduras que contienen la combinación apropiada de genes que permiten obtener un producto de la fermentación de mosto mejorado organolépticamente. Esta estrategia tiene la ventaja, frente a la mejora clásica de cepas, que no implica la pérdida de ninguna característica de interés ni la aparición de otras nuevas que resulten indeseables. Por otro lado, no presenta los problemas asociados con la transformación genética de organismos por cuanto no se manipula el genoma de los mismos. El único inconveniente de esta técnica es que el aislamiento de una nueva cepa, desde medios naturales, con las características apropiadas, es un fenómeno probabilístico y que requiere un enorme esfuerzo de análisis y diagnóstico de una gran cantidad de organismos y cepas.

La cepa de levadura utilizada en esta invención fue obtenida en un proceso de selección y aislamiento de levaduras con capacidad de formar una combinación de productos aromáticos y saborizantes superior a las existentes comercialmente, con capacidad de formar o tolerar una concentración alcohólica superior a 4-5% v/v, con capacidad de tolerar una concentración de sulfuroso en el mosto de 0.15 gr/L e incapaz de formar compuestos químicos de sabor u olor indeseables. Con estas pautas de trabajo las levaduras fueron aisladas desde diversos mostos de diferentes frutas. Las levaduras aisladas fueron analizadas por el examen cromatográfico de la composición de aromas durante la fermentación de mostos neutros de uva y por el análisis sensorial de los mismos. De este proceso, resultó seleccionada una levadura perteneciente a la especie *Pichia fermentans*. Las levaduras pertenecientes a esta especie han sido descritas como altamente productoras de compuestos aromáticos implicados de forma esencial en el aroma y buqué del vino, tales como el etil-caproato, etil-caprilato, 2-feniletanol, ésteres, alcoholes de alto peso molecular y ésteres de alcoholes entre otros compuestos (Lilly y col. Applied Environ. Microbiol. (2000), 66, 2: 744-753, Huang y col. (2001), Food Res. International, 34, 277-282, Rojas y col. (2001), International J. Food Microbiol. 70, 283-289). De esta cepa ha sido depositado cultivo, conforme a las provisiones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patente, en la autoridad internacional de depósito de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 (Valencia), España, con el número CECT 11773.

El uso combinado de esta levadura con otras del género *Saccharomyces* en un nuevo proceso de fermentación secuencial, que también se reivindica en la presente invención, ha dado lugar a vinos con mayor riqueza aromática. La composición de estos vinos ha sido caracterizada por cromatografía de gases y por análisis enzimáticos, evidenciando diferencias y mejoras organolépticas que han sido igualmente verificadas por análisis sensorial.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Pichia fermentans*, CECT 11773, y a la aplicación de un nuevo procedimiento de vinificación por el cual el mosto es sembrado en tiempos diferentes por dicha cepa y por otra del género *Saccharomyces*. La primera da lugar a la síntesis de una gran cantidad de sustancias aromáticas y saborizantes con baja producción de etanol, que determinarán el aroma del producto final. La segunda levadura se encarga de terminar la fermentación aumentando la cantidad de alcohol acumulado hasta un 12-13% v/v.

La cepa CECT 11773 corresponde a una levadura natural aislada de la corteza de fruta madura y perteneciente a la especie *Pichia fermentans*. Presenta una excelente capacidad de crecimiento en mosto de uva, tanto blanca como tinta. Si el mosto se mantiene a una temperatura entre 17°C y 30°C la fermentación comienza en menos de 24 horas, aunque la concentración de SO<sub>2</sub> sea de 0.15 gr/L. Esto la diferencia claramente de otras levaduras no-*Saccharomyces*, que se caracterizan por no tolerar el SO<sub>2</sub> y, por tanto, no pueden ser utilizadas como sobreproductoras de aromas en condiciones de vinificación industrial.

La nueva cepa es capaz de producir gran cantidad de compuestos volátiles y no volátiles implicados en el aroma y sabor del vino. La Tabla 1, recoge los componentes sintetizados por la cepa CECT 11773 en un mosto de uva de la variedad macabeo. Por comparación con el perfil de compuestos formados por *Saccharomyces* (Tabla 4), se demuestra que la levadura *Pichia fermentans* CECT 11773 da lugar a un perfil más variado y con mayor cantidad de compuestos aromáticos.

# ES 2 222 786 B1

TABLA 1

Subproductos de la fermentación obtenidos por siembra controlada de mosto macabeo con *Pichia fermentans* CECT 11773. (<sup>a</sup> mg/l, <sup>b</sup> % v/v). Las condiciones de cultivo son las mismas que las descritas en el ejemplo 2

|                                 | CECT11773   |
|---------------------------------|-------------|
| Acetaldehido <sup>a</sup>       | 319.49±0.82 |
| Acido Acético <sup>a</sup>      | 18.43±0.05  |
| Acetato de etilo <sup>a</sup>   | 20.40±0.52  |
| Metanol <sup>b</sup>            | 43.15±0.63  |
| Etanol <sup>b</sup>             | 5.29 ±0.30  |
| 1 propanol <sup>a</sup>         | 30.55±0.63  |
| 2 metil 1 propanol <sup>a</sup> | 69.55±0.68  |
| 2 metil 1 butanol <sup>a</sup>  | 120.35±0.50 |
| 3 metil 1 butanol <sup>a</sup>  | 142.56±3.57 |
| n butanol <sup>a</sup>          | 81.97±1.65  |
| 1 hexanol <sup>a</sup>          | 207.01±1.83 |
| Etil Caprilato <sup>a</sup>     | 250.83±0.43 |
| 2,3 butenodiol <sup>a</sup>     | 121.86±1.50 |

La cepa CECT 11773 objeto de esta invención, está caracterizada además por una elevada capacidad de fermentar tanto a temperaturas bajas como altas, no provoca turbidez y su fermentación no es rápida evitando así la formación de espuma. Produce muy bajas concentraciones de ácido acético, produce un máximo de 5% de etanol y no sintetiza ningún producto que interfiera con el crecimiento y fermentación de *Saccharomyces*, en el caso de que esta levadura sea sembrada posteriormente en el mismo mosto. Una característica de gran importancia es que la CECT 11773 presenta una tolerancia al SO<sub>2</sub> que la permite crecer a una concentración de 0.15 gr/l de metabisulfito potásico a un pH 3.3, durante todo el proceso de fermentación. Datos experimentales obtenidos por los inventores, demuestran que esta levadura solo es sustituida por la cepa de *Saccharomyces* inoculada posteriormente cuando la concentración de etanol supera el 6%. Esto posibilita su uso industrial y el incremento controlado de aromas en el vino producido por el procedimiento que se describe en este documento.

Otras características fisiológicas y bioquímicas de la cepa CECT 11773 están descritos en la tabla 2.

TABLA 2

Características bioquímicas y morfológicas de *Pichia fermentans* CECT 11773  
Características morfológicas

|                          |  |
|--------------------------|--|
| - Morfología celular     | células redondas, ovaladas, ligeramente alargadas. |
| - Morfología de colonia: |  |
| - Textura                | colonias con textura mantecosa, superficie lisa    |
| - Color                  | colonias de color blanco                           |
| - Reborde                | lobulado   |
|                          | Se observó pseudomicelo                            |

## ES 2 222 786 B1

### *Fermentación de compuestos carbonados*

| Fuentes de carbono | 1 día | 2 días | 3 días | 7 días |
|--------------------|-------|--------|--------|--------|
| 5<br>Glucosa       | +     | +      | +      | +      |
| Lactosa            | -     | -      | -      | -      |
| 10<br>Sacarosa     | -     | -      | -      | -      |
| Melezitosa         | -     | -      | -      | -      |
| 15<br>Almidón      | -     | -      | -      | -      |
| Rafinosa           | -     | -      | -      | -      |
| Galactosa          | -     | -      | -      | -      |
| 20<br>Maltosa      | -     | -      | -      | -      |
| Celobiosa          | -     | -      | -      | -      |
| 25<br>Melibiosa    | -     | -      | -      | -      |

### *Asimilación de compuestos carbonados*

| Fuentes de carbono | 1 día | 2 días | 3 días | 7 días |
|--------------------|-------|--------|--------|--------|
| 30<br>Glucosa      | +     | +      | +      | +      |
| Lactosa            | -     | -      | -      | -      |
| 35<br>Sacarosa     | +     | +      | +      | +      |
| Melezitosa         | +     | +      | +      | +      |
| 40<br>Trehalosa    | +     | +      | +      | +      |
| D-arabinosa        | -     | -      | -      | -      |
| L-arabinosa        | -     | -      | -      | -      |
| 45<br>Eritritol    | -     | -      | -      | -      |
| Galactosa          | +     | +      | +      | +      |
| 50<br>Maltosa      | +     | +      | +      | +      |
| Celobiosa          | -     | -      | -      | -      |
| 55<br>Melobiosa    | +     | +      | +      | +      |
| Rafinosa           | -     | -      | -      | -      |
| L-ramnosa          | -     | -      | -      | -      |
| 60<br>D-xilosa     | -     | -      | +      | +      |
| Mio-inositol       | -     | -      | -      | -      |
| 65<br>Manitol      | -     | -      | -      | -      |

## ES 2 222 786 B1

Esta cepa ha sido caracterizada molecularmente por los autores de este documento, utilizando la técnica de la secuenciación de los amplificadores por la reacción en cadena de la polimerasa del DNA codificante del RNA ribosómico 5.8s y las dos regiones espaciadoras no transcribibles flanqueantes (PCR-ITS), descrita en los protocolos de los documentos: White y col. (1990) PCR protocols, Ed. Innis, Gelfand, Sninsky and White. San Diego, Academic Press, 315-322, y Sambrook y col. (1989) Cold Spring Harbor, New York.

La secuencia de las regiones no transcribibles flanqueantes del DNA codificante del RNA ribosómico 5s (SEQ.ID NO.1) ha sido registrada en el GeneBank con el número de acceso: AY027508.

Dicha secuencia ha sido registrada en el GeneBank con el número de acceso: AY027508.

El análisis de restricción se muestra a continuación:

TABLA 3

Análisis de restricción de los ITS de *Pichia fermentans*. El tamaño del fragmento amplificado por PCR así como los obtenidos por las enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* se presenta en número de nucleótidos pares

| Especie                  | Amplificado | <i>CfoI</i>    | <i>HaeIII</i> | <i>HinfI</i> |
|--------------------------|-------------|----------------|---------------|--------------|
| <i>Pichia fermentans</i> | 450         | 170+100+100+80 | 340+90        | 250+200      |

El procedimiento preferente de uso de esta levadura es en una fermentación dirigida de siembra secuencial. En primer lugar el mosto, debidamente tratado, es sembrado con *Pichia fermentans* CECT 11773 de tal forma que su densidad de población final sea al menos tres ordenes de magnitud mayor que la de cualquier otra levadura. Para ello se utiliza un pie de cuba apropiado. Esta levadura permanece como microorganismo fermentador predominante durante 2-4 días a una temperatura entre 15°C y 24°C, en todo caso hasta que la concentración de aromas sea la deseada por el operador. Posteriormente el caldo es nuevamente sembrado, pero en este caso con una levadura perteneciente al género *Saccharomyces*, preferentemente una levadura autóctona seleccionada. Igualmente se prepara un pie de cuba con una densidad de población semejante a la empleada en la fermentación anterior. Después de realizar la siembra, el proceso se deja transcurrir durante 20-30 días entre 18°C y 24°C, según se trate de mosto blanco o tinto. Una vez terminada la fermentación el vino puede seguir el tratamiento específico y habitual de la bodega.

Una descripción detallada de la aplicación de esta invención se describe a continuación:

### a) Aplicación a la fermentación para la obtención de vino blanco

Durante el momento del prensado, el mosto es tratado con anhídrido sulfuroso (en forma gaseosa o de metabisulfito potásico) hasta una concentración de 0.1 gr/L. Posteriormente es clarificado por sedimentación o centrifugación. Seguidamente el caldo es tratado con la cantidad necesaria de ácido tartárico, para llevar su pH hasta 3.25.

Cuando el mosto alcance una temperatura de 15°C a 17°C se siembra con un pie de cuba que debe ser entre un 2.5% y 5% del volumen de mosto a fermentar. Este pie de cuba está preparado a partir de mosto clarificado y sembrado con un precultivo de la levadura *Pichia fermentans* CECT 11773, que se mantiene a 28°C, durante 24 horas en aireación, preferentemente por remonte mecánico. Alternativamente el mosto se puede sembrar con un volumen de pie de cuba que permita una densidad de población final de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

El mosto una vez sembrado con la levadura *Pichia fermentans* CECT 11773, es remontado y se deja fermentar a 18°C, entre 2 y 4 días, según el grado de aromas que se desee introducir en el caldo. Transcurrido este tiempo se realiza una nueva siembra con un pie de cuba, elaborado en las mismas condiciones que el anterior pero con *Saccharomyces cerevisiae* como cepa de levadura en cultivo. Esta cepa puede ser comercial o seleccionada de las poblaciones autóctonas. Desde el momento de la segunda siembra la fermentación se mantiene a 18°C durante 20 y 30 días, hasta que la concentración de azúcares reductores es inferior a 0.2 gr/L. En este momento la fermentación puede ser dada por terminada y el caldo debe ser filtrado. En algunos casos la concentración de anhídrido sulfuroso deberá ser corregida. Finalmente el vino se almacena a 4°C con el fin de conservarlo en buenas condiciones y precipitar los restos sólidos y el tartrato que se forme a esta temperatura.

Transcurridos entre 40 y 60 días, el vino es nuevamente filtrado y embotellado en atmósfera inerte.

### b) Aplicación a la fermentación para la obtención de vino tinto

Las uvas tintas son prensadas de forma ligera pero que asegura la rotura de las bayas. La pasta resultante es sulfitada hasta una concentración de 0.1 gr/L de sulfito total y el pH es corregido hasta 3.25.

Esta pasta es sembrada con un inóculo de *Pichia fermentans* CECT 11773 preparado como se describe en el

## ES 2 222 786 B1

apartado anterior. Para iniciar eficientemente el proceso de fermentación dicha pasta debe ser remontada 24 horas después de la siembra. La fermentación se mantiene a una temperatura entre 20°C y 24°C, durante 2 a 4 días.

Transcurrida esta primera fermentación se realiza la siembra con la segunda levadura *Saccharomyces cerevisiae* como cepa de levadura en cultivo. Esta cepa puede ser comercial o seleccionada de las poblaciones autóctonas. Esta siembra se realiza con un pie de cuba con mosto clarificado, que debe mantenerse a 24°C durante 24 horas o hasta que permita una densidad de población final, desde la siembra, de  $1 \times 10^6$  ufc/mL. La pasta de mosto puede volver a ser remontada para reactivar la fermentación y es mantenida entre 22°C y 24°C, durante 20 ó 30 días. Posteriormente se realiza una prensada de descube para eliminar las pieles de la uvas y los residuos sólidos. Inmediatamente el vino es enfriado hasta 4°C, para eliminar las lías, y es filtrado para eliminar las partículas no sedimentarias. Finalmente, según las necesidades de la bodega, el vino es almacenado hasta su embotellamiento como vino joven o hasta su almacenamiento en barrica.

La aplicación de la presente invención da lugar a un producto con un contenido en sustancias aromáticas más rico y variado que al realizar la fermentación por el método clásico de fermentación dirigida o por fermentación espontánea. La introducción en el cultivo de una considerable cantidad de *Pichia fermentans* CECT 11773 en condiciones de ventaja competitiva con las poblaciones salvajes es una novedad, que implica una mejora evidente sobre los procedimientos tradicionales, por cuanto se introduce una fase, en la técnica, destinada únicamente a la formación específica de aromas. Esta fase puede ser controlada y sus resultados cuantificados independientemente al proceso fermentativo global. En la actualidad, no existen documentos que protejan la aplicación de una fase específica de este tipo en la vinificación. Como se describe en los siguientes ejemplos la diferencia en composición química de sustancias aromáticas, entre el procedimiento de fermentación dirigida clásica y el de fermentación dirigida secuencial con diferentes levaduras que aquí se propone es cuantificable.

### 25 Ejemplo comparativo

#### *Producción de vino blanco de la variedad macabeo por fermentación dirigida clásica*

Se preparan 1000 L de mosto por prensado de la uva por un método convencional. Durante el momento del prensado el mosto es tratado con anhídrido sulfuroso (en forma gaseosa o de metabisulfito potásico) hasta una concentración de 0.1 gr/L. Posteriormente es clarificado por sedimentación o centrifugación. Seguidamente el caldo es tratado con la cantidad necesaria de ácido tartárico, para llevar su pH hasta 3.25.

El mosto es enfriado hasta que alcance una temperatura de 15°C a 17°C. En este momento se siembra con un pie de cuba de 50 L. Este pie de cuba está preparado a partir de mosto clarificado y sembrado con un precultivo de la levadura comercial *Saccharomyces* L2056, que se mantiene a 28°C, durante 24 horas en aireación, preferentemente por remonte mecánico. En estas condiciones la densidad de población de la levadura es tal que la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de mosto sembrado será aproximadamente de  $1 \times 10^6$ .

El mosto sembrado es remontado, para iniciar activamente la fermentación y permanece a 18°C durante 20 días o en todo caso hasta que la concentración de azúcares reductores sea menor de 0.2 gr/L.

En este momento la fermentación puede ser dada por terminada y el caldo debe ser filtrado. En algunos casos la concentración de anhídrido sulfuroso deberá ser corregida. Finalmente el vino se almacena a 4°C con el fin de conservarlo en buenas condiciones, precipitar los restos sólidos y el tartrato que se forme a esta temperatura.

Transcurridos entre 40 y 60 días, el vino es nuevamente filtrado y embotellado en atmósfera inerte.

El perfil de la composición de sustancias aromáticas implicadas en el sabor y aroma del vino, cuantificadas por cromatografía de gases, se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4

*Perfil cromatográfico de los aromas formados durante la fermentación de mosto macabeo con Saccharomyces L2056 por fermentación dirigida clásica. (a mg/l, b % v/v)*

|                               | L2056       |
|-------------------------------|-------------|
| Acetaldehido <sup>a</sup>     | 195.53±1.12 |
| AcidoAcetico <sup>a</sup>     | 23.57±0.62  |
| Acetato de etilo <sup>a</sup> | 66.92 ±0.21 |
| Metanol <sup>a</sup>          | 43.68±0.16  |



# ES 2 222 786 B1

TABLA 4 (continuación)

|                                 | L2056       |
|---------------------------------|-------------|
| Etanol <sup>b</sup>             | 8.95±0.98   |
| 1 propanol <sup>a</sup>         | 26.67±0.15  |
| 2 metil 1 propanol <sup>a</sup> | 68.87±0.15  |
| 2 metil 1 butanol <sup>a</sup>  | 118.84±0.09 |
| 3 metil 1 butanol <sup>a</sup>  | 160.14±0.06 |
| n butanol <sup>a</sup>          | 45.15±5.72  |
| 1 hexanol <sup>a</sup>          | 0           |
| Etil Caprilato <sup>a</sup>     | 255.09±1.01 |
| 2,3 Butenodiol <sup>a</sup>     | 22.47±0.81  |

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

## Ejemplo 1

### *Producción de vino blanco de la variedad macabeo por fermentación secuencial dirigida*

Se preparan 1000 L de mosto por prensado de la uva por un método convencional. Durante el momento del prensado el mosto es tratado con anhídrido sulfuroso (en forma gaseosa o de metabisulfito potásico) hasta una concentración de 0.1 gr/L. Posteriormente es clarificado por sedimentación o centrifugación. Seguidamente el caldo es tratado con la cantidad necesaria de ácido tartárico, para llevar su pH hasta 3.25.

El mosto es enfriado hasta que alcance una temperatura de 15°C a 17°C. En este momento se siembra con un pie de cuba de 50 L. Este pie de cuba está preparado a partir de mosto clarificado y sembrado con un precultivo de *Pichia fermentans* CECT 11773, que se mantiene a 28°C, durante 24 horas en aireación, preferentemente por remonte mecánico. En estas condiciones la densidad de población de la levadura es tal que la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de mosto sembrado será aproximadamente de  $1 \times 10^6$ .

El mosto una vez sembrado con *Pichia fermentans* CECT 11773, es remontado y se deja fermentar a 18°C, entre 2 y 4 días, según el grado de aromas que se desee introducir en el caldo. Transcurrido este tiempo se realiza una nueva siembra con un pie de cuba, elaborado en las mismas condiciones que el anterior pero con *Saccharomyces* L2056 como cepa de levadura en cultivo. Esta cepa puede ser comercial o seleccionada de las poblaciones autóctonas. Desde el momento de la segunda siembra la fermentación se mantiene a 18°C durante 20 a 30 días, hasta que la concentración de azúcares reductores es inferior a 0.2 gr/L. En este momento la fermentación puede ser dada por terminada y el caldo debe ser filtrado. En algunos casos la concentración de anhídrido sulfuroso deberá ser corregida. Finalmente el vino se almacena a 4°C con el fin de conservarlo en buenas condiciones, precipitar los restos sólidos y el tartrato que se forme a esta temperatura.

Transcurridos entre 40 y 60 días, el vino es nuevamente filtrado y embotellado en atmósfera inerte.

Por este procedimiento se obtiene un perfil de compuestos implicados en el aroma del vino que se representa en la Tabla 5.

# ES 2 222 786 B1

TABLA 5

Perfil cromatográfico de la composición en sustancias aromáticas formadas durante la fermentación dirigida secuencial con *Pichia fermentans* CECT 11773 y *Saccharomyces* L2056. Las columnas de valores representan las cantidades de compuestos producidos por fermentación con CECT 11773 2,3 ó 4 días y por resiembra hasta completar 20 días de fermentación con L2056

|                                       | <b>2 díasCECT11773<br/>+18 díasL2056</b> | <b>3 díasCECT11773<br/>+17 díasL2056</b> | <b>4 díasCECT11773<br/>+16 díasL2056</b> |
|---------------------------------------|--|--|--|
| <b>Acetaldehido<sup>a</sup></b>       | 319.87±10.5                              | 357.60±0.94                              | 364.17±1.21                              |
| <b>AcidoAcetico<sup>a</sup></b>       | 21.16±0.02                               | 21.57±0.20                               | 23.68±0.91                               |
| <b>Acetato de etilo<sup>a</sup></b>   | 86.79±0.18                               | 86.70±0.02                               | 84.96±2.57                               |
| <b>Metanol<sup>a</sup></b>            | 43.6±0.28                                | 42.74±0.06                               | 43.15±0.07                               |
| <b>Etanol<sup>b</sup></b>             | 10.23±0.06                               | 9.79±0.06                                | 8.82±0.04                                |
| <b>1 propanol<sup>a</sup></b>         | 27.40±0.30                               | 26.36±0.06                               | 28.86±0.22                               |
| <b>2 metil 1 propanol<sup>a</sup></b> | 69.2±0.30                                | 68.40±0.01                               | 68.65±0.05                               |
| <b>2 metil 1 butanol<sup>a</sup></b>  | 119.48±0.56                              | 118.57±0.03                              | 120.77±0.04                              |
| <b>3 metil 1 butanol<sup>a</sup></b>  | 164.23±0.81                              | 162.53±0.52                              | 173.04±2.89                              |
| <b>n butanol<sup>a</sup></b>          | 84.1±0.85                                | 89.41±0.86                               | 90.70±0.28                               |
| <b>1 hexanol<sup>a</sup></b>          | 207.3±0                                  | 206.50±1.99                              | 220.7±0                                  |
| <b>Etil Caprilato<sup>a</sup></b>     | 256.43±6.36                              | 302.70±1.14                              | 351.04±0.06                              |
| <b>2,3 Butenodiol<sup>a</sup></b>     | 218.45±2.33                              | 296.34±14.81                             | 305.34±6.50                              |

## Ejemplo 2

Fermentación de mosto de uva procedente de concentrado por fermentación dirigida secuencial

El mosto de uva concentrado se diluye hasta una concentración de azúcares reductores comprendida entre 20 y 25% w/v. Se corrige el pH hasta 3.25 añadiendo la correspondiente cantidad de ácido tartárico y se sulfita hasta una concentración de 0.1 gr/L. Las sucesivas siembras con las diferentes levaduras y el procedimiento fermentativo se realizan como se describe en el ejemplo 1.

# ES 2 222 786 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Levadura vínica perteneciente a la especie *Pichia fermentans* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, con número de identificación CECT 11773, **caracterizada** por presentar regiones no transcribibles flanqueantes del DNA codificante del RNA ribosómico 5S, que corresponde a la secuencia SEQ. ID NO1 registrada en el GeneBank con el número de acceso: AY027508.

10 2. Levadura vínica según reivindicación 1, **caracterizada** porque presenta una tolerancia de concentración alcohólica superior a 5% v/v.

15 3. Levadura vínica según reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque presenta una tolerancia al anhídrido sulfuroso de hasta 0,15 gr/l.

20 4. Levadura vínica según reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque produce un máximo de 5% de etanol.

25 5. Levadura vínica según reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque presenta una elevada capacidad de fermentar, es decir con una producción de etanol del 5% durante 2 a 4 días, a temperaturas comprendidas entre 15°C y 24°C.

30 6. Procedimiento de fermentación secuencial dirigida que comprende la utilización de la levadura CECT 11773, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

35 a) tratamiento del mosto con anhídrido sulfuroso hasta una concentración de 0,1 g/l;

40 b) tratamiento del caldo resultante con ácido tartárico hasta llevar su pH a 3,25;

45 c) preparación de un pie de cuba entre 2,5 y 5% v/v del volumen de mosto a fermentar;

50 d) sembrado con un precultivo de la levadura *Pichia fermentans* CECT 11773 durante un tiempo de 2 a 4 días, y a una temperatura entre 15°C a 24°C;

55 e) preparación de un pie de cuba en las mismas condiciones que las anteriormente mencionadas;

60 f) sembrado con un precultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante un tiempo de 20 a 30 días, y a una temperatura entre 18°C y 24°C;

65 g) eliminación de residuos sólidos y filtrado;

70 h) almacenamiento del vino obtenido, a una temperatura de 4°C hasta su posterior embotellado o crianza en bodega.

75 7. Procedimiento según reivindicación 6, **caracterizado** porque en la producción de vino tinto, la etapa d) se realiza preferentemente a una temperatura entre 20°C a 24°C.

80 8. Procedimiento según reivindicación 6, **caracterizado** porque en la producción de vino tinto, la etapa f) se realiza preferentemente a una temperatura entre 22°C a 24°C.

85 9. Procedimiento según reivindicación 6, **caracterizado** porque en la producción de vino blanco, la etapa d) se realiza preferentemente a una temperatura de 18°C.

90 10. Procedimiento según reivindicación 6, **caracterizado** porque en la producción de vino blanco, la etapa f) se realiza preferentemente a una temperatura de 18°C.

95 11. Uso de la levadura CECT 11773, en fermentación secuencial dirigida para la producción de vinos.

# ES 2 222 786 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Almería

5 <120> Procedimiento de fermentación dirigida secuencial, nueva cepa que interviene en el mismo, y su aplicación industrial.

<130> P00002595/2002

10

<140> P200202743

<141> 2002-11-28

15

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 444

<212> DNA

<213> *Pichia fermentans*

25

<400> 1

|    |  |            |
|----|--|------------|
|    | <b>tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta ctgtgattta tatcttatac acatgcgtga</b> | <b>60</b>  |
| 30 | <b>gcgcatcaaa cacctaaaat tgtaataata ccagtcacta agttttaaca aaacaaaact</b> | <b>120</b> |
|    | <b>ttcaacaacg gatctcttgg ttctcgcac gatgaagagc gcagcgaaat gcgataccta</b>  | <b>180</b> |
|    | <b>gtgtgaattg cagccatcgt gaatcatcga gttcttgaac gcacattgcg ccccatggta</b> | <b>240</b> |
| 35 | <b>ttccatgggg catgcctgtc tgagcgtcgt ttccttcttg cgcaagcaga gttgagaaca</b> | <b>300</b> |
|    | <b>ggctatgcct ttttcgaaat ggaacgtcgt ggacgaagtg aactaaactt ttagcacgct</b> | <b>360</b> |
| 40 | <b>ttggccgccg aacttttaac taagctcgac ctcagatcag gtaggaatac ccgctgaact</b> | <b>420</b> |
|    | <b>taagcatatc aataagccgg agga</b>  | <b>444</b> |

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 222 786

② Nº de solicitud: 200202743

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.11.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/16, C12G 1/022 // (C12N 1/16, C12R 1:84)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X         | LAS HERAS-VÁZQUEZ, F.J.; MINGORANCE CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Research 2003, Vol. 3, páginas 3-9. Publicado en línea 25. Julio 2002.                        | 1-5                        |
| A         |  | 6,11                       |
| A         | GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E. et al. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Archives of Microbiology, 1998, Vol. 169, páginas 387-392.   | 1-6,11                     |
| A         | HUANG, C.-Jr.; LEE, S.-L.; CHOU, C.-C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by Pichia fermentans L-5 under various culture conditions. Food Research International, 2001, Vol. 34, páginas 277-282.   | 1-6,11                     |
| A         | MADRID VICENTE, A.; MADRID CENZANO, J.; MADRID CENZANO, A. Tecnología y Legislación del Vino y Bebidas Derivadas. Edición ampliada. Madrid. Editoriales A. Madrid Vicente, Ediciones y Mundi-Prensa Libros, S.A., 1994, ISBN 84-87440-63-0 (A. Madrid Vicente, Ediciones) y 84-7114-487-5 (Mundi-Prensa Libros, S.A.). Páginas 87,104,105,119,138,139,148,149. | 6-10                       |

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

30.11.2004

**Examinador**

E. Relaño Reyes

**Página**

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 222 786

② Nº de solicitud: 200202743

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.11.2002

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/16, C12G 1/022 // (C12N 1/16, C12R 1:84)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | TORO, M.E. y VÁZQUEZ, F. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of <i>Candida cantarellii</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wine yeast. <i>World Journal of Microbiology &amp; Biotechnology</i> . Mayo-Junio 2002, Vol. 18, nº 4, páginas 347-354. | 6-8                        |
| A         | ES 8507605 A1 (HICKINBOTHAM WINEMARKERS PTY. LTD.) 01.10.1985, ejemplo, página 16, línea 23 - página 18, línea 14.  | 6                          |
| A         | FR 2654742 A1 (FRANCOIS, O.) 24.05.1991, página 4, líneas 5-12.   | 6                          |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.11.2004

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

2/2