



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 015**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745494 .1**

96 Fecha de presentación : **07.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1395649**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54

Título: **Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas y medio de rehidratación.**

30

Prioridad: **08.06.2001 FR 01 07535**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Lallemand S.A.S.**
19, rue des Briquetiers
31700 Blagnac, FR

72

Inventor/es: **Dulau, Laurent;**
Ortiz-Julien, Anne y
Trioli, Gianni

74

Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 269 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas y medio de rehidratación.

5 La presente invención se refiere al campo de la técnica de la producción de bebidas alcohólicas, en particular al de la producción de vinos. En este campo, los problemas asociados a las fermentaciones representan una pérdida de ganancias importante en términos económicos. Efectivamente, estos problemas de fermentaciones se traducen, en cuanto a los vinos, en pérdidas de rendimiento, calidad, e incluso a veces en pérdidas de volumen. Por lo tanto es importante para las empresas de este tipo disminuir la frecuencia de aparición de problemas de fermentación.

10 Ahora, de forma extendida, se usan cultivos puros de levaduras para permitir un inicio rápido y un desarrollo regular de la fermentación de los mostos de uva. Los cultivos puros de levaduras de vinificación son cepas seleccionadas de la familia *Saccharomyces* que en general pertenecen a las especies *cerevisiae*, *uvarum* o *bayanus*.

15 Sin embargo, uno de los momentos críticos de la fermentación sigue siendo el final de esta fermentación. Es esencial poder terminar esta reacción con una velocidad de consumo de los azúcares suficiente para evitar situaciones de parada o de fermentaciones ralentizadas que representan situaciones de riesgo en las que otros microorganismos, en particular bacterias lácticas, pueden entonces colonizar rápidamente el medio de fermentación parando definitivamente la fermentación alcohólica. Algunos de estos microorganismos usarán los azúcares residuales para producir metabolitos indeseables como por ejemplo ácido acético, que conllevan pérdidas de calidad en el vino afectado.

20 Se entiende por fermentaciones problemáticas las fermentaciones que corresponden a dos tipos de situaciones: las fermentaciones lentas y las fermentaciones ralentizadas. La velocidad de fermentación de un medio se define como la cantidad de dióxido de carbono desprendido por unidad de tiempo. Se representa mediante la curva obtenida de la cantidad de dióxido de carbono desprendido en función del tiempo $V = dCO_2/dt$.

25 En las fermentaciones lentas, las velocidades máximas observadas durante la fermentación son poco elevadas. Estas fermentaciones lentas en general se deben a poblaciones de levaduras que presentan una actividad metabólica débil, en general asociadas a una falta de nitrógeno asimilable de los mostos.

30 Las fermentaciones ralentizadas o las paradas de fermentación se caracterizan por una velocidad máxima de fermentación relativamente elevada, pero que disminuye progresivamente, volviéndose muy débil la viabilidad de las levaduras. Estas fermentaciones entonces se ralentizan mucho o se paran totalmente ya que la población de levaduras es insuficiente para asegurar la terminación de consumo de los azúcares. En la mayoría de los casos, este tipo de fenómeno se observa cuando hay carencias de oxígeno o fuertes carencias de nitrógeno.

35 Se sabe que estas fermentaciones problemáticas muy a menudo están asociadas a desequilibrios o a carencias de los nutrientes del medio (Alexandre y col., *J. of Ind. Microbiol. and Biotechnology*, vol. 20, 1998: páginas 20-27). En efecto, son necesarios diferentes nutrientes para permitir que las levaduras, por una parte se desarrollen bien con el fin de colonizar el medio de fermentación y por otra parte asegurar eficazmente el metabolismo de los azúcares en alcohol y éste hasta el agotamiento total de estos azúcares. Estos nutrientes pertenecen en particular, a las siguientes categorías: fuentes de nitrógeno, fuentes de oxígeno, vitaminas y sales minerales.

40 El nitrógeno asimilable está constituido por nitrógeno amoniacal y nitrógeno α -aminado. Es el nutriente que más influye en la velocidad de fermentación alcohólica (Agenbach, Proc. South African Soc. Enol. Vitic, Cape town, South Africa. Stellenbosh SA, 1977: páginas 66-87). El nitrógeno es un elemento esencial, puesto que permite la síntesis de las proteínas y por lo tanto el crecimiento de las levaduras. Su carencia en el mosto por una parte limita el crecimiento de las levaduras y por lo tanto la velocidad de fermentación, y por otra parte induce una disminución importante de la actividad de transporte de los azúcares, aumentando así el riesgo de parada de la fermentación o de fermentación ralentizada. Una carencia de nitrógeno también puede conllevar una desviación del metabolismo de la levadura, conduciendo, en particular, a la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S), nefasta para las características aromáticas del vino.

45 En general los mostos contienen entre 80 y 400 mg/l mientras que el umbral de carencia se sitúa hacia 150-180 mg/l. Por lo tanto, una carencia de nitrógeno del mosto es un riesgo importante para el buen desarrollo de la vinificación.

50 El oxígeno tiene una función primordial en la fermentación alcohólica. Asegura el buen desarrollo de la población de levaduras y el mantenimiento de una buena viabilidad de las levaduras. Permite la síntesis de compuestos lipídicos tales como los esteroides o los ácidos grasos insaturados que constituyen la membrana celular de las levaduras y suponen una mejor resistencia al etanol. La fluidez de la membrana es, en efecto, función de la relación de ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados. La presencia de ácidos grasos insaturados es, por lo tanto, primordial para esta resistencia al alcohol.

55 Las necesidades mínimas de O_2 para el buen desarrollo de una fermentación se pueden calcular en aproximadamente 5-10 mg/l (Sablayrolles y Barre. *Sci. Alim.*, vol. 6, 1986: páginas 373-383). Sin embargo, el oxígeno es consumido muy rápidamente al principio de la fermentación, por una parte por las enzimas (en caso de pudrición: lacasa) y por otra parte la flora de levaduras oxidativas. Por lo tanto, esto induce a los viticultores a añadir oxígeno en el curso de la

fermentación, antes de agotarse el medio. Por lo tanto, el momento de adición de este elemento (media fermentación, después de multiplicación de las células y dilución de los lípidos de la flora fermentativa) es primordial.

5 Otro medio conocido para evitar los problemas de fermentación ligados a una carencia de oxígeno es la adición al mosto de ácidos grasos insaturados, esteroides o compuestos ricos en estas moléculas tales como las burbas y algunos derivados de levaduras.

10 Algunas vitaminas tienen una función esencial en el desarrollo de la fermentación alcohólica. La biotina, por ejemplo, favorece la producción de ésteres y permite una mayor viabilidad celular al final de la fermentación. En el caso de carencia, el crecimiento celular es afectado de forma significativa. El pantotenato, implicado en el metabolismo de los lípidos, tiene un efecto positivo en las cualidades organolépticas: disminuye el riesgo de producción de H₂S así como la acidez volátil. Finalmente, la tiamina, cuya función ha sido objeto de numerosos estudios, es otra de las vitaminas que puede ser limitante y cuya carencia puede provocar paradas de fermentación. Esta deficiencia a menudo se debe a determinados tratamientos prefermentativos realizados en condiciones mal controladas (sulfitación, calentamiento). En efecto, la tiamina tiene la propiedad de combinarse rápidamente con el SO₂ y entonces ya no está biodisponible. Además, puede desaparecer rápidamente del medio. Efectivamente, se ha demostrado (Bataillon y col., *J. Ferm. Bioeng.*, vol. 82, 1996: páginas 145-150) que en presencia de 106 células de *Saccharomyces cerevisiae*/ml, la casi totalidad de la tiamina ha desaparecido en 2 a 3 horas, pudiendo las levaduras acumularla en concentraciones importantes. Además, la flora nativa que no son levaduras consume este elemento, a veces más rápidamente que 20 *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros nutrientes como el magnesio, cinc, manganeso o potasio son igualmente importantes para la actividad de la levadura. El magnesio en particular tiene una función esencial en el control del crecimiento celular y el metabolismo de las levaduras. Permite una mejor resistencia a la temperatura y a la presión osmótica. Interviene en el mantenimiento de la integridad celular (estabilización de los ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y proteínas) (Walker, *Critic. Rev. Biotechnol.*, vol. 14, 1994: páginas 311-354). Las adiciones de magnesio aumentan la producción de etanol. El cinc también es muy importante, ya que es un cofactor de enzimas de la glucólisis; permite una mejor tolerancia al alcohol y tiene una función importante en la producción de ésteres.

30 Aunque las carencias de estos elementos minerales en el medio de fermentación son poco frecuentes, raramente están presentes en forma biodisponible. En efecto, estos cationes pueden estar ligados a diferentes tipos de moléculas en el mosto, tales como proteínas y polifenoles, que la levadura no puede usar.

35 Por lo tanto, la composición de los mostos en nutrientes útiles para la levadura se considera una característica crucial para llevar a cabo bien la vinificación. La eventualidad de una carencia en uno u otro hace que se corra un riesgo importante en cuanto al producto que finalmente se obtendrá. Por esto, para paliar estos riesgos de carencias se han propuesto y actualmente se ponen en práctica algunas soluciones.

40 Hoy en día se llevan a cabo varias prácticas con el fin de complementar los mostos con carencias a lo largo de la fermentación y disminuir la frecuencia de aparición de fermentaciones problemáticas:

- Para las carencias de nitrógeno: se aconseja la adición al mosto a media fermentación de fosfato diamónico o sulfato amónico (Sablayrolles y col., *J. Ferm. Bioeng.*, vol. 82, 1996: páginas 377-381).
- 45 - Para las carencias de oxígeno y de factores de crecimiento, la adición al mosto de burbas finas permite controlar la turbidez y aportar nutrientes tales como esteroides y ácidos grasos insaturados (Delfini y col., *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 44, 1993: páginas 86-92). No obstante, en la práctica no siempre es fácil realizar esta adición en las bodegas. Por esto se ha propuesto la adición de productos complejos que contienen levaduras inactivadas, con el fin de compensar las carencias del mosto. Estos productos en general contienen, además de las levaduras inactivadas o cortezas de levaduras, fosfato amónico y tiamina. Además de su aporte nutritivo, influyen en la calidad global de los vinos. La eficacia de la adición de dichos productos se ha demostrado en numerosas situaciones enológicas (Trioli, *Vitic. Enol. Sci.*, vol. 51 (3), 1996: páginas 204-209).

55 Recientemente, se ha desarrollado un medio de intervención particularmente eficaz, con el fin de disminuir los riesgos de detención de la fermentación (Sablayrolles y col. *J. Ferm. Bioeng.* vol. 82, 1996: páginas 377-381). Consiste en realizar simultáneamente un aporte de nitrógeno y oxígeno al mosto. Se constata así que los efectos se suman. Sin embargo, es primordial que estas adiciones combinadas sean controladas, siendo esenciales el momento de los aportes y la cantidad de nutrientes aportada.

60 Finalmente, la adición de tiamina es una práctica corriente. De forma habitual se añade al principio de la fermentación, lo que hace que esté muy poco disponible para la levadura encargada de asegurar la fermentación alcohólica.

65 Por otra parte, hay que indicar que estudios recientes sobre la caracterización de las necesidades de nitrógeno asimilable y de oxígeno de diferentes levaduras fermentativas, permiten a los profesionales elegir la levadura en función de la calidad nutritiva del mosto que se va a fermentar (Julien y col., *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 51 (3), 2000: páginas 215-222). No obstante, este conocimiento no permite liberarse de la corrección de los mostos en algunos factores nutritivos.

Así pues, todas las soluciones técnicas descritas y usadas hasta el momento se basan en el mismo principio: realizar uno o varios aportes al mosto de nutrientes indispensables para la actividad fermentativa de la levadura al principio o en el curso de la fermentación.

5 Estos procedimientos no permiten proporcionar directamente a la levadura los nutrientes útiles en cantidad y/o concentración suficientes para mantener una velocidad de fermentación elevada hasta el final de la fermentación, ni de liberarse del problema de la disponibilidad de algunos elementos esenciales para el buen desarrollo de la levadura de fermentación.

10 Por consiguiente, a pesar de la aplicación de estas técnicas existe todavía un gran número de situaciones de fermentación problemáticas.

15 En estos últimos veinte años, se ha generalizado el uso de fermentos seleccionados en forma seca (Levaduras Secas Activas, LSA). Antes de su uso, es necesario llevar a cabo una etapa de rehidratación. Este etapa, relativamente sencilla de llevar a cabo, es, sin embargo, capital para la calidad del fermento una vez rehidratado (Monk, Proceedings of the ASVO Seminar: Advances in Juice Clarification and Yeast Inoculation. Melbourne, Aus. 22-23, 1997).

20 Muchos autores han proporcionado las bases teóricas y han descrito las transformaciones estructurales y bioquímicas que se producen en las células de levadura durante las operaciones de deshidratación y rehidratación (M.J. Bakers y col., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 35, 1987, pp. 127-171). Las condiciones óptimas que hay que usar en la rehidratación para evitar cuanto sea posible la destrucción de las células, también han sido objeto de diversos estudios. Uno de los más completos lo han realizado Radler y col., sobre la rehidratación de levaduras de vinificación (Von F. Radler y col., *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, vol 3, 1985, pp. 73-77). También se puso de manifiesto que la composición del medio de rehidratación tenía influencia en la actividad metabólica de la levadura
25 medida durante las dos primeras horas después de la rehidratación. En particular, las mezclas de zumos de uva y agua y las soluciones que contenían una cantidad definida de glucosa, fructosa, ácido málico, aminoácidos, ácido 2-cetoglu-tárico, sulfato amónico, vitaminas o KCl, CaCl₂ y NaCl, tuvieron un efecto más o menos marcado sobre la actividad metabólica de las células de levadura seca, obteniéndose el mayor aumento de actividad con una solución de KCl al 1%.

30 Este estudio, como la mayoría de los realizados en este campo, tenía por objeto obtener una tasa de células revividas lo más alta posible gracias a condiciones de rehidratación definidas, siendo el criterio decisivo la capacidad de la levadura para retomar una actividad fermentativa elevada en el plazo más breve posible. La composición de los medios de rehidratación se ha concebido en función de este criterio, se ha probado en ensayos de corta duración, y la naturaleza de los componentes de dichos medios y las concentraciones usadas apuntan esencialmente a conservar la integridad de la membrana celular y a estabilizar la presión osmótica, por ejemplo, por adición de sales.

35 Sin embargo, no se ha puesto de manifiesto que condiciones de rehidratación particulares de las levaduras puedan tener influencia a más largo plazo sobre la actividad fermentativa de las células de levadura. En particular, hasta ahora no se ha sugerido más que una solución que permita evitar las fermentaciones problemáticas, que se busca en las condiciones de rehidratación de las levaduras, es decir, antes de introducirlas en el mosto que se va a fermentar.

40 De forma sorprendente e inesperada, se ha encontrado que la rehidratación de las levaduras secas activas (LSA) en un medio al que se ha añadido un complejo nutritivo que comprende derivados de levaduras y opcionalmente otros nutrientes, permite aumentar las capacidades de fermentación de las levaduras resultantes de esta etapa de rehidratación, en particular al final de la fermentación, mientras que la adición de este tipo de complejo en el mosto no permitía observar dichos efectos.

45 Por lo tanto, la presente invención propone un procedimiento que permite prevenir las fermentaciones problemáticas, en particular gracias al uso de medios de rehidratación de las levaduras secas activas particulares, así como la aplicación de este procedimiento a la producción de vinos y otras bebidas alcohólicas producidas por fermentación.

50 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de rehidratación de levaduras secas activadas para la fermentación alcohólica, en el que dichas levaduras secas activas se ponen en un medio acuoso que contiene al menos levaduras inactivas o un derivado de levadura en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio. De acuerdo con una variante del procedimiento según la invención, el medio de rehidratación de las LSA puede contener también uno o varios nutrientes complementarios susceptibles de encontrarse en una concentración o con una disponibilidad insuficientes en el mosto. Estos elementos nutritivos complementarios se eligen entre fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, vitaminas, sales minerales, ácidos grasos, esteroides o azúcares naturales ricos en estos
60 elementos.

65 Las levaduras secas activas referidas son todas las levaduras de vinificación usadas para sembrar los mostos de uvas, con el fin de asegurar un buen inicio y un desarrollo regular de la fermentación. Se trata, en particular de levaduras de la familia de *Saccharomyces*, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras inactivas y los derivados de levaduras son bien conocidos para el experto en la materia y están disponibles en el comercio. Se entiende que en el presente procedimiento se pueden usar levaduras inactivas enriquecidas en sales minerales, como por ejemplo las descritas en la solicitud de patente GB 98 1110.02, o levaduras inactivas

ES 2 269 015 T3

enriquecidas con cualquier otro nutriente. Los derivados de levadura son todos los productos susceptibles de obtenerse a partir de células de levaduras enteras o fraccionadas, por acción física o química. Comprenden, en particular, los extractos de levadura obtenidos por autólisis y las cortezas de levaduras. Se presentan, lo más habitualmente, en forma de polvo más o menos fino después de molienda, y según la invención se usan en suspensión en el medio de rehidratación.

El medio de rehidratación usado tiene como base un medio acuoso que puede ser azucarado o no. En el caso de un medio azucarado, se usa preferiblemente, como se hace habitualmente en la práctica, agua glucosada o zumo de uva, sacado, en general, del mosto que se pretende fermentar.

Las levaduras inactivas o derivados de levadura así como los nutrientes complementarios se introducen en el medio base, y después se añaden las LSA de forma que la rehidratación se desarrolle desde el inicio en el medio así definido. Así pues, el procedimiento según la invención comprende esencialmente las etapas que consisten en:

- a) preparar un medio de rehidratación que comprende, en un medio azucarado o no azucarado,
 - i) al menos levaduras inactivas o un derivado de levadura,
 - ii) y, además, opcionalmente uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, vitaminas, sales minerales, ácidos grasos, esteroides o azúcares naturales ricos en estos elementos,
- b) introducir las levaduras secas activas en el medio de rehidratación así preparado;
- c) incubar el medio de rehidratación que contiene las levaduras secas activas.

Según un aspecto particular de la invención, el procedimiento se puede llevar a cabo de la siguiente forma. Se introduce en el medio acuoso base

- i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio, y
- ii) y opcionalmente uno o varios nutrientes complementarios elegidos entre sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; un ácido graso, un esteroide, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos tal como en especial las burbas; tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; fosfatos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso, o una combinación de estas sales minerales, aportando cada nutriente complementario elegido con una concentración de 200 a 1000 veces superior, preferiblemente 500 veces superior, a la que tendrá en el mosto que va a fermentar.

Después, se introducen las levaduras secas activas en el medio de rehidratación así preparado en una cantidad de 50 a 150 g/l, preferiblemente 100 g/l de medio, y se incuba el medio de rehidratación que contiene las levaduras secas activas a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C, preferiblemente 37°C, durante 20 a 40 minutos, preferiblemente 30 minutos.

En otros términos, las LSA son rehidratadas en un medio bastante más concentrado en nutrientes de lo que será el mosto en el que van a desarrollar su actividad de fermentación. Durante la siembra, el inóculo que contiene las células de LSA revividas y el medio de rehidratación, aporta el conjunto de sus componentes al mosto. El factor de dilución será función de los volúmenes respectivos de medio de rehidratación/medio de fermentación. De forma inesperada, esta relación se fija de forma ventajosa de manera que las concentraciones de los nutrientes complementarios en el mosto sean del mismo orden de magnitud de las concentraciones introducidas habitualmente en los mostos al principio o en el curso de la fermentación. Por ejemplo, si C1 es la concentración deseada del nutriente N1 en el mosto, y el volumen de siembra es de 20 ml por un litro de mosto, es decir un factor 500, entonces el medio de rehidratación deberá contener N1 en una concentración del orden de 500 x C1.

Según un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento se puede llevar a cabo de la siguiente forma. Se introduce en el medio acuoso base

- i) las levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio,
- ii) y, además, uno o varios de los siguientes componentes: 20 a 50 mg/l de pantotenato de calcio, 0,15 a 0,30 mg/l de biotina, 20 a 60 mg/l de sal de cinc, 200 a 500 mg/l de sal de magnesio, 2 a 5 mg/l de sal de manganeso.

Después, se introducen las levaduras secas activas en el medio de rehidratación así preparado, en una cantidad de 50 a 150 g/l, preferiblemente 100 g/l de medio; y finalmente se incuba el medio de rehidratación que contiene

ES 2 269 015 T3

las levaduras secas activas a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C, preferiblemente 37°C, durante 20 a 40 minutos, preferiblemente 30 minutos.

5 Otro objeto de la presente invención es un medio de rehidratación de levaduras secas activas, susceptible de usarse en el procedimiento previamente descrito. Dicho medio comprende al menos, en un medio base acuoso

- i) levaduras inactivas o extractos de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio,
- 10 ii) y, además, opcionalmente uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, vitaminas, sales minerales, ácidos grasos, esteroides o fuentes naturales ricas en estos elementos.

De forma ventajosa, en dicho medio de rehidratación se introducen en un medio acuoso, azucarado o no,

- 15 i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio, y
- ii) uno o varios nutrientes elegidos entre sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; un ácido graso, un esteroide, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos tal como en especial las burbas; tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; fosfatos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso, o una combinación de estas sales minerales, con una concentración de 200 a 1000 veces superior, preferentemente 500 veces superior, a la que tendrá en el mosto que va a fermentar.

25 En particular, el medio de rehidratación de levaduras secas activas según la invención puede contener al menos,

- i) levaduras inactivas o extractos de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio,
- 30 ii) uno o varios de los siguientes componentes: 27 mg/l de pantotenato de calcio, 0,2 mg/l de biotina, 50 mg/l de sulfato de cinc, 433 mg/l de sulfato de magnesio, 4 mg/l de sulfato de manganeso; en un medio acuoso, preferiblemente agua glucosada en una cantidad de 50 g/l o zumo de uva.

35 También es un objeto de la presente invención, una composición seca dirigida a la preparación de un medio de rehidratación de levaduras secas activas, que comprende al menos

- i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en forma deshidratada en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio,
- 40 ii) uno o varios nutrientes complementarios elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, vitaminas, sales minerales, ácidos grasos, esteroides o fuentes naturales ricas en estos elementos.

Dicha composición seca puede contener en particular, especialmente

- 45 i) al menos 98% en peso de levaduras inactivas o de derivado de levadura, en forma deshidratada,
- ii) uno o varios nutrientes elegidos entre sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; un ácido graso, un esteroide, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos tal como en especial las burbas; tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; fosfatos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso, o una combinación de estas sales minerales.

De forma ventajosa, podrá estar constituida por

- 55 i) aproximadamente 99,3% en peso de levaduras inactivas o de derivado de levadura, en forma deshidratada
- ii) uno o más nutrientes elegidos entre ácido pantoténico, biotina, una sal de cinc, una sal de magnesio, una sal de manganeso.

60 El inóculo, preparado por el procedimiento de rehidratación de las LSA según la invención o con ayuda del medio de rehidratación reivindicado, se podrá usar para sembrar un mosto dirigido a la producción de una bebida alcohólica fermentada. Se introducirá en el mosto en una cantidad previamente definida en función de las concentraciones de LSA, levadura inactiva o derivados de levadura y nutrientes complementarios introducidos en el medio de rehidratación, según los criterios de dilución definidos en lo que antecede, es decir de 200 a 1000 veces, preferiblemente 500 veces.

ES 2 269 015 T3

La presente invención tendrá una aplicación natural en la producción de una bebida alcohólica fermentada a partir de un zumo de uva, tal como un vino.

Los siguientes ejemplos ilustran de forma no limitante, los modos de realización de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Mejora del perfil de fermentación de un mosto sintético por incorporación de un extracto de levadura en el medio de rehidratación de la levadura de fermentación

Se llevaron a cabo tres fermentaciones en paralelo y por duplicado en un mosto sintético MS 70-fa (como el descrito por Bely y col. (1990)) que correspondía a un medio con carencia de nitrógeno asimilable (100 mg/l) y que contenía 200 g/l de azúcares fermentables. La levadura seca activa usada es la levadura comercial Lalvin EC1118™.

Medio de rehidratación

Mo: Medio de rehidratación testigo: agua con adición de glucosa 50 g/l.

Me: Medio de rehidratación que contiene un extracto de levaduras (Bacto-yeast extract ref. 0127-01-7, DIFCO, EE.UU.) usado con una dosis que permite una concentración final de extracto en el mosto de fermentación de 30 g/hl, es decir 150 g/l de medio de rehidratación.

Rehidratación

1 - Se rehidrata 1 gramo de levadura seca activa Lalvin EC1118™ en

10 ml de medio Mo a 37°C durante 30 minutos.

2 - Se rehidrata 1 gramo de levadura seca activa Lalvin EC1118™ en 10

ml de medio Me a 37°C durante 30 minutos.

Fermentación

Fo: Fermentación testigo llevada a cabo con la levadura rehidratada en el medio Mo. No hay presente ningún extracto de levadura.

F1: Fermentación llevada a cabo con la levadura rehidratada en el medio Mo. Se vuelve a añadir un extracto de levadura al principio de la fermentación alcohólica directamente al mosto sintético en una cantidad de 30 g/hl.

F2: Fermentación llevada a cabo con la levadura rehidratada en el medio Me que contiene el extracto de levadura que se encuentra en un nivel de 30 g/hl en el mosto sintético.

Tres fermentadores que contienen 1,1 litros de mosto sintético MS70-fa, se inoculan con 2,2 ml de solución de rehidratación (lo que corresponde a una dosis de uso de 20 g/hl de levadura seca activa). La temperatura de fermentación es de 24°C. Se registra la producción de CO₂ en función del tiempo.

Los resultados obtenidos (figura 1) muestran que la fermentación llevada a cabo por la levadura rehidratada en presencia de extracto de levadura en el medio de rehidratación (modalidad F2) termina antes que las otras dos fermentaciones (modalidades Fo y F1). La cinética del final de la fermentación caracterizada por la pendiente de la curva es más rápida en la modalidad F2, lo que explica la ganancia de tiempo observada de aproximadamente 50 horas con respecto a las otras modalidades. La adición de extracto de levadura al principio de la fermentación alcohólica, en estas condiciones no permite mejorar el perfil de fermentación con respecto a la modalidad testigo Fo.

Ejemplo 2

Mejora del perfil de fermentación de un mosto real de Chardonnay por incorporación de un extracto de levadura en el medio de rehidratación de la levadura de fermentación

Se llevan a cabo dos fermentaciones en paralelo y por duplicado en un mosto real de Chardonnay procedente del sur de Francia (región de Languedoc) que contiene 365 mg/l de nitrógeno asimilable (situación de no carencia) y que

ES 2 269 015 T3

contiene 220 g/l de azúcares fermentables. La levadura seca activa usada es la levadura comercial Lalvin EC1118™, inoculada con una dosis de 20 g/hl.

Rehidratación

5

Se rehidrata 1 gramo de la levadura seca Lalvin EC1118™ en 10 ml de agua glucosada (50 g/l) a 37°C durante 30 minutos. En la rehidratación testigo no se lleva a cabo ninguna adición. En la modalidad 2, se añaden 1,5 g de extracto de levadura (Bacto-yeast extract ref. 0127-01-7, DIFCO, EE.UU.) a los 10 ml de medio de rehidratación.

10 Fermentación

Las dos fermentaciones corresponden a las siguientes modalidades:

- 15 F1: Fermentación llevada a cabo con la levadura EC1118™ rehidratada en un medio de rehidratación en ausencia de extracto de levadura. El extracto de levadura se añade al principio de la fermentación alcohólica directamente en el mosto de Chardonnay con una dosis de 30 g/hl.
- 20 F2: La fermentación se lleva a cabo con la levadura EC1118™ rehidratada en presencia de un extracto de levadura (usado con una dosis que permite una concentración de 30 g/hl en el mosto) en el medio de rehidratación.

25 Los fermentadores de 1,1 litros se inoculan con 2,2 ml de solución de rehidratación que contiene las LSA, lo que corresponde a una dosis de inoculación en el mosto de 20 g/hl de levaduras secas activas. La temperatura de fermentación es de 24°C. Se registra la producción de CO₂ en función el tiempo.

30 Los resultados obtenidos (figura 2) muestran que la fermentación llevada a cabo por la levadura rehidratada en presencia de extracto de levadura en el medio de rehidratación (modalidad F2) termina antes que la fermentación testigo F1. La cinética del final de la fermentación caracterizada por la pendiente de la curva es más rápida en la modalidad F2, lo que explica la ganancia de tiempo observada con respecto a la modalidad testigo. Incluso en ausencia de carencia de nitrógeno asimilable, la adición de extracto de levadura durante la rehidratación, permite mejorar el final de la fermentación alcohólica al influir en la cinética de fermentación (pendiente de la curva del final de la fermentación de 42° comparado con 26° en la fermentación testigo). De esta forma, el resultado del ejemplo 1 observado en el mosto sintético se confirma en el mosto real, es decir, que la adición de extracto de levadura en el medio de rehidratación permite una fermentación acelerada con respecto a la misma adición en el mosto al principio de la fermentación alcohólica.

35

Ejemplo 3

40 *Influencia de la adición de diferentes nutrientes en la duración de la fermentación de un mosto sintético con carencias*

Se llevaron a cabo 12 fermentaciones en paralelo y por duplicado en un mosto sintético MS 70-fa como se describe en el ejemplo 1, que correspondía a un medio con carencia de nitrógeno asimilable (100 mg/l) y que contenía 200 g/l de azúcares fermentables. La levadura seca activa usada es la levadura comercial Uvaferm CEG™, inoculada con una dosis de 20 g/hl. El extracto de levadura es el extracto comercial Bacto-yeast extract ref. 0127-01-7 (DIFCO, EE.UU.). Las vitaminas y las sales minerales son los productos estándar disponibles en los proveedores.

45

Las doce fermentaciones corresponden a las siguientes modalidades:

- 50 F1 y F2: Testigos en los que no se añade ningún extracto de levadura, ni en el medio de rehidratación de la levadura ni en el medio de fermentación. El medio de rehidratación testigo es el medio base: agua glucosada 50 g/l.
- 55 F3: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEG™ rehidratada en presencia de extracto de levadura (usada con una dosis que permite una concentración de 30 g/hl en el mosto) en el medio de rehidratación.
- F4: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEG™ rehidratada en un medio de rehidratación testigo. Se añade el mismo extracto de levadura que para F3 al principio de la fermentación alcohólica directamente al mosto sintético MS70-fa con una dosis de 30 g/hl.
- 60 F5: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEG™ rehidratada en presencia de levadura inactiva (LBI2130™; Lallemand, Canadá, usada con una dosis que permite una concentración de 30 g/hl en el mosto) en el medio de rehidratación.
- 65 F6: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEG™ rehidratada en un medio de rehidratación testigo. Se añade la misma levadura inactiva que para F5 al principio de la fermentación alcohólica directamente al mosto sintético MS70-fa con una dosis de 30 g/hl.

ES 2 269 015 T3

- F7: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en presencia de fosfato diamónico (usado con una dosis que permite una concentración de 10 g/hl en el mosto) en el medio de rehidratación.
- 5 F8: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en el medio de rehidratación testigo. El fosfato diamónico se añade al principio de la fermentación alcohólica con la dosis de 10 g/hl.
- F9: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en presencia de un cóctel de vitaminas (pantotenato, tiamina y biotina) en el medio de rehidratación de modo que se obtengan concentraciones en el mosto de 60 µg/l, 34 µg/l y 0,5 µg/l, respectivamente.
- 10 F10: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en el medio de rehidratación testigo. Se añade el cóctel de vitaminas usado para F9 al principio de la fermentación alcohólica con las concentraciones indicadas antes.
- 15 F11: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en presencia de un cóctel de sales minerales (Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, en forma de sulfatos) en el medio de rehidratación, de modo que se obtengan concentraciones respectivas de sales en el mosto de 460 µg/l, 58 µg/l y 4,5 µg/l.
- 20 F12: Fermentación llevada a cabo con la levadura CEGTM rehidratada en el medio de rehidratación testigo. Se añade el cóctel de sales minerales usado para F11 al principio de la fermentación alcohólica, con las concentraciones indicadas antes.

25 Las condiciones de rehidratación son idénticas cualquiera que sea el tipo de producto añadido (extracto de levadura, levadura inactiva, fosfato diamónico, cóctel de vitaminas o sales minerales). Corresponden a las aplicadas en los ejemplos 1 y 2. Los volúmenes y las condiciones de fermentación son idénticos a los descritos en los ejemplos 1 y 2. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla 1. Los valores presentados corresponden a la media de las duraciones de fermentación en horas, de los duplicados de cada modalidad.

TABLA 1

Producto añadido	Duración de la fermentación, en horas	
	en medio de rehidratación	al principio de la fermentación
0	290	290
Extracto de levadura	250	280
Levadura inactiva	275	282
Fosfato diamónico	280	285
Cóctel de vitaminas	283	288
Cóctel de sales	265	270

55 Los resultados muestran que cualquiera que sea el tipo de elemento nutritivo añadido, las adiciones durante la fase de rehidratación permiten una mejor reducción de las duraciones de fermentación que con las mismas adiciones realizadas al principio de la fermentación alcohólica.

ES 2 269 015 T3

Ejemplo 4

Composición seca y medio de rehidratación M1 correspondiente

5 Composición seca en polvo lista para usar:

10	Levadura inactiva	998,10 g
	Fosfato diamónico	333,33 g
	Ácido pantoténico	200,00 mg
15	Tiamina	113,33 mg
	Biotina	1,65 mg
20	Sulfato de cinc	195,00 mg
	Sulfato de magnesio	1500,00 mg
25	Sulfato de manganeso	15,00 mg

30 Se pesa una cantidad de 150 g de esta composición seca y se introduce en 1 litro de agua glucosada 50 g/l. Se obtiene el siguiente medio de rehidratación M1:

35	Levadura inactiva	149,71 g/l
	Fosfato diamónico	50,00 g/l
	Ácido pantoténico	30,00 mg/l
40	Tiamina	17,00 mg/l
	Biotina	0,25 mg/l
	Sulfato de cinc	29,25 mg/l
45	Sulfato de magnesio	225,00 mg/l
50	Sulfato de manganeso	2,25 mg/l

50

55

60

65

ES 2 269 015 T3

Ejemplo 5

Procedimiento de rehidratación de una levadura de vinificación comercial

5 Se introducen 15 g de levadura seca activa Lalvin EC1118™ en 100 ml de medio de rehidratación M1 preparado siguiendo el ejemplo 4. Después de 30 minutos de incubación a 37°C se obtiene un inóculo listo para sembrar un mosto con una cantidad de 20 ml de inóculo por litro. Las concentraciones de nutrientes aportadas al mosto son, por lo tanto, las siguientes (se considera que el volumen inoculado contiene dichos elementos sea en forma libre en la fase acuosa del medio de rehidratación o bien en forma asimilada por las levaduras rehidratadas):

10

Fosfato diamónico	0,10 g/l
Ácido pantoténico	60,00 µg/l
Tiamina	34,00 µg/l
Biotina	0,50 µg/l
Sal de cinc	0,058 µg/l
Sal de magnesio	0,45 µg/l
Sal de manganeso	4,50 µg/l

15

20

25

Ejemplo 6

30

Medio de rehidratación M2 y composición C2

En 1 litro de agua purificada, se mezclan 50 g de glucosa y 150 g de la composición seca C2, que comprende:

35

Levaduras inactivas	149,49 g
Pantotenato de calcio	27,0 mg
Biotina	0,2 mg
Sal de cinc	50,0 mg
Sal de magnesio	433,0 mg
Sal de manganeso	4,0 mg

40

45

50 En este medio M2 se rehidratarán 100 g de levadura seca activa Uvaferm CEG™, comercializada por Lallemand. El medio M2 que contiene la levadura rehidratada se inoculará en un mosto que se va a fermentar en una cantidad de 0,08 a 0,41/hl, preferiblemente 0,21/hl.

Ejemplo 7

55

Aplicación a la preparación de una bebida fermentada

El medio M2 que contenía la composición C2 se ha usado para rehidratar las LSA y sembrar un mosto de fermentación de un vino blanco en condiciones industriales en una bodega de la región de la Mancha en España.

60

Cepa: Airén

Nitrógeno asimilable en el mosto: 225 mg/l (mosto sin carencia)

65

Se realizaron fermentaciones en cubas de 100 hectolitros según diferentes modalidades, con el fin de determinar las condiciones más favorables. Se usaron dos tipos de LSA, solas o en presencia de otras sustancias añadidas habitualmente a los mostos para favorecer la fermentación. En particular se ha estudiado la influencia del fosfato diamónico y de un activado de la fermentación aportados al medio de fermentación.

ES 2 269 015 T3

Se rehidrataron las levaduras secas activas Uvaferm™ CEG (Lallemand, Canadá) y Uvaferm™ PM (Lallemand, Canadá) con ayuda del medio M2 descrito en el ejemplo 6. Para cada una de las dos levaduras se llevaron a cabo 4 ensayos, añadiendo:

5	Ensayo nº 1	Fosfato diamónico	0,2 g/l	Inicio de fermentación
10	Ensayo nº 2	Fosfato diamónico	0,2 g/l	Inicio de fermentación
		Activador de fermentación	0,3 g/l	Primer tercio de la fermentación
15	Ensayo nº 3	Composición C2	0,3 g/l (equiv.)	Medio de rehidratación
		Fosfato diamónico	0,2 g/l	Inicio de fermentación
20	Ensayo nº 4	Composición C2	0,3 g/l (equiv.)	Medio de rehidratación
		Activador de fermentación	0,3 g/l	Primer tercio de la fermentación
25				

El activador de fermentación usado es el activador Fermaid™ (Lallemand, Canadá).

30 El perfil cinético de estas ocho fermentaciones se siguió midiendo la densidad del mosto y el nivel de producción de un compuesto secundario de la fermentación, es decir el acetato. Efectivamente, el acetato es responsable de la acidez volátil de los vinos, y debe minimizarse para obtener buenas cualidades gustativas. Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas 2 y 3.

35 Los valores presentados en la tabla 2 corresponden a las duraciones de fermentación en días de cada modalidad.

TABLA 2

	Duración de la fermentación, en días		
Nº de ensayo	Uvaferm™ CEG	Uvaferm™ PM	
45 1	10	8	
2	9	7	
50 3	9	7	
4	9	6	

55 Parece que para las dos levaduras secas activas ensayadas, la adición de la composición C2 en el medio de rehidratación permite mejorar sensiblemente el perfil cinético de fermentación (ensayo nº 3 comparado con el ensayo nº 1). Además, como se ve en el ensayo nº 4 en el que se obtienen las cinéticas más rápidas, el efecto obtenido por adición de la composición C2 en el medio de rehidratación de las LSA actúa de forma acumulativa con el efecto producido por la adición de un activador de fermentación.

60 Los valores presentados en la tabla 3 corresponden a la acidez volátil medida al final de la fermentación por el método de Duclaux-Gayon, conocido para el experto en la materia.

65

ES 2 269 015 T3

TABLA 3

		Acidez volátil, en g/l	
	Nº de ensayo	Uvaferm™ CEG	Uvaferm™ PM
5	1	0,48	0,33
10	2	0,51	0,33
	3	0,44	0,18
15	4	0,46	0,22

20 A la vista de estos resultados, parece que la adición de la composición C2 durante la rehidratación permite disminuir la producción de acidez volátil. Esto podría deberse al hecho de que las levaduras están en mejores condiciones fisiológicas y por lo tanto son aptas para soportar mejor las condiciones fisicoquímicas encontradas en un mosto en fermentación. Este estado fisiológico se traduciría entonces en una mejor resistencia al estrés, induciendo una producción menor de acidez volátil.

25 Este efecto positivo complementario refuerza el interés del procedimiento según la presente invención para la rehidratación de LSA dirigidas a la fermentación alcohólica. De forma general, los resultados obtenidos al final de estos ensayos confirman este interés a escala industrial.

30 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

35 Documentos de patentes citados en la descripción

- GB 98111002 A [0032]

40 Documentos de patentes no citados en la descripción

- ALEXANDRE *et al.* *J. of Ind. Microbiol. and Biotechnology*, 1998, vol. 20, 20-27 [0007]
- Agenbach. *Proc. South African Soc. Enol. Vitic.*, 1977, 66-87 [0008]
- 45 • SABLAYROLLES. *Barre. Sci. Alim.*, 1986, vol. 6, 373-383 [0011]
- BATAILLON *et al.* *J. Ferm. Bioeng.*, 1996, vol. 82, 145-150 [0013]
- 50 • WALKER. *Critic. Rev. Biotechnol.*, 1994, vol. 14, 311-354 [0014]
- SABLAYROLLES *et al.* *J. Ferm. Bioeng.*, 1996, vol. 82, 377-381 [0017] [0018]
- DELFINI *et al.* *Am. J. Enol. Vitic.*, 1993, vol. 44, 86-92 [0017]
- 55 • TRIOLI. *Vitic. Enol. Sci.*, 1996, vol. 51 (3), 204-209 [0017]
- JULIEN *et al.* *Am. J. Enol. Vitic.*, 2000, vol. 51 (3), 215-222 [0020]
- 60 • MONK. Proceedings of the ASVO Seminar: *Advances in Juice Clarification and Yeast Inoculation*, 1997, 22-23 [0024]
- M.J. BAKERS *et al.* *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1987, vol. 35, 127-171 [0025]
- 65 • VON F. RADLER *et al.* *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1985, vol. 3, 73-77 [0025]

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas para la fermentación alcohólica **caracterizado** porque dichas levaduras secas activas se introducen en un medio acuoso que contiene levaduras inactivas o un derivado de levadura en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio.

10 2. Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichas levaduras secas activas se introducen en un medio acuoso que contiene también uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico, vitaminas, sales minerales, ácidos grasos, esteroides, o fuentes naturales ricas en estos elementos.

15 3. Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas según la reivindicación 2, que comprende esencialmente las etapas que consisten en:

- 15 a) preparar un medio de rehidratación acuoso, azucarado o no azucarado, que comprende
- 20 i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio, y opcionalmente
- 25 ii) uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico que comprenden sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; ácidos grasos, esteroides, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos como en especial las burbas; vitaminas que comprenden tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; sales minerales que comprenden fosfatos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso o una combinación de estas sales minerales, aportándose cada nutriente elegido en una concentración de 200 a 1000 veces superior, preferiblemente 500 veces superior, a la que tendrá en el mosto que va a fermentar, en un medio acuoso,
- 30 b) introducir las levaduras secas activas en el medio de rehidratación preparado de este modo, en cantidad de 50 a 150 preferiblemente 100 g/l de medio.

35 4. Procedimiento de rehidratación de levaduras secas activas según la reivindicación 3, que comprende esencialmente las etapas que consisten en:

- 40 a) preparar un medio de rehidratación que comprende,
- 45 i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 preferiblemente 150 g/l de medio, y
- ii) uno o varios de los componentes siguientes: 20 a 50 mg/l de pantotenato de calcio, 0,15 a 0,30 mg/l de biotina, 20 a 60 mg/l de sal de cinc, 200 a 500 mg/l de sal de magnesio, 2 a 5 mg/l de sal de manganeso, en un medio acuoso;
- 50 b) introducir las levaduras secas activas en el medio de rehidratación preparado de este modo, en una cantidad de 50 a 150 g/l, preferiblemente 100 g/l de medio;
- c) incubar el medio de rehidratación a una temperatura entre 30°C y 45°C.

55 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque comprende también una etapa que consiste en incubar el medio de rehidratación que contiene las levaduras secas activas a una temperatura comprendida entre 30°C y 45°C, preferiblemente 37°C, durante 20 a 40 minutos, preferiblemente 30 minutos.

60 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque las levaduras secas activas son levaduras de vinificación.

60 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque las levaduras secas activas son *Saccharomyces*.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las *Saccharomyces* son del género *cervisiae*.

65 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque las levaduras inactivas son levaduras enriquecidas en nutrientes.

ES 2 269 015 T3

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque las levaduras inactivas están enriquecidas en sales minerales.

5 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque los derivados de levadura son productos susceptibles de obtenerse a partir de células de levaduras enriquecidas o fraccionadas, por acción física o química.

10 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dichos productos son extractos de levaduras obtenidos por autólisis y cortezas de levaduras.

13. Medio de rehidratación de levaduras secas activas que comprende al menos un medio acuoso, azucarado o no, de levaduras inactivas o un derivado de levadura en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio.

15 14. Medio de rehidratación según la reivindicación 13, que comprende al menos, en un medio acuoso azucarado o no,

- 20 i) levaduras inactivas o un derivado de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l de medio,
- 25 ii) uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico que comprenden sales de amonio, urea, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; ácidos grasos, esteroides, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos como en especial las burbas; vitaminas que comprenden tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; sales minerales que comprenden fosfatos, nitratos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso o una combinación de estas sales minerales, aportándose cada nutriente elegido en una concentración de 200 a 1000 veces superior, preferiblemente 500 veces superior, a la que tendrá en el mosto que va a fermentar.

30 15. Medio de rehidratación de levaduras secas activas según la reivindicación 14, que comprende al menos, en un medio acuoso, preferiblemente agua glucosada en una cantidad de 50 g/l o zumo de uva,

- 35 i) levaduras inactivas o extractos de levadura, en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l,
- ii) uno o varios de los siguientes componentes: 27 mg/l de pantotenato de calcio, 0,2 mg/l de biotina, 50 mg/l de sal de cinc, 433 mg/l de sal de magnesio, 4 mg/l de sal de manganeso.

40 16. Uso de una composición seca para preparar un medio de rehidratación de levaduras secas activas, **caracterizado** porque comprende al menos levaduras secas inactivas o derivados de levadura añadidos al medio de rehidratación en una cantidad de 100 a 200 g/l, preferiblemente 150 g/l, en forma deshidratada y uno o varios nutrientes elegidos entre fuentes de nitrógeno orgánico que comprenden sales de amonio, aminoácidos, péptidos, proteínas o una fuente biológica rica en nitrógeno; ácidos grasos, esteroides, una combinación de estos o una fuente natural rica en estos elementos como en especial las burbas; vitaminas que comprenden tiamina, biotina, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, pirodoxina, o una fuente natural rica en vitaminas; sales minerales que comprenden fosfatos, sales de cinc, magnesio, calcio, potasio, sodio, hierro, cobre, manganeso o una combinación de estas sales minerales.

50 17. Composición seca dirigida a la preparación de un medio de rehidratación de levaduras secas activas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizada** porque comprende al menos,

- 55 i) aproximadamente 99,3% en peso de levaduras inactivas o de derivado de levadura, en forma deshidratada,
- ii) uno o varios nutrientes elegidos entre el ácido pantoténico, la biotina, una sal de cinc, una sal de magnesio, una sal de manganeso.

18. Procedimiento de producción de una bebida alcohólica fermentada **caracterizado** porque comprende:

- 60 - la rehidratación de levaduras secas activas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12,
- la siembra del mosto con las levaduras rehidratadas así obtenidas.

65 19. Procedimiento de producción de una bebida alcohólica fermentada, **caracterizado** porque comprende:

- la rehidratación de levaduras secas activas en un medio de rehidratación según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15,

ES 2 269 015 T3

- la siembra del mosto con las levaduras rehidratadas así obtenidas.

5 20. Procedimiento de producción de una bebida alcohólica fermentada según una cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, **caracterizado** porque el mosto es un zumo de uva.

10 21. Inóculo de levaduras, **caracterizado** porque contiene las levaduras secas activas revividas según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y medio de rehidratación según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



