

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 704**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2010 E 10170494 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2277990**

54 Título: **Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13030 y su uso para la elaboración de bebidas alcohólicas**

30 Prioridad:

22.07.2009 ES 200901625

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.12.2014

73 Titular/es:

**GUSERBIOT S.L.U. (100.0%)
Polígono Industrial Jundiz C/ Judinz, 26
01015 Vitoria, Araba/Álava, ES**

72 Inventor/es:

**BARBERO MANGAS, FRANCISCA;
ABADIN INSUA, CRISTINA;
OYANGUREN GARCÍA, ÍÑIGO y
ZUMÁRRAGA URIBESALGO, MIREN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 524 704 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

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13030 y su uso para la elaboración de bebidas alcohólicas

5 En el transcurso de la fermentación del mosto, se produce la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras. En las primeras etapas de fermentación (4-5% Vol. de alcohol), se desarrollan levaduras indígenas con bajo poder fermentativo de las especies: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*. Una vez se supera el 4-5% Vol. de alcohol, el proceso fermentativo es dominado fundamentalmente por la especie *Saccharomyces cerevisiae*, más resistente al alcohol.

10 El origen de estas levaduras está fundamentalmente en la superficie de las uvas así como en el ambiente de la bodega (maquinaria, tolvas, prensas, depósitos de fermentación, etc.), siendo esta última una importante fuente de microorganismos que inoculan los mostos. El número de levaduras presentes en el hollejo de la uva sana es muy bajo (entre 10³ y 10⁶ UFC/ml), y el número de *Saccharomyces cerevisiae* es aún menor, menos de 50 células/ml de mosto. En la bodega, *S. cerevisiae* es la especie predominante.

15 La microflora presente en la uva se puede ver afectada por un gran número de factores que influyen en el número y proporción de las diferentes especies.

20 Entre estos factores se incluye la temperatura, la pluviometría y otras influencias climáticas, el grado de madurez de la uva, el empleo de tratamientos fitosanitarios, el daño físico debido a hongos, insectos, etc. y la variedad de uva. Las variaciones en la flora inicial pueden influir en el proceso fermentativo, provocando retrasos e incluso interrupciones en la fermentación, y pueden afectar a la calidad del vino y dar lugar a cambios en la acidez volátil y a sabores y/o aromas desagradables.

25 De hecho, la variabilidad de la flora levaduriforme de los mostos puede solventarse mediante la adición en cada vendimia de un inóculo microbiano que, al ser mayoritario, normalice la flora inicial y, de esta forma, dé lugar a una fermentación homogénea en la bodega año tras año.

30 A la hora de seleccionar las levaduras para la producción de vinos de calidad, se busca que las levaduras tengan las siguientes características:

- Alta tolerancia a etanol
- Degradación total de los azúcares fermentables
- 35 - Resistencia al SO₂
- Alta capacidad fermentativa
- Producción de glicerol
- Fenotipo *Killer*

40 Por el contrario, se intenta evitar que la levadura posea las siguientes características no deseables:

- Producción de H₂S
- Producción de acidez volátil
- Producción de acetaldehído y piruvato
- 45 - Formación de precursores de carbamato de etilo

50 En la actualidad, casi todas las bodegas emplean inóculos de levaduras comerciales para la fermentación de sus mostos. La utilización de estos inóculos comerciales en las bodegas reduce el riesgo de cinéticas de fermentación lentas y defectos en el gusto y aroma de los vinos. Debido a esto, la inoculación del mosto con estas levaduras es una práctica generalizada en las bodegas. En la mayoría de los casos, estas levaduras han sido aisladas en áreas, variedades de uva y condiciones diferentes a las existentes en las bodegas que las usan, además de emplearse indistintamente en otras denominaciones de origen tanto españolas como de otros países, siendo la consecuencia de su empleo la elaboración de vinos con cierta pérdida de tipicidad.

55 Frente a este inconveniente de una aplicación generalizada y la pérdida de tipicidad, una alternativa que está demostrando ser válida es la utilización de levaduras autóctonas, aisladas a partir de uvas en una determinada zona para elaborar vinos de esa misma zona. De esta forma se puede controlar el proceso fermentativo respetando al mismo tiempo el carácter local de los vinos. En este punto deben indicarse por tanto las numerosas ventajas que presentaría el empleo de levaduras autóctonas cuando se seleccionan en las denominaciones de origen para la elaboración de los vinos. Por otra parte, la selección debe centrarse en las uvas, no en el ambiente de bodega, debido a que precisamente en las bodegas existe una población residual de levaduras de origen variado y esencialmente comercial.

Descripción de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011, dicha cepa fue depositada el 12 de mayo de 2009 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Burjasot, Valencia con el número de acceso CECT 13030.

En un aspecto más particular, la cepa de la presente invención se encuentra en formato líquido, fresco en pasta, seco activo y seco instantáneo.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011 depositada en la CECT, con número de acceso CECT 13030 en la elaboración de bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación alcohólica.

15 En un aspecto más particular, la bebida alcohólica se selecciona de entre vino, cerveza, cava y sidra.

En otro aspecto más particular, la bebida alcohólica es vino elaborado a partir de mostos de uva. En otro aspecto más particular, los mostos son de uva de la región vitivinícola de la Rioja Alavesa, más en particular son mostos de uva de variedad de uva tinta, más en particular son de la variedad Garnacha, Graciano, Mencía, Monastrell, Mazuelo, Bobal, más en particular la uva es de la variedad Tempranillo.

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011 depositada en la CECT, con número de acceso CECT 13030 para la elaboración de biomasa.

Descripción de las figuras

Figura 1: Perfiles genéticos de la cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) obtenidos por separación electroforética en geles de agarosa mediante la técnica de amplificación de las secuencias inter delta (A) y el análisis de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (B). M: Marcador de peso molecular (fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I).

Figura 2. Cinética fermentativa de la levadura autóctona y de la levadura comercial en la microvinificación I del ejemplo 2. La cinética fermentativa de estas levaduras se expresó como la evolución de los °Brix del mosto en función del tiempo.

Figura 3: Cinética fermentativa de la levadura autóctona y de la levadura comercial en la microvinificación III del ejemplo 2.

Figura 4. Cinética fermentativa de la levadura autóctona en formatos: fresco en pasta, seca y de la levadura comercial en la microvinificación I del ejemplo 3.

Figura 5. Cinética fermentativa de la levadura autóctona en formatos: fresco en pasta, seca y de la levadura comercial en la microvinificación II del ejemplo 3.

Figura 6. Cinética fermentativa de la levadura autóctona en formatos: fresco en pasta, seca y de la levadura comercial en la microvinificación III del ejemplo 3.

Figura 7. Cinética fermentativa de la levadura autóctona en formatos: fresco en pasta, seca y de la levadura comercial en la microvinificación IV del ejemplo 3.

Figura 8. Cinética fermentativa de la levadura autóctona y de la levadura comercial en la microvinificación I del ejemplo 5.

Figura 9. Cinética fermentativa de la levadura autóctona y de la levadura comercial en la microvinificación II del ejemplo 5.

Descripción de la invención

50 La cepa GBiot-EL 011 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 13030, presenta las siguientes características:

Morfología:

- 55
- Morfología celular: células ovaladas, redondeadas
 - En medio sólido (agar extracto de malta) la colonia presentaba un color blanquecino, superficie lisa y brillante
 - En agar lisina no presentaba crecimiento.

Características metabólicas

- 60
- Fermentación de carbohidratos en condiciones de aerobiosis, la cepa fue: Glucosa (+), maltosa (+), sacarosa (+), trehalosa (+), rafinosa (+), α glucosidasa (+), xilosa (+), galactosa (+), histidina (+), leucil-glicina (+), prolina (-) y lactosa (-).
 - 65 - Fermentación de carbohidratos en condiciones de anaerobiosis, la cepa fue: Glucosa (+), maltosa (+), sacarosa (+), trehalosa (+), rafinosa (+), β glucosidasa (+) y galactosa (+).

- Asimilación de compuestos nitrogenados, la cepa fue: nitrato (-), lisina (-).
 - Requerimientos de oxígeno: es anaerobia facultativa.
 - Crecimiento a distintas temperaturas: la cepa creció, al menos, en un intervalo de temperatura comprendido entre 14 °C y 37 °C.
- 5 - Resistencia a la cicloheximida: presentó su límite de crecimiento en presencia de 10 ppm de cicloheximida.

Características enológicas/tecnológicas de la cepa:

10 La cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) presentó una cinética de fermentación rápida y regular con una fase de latencia corta. Fue capaz de llevar a cabo fermentaciones alcohólicas dentro de un amplio rango de temperaturas, al menos entre 14 °C y 30 °C, pero fue óptima para fermentaciones de vinos tintos con un intervalo de temperatura de 20-30 °C. La capacidad floculante fue buena y con formación de espuma media.

15 El rendimiento alcohólico fue elevado: 16,8 gramos de azúcar por grado alcohólico producido. Agotó casi en su totalidad los azúcares reductores presentes en el mosto, dejando los vinos prácticamente secos (entre 1-6 g/l de azúcares residuales).

20 La cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) mostró una resistencia elevada al dióxido de azufre, resistiendo concentraciones de hasta 100 g/l de SO₂ total. La cepa de levadura GBiot-EL 011 (CECT 13030) se inoculó en un medio de cultivo, que contenía concentraciones de 50, 75 y 100 mg/l de SO₂ y se observó si el crecimiento se producía tras 48-72 horas de incubación.

25 La tolerancia a etanol también fue elevada, en torno al 16% vol. La determinación de la resistencia a etanol se llevó a cabo mediante la inoculación de una cepa autóctona tanto en el medio de cultivo líquido como en placas Petri con contenidos de etanol de 12, 14 y 16% v/v.

30 La cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) tiene un fenotipo *Killer* neutro, es decir, no secreta la toxina *Killer* pero sí es resistente a ella. La determinación del fenotipo *Killer* se basa en la inoculación de la levadura que se va a probar en una placa con un medio tamponado e inoculado con un césped de levadura sensible, y en otra placa, con el mismo medio inoculado con un césped de levadura *Killer* (Bevan y Somers, 1969). Tras su incubación a 27 °C durante 72 horas se observó crecimiento en ambas placas sobre los dos céspedes de las cepas control sin aparición de halos de inhibición.

35 La producción de ácido sulfhídrico fue baja. El método utilizado para determinar la formación de H₂S se basó en el grado de oscurecimiento de las colonias crecidas en un medio con agar Biggy (Bismuth-Glucose-Glycine-Yeast), una modificación de la fórmula desarrollada por Nickerson (1953). Este medio contiene sulfito de bismuto y varía de color crema (cepas poco productoras) a marrón oscuro (cepas muy productoras). El grado de oscurecimiento lo determina el sulfuro de bismuto, que se forma por la combinación del bismuto en el medio y el H₂S liberado por las levaduras.

40 La producción de glicerol fue media, 8 g/l de glicerol. La determinación del glicerol producido durante la fermentación alcohólica se realizó mediante el método enzimático desarrollado por Kreutz (1962) modificado.

45 La producción de acidez volátil también fue baja (<0,54 g/l de ácido acético). Se empleó el método de García-Tena (García Barceló, 1976).

Caracterización genérica

50 La caracterización genética de la cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) se obtuvo mediante dos técnicas moleculares complementarias: la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las secuencias inter delta que flanquean los retrotrasposones Ty1 (Ness, 1993) y el análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (Querol, 1992). La Figura 1 muestra los perfiles genéticos de la cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030) obtenidos con cada una de las técnicas.

Producción de biomasa

55 La producción de biomasa se llevó a cabo mediante cultivo Fed-Batch, en un fermentador de 12 litros de capacidad total (Biostat C), con control continuo del pH, temperatura, oxígeno disuelto y agitación. La alimentación se llevó a cabo empleando un medio de alimentación con una concentración de azúcares totales de 250 g/l (sacarosa, glucosa, fructosa), suplementado con una fuente de nitrógeno, magnesio, vitaminas (biotina, inositol y pantotenato cálcico) y sales minerales (sulfato de hierro, sulfato de zinc y sulfato de cobre).

60 El fermentador se inoculó con un volumen de inoculación asegurándose un recuento de células en el volumen inicial de fermentación de 10⁸ UCF/ml.

65 En cuanto a las condiciones de fermentación, fueron las siguientes:

- pH: el pH del cultivo se mantuvo en 4,5 a lo largo de todo el proceso mediante la adición de NaOH al 25% (p·v⁻¹) y H₃PO₄ al 75% (p·v⁻¹).
- Temperatura: 30 °C
- Agitación: 700 rpm

5 El proceso de obtención de biomasa duró del orden de 40 horas. La viabilidad obtenida por ml en el caldo fermentado alcanzó el orden de 10⁹ UFC/ml.

A partir de este caldo obtuvimos los siguientes formatos para la levadura:

- 10 - Formato líquido: caldo fermentado sin ningún tipo de tratamiento con un recuento de células viables $\geq 10^9$ UFC/ml.
- Formato en pasta: se obtuvo a partir de la filtración, mediante filtro prensa, del caldo fermentado. Este tratamiento nos permitió obtener una crema con un recuento de células viables $\geq 10^{10}$ UFC/g.
- 15 - Formato seco activo: este formato se obtuvo a partir de la levadura en pasta y con un tratamiento de deshidratación consistente en un secado con lecho fluido. El producto ha de tener un contenido de humedad inferior al 8 %. El secado a 37 °C durante 60 minutos nos proporcionó un producto de levadura seca con un recuento de células viables $\geq 5 \times 10^5$ UFC/g. Para su aplicación el producto ha de rehidratarse previamente.
- 20 - Fórmula seca instantánea: este formato se obtuvo a partir de la levadura en pasta con un tratamiento de deshidratación por secado en lecho fluido. El producto ha de tener un contenido de humedad inferior al 5 % y un recuento de células viables $\geq 10^{10}$ UFC/g.

Ejemplo 1. Obtención de la cepa GBiot-EL 011 (CECT 13030)

25 El aislamiento y la selección de las levaduras se realizaron durante dos vendimias consecutivas. Como resultado de este estudio, se seleccionó una cepa de levadura autóctona de la especie *S. cerevisiae*, GBiot-EL 011 (CECT 13030). Las pruebas de la levadura autóctona seleccionada se realizaron durante 3 vendimias.

30 Para el aislamiento de levaduras autóctonas, se procedió a recoger uva sana y madura de la variedad Tempranillo en varios viñedos pertenecientes a la región vitivinícola de Rioja Alavesa. Se tomaron muestras procedentes de viñedo joven (cepa de edad menor a los 25 años), viñedo viejo (cepa de edad comprendida entre 25-50 años) y viñedo autóctono (cepa con una edad superior a 50 años).

35 Las uvas se trasladaron al laboratorio y se almacenaron en un lugar fresco y ventilado hasta su procesamiento. En ese momento, se estrujaron y fermentaron en recipientes estériles. Dichos recipientes se introdujeron en un incubador orbital con temperatura controlada de 27 °C. A lo largo de la fermentación se realizó un seguimiento de los °Brix y una vez que éstos se estabilizaron se procedió a la toma de muestras de estos envases para aislar las levaduras. Las muestras obtenidas para aislar las levaduras se inocularon, tras las correspondientes diluciones decimales, en placas de Petri que contenían agar extracto de malta y se dejaron incubar a 27 °C. De cada placa, con 40 30-300 colonias, se tomaron tres colonias diferentes con una apariencia concordante con *Saccharomyces cerevisiae*. El total de cepas de levaduras aisladas de la uva, con apariencia de *S. cerevisiae* fue de 175.

Una vez caracterizadas todas las levaduras, se seleccionaron aquellas que cumplían los siguientes requisitos tecnológicos:

- 45 - Crecimiento en lisina-agar: negativo.
- Prueba rápida: *S. cerevisiae*.
- Fenotipo *Killer*: neutro o *Killer*.
- Formación de ácido sulfhídrico: media o baja.
- 50 - Resistencia al dióxido de azufre: crecimiento positivo al menos en placas con 50 mg/l de SO₂/l.
- Resistencia a etanol: crecimiento positivo al menos en placas con 12 % de etanol.

De todas las levaduras aisladas, 76 de las cepas se identificaron como *S. cerevisiae* mediante el Rapid Yeast Plus System (Remel).

55 El total de levaduras seleccionadas de acuerdo con estos criterios fueron 41. Estas levaduras se sometieron a un primer proceso de microvinificación con mosto de uva estéril.

60 Las microvinificaciones consistieron en la inoculación con las levaduras autóctonas caracterizadas en un mosto estéril y posterior vinificación a escala de laboratorio en condiciones controladas. La inoculación con las levaduras autóctonas preseleccionadas se realizó en mosto de uva de la variedad Tempranillo procedente de la Rioja Alavesa.

Este proceso de microvinificación nos permitió descartar las levaduras con cinéticas fermentativas inadecuadas y que dieron lugar a levaduras no aptas desde el punto de vista organoléptico.

65

El proceso de fermentación se llevó a cabo en frascos de fermentación de cristal de 250 ml, por duplicado, sumergidos en un baño termostático con agitación y temperatura controlada de entre 16 y 27 °C, dependiendo del producto que se deseaba obtener. Las levaduras pendientes de probar se inocularon en una proporción que nos permitió alcanzar en todos los casos una población inicial de 10⁶ células/ml. El proceso de fermentación se siguió por medida diaria del °Brix hasta alcanzar un valor constante. En ese momento el vino se trasegó, se centrifugó y se almacenó en atmósfera inerte de nitrógeno o se sulfitó (20 mg SO₂/l) hasta el momento de la cata del vino. En la cata de vino se valoraron los siguientes aspectos:

- Color: se valoró la formación de capa, limpidez y brillo.
- Nariz: intensidad, complejidad, y con aromas sin defectos.
- Boca: tanicidad y cuerpo.

Además de la cata, se realizó un análisis de los vinos obtenidos de los siguientes parámetros: pH, azúcares, grado, azufre libre, azufre combinado y azufre total, acidez volátil, acidez total, glicerol, ácido málico, intensidad colorante, tonalidad, índice de polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales y parámetros CIELAB. Estos análisis fueron realizados por la FUNDACIÓN LEIA.

Los resultados obtenidos en este proceso de vinificación nos permitieron descartar todas aquellas cepas que no presentaron buena actividad fermentativa y dieron lugar a defectos organolépticos en el vino.

Las cepas que presentaron una buena actividad y cinética fermentativa y que se valoraron positivamente en la cata, se identificaron mediante pruebas de biología molecular (PCR y RFLP del ADN mitocondrial). Esta caracterización molecular nos reveló cuántas de las cepas aisladas e identificadas como *S. cerevisiae* eran genéticamente diferentes, es decir, eran cepas distintas.

Con la información obtenida en la microvinificación, tanto de la cinética fermentativa, los resultados de la cata y análisis del vino y con la información sobre caracterización molecular de las cepas previamente seleccionadas de dicha microvinificación, se procedió a realizar otras dos microvinificaciones que nos seleccionaron las cepas que probamos a escala industrial, es decir, en bodega. En estas microvinificaciones se analizaron las cepas variando las condiciones del mosto y dependiendo de la aplicación perseguida.

Para la selección de cepas de levadura para la fermentación alcohólica con el fin de obtener vino tinto, se realizaron las siguientes las microvinificaciones:

Microvinificación de mosto rico en azúcares: el mosto que se utilizó como sustrato tenía un contenido en azúcares de 25 °Brix, lo que supuso un grado alcohólico de 14,8°.

Microvinificación de mosto con pasta: fue una microvinificación en la que el mosto contenía gran cantidad de materia en suspensión tal como lías, hollejos, etc., que simuló las condiciones del mosto en bodega.

En el caso de la selección de cepas para procesos de refermentación, además de analizar estas condiciones, se analizaron otras microvinificaciones tales como:

- Microvinificación de mosto con bajo contenido en nutrientes, tales como nitrógeno y vitaminas.
 - Microvinificación a baja temperatura 12 °C y a alta temperatura 33 °C.
 - Microvinificación con mosto parado, con azúcar y alto contenido en alcohol.
- Dependiendo de las cinéticas fermentativas, los resultados analíticos obtenidos y los resultados por cata, se seleccionan las cepas que se probaron en bodega.

Ejemplo 2. Microvinificación con mostos distintos y levadura líquida

La microvinificación se realizó en dos mostos de uva Tempranillo diferentes que presentaban las características físico-químicas descritas en la tabla 1.

Tabla 1 Parámetros analíticos de los mostos de partida para la microvinificaciones.

ANÁLISIS	MOSTO 1	MOSTO 2
pH	3,83	3,65
°Brix	22	23,4
Densidad (g/ml)	1093	1098
Azúcares reductores (g/l)	190	208
Grado probable (%v/v)	12,8	13,7
NFA (mg/l)	167	149
SO ₂ libre (mg/l)	0	13
SO ₂ total (mg/l)	3	26

ANÁLISIS	MOSTO 1	MOSTO 2
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,06	0,03
Acidez total (g/l ácido tartárico)	5,2	5,7
Ácido málico (g/l)	3,3	3,9
Glicerol (g/l)	0,58	0,57
Intensidad colorante	5,888	4,02
Tonalidad	0,699	0,43
IPT	30	19
Antocianos totales (mg/l)	217	278
Taninos totales (mg/l)	1,5	1
Parámetros CIELAB:		
Significación I*	21,219	39,085
Significación a*	45,099	61,8
b*	24,936	20,127

Microvinificación 1

5 En esta microvinificación se comparó la levadura autóctona GBiot-EL 011 (CECT 13030) aislada a partir de uvas procedentes de viñedos de Rioja Alavesa junto a una levadura comercial Zymaflore F15 que se utilizó como referencia. Como sustrato se utilizó un mosto de Tempranillo estéril, referenciado como mosto 2 en la tabla 1 (mosto estéril sin población microbiana y sin hollejos).

10 Tanto la levadura autóctona como la cepa comercial presentaron una cinética fermentativa rápida y regular y terminaron la fermentación en 19 días.

Los resultados analíticos de los vinos obtenidos a partir del mosto inoculado se resumen en la tabla 2.

MUESTRA	LEVADURA COMERCIAL	LEVADURA AUTÓCTONA
pH	3,46	3,43
°Brix	7,5	7,5
Grado (v/v)	13,5	13,62
Rendimiento EtOH (%)	47,4	47,8
Azúcares reductores (g/l)	3,1	3,6
SO ₂ libre (mg/l)	0	0
SO ₂ combinado (mg/l)	9	6
SO ₂ total (mg/l)	9	6
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,26	0,29
Acidez total (g/l ácido tartárico)	6,3	6,3
Glicerol (g/l)	8,5	8,5
Ácido málico (g/l)	3,08	3,4
Intensidad colorante	3,557	3,3
Tonalidad	0,86	0,862
IPT	21	19
Antocianos (mg/l)	144	153
Taninos totales (mg/l)	1	1
Parámetros CIELAB:		
I*	34,184	37,163
a*	30,953	30,717
b*	12,716	12,121

Como puede observarse, la levadura autóctona seleccionada conduce a la obtención de un vino, tras la fermentación alcohólica, de características muy similares al obtenido con la levadura comercial. En los dos casos los vinos fueron correctos desde el punto de vista organoléptico, no apreciándose defectos. Los resultados obtenidos en las analíticas no mostraron diferencias significativas entre las dos levaduras.

5

Microvinificación II

En esta microvinificación se utilizó el mosto referenciado como 1 en la tabla 1 que, al igual que el anterior, se trata de un mosto estéril sin población microbiana y sin hollejos.

10

La Figura 2 representa la cinética fermentativa de estas levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto en función del tiempo. Las dos levaduras terminaron la fermentación en 13 días y presentaron una cinética fermentativa similar.

15

La tabla 3 muestra los parámetros analíticos de los vinos obtenidos en esta microvinificación.

Tabla 3. Parámetros analíticos de los vinos elaborados con microvinificación II

MUESTRA	LEVADURA COMERCIAL	LEVADURA AUTÓCTONA
pH	3,44	3,41
°Brix	7	7
Grado (v/v)	12,97	13,78
Rendimiento EtOH (%)	45,5	48,4
Azúcares reductores (g/l)	2,6	2,6
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,27	0,21
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	5	5
Glicerol (g/l)	8,8	8,5
Ácido málico (g/l)	2,76	2,72
Intensidad colorante	0,496	0,478
Tonalidad	1,286	1,306
IPT	6	6
Antocianos (mg/l)	20	22
Taninos totales (mg/l)	0,3	0,3
Parámetros CIELAB:		
L*	87,886	88,46
a*	8,987	9,123
b*	9,015	9,343

En esta segunda microvinificación se observaron pequeñas diferencias entre la levadura autóctona y la comercial, que se apreciaron en el valor del grado y rendimiento de etanol obtenidos, siendo ligeramente superiores los obtenidos con la levadura autóctona.

20

En cuanto a la valoración en cata, el vino inoculado con la levadura autóctona destacó por su intensidad y redondez.

25

Microvinificación III

La microvinificación realizada utilizó como base el mosto que se probó en la primera vinificación, referenciado como mosto 2, con los hollejos presentes en el mismo mosto. Las cinéticas de fermentación que presentaron en este mosto las levaduras se reflejan en la figura 3.

30

Las fermentaciones con este mosto fueron más rápidas que en las dos microvinificaciones anteriores, y en solo 8 días estuvieron terminadas. El contenido en sólidos en suspensión estimuló el crecimiento y metabolismo de las levaduras durante la fermentación. Las dos levaduras, al igual que en las dos microvinificaciones anteriores, presentaron una cinética similar.

35

Respecto a los resultados analíticos de los vinos obtenidos en esta microvinificación, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la microvinificación III.

MUESTRA	LEVADURA COMERCIAL	LEVADURA AUTÓCTONA
pH	3,48	3,47
°Brix	7,6	7,6
Grado (v/v)	13,98	13,34
Rendimiento EtOH (%)	49,1	46,8
Azúcares reductores (g/l)	1,6	1,7
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,21
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	7,2	6,5
Glicerol (g/l)	10	9,9
Ácido málico (g/l)	3,56	3,54
Intensidad colorante	1,981	2,123
Tonalidad	0,813	0,864
IPT	15	15
Antocianos (mg/l)	117	112
Taninos totales (mg/l)	0,8	0,8
Parámetros CIELAB:		
L*	58,139	55,992
a*	45,227	42,969
b*	17,163	18,446

5 En esta microvinificación se observaron pequeñas diferencias entre la levadura autóctona y la comercial, que se apreció en el rendimiento de etanol obtenido, siendo en este caso ligeramente superior en el vino fermentado con levadura comercial.

Respecto a la cata, los vinos fueron valorados positivamente, y no se apreciaron defectos en los mismos.

10 Además de la cata y el análisis de los vinos, se procedió a realizar un estudio de implantación de las dos levaduras, dado que el mosto con hollejos presentaba su propia población indígena. En los dos casos, tanto la levadura autóctona como la comercial se implantaron en un 100%.

Ejemplo 3. Microvinificación con diferentes formatos de la levadura autóctona.

15 Se probaron 3 formatos de presentación de la levadura autóctona con el fin de evaluar las cualidades fermentativas, organolépticas y analíticas de las distintas formulaciones. Los formatos fueron los siguientes: en forma de pasta fresca y en forma seca activa. La levadura autóctona se comparó con la Zymaflore F15, utilizada frecuentemente en la elaboración del vino Rioja y apreciada por los enólogos por sus características fermentativas, analíticas y organolépticas. En el caso de la levadura comercial, se realizó el ensayo en su forma seca activa, que es el formato
20 comercial disponible.

Como substratos para las fermentaciones en el laboratorio, se emplearon dos mostos de uva de la variedad Tempranillo procedentes de Rioja Alavesa. La siguiente tabla recoge las principales características de dichos mostos.

25

Tabla 5 Parámetros físico-químicos de los mostos empleados para las microvinificaciones.

Parámetros analíticos	Mosto 1	Mosto 2
Grado probable (%v/v)	12,90	14,72
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,03	0,03
Acidez total (g/l ácido tartárico)	3,7	3,7
Ácido málico (g/l)	2,41	2,8
Glicerol (g/l)	0,19	0,25
Intensidad colorante	1,994	2,472
Tonalidad	0,465	0,532
IPT	15	16
Antocianos totales (mg/l)	140	156
Taninos totales (mg/l)	1	1

Parámetros analíticos	Mosto 1	Mosto 2
Parámetros CIELAB:		
L*	58,153	48,673
a*	57,331	49,962
b*	8,449	5,453

Las microvinificaciones llevadas a cabo fueron las siguientes:

- Microvinificación I: mosto 1 estéril, ajustado a 23 °Brix, 257 mg N asimilable/l, 40 mg SO₂/l y pH 3,51.
- 5 - Microvinificación II: mosto 2 estéril con exceso de azúcares, a 25 °Brix, 260 mg N asimilable/l 40 mg SO₂/l y pH 3,54.
- Microvinificación III: mosto 2 con pasta (hollejos), a 24.6 °Brix, 40 mg SO₂/l y pH 3,42.
- Microvinificación II: mosto 1 estéril, ajustado a 23 °Brix, 250 mg N asimilable/l, 40 mg SO₂/l y pH 3,5.

10 La preparación de las inoculaciones se realizó de la siguiente forma:

- Levadura fresca: se disolvió en una parte alícuota de mosto y se añadió directamente.
- Levadura seca: se disolvió en agua destilada con glucosa (1:10 w/v), se incubó a 40 °C durante 20 minutos, se mezcló con una parte alícuota de mosto, se incubó durante 10 minutos y se añadió el mosto para comenzar la fermentación.

15 En ese momento de la inoculación se obtuvo en todos los casos una población inicial de levaduras de 10⁶ células/ml. Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos de cristal de 250 ml sumergidos en baños termostatizados con agitación y temperatura controlada (27 °C). El proceso se siguió mediante medida diaria de °Brix y se dio por finalizado cuando éste se estabilizó. Los vinos elaborados se trasegaron, se centrifugaron y almacenaron en una atmósfera inerte de nitrógeno y se sulfitaron (20 mg SO₂/l) hasta el momento de la cata.

20 Una vez finalizadas las microvinificaciones, se realizaron las catas de los vinos obtenidos, valorando su color, aroma y gusto. Asimismo se realizaron los análisis correspondientes.

25 Sobre estos datos se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (tipo de levadura y formato) para detectar diferencias significativas entre las microvinificaciones preparadas con diferentes levaduras en sus diferentes formatos. El nivel de significación en todos los casos es del 95%.

30 *Microvinificación I*

En esta microvinificación se utilizó el mosto 1 como sustrato a fermentar.

35 La figura 4 muestra la cinética fermentativa de estas levaduras expresada como la evolución de los grados Brix del mosto con el tiempo.

40 Como se aprecia en la Figura 4, la levadura autóctona (fresca o seca) comenzó la fermentación rápidamente, mientras que la levadura comercial comenzó un poco más tarde. Todas las fermentaciones terminaron en un tiempo similar y con unos °Brix similares.

Los resultados analíticos de los vinos obtenidos de las microvinificaciones de la levadura autóctona y la levadura control en sus diferentes formatos se muestran en la tabla 6.

45 Tabla 6: Parámetros físico-químicos de los vinos obtenidos por la inoculación de la levadura autóctona en sus diferentes formatos y la levadura comercial sobre el mosto 1.

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
	Fresca	Seca	Seca
Formato			
pH	3,26 ± 0,07	3,16 ± 0,04	3,23 ± 0,03
°Brix	6,9 ± 0,1	6,7 ± 0,4	6,9 ± 0,1
Grado	13,4 ± 0	12,5 ± 0,5	12,8 ± 0,1
Azúcares reductores (g/l)	2,8 ± 0,6	2,5 ± 1,7	2,7 ± 1,1
Rendimiento EtOH (%)	57,90 ± 0,09	54,14 ± 2,22	55,21 ± 0,37
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,29 ± 0,06	0,29 ± 0,11	0,44 ± 0,02
Acidez total (g/l ácido tartárico)	5,7 ± 0,1	6,0 ± 0,2	5,7 ± 0,1
Glicerol (g/l)	6,4 ± 0,1	7,4 ± 0,4	8,2 ± 0,1

ES 2 524 704 T3

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
Formato	Fresca	Seca	Seca
Ácido málico (g/l)	3,07 ± 0,08	2,65 ± 0,64	2,47 ± 0,01
Intensidad colorante	1,380 ± 0,230	1,580 ± 0,160	1,040 ± 0,100
Tonalidad	0,570 ± 0,030	0,610 ± 0,040	0,650 ± 0,010
IPT	13 ± 1	13 ± 0	13 ± 1
Antocianos (mg/l)	85 ± 6	84 ± 13	84 ± 0
Taninos totales (mg/l)	0,62 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,65 ± 0,04
Parámetros CIELAB:			
L*	67,370 ± 4,060	63,480 ± 2,540	73,160 ± 2,300
a*	43,840 ± 4,990	42,460 ± 5,430	34,740 ± 0,950
b*	8,060 ± 0,910	8,620 ± 1,460	6,780 ± 0,410

Desde el punto de vista organoléptico, los catadores describieron los vinos como correctos, sin defectos sensoriales que descartaran ninguno de los formatos en que se presentaba la levadura autóctona.

5 Microvinificación II

Se repitió el diseño experimental desarrollado en la Microvinificación I, utilizando el mosto referenciado como 2 con un °Brix ligeramente más alto (25 °Brix) con el fin de comprobar la efectividad de la levadura autóctona en un medio con mayor contenido en azúcares.

10 En todos los casos, las microvinificaciones se llevaron a cabo por inoculación de la levadura autóctona en sus dos formatos (fresco en pasta y seco) y la levadura comercial sobre el Mosto 2.

15 En la figura 5 se muestra la cinética fermentativa de estas levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto con el tiempo.

20 Al igual que en la microvinificación I, la levadura autóctona comenzó la fermentación inmediatamente tras añadirse al mosto, mientras que la levadura comercial tiene un "periodo de adaptación" mayor. Todas las levaduras terminaron la fermentación en 15 días y los vinos resultantes presentaron unos niveles de azúcares residuales similares.

La Tabla 7 muestra los resultados analíticos de los vinos obtenidos de las microvinificaciones por inoculación de la levadura autóctona en sus diferentes formatos y la levadura comercial sobre el mosto 2.

25 **Tabla 7. Parámetros físico-químicos de los vinos obtenidos por inoculación de la levadura autóctona en sus diferentes formatos y la levadura comercial sobre el mosto 2 ± DE.**

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
Formato	Fresca	Seca	Seca
pH	3,32 ± 0,0	3,33 ± 0,04	3,31 ± 0,01
°Brix	9,5 ± 0,1	8,7 ± 0,4	9,3 ± 0,4
Grado	13,7 ± 0,3	13,9 ± 0,5	13,6 ± 0,3
Azúcares reductores (g/l)	21,7 ± 1,6	14,0 ± 6,2	19,5 ± 4,5
Rendimiento EtOH (%)	44,01 ± 1,08	44,55 ± 1,53	43,51 ± 0,06
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,38 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,36 ± 0,04
Acidez total (g/l ácido tartárico)	6,0 ± 0,1	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,1
Glicerol (g/l)	8,6 ± 1,1	8,1 ± 0,6	8,7 ± 1,1
Ácido málico (g/l)	3,10 ± 0,11	2,84 ± 0,23	2,97 ± 0,21
Intensidad colorante	1,910 ± 0,980	1,240 ± 0,210	1,650 ± 0,410
Tonalidad	0,750 ± 0,070	0,720 ± 0,040	0,740 ± 0,070
IPT	15 ± 1	14 ± 0	15 ± 1
Antocianos (mg/l)	95 ± 1	93 ± 3	93 ± 3
Taninos totales (mg/l)	0,73 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,73 ± 0,01

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
Formato	Fresca	Seca	Seca
Parámetros CIELAB:			
L*	57,650 ± 18,680	48,680 ± 24,17	61,620 ± 8,900
a*	30,790 ± 7,990	32,540	32,530 ± 7,370
b*	7,900 ± 3,170	7,230 ± 2,92	8,540 ± 2,210

Los resultados analíticos no mostraron diferencias relevantes entre los diferentes formatos de la levadura autóctona ni con respecto a la levadura comercial. A nivel de cata, todos los vinos se describieron como correctos, sin encontrarse grandes diferencias entre los vinos testados.

5

Microvinificación III

El objetivo de este ensayo fue observar la evolución de las cepas en un mosto con sólidos en suspensión y ver su influencia en la cinética fermentativa, en los parámetros analíticos de los vinos, así como en sus características organolépticas. Asimismo, también para ver su interacción con las levaduras indígenas del mosto, que en este caso crecieron durante la fermentación junto con la levadura inoculada. Las levaduras analizadas y los formatos analizados fueron los mismos que los analizados para las microvinificaciones anteriores.

10

La Figura 6 muestra la cinética fermentativa de estas levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto con el tiempo.

15

Las fermentaciones con este mosto fueron mucho más rápidas que en las microvinificaciones anteriores, y en sólo 12 días estuvieron terminadas, ya que el contenido en sólidos en suspensión estimuló el crecimiento y metabolismo de las levaduras durante la fermentación. En la fermentación espontánea y en las fermentaciones con levadura comercial, el arranque de fermentación fue más lento que en las fermentaciones inoculadas con la levadura autóctona. No se observaron diferencias significativas en el grado Brix final.

20

En la tabla 8 se muestran los resultados analíticos de los vinos obtenidos por inoculación del Mosto 2 con pasta, con la levadura autóctona y la levadura comercial.

25

Tabla 8. Parámetros físico-químicos de los vinos obtenidos por inoculación de la levadura autóctona en sus diferentes formatos y la levadura comercial sobre el mosto 2 ± DE.

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
Formato	Fresca	Seca	Seca
pH	3,57 ± 0,02	3,55	3,54
°Brix	8,6 ± 0,0	8,3	8,6
Grado	14,5 ± 0,1	13,5	14
Azúcares reductores (g/l)	1,6 ± 0,1	1,4	1,5
Rendimiento EtOH (%)	46,58 ± 0,27	43,26	44,90
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24 ± 0,04	0,30	0,30
Acidez total (g/l ácido tartárico)	6,5 ± 0,1	6,8	6,4
Glicerol (g/l)	9,6 ± 0,6	10,7	12,5
Ácido málico (g/l)	2,95 ± 0,08	2,61	2,47
Intensidad colorante	2,250 ± 0,040	2,790	1,940
Tonalidad	0,860 ± 0,010	0,790	0,870
IPT	18 ± 3	20	16
Antocianos (mg/l)	131 ± 1	140	104
Taninos totales (mg/l)	0,94 ± 0,14	0,98	0,80
Parámetros CIELAB:			
L*	55,070 ± 1,480	49,300	60,510
a*	50,530 ± 3,490	57,800	50,330
b*	17,520 ± 5,060	18,430	12,530

Al igual que en las microvinificaciones anteriores, no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos con los parámetros analizados entre la levadura autóctona en sus diferentes formatos con respecto a la levadura comercial.

- 5 En el panel de cata, los vinos elaborados con la levadura autóctona han sido valorados independientemente del formato de la levadura ensayada.

Microvinificación IV

- 10 En este caso, la microvinificación se realizó utilizando como base el Mosto 1, con una concentración media de azúcares en el mosto algo superior (23 °Brix).

En la Figura 7 se muestra la cinética fermentativa de estas levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto con el tiempo.

- 15 Las fermentaciones terminaron tras 16 días y los vinos se retiraron para realizar los análisis químicos y la cata. En este caso, los vinos inoculados con la levadura autóctona y comercial seca tardaron un poco más que las demás en comenzar la fermentación. Sin embargo, todas terminaron en un tiempo similar, y con un grado Brix residual similar.

- 20 En la siguiente tabla se muestran los resultados analíticos de los vinos obtenidos por inoculación del Mosto 1 con mayor contenido en azúcares con la levadura autóctona y la levadura comercial.

Tabla 9. Parámetros físico-químicos de los vinos obtenidos por inoculación de la levadura autóctona en sus diferentes formatos y la levadura comercial sobre el mosto 1 con mayor contenido en azúcares. Media ± DE

Levadura	AUTÓCTONA		COMERCIAL
Formato	Fresca	Seca	Seca
pH	3,13 ± 0,17	3,20 ± 0,07	3,01 ± 0,18
°Brix	7,4 ± 0,3	6,9 ± 0,4	7,2 ± 0,0
Grado	12,7 ± 0,3	12,6 ± 0,6	12,6 ± 0,8
Azúcares reductores (g/l)	5,4 ± 4,6	2,4 ± 2,5	3,9 ± 0,4
Rendimiento EtOH (%)	54,67 ± 1,33	54,39 ± 2,44	54,50 ± 3,53
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,35 ± 0,06	0,47 ± 0,11	0,32 ± 0,02
Acidez total (g/l ácido tartárico)	6,0 ± 0,3	5,5 ± 0,1	6,3 ± 0,1
Glicerol (g/l)	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,6	8,9 ± 0,5
Ácido málico (g/l)	2,31 ± 0,03	2,39 ± 0,24	2,10 ± 0,01
Intensidad colorante	1,480 ± 0,120	1,750 ± 0,410	1,550 ± 0,020
Tonalidad	0,540 ± 0,000	0,600 ± 0,040	0,530 ± 0,010
IPT	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0
Antocianos (mg/l)	137 ± 3	120 ± 14	130 ± 4
Taninos totales (mg/l)	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Parámetros CIELAB:			
L*	65,020 ± 2,330	58,930 ± 7,250	63,730 ± 0,280
a*	45,790 ± 0,080	43,760 ± 4,760	47,290 ± 1,170
b*	5,490 ± 0,090	6,410 ± 0,270	6,400 ± 0,110

- 25 Los resultados obtenidos con las microvinificaciones llevadas a cabo por inoculación de la cepa de levadura autóctona en sus dos formatos (fresco en pasta, seca) y la levadura comercial muestran que:

- 30 - La levadura autóctona, tanto con mostos diferentes como en sus diferentes formatos, mostró una capacidad fermentativa elevada, terminando la fermentación en mostos de 23 °Brix, correspondiendo a un grado alcohólico probable del 13,5 %.
- Tanto en mostos con 23 °Brix como con 25 °Brix, la levadura autóctona comenzó la fermentación de una forma más vigorosa. La levadura comercial tuvo un inicio de fermentación más lento.
- 35 - Ninguna de las levaduras analizadas formó cantidades elevadas de ácido acético y los valores de acidez volátil estuvieron por debajo de 0,54 g/l en todas las microvinificaciones.
- La acidez total estuvo siempre por debajo de los 6,7 g de ácido tartárico/l.

- La formación de glicerol por las levaduras autóctonas fue similar a la de la cepa comercial, caracterizada por una alta producción de este compuesto. El tipo de formato en el que se presentó la levadura no influyó en la producción de glicerol.
- En todas las fermentaciones, la levadura autóctona dio lugar a vinos con grados alcohólicos similares a los obtenidos con levadura comercial.
- En cuanto al rendimiento de etanol, hubo grandes diferencias entre la levadura comercial y la autóctona.
- Respecto a la contribución de la levadura autóctona a los parámetros de color de los vinos, ésta estuvo condicionada por el tipo de mosto que fermentó. Dentro de cada tipo de mosto, no hubo diferencias entre las levaduras inoculadas y los diferentes formatos analizados.
- Respecto al análisis sensorial de los vinos fermentados, la levadura autóctona en todos sus formatos tuvo un comportamiento similar a la levadura comercial en todas las pruebas.

Ejemplo 4: Fermentaciones industriales

La levadura GBiot-EL 011 (CECT 13030), analizada en los ensayos de microvinificación a escala de laboratorio fue testada durante tres vendimias consecutivas en dos bodegas de Rioja Alavesa (Bodegas Vinos de los Herederos del Marqués de Riscal y Bodegas Baigorri). Además de esta levadura, se utilizó como control la misma levadura comercial que en los ejemplos anteriores. Las dos levaduras se analizaron en depósitos que contenían mosto de uva Tempranillo.

La levadura autóctona fue suministrada a las bodegas en el formato fresco en líquido y en pasta. La levadura comercial se analizó en forma de levadura seca activa, que es el formato disponible comercialmente.

Fermentación a escala industrial con el formato fresco líquido

La levadura autóctona se analizó en las dos bodegas de Rioja Alavesa antes mencionadas durante dos vendimias consecutivas. La levadura se suministró en formato líquido. Las inoculaciones se realizaron en depósitos con 20.000 kg. de uvas. La variedad de uva sobre la que se realizó la inoculación fue de la variedad Tempranillo.

Inoculación vendimia año 2006

La tabla 10 muestra los parámetros analíticos del mosto (antes de la inoculación), y del vino finalizada la fermentación alcohólica (FOH), en la bodega 1 del depósito inoculado con la levadura comercial del depósito inoculado con la levadura autóctona en su formato líquido.

	LEVADURA COMERCIAL		LEVADURA AUTÓCTONA EN FORMATO LÍQUIDO	
	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH
pH	3,5	3,52	3,52	3,62
°Brix	23,6	7,8	22,2	7,6
Grado (v/v)	0,00	13,46	0,00	13,45
Rendimiento EtOH (%)				
Azúcares reductores (g/l)	251	6	247	3
SO ₂ libre (mg/l)	16	0	0	0
SO ₂ combinado (mg/l)	17	7	32	13
SO ₂ total (mg/l)	33	7	32	13
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,09	0,24	0,21	0,39
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	4,5	5,9	4,5	5,2
Glicerol (g/l)	0,1	8,7	0,3	7,8
Ácido málico (g/l)	3,11	3,12	2,22	2,64
Intensidad colorante	5,458	8,628	3,751	9,389
Tonalidad	0,416	0,544	0,512	0,588
IPT	26	42	15	50
Antocianos (mg/l)	551	619	218	647
Taninos totales (mg/l)	1,3	2,1	0,8	2,5
Parámetros CIELAB:				
L*	30,005	17,594	36,909	15,631
a*	60,168	48,448	58,76	47,997
b*	23,639	28,414	13,075	26,246

ES 2 524 704 T3

La tabla 11 muestra los parámetros analíticos del mosto (antes de la inoculación), y del vino finalizada la fermentación alcohólica (FOH), de la bodega 2 de uno de los depósitos de fermentación inoculado con la levadura comercial con la levadura autóctona en formato fresco líquido.

	LEVADURA COMERCIAL		LEVADURA AUTÓCTONA EN FORMATO LÍQUIDO	
	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH
pH	No hay datos	3,62	3,69	3,8
°Brix	No hay datos	8	25,2	8,8
Grado (v/v)	No hay datos	13,46	0	14,43
Rendimiento EtOH (%)	No hay datos			
Azúcares reductores (g/l)	No hay datos	1	273	2
SO ₂ libre (mg/l)	No hay datos	2	3	6
SO ₂ combinado (mg/l)	No hay datos	8 3		15
SO ₂ total (mg/l)	No hay datos	10	6	21
Acidez volátil (g/l ácido acético)	No hay datos	0,33	0,06	0,39
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	No hay datos	5,6	4,4	6,1
Glicerol (g/l)	No hay datos	5,8	0,3	9,5
Ácido málico (g/l)	No hay datos	2,06	3,57	3,43
Intensidad colorante	No hay datos	12,27	3,459	11,12
Tonalidad	No hay datos	0,535	0,692	0,591
IPT	No hay datos	52	18	54
Antocianos (mg/l)	No hay datos	749	212	902
Taninos totales (mg/l)	No hay datos	2,6	0,9	2,7
Parámetros CIELAB:				
L*	No hay datos	12,491	39,953	11,125
a*	No hay datos	43,633	53,025	41,424
b*	No hay datos	21,415	20,756	18,909

5 Respecto a la implantación de levadura autóctona, en las dos bodegas se observaron buenos resultados de implantación.

10 Los resultados mostraron características físico-químicas excepcionales en el vino obtenido por inoculación del mosto con la levadura autóctona seleccionada, en comparación con el vino obtenido por inoculación del mosto con la levadura comercial habitualmente empleada en la bodega. A nivel de cata, los vinos obtenidos fueron clasificados por los enólogos de las bodegas como vinos muy correctos y de gran calidad.

15 Todos estos resultados ponen de manifiesto las características excepcionales de la levadura autóctona aislada y seleccionada de Rioja Alavesa, para la elaboración de vino de calidad extraordinaria y que mantiene la tipicidad propia de los vinos de esta importante comarca vitivinícola.

Inoculación vendimia año 2007 con formato fresco en pasta

20 Las inoculaciones se realizaron en depósitos de 20.000 kg. de uvas pertenecientes a las mismas bodegas de arriba. La variedad de uva sobre la que se realizó la inoculación fue levadura de la variedad Tempranillo. En esta vendimia se analizó la levadura autóctona en forma de pasta. Al igual que en las vendimias anteriores, se utilizó como control la misma levadura comercial.

25 En la tabla 14 se muestran los datos obtenidos en el transcurso de la fermentación de los depósitos inoculados con la levadura fresca en pasta y se compararon con los detalles de las inoculaciones con la levadura comercial habitualmente empleada en la bodega. Vinificación en bodega 1

	Levadura autóctona fresca en pasta		Levadura comercial	
	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH
pH	3,41	3,55	3,31	3,56
°Brix	23,2	8	23,2	7,6
Grado (v/v)	0	13,94	0	13,46
Rendimiento EtOH (%)	0	49,61	0	48,11
Azúcares reductores (g/l)	222	6	221	5
SO ₂ libre (mg/l)	0	0	10	0
SO ₂ combinado (mg/l)	15	5	23	0
SO ₂ total (mg/l)	15	5	33	0
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,21	0,09	0,18
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	6,4	5,8	6,9	6,1
Glicerol (g/l)	0,9	8,7	0,2	8,1
Ácido málico (g/l)	4,38	3,58	4,56	3,82
Intensidad colorante	8,841	10,151	6,89	8,148
Tonalidad	0,43	0,515	0,373	0,493
IPT	24	53	19	48
Antocianos (mg/l)	351	502	364	489
Taninos totales (mg/l)	1,2	2,6	1	2,4
Parámetros CIELAB:				
L*	20,128	16,278	30,27	23,614
a*	50,441	47,695	60,729	56,223
b*	31,955	27,293	39,1	37,178

Los resultados muestran muy buenas características físico-químicas en el vino obtenido por inoculación del mosto con esta levadura autóctona seleccionada, en comparación con el empleo de la levadura comercial.

- 5 Las fermentaciones alcohólicas y malolácticas de los depósitos sobre los que se habían inoculado las levaduras autóctonas transcurrieron con total normalidad, elaborándose los vinos perfectamente. Las fermentaciones con esta levadura transcurrieron con total normalidad, elaborándose unos vinos de calidad muy alta y con unas valoraciones organolépticas por cata excepcionales, según los detalles recogidos de las bodegas participantes.
- 10 Los resultados obtenidos con las fermentaciones industriales llevadas a cabo con la levadura autóctona en su formato fresco en pasta fresca y la levadura comercial nos permiten extraer de forma general las siguientes conclusiones:
- La levadura autóctona presenta buenos resultados de implantación.
 - 15 - La levadura autóctona en su formato fresco en pasta ha presentado una capacidad fermentativa elevada y ha dado lugar a vinos con un grado alcohólico adecuado para los vinos de Rioja. Así mismo, se alcanzó un buen rendimiento en la producción de etanol con ambos formatos de la levadura autóctona.
 - Los vinos elaborados con la levadura autóctona fresca en pasta tienen una acidez volátil por debajo de 0,35 g/l tras la fermentación alcohólica y una acidez total por debajo de 6,8 g de ácido tartárico/l. Estos valores son apropiados para los vinos de Rioja.
 - 20 - La inoculación con levadura autóctona fresca en pasta dio lugar a vinos con altas concentraciones de glicerol, valores mayores incluso que los obtenidos con la levadura comercial.
 - Se puede concluir según los resultados obtenidos en su conjunto, que la levadura autóctona fresca en pasta presenta una elevada calidad tecnológica.

25 *Vinificación en bodega 2*

En la tabla 15 se muestran los resultados analíticos durante el transcurso de la fermentación en la bodega 2 de los depósitos en los que se ha inoculado la levadura autóctona fresca en pasta y se comparan con los datos de la levadura comercial habitualmente empleada en la bodega.

30

	Levadura autóctona fresca en pasta		Levadura comercial	
	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH	ANTES DE LA INOCULACIÓN	DESPUÉS DE LA FOH
pH	3,3	3,41	3,22	3,52
° Brix	23,6	7,4	22,4	7,6
Grado (v/v)	0	13,46	0	13,46
Rendimiento EtOH (%)	0	51,37	0	54,81
Azúcares reductores (g/l)	207	1	194	2
SO ₂ libre (mg/l)	0	0	0	0
SO ₂ combinado (mg/l)	0	0	0	22
SO ₂ total (mg/l)	0	0	0	22
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0	0,21	0,03	0,27
Acidez volátil (g/l ácido tartárico)	5,2	5,8	5,8	5,6
Glicerol (g/l)	0,3	9,1	0,4	8,8
Ácido málico (g/l)	3,69	2,9	3,03	3,15
Intensidad colorante	2,588	8,801	3,69	8,064
Tonalidad	0,71	0,491	0,633	0,552
IPT	13	44	18	49
Antocianos (mg/l)	93	552	140	670
Taninos totales (mg/l)	0,6	2,2	0,9	2,4
Parámetros CIELAB:				
L*	47,792	20,529	39,386	17,634
a*	48,681	52,12	55,19	47,498
b*	18,96	33,092	23,745	26,845

Los resultados muestran características físico-químicas excepcionales en el vino obtenido por inoculación del mosto con la levadura autóctona seleccionada en comparación con el vino obtenido por inoculación del mosto con la levadura comercial habitualmente empleada en la bodega.

- 5 Todos estos resultados ponen de manifiesto las características excepcionales de la levadura autóctona aislada y seleccionada de Rioja Alavesa, para la elaboración de vino de calidad extraordinaria y que mantiene la tipicidad propia de los vinos de esta importante comarca vitivinícola.
- 10 Además de evaluar la aportación de las levaduras desde el punto de vista físico-químico, se estudió la capacidad de implantarse en los depósitos inoculados frente a la población indígena presente en el mosto. El estudio de implantación combinó la técnica molecular de ADN mitocondrial y la determinación del fenotipo *killer*. Los resultados obtenidos para cada una de las bodegas se muestran a continuación.
- 15 Los resultados obtenidos con las fermentaciones industriales llevadas a cabo con la levadura autóctona en su formato fresco en pasta y la levadura comercial muestran que:
- La levadura autóctona fresca en pasta presenta buenos resultados de implantación.
 - La levadura autóctona en su formato fresco en pasta ha presentado una capacidad fermentativa elevada y ha dado lugar a vinos con un grado alcohólico adecuado para los vinos de Rioja. Así mismo, se alcanzó un buen rendimiento en la producción de etanol.
 - Los vinos elaborados con la levadura autóctona fresca en pasta presentaron una acidez volátil por debajo de 0,25 g/l tras la fermentación alcohólica y una acidez total por debajo de 6,0 g de ácido tartárico/l. Estos valores son adecuados para vinos Rioja.
 - La inoculación con levadura autóctona fresca en pasta dio lugar a vinos con altas concentraciones de glicerol, valores mayores incluso que los obtenidos con la levadura comercial.
 - La levadura fresca en pasta dio lugar a un vino con alta intensidad colorante y capa alta tras la fermentación alcohólica.

30 Ejemplo 5: Diferenciación de la levadura autóctona frente a la levadura comercial

Con objeto de comprobar si existen diferencias en el consumo de fructosa entre la cepa de levadura autóctona aislada a partir de uvas procedentes de viñedos de Rioja Alavesa y la levadura comercial de referencia, se procedió a realizar una serie de procesos de microvinificación en laboratorio inoculando cada una de las levaduras en sendos frascos de fermentación que contenían mosto estéril de la variedad Tempranillo, del que se determinó el contenido

inicial de glucosa y fructosa. El tamaño de la inoculación tanto de la levadura autóctona como de la comercial, con que se inoculó la levadura estéril fue de 2×10^8 UFC/ml.

En la tabla 16 se indican las características del mosto estéril utilizado para las microvinificaciones.

5

Tabla 16

PARÁMETROS ANALÍTICOS	MOSTO
pH	3,53
°Brix	26
NFA (mg/l)	249,2
Glucosa (g/l)	155,81
Fructosa (g/l)	164,51

Microvinificación I

10 En la siguiente figura se representa la cinética fermentativa de las levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto con el tiempo.

En la figura 8 se muestra que, tanto la levadura autóctona como la cepa comercial, presentaron una cinética fermentativa rápida y regular y terminaron la fermentación en 14 días.

15

Los resultados analíticos de los vinos obtenidos a partir del mosto inoculado se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

MUESTRA	LEVADURA COMERCIAL	LEVADURA AUTÓCTONA
pH	3,5	3,6
°Brix	8,8	8,4
NFA (mg/l)	78,4	78,4
Glucosa (g/l)	0,316	0,215
Fructosa (g/l)	7,625	3,921

20 *Microvinificación II*

En la figura 9 se representa la cinética fermentativa de las levaduras expresada como la evolución de los °Brix del mosto en función del tiempo.

25 Tanto la levadura autóctona como la cepa comercial presentaron una cinética fermentativa rápida y regular y terminaron la fermentación en 14 días.

La tabla 18 muestra los resultados analíticos de los vinos obtenidos en la microvinificación II.

MUESTRA	LEVADURA COMERCIAL	LEVADURA AUTÓCTONA
pH	3,48	3,51
°Brix	9	8,6
NFA (mg/l)	78,4	78,4
Glucosa (g/l)	0,65	0,189
Fructosa (g/l)	11,212	6,119

30

A partir de los datos obtenidos en estas dos microvinificaciones, se observó una considerable diferencia respecto del consumo de fructosa entre las dos levaduras. Tanto en la microvinificación I como en la II, la levadura autóctona consumió más fructosa que la comercial, siendo el valor obtenido de la fructosa residual en el mosto inoculado con la levadura autóctona del orden de la mitad que el obtenido con la levadura comercial. También se observa, aunque con una diferencia menos significativa, que la levadura autóctona permitió obtener un vino con menos contenido en glucosa.

35

Estos datos muestran que la levadura autóctona presentaba una capacidad mayor de consumo y, por tanto, de asimilación de fructosa del mosto, frente a la levadura comercial.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 13030.
2. Cepa según la reivindicación 1, **caracterizada por que** se encuentra en formato líquido, fresco en pasta, seco activo o seco instantáneo.
- 10 3. Uso de la cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011 depositada en la CECT con el número de acceso CECT 13030 en la elaboración de bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación alcohólica.
- 15 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la bebida alcohólica se selecciona de entre vino, cerveza, cava y sidra.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la bebida alcohólica es vino elaborado a partir de mosto de uva.
- 20 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la uva es de la variedad Tempranillo.
7. Uso de la cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* identificada como GBiot-EL 011 depositada en la CECT con el número de acceso CECT 13030 para la producción de biomasa.

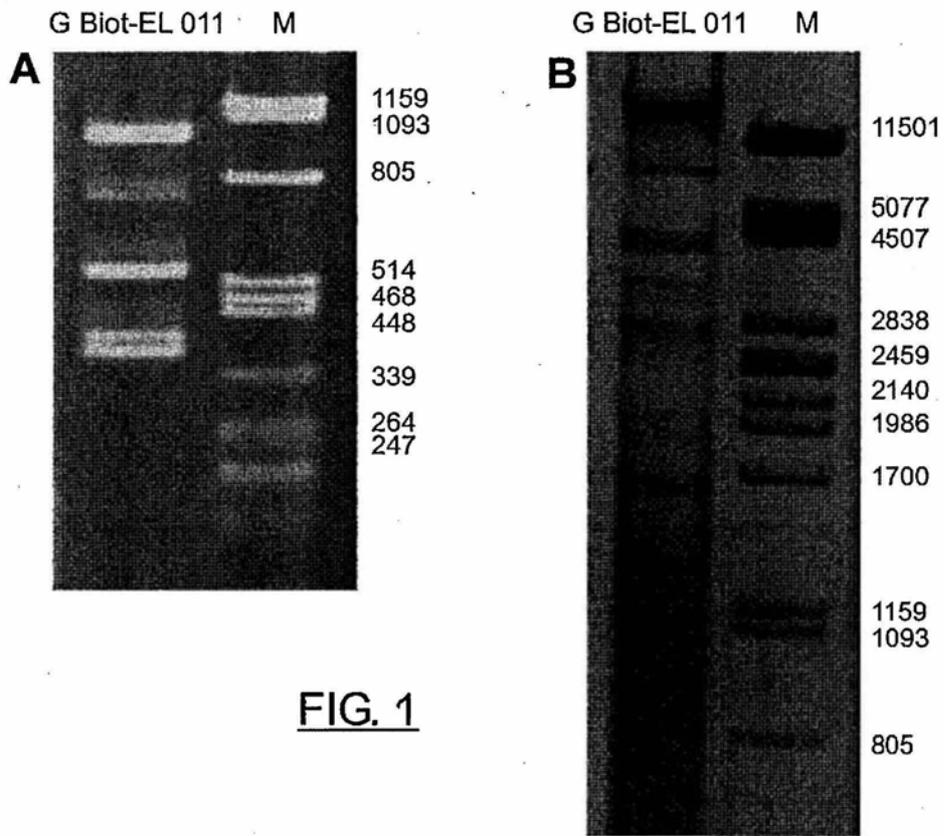


FIG. 1

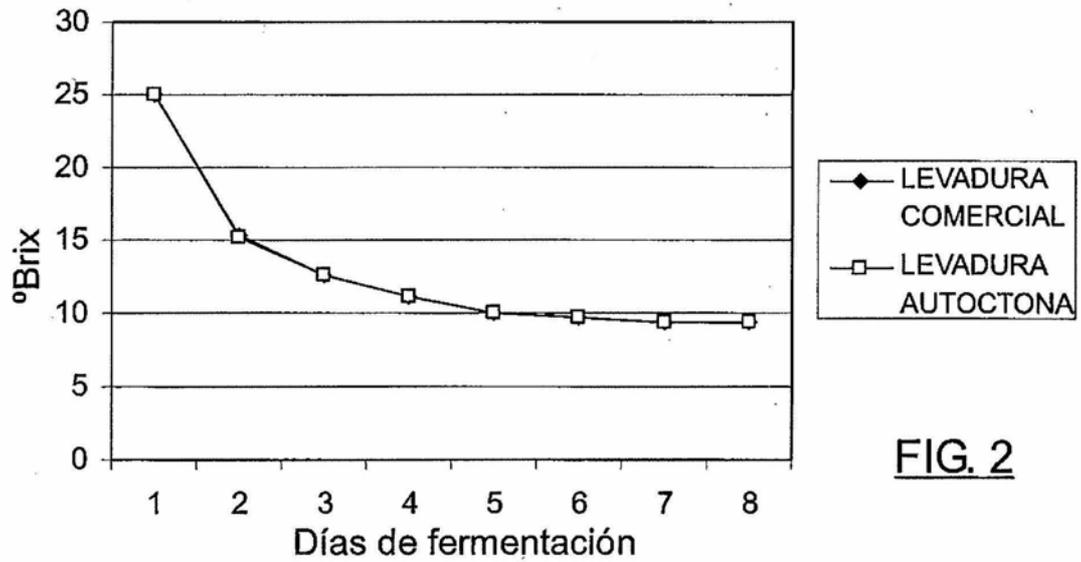


FIG. 2

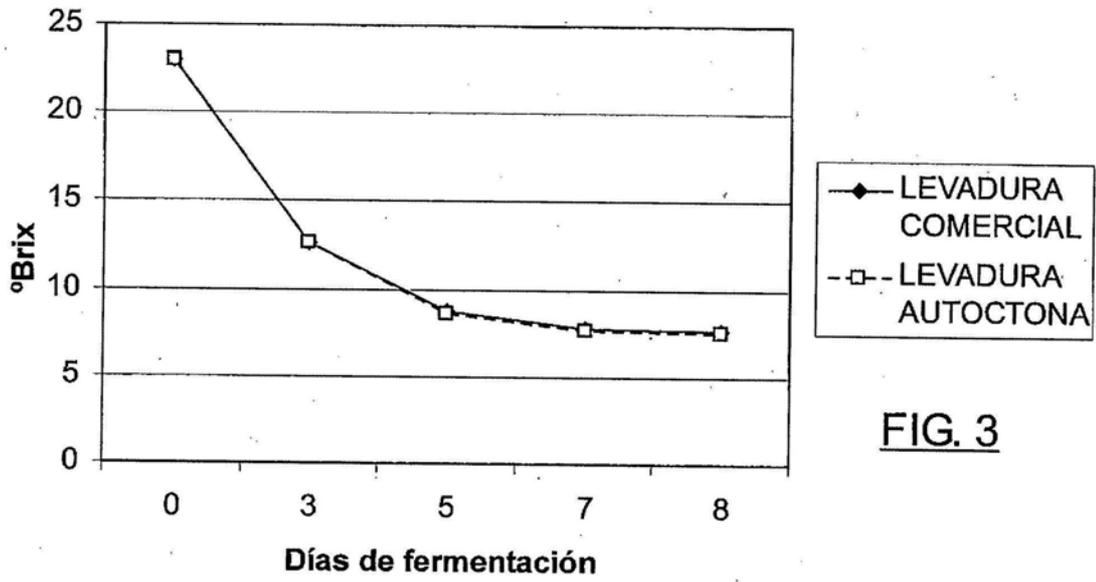


FIG. 3

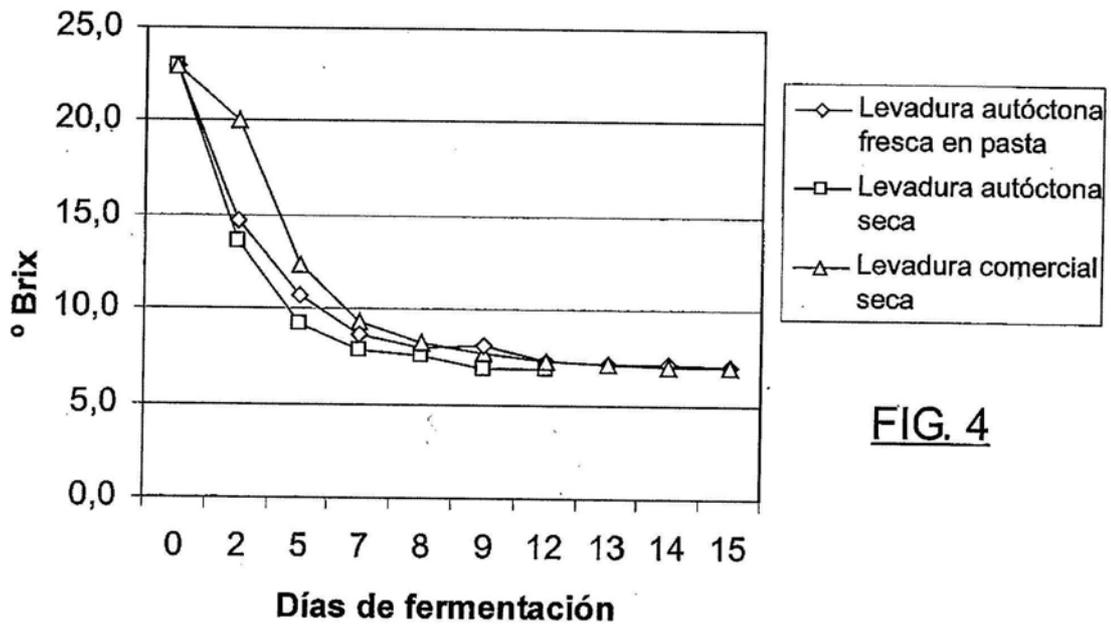


FIG. 4

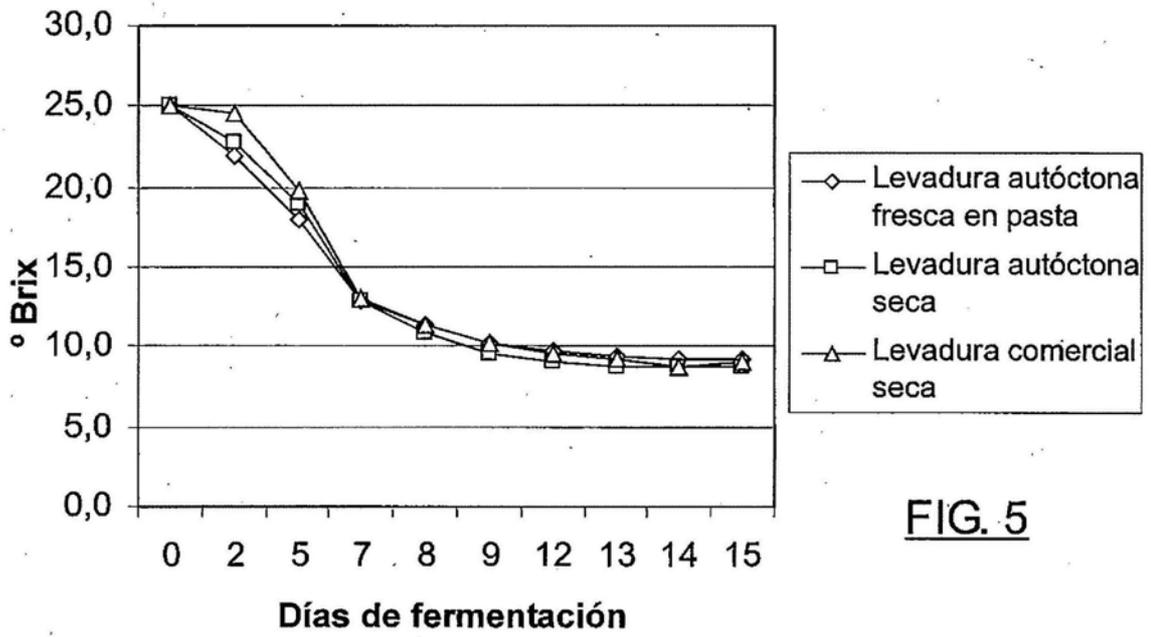


FIG. 5

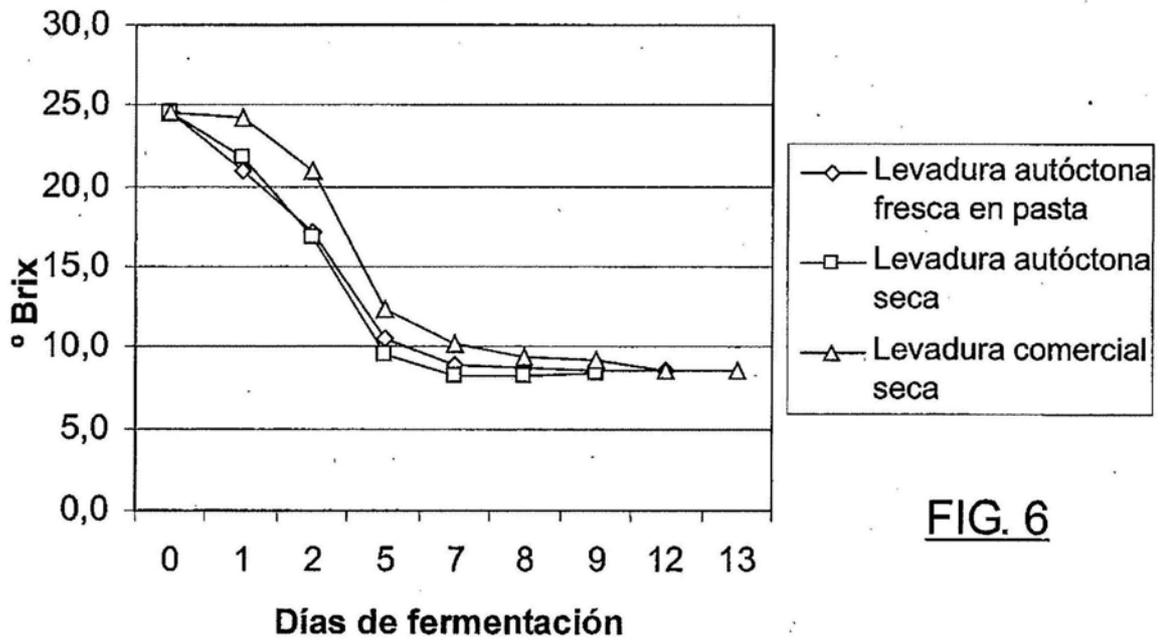


FIG. 6

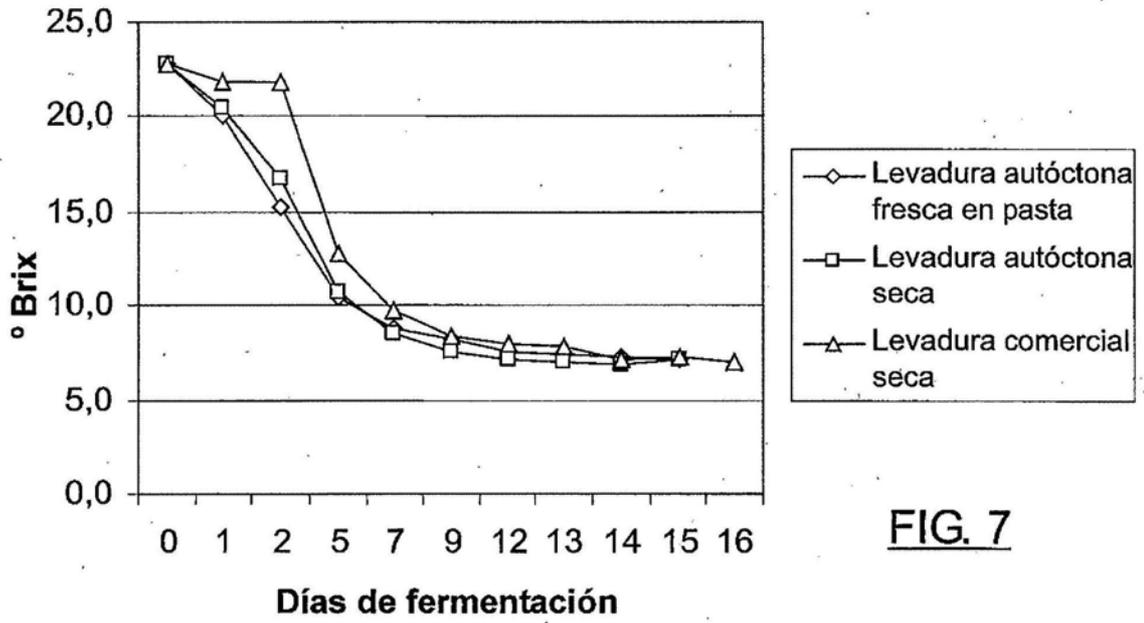


FIG. 7

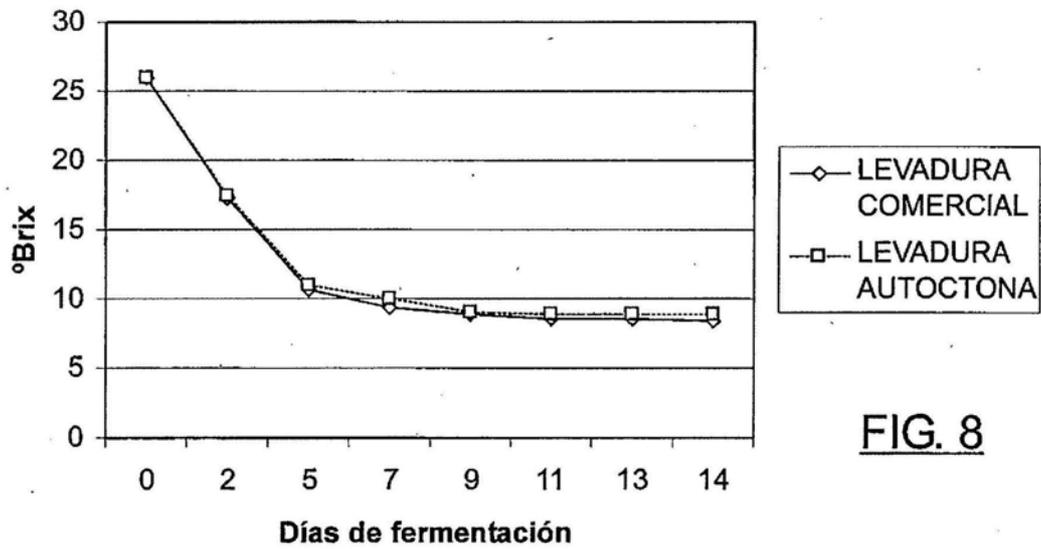


FIG. 8

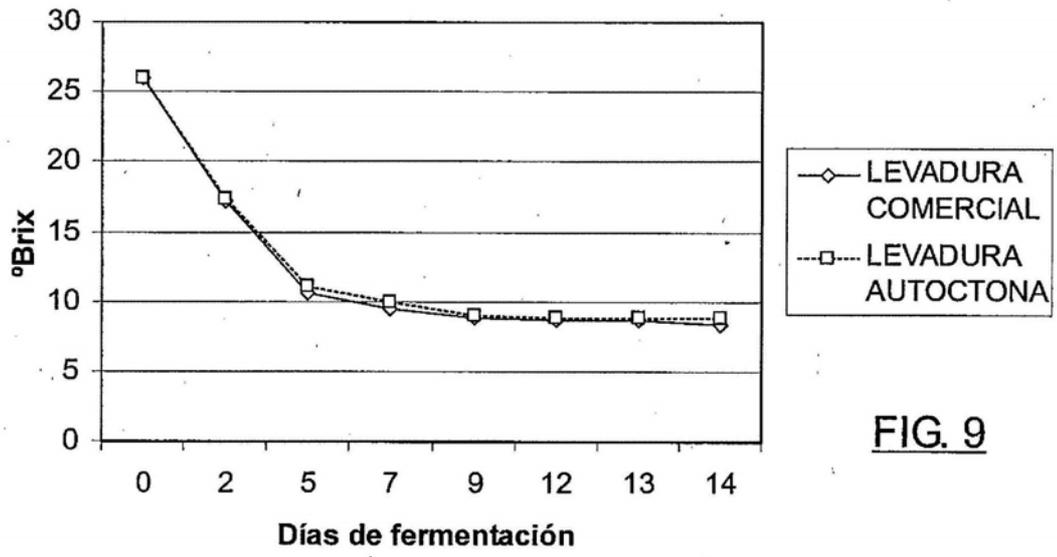


FIG. 9