

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 343**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012 E 12382074 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2634247**

54 Título: **Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y su uso para la producción de bebidas alcohólicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 525 343 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* y su uso para la producción de bebidas alcohólicas

5 La presente invención pertenece al campo de la producción de levaduras que se utilizan en la elaboración de bebidas alcohólicas mediante procesos de fermentación; específicamente, la invención hace referencia a una nueva cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y al uso de la misma para dicho propósito.

Estado del arte anterior

10 Hasta hace muy poco, en particular en la enología del viejo mundo, la idea predominante era que la fermentación espontánea del mosto de uva, es decir aquella que tiene lugar sin la utilización de ningún inóculo externo, daba como resultado vinos con mejores aromas y buqués. Actualmente, sin embargo, se asume que el uso de levaduras seleccionadas presenta numerosas ventajas con respecto a la fermentación espontánea tradicional, tal como por ejemplo una tasa de fermentación más elevada, un consumo máximo de azúcares reductores, una mayor reproductibilidad de la calidad del vino elaborado, la prevención de alteraciones microbiológicas y químicas durante las etapas más tempranas de fermentación y una mayor flexibilidad en el control de la calidad organoléptica del vino.

15 De hecho, las levaduras seleccionadas han sido utilizadas con excelentes resultados en muchos países, para obtener productos finales con una calidad más uniforme que aquellos producidos mediante fermentaciones espontáneas.

20 El vino es el producto obtenido de la fermentación alcohólica, un proceso por el que los azúcares de la uva se convierten en etanol debido a la acción de levaduras. Sin embargo, la verdadera importancia de esto último yace no sólo en la producción del grado alcohólico del vino obtenido, sino, además, en el hecho de que durante el proceso de fermentación, las levaduras están implicadas en la generación de numerosos compuestos secundarios que determinan la calidad final del vino elaborado, además de la tipicidad del mismo.

25 Durante la fermentación del mosto de uva, tiene lugar la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras. Durante las primeras etapas de fermentación (4% - 5% vol. de alcohol), se desarrollan levaduras autóctonas con un bajo poder de fermentación, de los siguientes géneros: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*. Una vez que se sobrepasa el 4% - 5% de vol. de alcohol, el proceso de fermentación es principalmente dominado por la especie *Saccharomyces cerevisiae*, que es más resistente al alcohol (Heard and Fleet, 1988, Journal of Applied Bacteriology, 65: 23-28).

30 El origen de estas levaduras yace principalmente en la superficie de las uvas, además de en el ambiente de la bodega (maquinaria, tolvas, prensas, tanques de fermentación, etc.), siendo esto último una fuente significativa de microorganismos que inoculan los mostos de uva. La cantidad de levaduras presente en la piel de las uvas sanas es muy baja (entre 10^3 y 10^6 UFC/ml), y la cantidad de *Saccharomyces cerevisiae* es incluso menor (menos de 50 células/ml de mosto). En las bodegas, *S. cerevisiae* es la especie predominante (Fleet, 2003, International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22).

35 La microflora presente en las uvas puede verse afectada por un gran número de factores que ejercen una influencia en el número y proporción de las diferentes especies. Estos factores incluyen la temperatura, la pluviometría y otros factores climáticos, el grado de madurez de las uvas, el uso de tratamientos fitosanitarios, el daño físico causado por hongos, insectos, etc., y la variedad de la uva. Los cambios en la flora inicial pueden afectar al proceso de fermentación, causando retrasos en la fermentación e incluso paradas, pueden influenciar la calidad del vino, y conducir a cambios en la acidez volátil y a aromas y/o sabores desagradables.

40 De hecho, la variabilidad de la flora levaduriforme de los mostos de uva puede resolverse mediante la adición, en cada cosecha de uvas, de un inóculo microbiano que, debido a que es predominante, normaliza la flora inicial y, por tanto, conduce a una fermentación homogénea en cada bodega año tras año.

Cuando se seleccionan las levaduras para la producción de vinos de calidad, resulta deseable que tengan las siguientes características:

- 45
- Alta tolerancia al etanol.
 - Total degradación de los azúcares fermentables.
 - Resistencia a SO₂.
 - Alta capacidad de fermentación.

- Producción de glicerol.
- Fenotipo *killer*.
- Carácter fructofílico.
- Resistencia al estrés durante la fermentación.

5 Por el contrario, se desea evitar que la levadura tenga las siguientes características no deseables:

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

10 Actualmente, casi todas las bodegas utilizan inóculos de levadura comercial para la fermentación de sus mostos de uva. El uso de estos inóculos comerciales en las bodegas reduce el riesgo de una cinética de fermentación lenta y defectos en el sabor y el aroma de los vinos. Por esta razón, la inoculación del mosto con estas levaduras es una práctica muy extendida en las bodegas. Sin embargo, en la mayoría de los casos estas levaduras han sido aisladas en áreas diferentes, a partir de diferentes variedades de uva y bajo condiciones diferentes a las que hay en las bodegas que las utilizan, además de ser utilizadas indistintamente en otras denominaciones de origen, tanto españolas como de otros países, siendo la consecuencia de este uso la elaboración de vinos con una cierta pérdida de tipicidad.

15 Una alternativa que se está convirtiendo en válida para sobrellevar las desventajas de una aplicación generalizada y la pérdida de tipicidad es el uso de levaduras autóctonas, aisladas de uvas en un área determinada, para elaborar vinos de esa misma área. De esta manera, el proceso de fermentación puede ser controlado, respetando al mismo tiempo el carácter local de los vinos.

Tales levaduras autóctonas aisladas de diferentes distritos de cultivos vinícolas se describen en EP 1 482 029, EP 2 277 990 and WO 2011/004254.

20 La EP 1 482 029 describe cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a partir de mostos de D.O. Vinos de Madrid que presentan propiedades enológicas tales como alto poder fermentativo, elevada resistencia al SO₂ y el fenotipo killer.

La EP 2 277 990 describe una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con características enológicas, que ha sido aislada de uvas de la variedad Tempranillo recogidas en viñedos de la región vinícola de la Rioja.

30 Otra cepa de *Saccharomyces cerevisiae* útil en la elaboración del vino se describe en el documento WO 2011/004254. La cepa ha sido aislada a partir de las uvas Prosecco cultivadas en la provincia de Treviso en Italia.

En este punto debemos señalar las numerosas ventajas para la elaboración de vinos ofrecidas por el uso de levaduras autóctonas seleccionadas en las designaciones de origen. Por otro lado, la selección debe centrarse en las uvas, no en el ambiente de la bodega, dado que precisamente en las bodegas existe una población residual de levaduras de un origen variado, principalmente comercial.

35 Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas mediante fermentación. Tal como se verá en los ejemplos, esta cepa tiene las ventajas de ser más resistente al estrés en la fermentación, mejorando la percepción organoléptica del vino producido, proporcionando un vino con un contenido de azúcar más bajo (carácter más fructofílico de la cepa), un contenido de glicerol más elevado y una menor acidez volátil, en comparación con otras cepas comerciales, tanto cuando se utiliza a nivel de micro-vinificación y cuando se utiliza en la bodega. Más aún, dicha cepa presenta una mejor adaptación a bajas temperaturas e inicia el proceso de fermentación antes que las levaduras de origen comercial. Tiene una cinética de fermentación más rápida, más regular en presencia de altas concentraciones de azúcares, una alta tolerancia al etanol y al dióxido de azufre, y proporciona una baja producción de ácido sulfhídrico.

40 Por lo tanto, la cepa descrita aquí presenta una capacidad de fermentación regular y elevada a diferentes temperaturas de fermentación y contenidos de azúcares del mosto de uva fermentado. Más aún, la levadura

autóctona GBiot EL-261, o “cepa de la invención”, presenta un contenido más elevado de manoproteínas en la estructura de su pared celular que otras levaduras de origen comercial, que favorecen la estabilización de proteínas y mejora las propiedades organolépticas del vino producido.

5 Por todas estas razones, un primer aspecto de la invención hace referencia a una cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito CECT 13065. En lo sucesivo, haremos referencia a esta cepa como “cepa de la invención” o “cepa GBiot EL-261”. Dicha cepa se depositó el 17 de enero de 2012 en el CECT, Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980, Paterna (Valencia, España).

10 La cepa de la invención pertenece al reino Fungi, división *Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Saccharomyces*, especie *S. cerevisiae*.

En un modo de realización preferido, la cepa de la invención se encuentra en forma líquida, fresca en forma de pasta, en forma seca activa o seca instantánea.

La “forma líquida” hace referencia a una suspensión de células de levadura en un medio líquido, con un contenido de sólidos de, preferiblemente, un 20% - 25%.

15 La “forma fresca en pasta” hace referencia a un formato en el que la levadura está concentrada en una pasta, con un contenido en materia seca de, preferiblemente, un 30% - 35%. Se produce mediante la filtración de la levadura en forma líquida.

La “forma seca activa” hace referencia a un formato en el que la levadura se encuentra en forma seca y tiene un máximo de contenido de humedad de preferiblemente un 8%. Se produce mediante el secado de un lecho fluido de levadura en forma de pasta fresca.

20 La “forma seca instantánea” hace referencia a un formato en el que la levadura se encuentra en forma seca y tiene un contenido de humedad máximo de un 5%. Se produce mediante el secado del lecho fluido de levadura en forma de pasta fresca.

25 La cepa de la invención puede ser utilizada en un proceso de fermentación, por sí misma o combinada con otros microorganismos capaces de realizar una fermentación alcohólica, preferiblemente con otras cepas de levadura del mismo género o un género diferente del de la cepa de la invención, con las ventajas asociadas descritas anteriormente, para obtener bebidas alcohólicas. Por esta razón, otro aspecto de la invención hace referencia al uso de la cepa de la invención para la elaboración de bebidas alcohólicas obtenidas mediante fermentación alcohólica.

30 Por “fermentación alcohólica” se entiende el proceso anaeróbico que, además de generar etanol, libera grandes cantidades de dióxido de carbono (CO₂) y energía para el metabolismo de bacterias y levaduras anaeróbicas. La fermentación alcohólica es un proceso de fermentación biológica en ausencia de aire (oxígeno – O₂), causado por la actividad de algunos microorganismos que procesan carbohidratos (en general azúcares, tales como, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, etc.), para obtener, como productos finales, un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: CH₃-CH₂-OH), dióxido de carbono (CO₂) en forma de un gas y moléculas de ATP que son consumidas por los propios microorganismos en su metabolismo energético celular anaeróbico.

35 “Bebidas alcohólicas” son todas aquellas bebidas que contienen etanol y que incluyen tanto bebidas producidas mediante fermentación alcohólica, tales como, por ejemplo, sin limitarse a las mismas, vino, cerveza, hidromiel, sake, cava o sidra, y bebida producidas mediante destilación, generalmente partiendo de un producto de fermentación (licores, aguardientes, etc.), que incluyen bebidas con características muy variadas, desde diferentes tipos de brandy y licores, hasta whisky, anís, tequila, ron, vodka, cachaza, vermut o ginebra, entre otras. En un modo de realización preferido, la bebida alcohólica se selecciona de la lista que consiste en: vino, cerveza, cava y sidra. En un modo de realización de mayor preferencia, la bebida alcohólica es vino elaborado a partir de mostos de uva.

40 “Vino” es la bebida obtenida a partir de uvas mediante la fermentación alcohólica del mosto o del jugo de las mismas. La fermentación se produce por la acción metabólica de las levaduras que convierten los azúcares de la fruta en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono. El azúcar y los ácidos en la uva son suficientes para el desarrollo de la fermentación. Sin embargo, el vino es el resultado de un conjunto de factores medioambientales, tales como, por ejemplo, sin limitarse a ello, el clima, latitud, altitud, horas de luz, etc. El vino al que hace referencia la presente invención puede ser, sin estar limitado a ello, vino de quema (aquel que se utiliza para la destilación ya que carece de las condiciones adecuadas para el consumo por parte del ser humano), vino de boca (diseñado para su consumo por seres humanos, por ejemplo como una bebida), vino espumoso, vino semi-espumoso, vino blanco, vino tinto, *aloque* (aquel que resulta de mezclar vino blanco y vino tinto), rosado, vino saturado (vino de color rojo oscuro, apenas transparente), clarete (vino transparente, claro, brillante) o vino noble (aquel que no requiere la adición previa de azúcar al mosto de uva para ser elaborado).

Los "mostos de uva" a los que hace referencia la invención pueden provenir de cualquier variedad de uva conocida para los expertos en el arte, que puedan ser utilizados para la elaboración de vinos. En un modo de realización preferido, dichos mostos provienen de uvas de la región vitícola de La Rioja, más preferiblemente, son mostos de variedades de uva roja, de forma aún más preferida de las variedades Garnacha, Graciano, Mencia, Monastrell, Mazuelo, Bobal o Tempranillo. En un modo de realización de aún mayor preferencia, la uva es de la variedad Tempranillo, de forma incluso más preferida de la región vitícola de la Comunidad Autónoma de La Rioja. La variedad "Tempranillo", también denominada "Tinta del país" o "Cencibel", hace referencia tanto a la variedad roja como a la variedad blanca de la mutación reciente: "Tempranillo blanco". La Tempranillo es preferiblemente una uva roja con una piel gruesa, que crece mejor en altitudes relativamente elevadas, pero puede también tolerar climas mucho más cálidos.

Otro aspecto de la invención hace referencia al uso de la cepa de la invención para la producción de biomasa. El término "biomasa" hace referencia a la cantidad de células de levadura viva obtenidas mediante un proceso de fermentación diseñado para producir la levadura. Dependiendo de las condiciones establecidas para producir la levadura (nutrientes, temperatura, aireación, pH), el rendimiento de la biomasa producida y el estado fisiológico de la misma puede variar, lo que tiene un impacto en la actividad de fermentación de la levadura. De igual manera, el proceso de secado es esencial, ya que puede afectar la viabilidad de las células. Por lo tanto, el correcto diseño y desarrollo del proceso de producción son esenciales para que la levadura realice correctamente la fermentación alcohólica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variantes de la misma no tienen la intención de excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para personas expertas en el arte, otros objetos, ventajas y características de la invención surgirán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan con fines ilustrativos, y no tienen la intención de limitar el alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Muestra los perfiles genéticos de la cepa GBiot-EL 261 obtenidos mediante separación por electroforesis en geles de agarosa utilizando amplificación de las secuencias inter-delta (A), y el análisis de fragmentos de restricción de ADN mitocondrial (B). M: marcador de peso molecular (fago λ , digerido con la enzima de restricción PstI).

Figura 2.- Muestra la cinética de la fermentación de la levadura autóctona GBiot-EL 261 y la levadura comercial en la micro-vinificación I. La cinética de la fermentación de estas levaduras se expresó como la evolución de °Brix del mosto de la uva en función del tiempo.

Figura 3.- Muestra la cinética de la fermentación de la levadura autóctona GBiot-EL 261 y de la levadura comercial en la micro-vinificación II.

Figura 4.- Muestra la cinética de la fermentación de la levadura autóctona GBiot-EL 261 y de la levadura comercial en la micro-vinificación III.

Figura 5.- Muestra la cinética de la fermentación de la levadura autóctona GBiot-EL 261 y de la levadura comercial en la micro-vinificación IV.

Figura 6.- Muestra las concentraciones finales de glucosa (A), fructosa (B), glicerol (C) y ácido acético (D) en los vinos inoculados con la levadura comercial y la levadura autóctona partiendo de mostos de uva sintéticos bajo diferentes condiciones iniciales: estándar (100 g/l glucosa + 100 g/l fructosa); exceso de fructosa (50 g/l glucosa + 150 g/l fructosa); únicamente fructosa (200 g/l fructosa) y únicamente glucosa (200 g/l glucosa).

Figura 7.- Muestra el estudio de la resistencia de la levadura autóctona y comercial a continuación de la incubación de la misma en diferentes concentraciones de la toxina K9 durante 5 horas. El crecimiento en placas de YPD tras 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación. Se llevaron a cabo controles tanto del medio YPD como de la toxina.

Ejemplos

A continuación ilustraremos la invención mediante ensayos realizados por parte de los inventores, que muestran la efectividad de la cepa de la invención en procesos de fermentación para la elaboración de bebidas alcohólicas. Estos ejemplos específicos se proporcionan para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen únicamente con fines ilustrativos; por lo tanto, no deben ser interpretados como limitaciones de la invención reivindicada en el presente documento. Por lo tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1. Caracterización de la cepa GBiot-EL 261

1.1. Morfología

- Morfología celular: células ovaladas, redondeadas.

- En medio sólido (agar extracto de malta), la colonia presentó un color blanquecino y una superficie lisa y brillante.

5 - En agar lisina no presentó crecimiento alguno.

- En medio de esporulación (agar acetato en medio de cultivo de Kleyn), formó ascosporas, que contenían 4 esporas por asca. Las esporas presentaban una morfología redondeada.

1.2. Características metabólicas

10 - 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 (-).

- Fermentación de carbohidratos en condiciones de anaerobiosis: la cepa fue Glucosa (+), maltosa (+), sacarosa (+), trehalosa (+), rafinosa (+), β -glucosidasa (+), α -glucosidasa (+) y galactosa (+).

- Asimilación de compuestos nitrogenados: la cepa fue nitrato (-), lisina (-).

15 - Requerimientos de oxígeno: la cepa es anaerobia facultativa.

- Crecimiento a temperaturas diferentes: la cepa creció, al menos, dentro de un rango de temperatura comprendido entre 14 °C y 37 °C.

- Resistencia a la cicloheximida: la cepa presentó su límite de crecimiento en presencia de 100 ppm de cicloheximida.

20 1.3. Características enológicas/tecnológicas de la cepa

La cepa GBiot-EL 261 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 temperaturas, al menos entre 15 °C y 35 °C, siendo la temperatura de fermentación óptima 27 °C.

Presentó una buena capacidad floculante y formación de espuma media.

25 El rendimiento alcohólico fue elevado: 16,8 gramos de azúcar por grado alcohólico producido. Agotó prácticamente todos los azúcares reductores presentes en el mosto de uva, dejando los vinos prácticamente secos (entre 1 - 5 g/l de azúcares residuales).

30 La cepa GBiot-EL 261 presentó una resistencia elevada al dióxido de azufre, resistiendo concentraciones de hasta 75 mg/l de SO₂ total. La cepa de levadura GBiot-EL 261 se sembró en un medio de cultivo que contenía concentraciones de 50, 75 y 100 mg/l de SO₂ y se comprobó el crecimiento tras 48 - 72 h de incubación.

La tolerancia al etanol también fue elevada, aproximadamente un 16% vol. La resistencia al etanol se determinó mediante la inoculación de la cepa autóctona tanto en un medio líquido como en placas de Petri con contenidos en etanol de 12 %, 14 % y 16% v/v.

35 La cepa GBiot-EL 261 presentó un fenotipo *Killer* neutro, es decir, no secretó la toxina *Killer* pero se mostró resistente a la misma. El fenotipo *Killer* se determinó mediante la siembra de la levadura a ser sometida a ensayo en una placa con un medio tamponado, inoculado con un césped de levadura sensible, y en otra placa, con el mismo medio inoculado con un césped de levadura *Killer*. Tras su incubación a 27 °C durante 72 h, se observó crecimiento en ambas placas sobre los dos céspedes de las cepas de control, sin aparición de halos de inhibición.

40 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 (por sus siglas en inglés, de *Bismuth-Glucose-Glycine-Yeast*), una modificación de la fórmula desarrollada por Nickerson (1953). Este medio contiene sulfito de bismuto y varía de un color crema (cepas poco productoras) a un color marrón oscuro (cepas muy

productoras). El grado de oscurecimiento viene determinado por el sulfuro de bismuto, que se forma por la combinación del bismuto en el medio y el H₂S liberado por las levaduras.

5 La producción de glicerol fue elevada, con una media de 11 g/l de glicerol obtenido. El glicerol producido durante la fermentación alcohólica se determinó utilizando una modificación del método enzimático desarrollado por Kreutz (1962).

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

1.4. Caracterización genética

10 La caracterización genética de la cepa GBiot-EL 261 se obtuvo mediante dos técnicas moleculares complementarias: amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las secuencias inter delta que flanquean los retrotransposones Ty1, y el análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial. La Figura 1 muestra los perfiles genéticos de la cepa GBiot-EL 261 obtenidos con cada una de las técnicas.

1.5. Producción de biomasa

15 La biomasa se obtuvo mediante un cultivo Fed-Batch, en un fermentador con una capacidad total de 40 litros (Biostat B), con un control constante del pH, la temperatura y el oxígeno disuelto, y bajo agitación. La alimentación se llevó a cabo utilizando un medio de alimentación con una concentración total de azúcares de 250 g/l (sacarosa, glucosa, fructosa), complementado 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).

20 El fermentador fue inoculado con un volumen de inóculo, asegurando un recuento de células de 10⁶ UFC/ml en el volumen de fermentación inicial.

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 25% (p•v⁻¹) y H₃PO₄ 75 % (p•v⁻¹).

25 - Temperatura: 30 °C.

- Agitación: 700 rpm.

El proceso para obtener la biomasa tuvo una duración de aproximadamente 40 horas. La viabilidad obtenida por ml en el caldo fermentado alcanzó el orden de UFC/ml.

A partir de este caldo se obtuvieron los siguientes formatos de levadura:

30 - Forma líquida: caldo fermentado sin ningún tipo de tratamiento, con un recuento de células viables del orden de 10⁹ UFC/ml.

- Forma en pasta: se obtuvo mediante la filtración del caldo fermentado utilizando un filtro prensa. Este tratamiento permitió obtener una crema con un recuento de células viables del orden de 10¹⁰ UFC/g.

35 - Forma seca activo: este formato se obtuvo a partir de la levadura en forma de pasta mediante un tratamiento de deshidratación que implicaba un secado con lecho fluido. El producto ha de tener un contenido en humedad menor del 8 %. El secado a 37 °C durante 60 minutos proporcionó un producto de levadura seca con un recuento de levaduras viables superior a 5 x 10¹⁰ UFC/g. Cuando se aplica, el producto debe rehidratarse previamente.

40 - Forma seca instantánea: se obtiene a partir de la levadura en forma de pasta mediante un tratamiento de deshidratación por secado en lecho fluido. El producto debe tener un contenido en humedad menor del 5 % y un recuento de levaduras viables ≥ 10¹⁰ UFC/g.

Ejemplo 2. Obtención de la cepa GBiot-EL 261

2.1. Aislamiento de las levaduras

Para aislar las levaduras autóctonas, se recolectaron uvas de la variedad Tempranillo saludables y maduras en diversos viñedos de la región vitícola de la Comunidad Autónoma de La Rioja. Se tomaron muestras de viñedos jóvenes, viñedos viejos y viñedos autóctonos.

- Vid joven: vid menor de 25 años de edad.

5 - Vid vieja: vid con una edad en un rango de entre 25 – 50 años.

- Vid autóctona: vid mayor de 50 años.

10 Las uvas se trasladaron al laboratorio y se almacenaron en un lugar fresco y aireado hasta el procesamiento de las mismas. En ese momento, fueron prensadas y se fermentaron en recipientes estériles. Dichos recipientes se introdujeron en un incubador orbital a una 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 tomaron muestras de estos envases para aislar las levaduras. Las muestras obtenidas para aislar las levaduras se sembraron, a continuación de las correspondientes diluciones decimales, en placas de Petri que contenían agar extracto de malta, y se dejaron 15 incubadas durante tres días a 27 °C. Se tomaron tres colonias diferentes de cada placa, cuya apariencia concordaba con la de *Saccharomyces cerevisiae*, que contenían 30 - 300 colonias. El número total de cepas de levaduras aisladas de las uvas que tenían la apariencia de *S. cerevisiae* fue de 235.

2.2. Selección de levaduras

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

- Crecimiento en lisina-agar: negativo.

20 - Test Rapid: *S. cerevisiae*.

- Fenotipo *Killer*: neutro o *Killer*.

- Formación de ácido sulfhídrico: media o baja.

- Resistencia al dióxido de azufre: crecimiento positivo en placas con al menos 50 mg/l SO₂/l.

- Resistencia al etanol: crecimiento positivo en placas con al menos 12 % de etanol.

25 De todas las cepas de levaduras aisladas, 146 de las cepas fueron identificadas como *S. cerevisiae* mediante el Test Rapid y amplificación por PCR de los fragmentos inter delta.

30 El número total de levaduras seleccionadas bajo estos criterios fueron 32. Estas levaduras se sometieron a un primer proceso de microvinificación en un volumen de 50 ml, y se sometieron a ensayo a tres temperaturas: 15 °C, 27 °C y 35 °C. Las microvinificaciones implicaron la inoculación de las levaduras autóctonas caracterizadas en un mosto de uva estéril y una posterior vinificación a escala de laboratorio bajo condiciones controladas. La inoculación con las levaduras autóctonas preseleccionadas se realizó en mosto de uvas rojas de la variedad Tempranillo procedente de la Comunidad Autónoma de La Rioja. De las 32 levaduras sometidas a ensayo, se seleccionaron las tres levaduras con la mejor cinética a las tres temperaturas del ensayo. Posteriormente, estas tres levaduras se 35 sometieron a un nuevo proceso de vinificación a 27 °C, en un volumen de 200 ml, con mosto estéril de la variedad Tempranillo, para evaluar su contribución organoléptica.

Las tres fermentaciones tuvieron una cinética similar, y los parámetros analíticos fueron similares; sin embargo, el vino obtenido mediante la actividad de fermentación de la cepa identificada como GBiot-EL 261 fue el mejor evaluado; por esta razón, dicha cepa fue seleccionada como la levadura autóctona para la elaboración de vino tinto a partir de uvas de la variedad Tempranillo procedente de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

40 Ejemplo 3. Validación de la levadura autóctona GBiot-EL 261 3.1. Microvinificaciones de laboratorio.

Se realizaron diversas microvinificaciones con la levadura autóctona GBiot-EL 261, en forma líquida, utilizando diferentes mostos de uvas Tempranillo de la Comunidad Autónoma de La Rioja. Paralelamente a esto, se realizaron microvinificaciones con una levadura comercial, también de origen autóctono, que fue utilizada como referencia.

45 Los procesos de vinificación se realizaron en matraces que contenían 200 ml de mosto de uva roja estéril de la variedad Tempranillo procedente del área vitícola de La Rioja.

Microvinificación I

En esta primera microvinificación, el sustrato utilizado fue un mosto estéril de uvas Tempranillo procedente del área vitícola de la Rioja alta, con un contenido inicial de azúcar de 23,8 °Brix, 342 mg/l de nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN, por sus siglas en inglés) y un pH de 3,38. Las fermentaciones se realizaron a 27 °C.

- 5 Como puede observarse en la Figura 2, ambas fermentaciones tuvieron lugar sin paradas y se completaron en 13 días.

Los resultados analíticos de los vinos obtenidos a partir del mosto de uva inoculado fueron los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la microvinificación I.

Parámetros analíticos	Mosto	Vino de la levadura COMERCIAL	Vino de la levadura AUTOCTONA
pH	3,38	3,43	3,35
°Brix	23,8	8,20	8,10
Glucosa (g/l)	107,51	0,00	0,00
Fructosa (g/l)	108,07	2,02	0,88
Etanol % (v/v)	0	15,61	15,26
Glicerol (g/l)	0,01	8,50	10,42
Ácido Málico (g/l)	2,88	2,42	2,72
Acidez total (g/l ácido tartárico)	3,2	4,66	4,42
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,48	0,43

10

La levadura autóctona GBiot-EL 261 permitió obtener un vino con un menor contenido de fructosa y un contenido más elevado de glicerol, en comparación con el vino elaborado con la levadura comercial de origen autóctono.

Análisis del aroma de la microvinificación I

- 15 Para evaluar la contribución organoléptica de la levadura autóctona GBiot-EL 261 al aroma del vino, los compuestos aromáticos de los vinos obtenidos en la microvinificación I fueron analizados mediante cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

La Tabla 2 muestra los datos relativos a los compuestos en donde se observaron diferencias significativas. Los resultados corresponden a las medias de las dos microvinificaciones realizadas con cada una de las levaduras.

20

Tabla 2. Composición aromática de los vinos obtenidos en la microvinificación I, inoculados con la levadura autóctona GBiot-EL 261 y la levadura comercial.

Compuestos volátiles (mg/l)	Vino de la levadura AUTOCTONA	Vino de la levadura COMERCIAL
Lactato de etilo	3	2
Succinato de dietilo	0,27	0,25
Hexanoato de etilo	0,136	0,097
Isovalerato de etilo	0,0012	0,0009
Butirato de etilo	0,052	0,04
Etanal	47,5	62,5
Acetato de etilo	18,5	21

Los vinos inoculados con la levadura autóctona GBiot-EL 261 presentaron la concentración más elevada de ésteres etílicos y una menor concentración de etanal y acetato de etilo.

5 El succinato de etilo y el lactato de etilo son dos ésteres etílicos relacionados con los aromas lácteos y del café. En particular, el lactato de etilo contribuye a mitigar los límites amargo y ácido en el sabor y, según algunos autores, contribuye a enriquecer el volumen y la redondez en boca.

El hexanoato de etilo está relacionado con los descriptores del aroma afrutado, específicamente aromas de piña y manzana, mientras que el isovalerato de etilo y el butirato de etilo contribuyen a aromas de frutos del bosque, tanto rojos (fresas, frambuesas, etc.), como negros (moras, arándanos, etc.), característicos de los vinos tinto Rioja.

10 La mayor parte de etanal o acetaldehído es producido por las levaduras al principio de la fermentación alcohólica. Cuando se produce en exceso, es responsable del típico olor del vino oxidado, con aromas a vino de Jerez o a manzanas excesivamente maduras que no son deseables en ningún vino de mesa.

15 El ácido acético puede reaccionar con etanol, para producir acetato de etilo, un compuesto que da al vino un olor a pegamento, laca para el pelo o esmalte de uñas. Debido a que ambos compuestos son el resultado de la degradación oxidativa del vino, el olor a ácido acético y el olor a pegamento aparecen a menudo de forma simultánea en el vino; por esta razón, resulta deseable una concentración final menor en el vino. De hecho, en concentraciones bajas (< 50 mg/l), puede resultar positivo y aportar complejidad al aroma.

20 En resumen, los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico de los vinos obtenidos en la microvinificación I muestran que la levadura autóctona GBiot EL-261 produce una mayor cantidad de ésteres etílicos, cuyos descriptores sensoriales corresponden a aromas afrutados, en particular de frutos del bosque. Esta característica refuerza su carácter autóctono y su respeto por el carácter varietal y la tipicidad de los vinos Rioja.

25 Más aún, los vinos obtenidos en esta microvinificación fueron catados por diversos enólogos de bodegas en la Comunidad Autónoma de La Rioja. En la evaluación organoléptica, basada en la apreciación de la calidad del vino en nariz y en boca, ambos vinos eran correctos desde un punto de vista organoléptico, y no se apreciaron defectos. El vino inoculado con la levadura autóctona GBiot-261 fue el mejor evaluado por el panel de catadores. En el vino obtenido con la levadura GBiot-EL 261, la evaluación sensorial subrayó la presencia de frutos rojos y negros (fresas, moras, arándanos) en nariz, además de una muy buena acidez y volumen en boca, lo que da como resultado un vino muy equilibrado que es persistente en boca. Esta evaluación sensorial concuerda con los resultados analíticos obtenidos mediante GC-MS.

Microvinificación II

30 Para evaluar la actividad de fermentación de la nueva levadura GBiot-EL 261 bajo condiciones estresantes de fermentación, y así evaluar su poder de fermentación, se realizó una fermentación a baja temperatura, específicamente a 15 °C. El mosto de uva utilizado fue el mismo que en la microvinificación previa y también fue esterilizado, como en el caso anterior.

35 Como puede observarse en la Fig. 3, la levadura autóctona mostró una mejor adaptación a una baja temperatura y permitió iniciar el proceso de fermentación antes que la levadura comercial. En cuanto a los resultados analíticos de los vinos obtenidos en esta microvinificación, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la microvinificación II.

Parámetros analíticos	Mosto	Vino de la levadura COMERCIAL	Vino de la levadura AUTÓCTONA
°Brix	23,8	8,80	8,40
Glucosa (g/l)	107,51	0,98	4,53
Fructosa (g/l)	108,07	50,04	20,95
Etanol % (v/v)	0	15,60	14,98
Glicerol (g/l)	0,01	9,85	10,68
Ácido Málico (g/l)	2,88	2,79	2,01
Acidez total (g/l ácido tartárico)	3,2	3,56	3,71
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,65	0,51

Como puede observarse, la levadura autóctona GBiot-EL 261 proporcionó al vino un menor contenido de azúcar y un contenido más elevado de glicerol, como en el caso de las microvinificaciones realizadas a 27 °C. La acidez volátil fue también menor en el vino elaborado con la levadura autóctona GBiot-EL 261.

Microvinificación III

- 5 Para continuar evaluando el poder de la cinética de la levadura autóctona, se realizaron microvinificaciones con mostos de uva estériles a 35 °C. El mosto utilizado fue el mismo que en las anteriores microvinificaciones.

Tal como se muestra en la Figura 4, ambas levaduras realizaron la fermentación en el mismo periodo de tiempo. Como en las anteriores microvinificaciones, la adaptación de la levadura autóctona GBito-EL 261 a condiciones estresantes fue más rápida que la de la levadura comercial.

- 10 La Tabla 4 muestra los resultados de los análisis realizados en los vinos obtenidos bajo estas condiciones.

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

Parámetros analíticos	Mosto	Vino de la levadura COMERCIAL	Vino de la levadura AUTÓCTONA
°Brix	23,8	10,00	9,60
Glucosa (g/l)	107,51	1,80	1,07
Fructosa (g/l)	108,07	13,92	13,75
Etanol % (v/v)	0	9,96	9,27
Glicerol (g/l)	0,01	10,20	12,46
Ácido Málico (g/l)	2,88	2,68	2,98
Acidez total (g/l ácido tartárico)	3,2	2,35	3,78
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,63	0,43

- 15 En esta microvinificación, se observó que el vino elaborado con la levadura autóctona GBiot-EL 261 presentó un contenido más elevado de glicerol y una acidez volátil menor que la obtenida con la levadura comercial de origen autóctono.

Microvinificación IV

En esta microvinificación, se evaluó la capacidad de fermentación de ambas levaduras en mostos de uva con un contenido inicial de azúcar elevado. Se añadió azúcar al mismo mosto estéril utilizado en las anteriores microvinificaciones hasta que se alcanzaron 25 °Brix. La temperatura de las fermentaciones fue de 27 °C.

- 20 La Figura 5 muestra que la cinética de la fermentación con altas concentraciones de azúcar fue más rápida y más regular con la levadura autóctona. El comienzo de la fermentación fue más rápido y los azúcares residuales al final de la fermentación fueron menores, en particular la fructosa. Una vez más se observó que la levadura autóctona GBiot-EL 261 se adapta mejor a condiciones estresantes.

- 25 La Tabla 5 muestra los resultados analíticos de los vinos obtenidos a partir de mosto de uva con un contenido de azúcar elevado.

Tabla 5. Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la microvinificación IV.

Parámetros analíticos	Mosto	Vino de la levadura COMERCIAL	Vino de la levadura AUTÓCTONA
°Brix	25	8,80	8,40
Glucosa (g/l)	118,85	0,80	0,60
Fructosa (g/l)	116,18	2,06	0,79
Etanol % (v/v)	0	11,21	11,19

Tabla 5. (continuación)

Parámetros analíticos	Mosto	Vino de la levadura COMERCIAL	Vino de la levadura AUTÓCTONA
Glicerol (g/l)	0,01	9,18	11,14
Ácido Málico (g/l)	2,88	2,67	2,11
Acidez total (g/l ácido tartárico)	3,2	2,73	1,61
Acidez volátil (g/l ácido acético)	0,24	0,65	0,48

5 Como en las anteriores microvinificaciones, se observó que el vino elaborado con la levadura autóctona GBiot-EL 261 contenía una concentración más elevada de glicerol y una acidez volátil menor a la obtenida con la levadura comercial de origen autóctono. Además, una vez más se observó un carácter más fructuoso de la levadura GBiot-EL 261, tal como se muestra en el valor de fructosa obtenido para el vino elaborado con la levadura autóctona GBiot-EL 261.

3.2. Consumo de azúcares

10 En el mosto de vino, la glucosa y la fructosa son los principales azúcares fermentables y se encuentran por lo general en cantidades iguales en el mosto de uva. *S. cerevisiae* es una levadura glucofílica, que muestra una mayor preferencia por la glucosa que por la fructosa. Durante la fermentación alcohólica, la relación del consumo de glucosa es mayor que la relación del consumo de fructosa; por esta razón, al final del proceso, la concentración de fructosa residual es más elevada. Algunos autores declaran que las diferencias en las relaciones de utilización de la glucosa y la fructosa de cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, pueden ser atribuidas a diferencias en la eficiencia en el transporte de los dos azúcares. Otros sugieren que la preferencia de *S. cerevisiae* por la glucosa sobre la fructosa depende de la cepa, y que la diferencia en el consumo entre la glucosa y la fructosa no es un parámetro fijo sino que depende de la historia genética de la levadura y de las condiciones externas.

Una buena capacidad de consumo de fructosa es de gran interés, ya que garantiza tener menos problemas en la fermentación, incluyendo las paradas en la fermentación causadas por los altos niveles iniciales de azúcar.

20 Para comprobar si existían diferencias en el consumo de fructosa entre la cepa de levadura autóctona aislada a partir de uvas de viñedos de La Rioja, y la levadura comercial de referencia, se llevaron a cabo una serie de procesos de microvinificaciones en laboratorio, inoculando cada una de las levaduras en matraces de fermentación que contenían mosto sintético MS300, que simula la composición del mosto de uva. Las condiciones iniciales del mosto fueron modificadas, cambiando la concentración inicial de azúcares: (i) Condiciones estándar: 100 g/l glucosa + 100 g/l fructosa; (ii) Exceso de fructosa: 50 g/l glucosa+ 150 g/l fructosa; (iii) Sólo fructosa: 200 g/l fructosa; (iv) Sólo glucosa: 200 g/l glucosa. En todos los casos, la concentración inicial de nitrógeno asimilable por levaduras (YAN) fue de 300 mg/l y el pH fue de 3,47. Las microvinificaciones se realizaron por triplicado, inoculando 2×10^6 UFC/ml en un volumen total de 30 ml, a 27 °C, bajo agitación.

30 Después de que hubieran transcurrido 8 días de fermentación, y una vez que todas las microvinificaciones se completaron, se tomaron muestras y los azúcares residuales, además del glicerol y del ácido acético, de los vinos obtenidos se cuantificaron mediante HPLC (Figura 6).

Los resultados obtenidos en las microvinificaciones realizadas con diferentes contenidos y concentraciones de azúcar permitieron concluir lo siguiente:

35 - Las concentraciones tanto de la glucosa residual como de la fructosa residual fueron menores en todos los mostos de uva inoculados con la levadura autóctona GBiot-EL 261 (Figuras 6A y 6B), siendo el consumo de fructosa de particular interés.

- La producción de glicerol por la levadura autóctona GBiot-EL 261 fue mayor bajo las diferentes condiciones estudiadas, en todos los casos superando 9,6 g/l (Fig. 6C).

40 - Finalmente, la acidez volátil (g/l de ácido acético) en los vinos fermentados con la levadura autóctona GBiot-EL 261 fue menor (Fig. 6D).

3.3. Contenido de manoproteínas en la pared celular

Las manoproteínas son componentes mayoritarios (25 % - 50 %) de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y, junto con otros polisacáridos, forman una parte de la estructura de la misma. Son

liberadas durante la fase activa del crecimiento de las células y tras la muerte celular, durante la llamada fase autolítica.

Estos compuestos son de gran interés enológico por diversas razones:

- Mejoran la estabilidad proteica y tartárica de los vinos.
 - 5 - Mejoran la estabilidad de la materia colorante.
 - Reducen la astringencia de los vinos tintos.
 - Mejoran la persistencia aromática.
 - Mejoran las características de espuma.
 - Aumentan la untuosidad, el cuerpo, la dulzura y la redondez del vino.
- 10 La liberación de manoproteínas durante la fermentación alcohólica depende de diversos factores, siendo uno de los principales la cepa de levadura. Ciertas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestran una producción marcada de estas macromoléculas durante la fermentación, y este factor es uno de los nuevos criterios de selección para levaduras diseñadas para la fermentación alcohólica.

15 Para evaluar la liberación de manoproteínas por parte de las levaduras, se estudió la resistencia a la toxina K9. La levadura *Williopsis saturnus* var. *mrakii* produce la toxina K9, que inhibe la síntesis de la pared celular y la actividad de la β -1,3-glucano sintasa, una enzima que sintetiza β -1,3-glucanos, macromoléculas estructurales que, junto con las manoproteínas, componen la pared celular de las levaduras. Las levaduras con una concentración más elevada de manoproteínas reducen la permeabilidad de la pared y, por tanto, limitan el acceso de la toxina K9 a la capa β -1,3-glucano, volviendo las células más resistentes.

20 Para producir la toxina, se realizó un cultivo celular de la levadura *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (CECT 11031) en medio YPD, incubándolo a 19 °C y 150 rpm durante 4 días. Una vez que el crecimiento se completó, el sobrenadante que contenía la toxina se centrifugó y se filtró (0,22 μ m). Por otro lado, se realizaron cultivos de la levadura autóctona GBiot-EL 261 y la levadura comercial en medio líquido YPD durante 24 horas. Se prepararon inóculos de ambas levaduras para lograr una población inicial de 10^3 UFC/ml, en 4 tubos que contenían diferentes concentraciones de la toxina K9: 0 %, 25 %, 50 % y 100 % (v/v), y se dejó incubar durante 5 horas a 27 °C. Después de transcurrido este tiempo, se tomaron 5 μ l de alícuotas de cada uno de los tubos y se sembraron en placas con YPD a 27 °C. Las lecturas de los resultados del crecimiento de las levaduras se llevaron a cabo a las 24 y 48 h.

30 Como puede observarse en la Figura 7, el crecimiento de la levadura autóctona GBiot-EL 261 a las 24 (Fig. 7A) y a las 48 horas (Fig. 7B) fue mayor, siendo particularmente evidente a las 24 horas. También se observó que, a las 48 horas y con un 100 % de concentración de la toxina K9, la levadura autóctona GBiot EL-261 presentó una mayor resistencia, como puede verse en el crecimiento, que es mucho mayor.

Por lo tanto, puede concluirse que la levadura autóctona GBiot EL-261 tiene un contenido más elevado en manoproteínas en la estructura de su pared celular, y que su contribución a la estabilización y a las propiedades organolépticas que mejoran la calidad del vino es mayor que la de la levadura comercial.

35 3.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en los ensayos de validación realizados con la cepa de levadura autóctona GBiot-EL 261 y la levadura comercial de origen autóctono permitieron sacar las siguientes conclusiones generales:

- La levadura autóctona GBiot-EL 261 presentó una capacidad de fermentación elevada y regular a diferentes temperaturas de fermentación y con diferentes contenidos de azúcar en el mosto de uva.
- 40 - En los mostos de uva tanto con 23 °Brix como 25 °Brix, la levadura autóctona GBiot-EL 261 inició la fermentación de forma más vigorosa. La levadura comercial presentó un comienzo de la fermentación más lento. En cualquier caso, tanto la levadura comercial como la autóctona terminaron la fermentación dentro de un periodo de tiempo similar.
- Los vinos elaborados a partir de mosto de Tempranillo estéril y con la levadura autóctona GBiot-EL 261 presentaron un contenido de glicerol más elevado y un contenido en fructosa menor, además de una menor acidez volátil, en comparación con los vinos elaborados con la levadura comercial de origen autóctono.

- El análisis sensorial realizado permitió destacar el carácter autóctono de la levadura, que respetó y mantuvo la tipicidad de los vinos elaborados con la variedad de uva Tempranillo.

- La levadura autóctona GBiot EL-261 presenta un contenido de manoproteínas más elevado en la estructura de su pared celular; por esta razón, podría esperarse obtener un vino más estable, con mejores propiedades organolépticas que el que puede obtenerse con la levadura comercial.

Como conclusión general, puede establecerse que, debido a sus características cinéticas y enológicas y a su contribución organoléptica, la levadura autóctona GBiot-EL 261 presenta una elevada calidad tecnológica y es adecuada para la elaboración de vinos de la variedad Tempranillo de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Ejemplo 4. Fermentaciones industriales

10 La levadura autóctona seleccionada, analizada en los ensayos de microvinificación a escala de laboratorio, se puso a prueba durante la cosecha de uva del 2011 en dos bodegas de la Rioja Alta. Además de esta levadura, se utilizó la misma levadura comercial que se sometió a ensayo en las microvinificaciones como control. Las dos levaduras se sometieron a ensayo en depósitos que contenían mosto de uva Tempranillo.

15 La levadura autóctona se suministró a las bodegas fresca en forma de pasta. La levadura comercial se sometió a ensayo en forma de levadura seca activa, que es el formato que se encuentra disponible comercialmente.

A continuación, se muestran los resultados para cada una de las bodegas A y B (Tablas 6 y 7, respectivamente).

Tabla 6. Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la BODEGA A.

Parámetros analíticos	Levadura COMERCIAL		Levadura AUTÓCTONA	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino
pH	3,3	3,20	3,30	3,30
°Brix	22,6	8,60	22,0	8,80
Glucosa (g/l)	101,51	0,00	99,04	0,00
Fructosa (g/l)	121,01	0,00	116,07	0,00
Etanol % (v/v)	0	13,98	0,00	14,00
Glicerol (g/l)	1,1	9,66	0,00	10,94
Ácido Málico (g/l)	1,3	2,20	1,50	2,60
Acidez total (g/l ácido tartárico)	6,68	5,88	5,86	5,84
Acidez volátil (g/l ácido acético)	< 0,10	0,32	< 0,10	0,31

Tabla 7. Parámetros analíticos de los vinos obtenidos en la BODEGA B.

Parámetros analíticos	Levadura COMERCIAL		Levadura AUTÓCTONA (Depósito 1)		Levadura AUTÓCTONA (Depósito 2)	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino	Mosto	Vino
pH	3,2	3,5	3,4	3,1	3,4	3,4
°Brix	21,2	8,00	23,70	8,80	21,50	8,00
Glucosa (g/l)	93,48	0,00	114,21	0,00	100,84	0,00
Fructosa (g/l)	102,31	2,02	121,22	0,88	108,77	0,88
Etanol % (v/v)	0	11,76	0,00	13,75	0,00	12,70

Tabla 7 (continuación)

Parámetros analíticos	Levadura COMERCIAL		Levadura AUTÓCTONA (Depósito 1)		Levadura AUTÓCTONA (Depósito 2)	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino	Mosto	Vino
Glicerol (g/l)	0	9,60	0,00	10,42	0,00	10,14
Ácido Málico (g/l)	1,7	2,50	2,00	2,70	2,60	> 3
Acidez total (g/l ácido tartárico)	5,26	>10	5,74	4,66	5,58	3,68
Acidez volátil (g/l ácido acético)	< 0,10	0,21	< 0,10	0,14	< 0,10	< 0,10

5 A nivel de la bodega, se observó la misma tendencia que en las microvinificaciones a nivel de laboratorio, de tal manera que se obtuvieron vinos con un mayor contenido en glicerol y un menor acidez volátil. En los vinos de la bodega B, se observó además un menor contenido de fructosa, que una vez más corroboró el mayor carácter fructofílico de la levadura autóctona GBiot-EL 261.

10 Además de la caracterización físico-química de los vinos obtenidos, se comprobó la implantación de la levadura frente a la población indígena presente en el mosto de uva. El estudio de implantación se realizó estudiando los perfiles genéticos de la cepa GBiot-EL 261, obtenidos mediante separación electroforética en geles de agarosa utilizando amplificación de las secuencias inter delta y determinación del fenotipo *killer*. Los resultados de implantación se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Resultados de la implantación en la bodega A.

Levadura inoculada	Concordancia perfil inter- δ + fenotipo <i>killer</i>	Grado de implantación
Levadura COMERCIAL	100 %	IMPLANTADA
Levadura AUTÓCTONA	100 %	IMPLANTADA

15 Tanto la levadura autóctona GBiot-EL 261 como la levadura comercial se implantaron en los depósitos inoculados con las mismas en la Bodega A. Tanto el perfil molecular como el fenotipo *killer* del 100 % de los aislados obtenidos en las muestras de vino, fermentaron con las levaduras en concordancia con la cepa inoculada en el depósito.

Tabla 9. Resultados de la implantación en la bodega B.

Levadura inoculada	Concordancia perfil inter- δ + fenotipo <i>killer</i>	Grado de implantación
Levadura COMERCIAL	100 %	IMPLANTADA
Levadura AUTÓCTONA (Depósito 1)	100 %	IMPLANTADA
Levadura AUTÓCTONA (Depósito 2)	100 %	IMPLANTADA

20 Como en el caso de la bodega A, tanto la levadura autóctona GBiot EL-261 como la levadura comercial se implantaron en los depósitos inoculados con las mismas, en la bodega B. El perfil molecular y el fenotipo *killer* del 100 % de los aislados concordaron con la levadura inoculada.

Conclusiones

Los resultados obtenidos con las fermentaciones industriales realizadas con la levadura autóctona fresca en forma de pasta y la levadura comercial permitieron sacar las siguientes conclusiones generales:

25 - La levadura autóctona GBiot-EL 261 presentó buenas cualidades de implantación.

- La levadura autóctona GBiot-EL 261 presentó una alta capacidad de fermentación y dio como resultado vinos con un grado alcohólico adecuado para los vinos Rioja. Más aún, se logró un buen rendimiento en la producción de etanol.

ES 2 525 343 T3

- La levadura autóctona GBiot-EL 261 produjo una mayor cantidad de glicerol y una menor acidez volátil que la levadura comercial.
- La levadura autóctona GBiot-EL 261 presentó un mayor carácter fructofílico.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos tipo con número de depósito CECT 13065.
- 5 2. Cepa según la reivindicación 1, **caracterizada porque** se encuentra en forma líquida, fresca en pasta, seca activa o seca instantánea.
3. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para la elaboración de bebidas alcohólicas obtenidas mediante fermentación alcohólica.
4. Uso según la reivindicación 3, en donde la bebida alcohólica se selecciona de la lista que consiste en: vino, cerveza, cava y sidra.
- 10 5. Uso según la reivindicación 4, en donde la bebida alcohólica es vino elaborado a partir de mostos de uva.
6. Uso según la reivindicación 5, en donde la uva es de la variedad Tempranillo.
7. Uso de la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para la producción de biomasa.

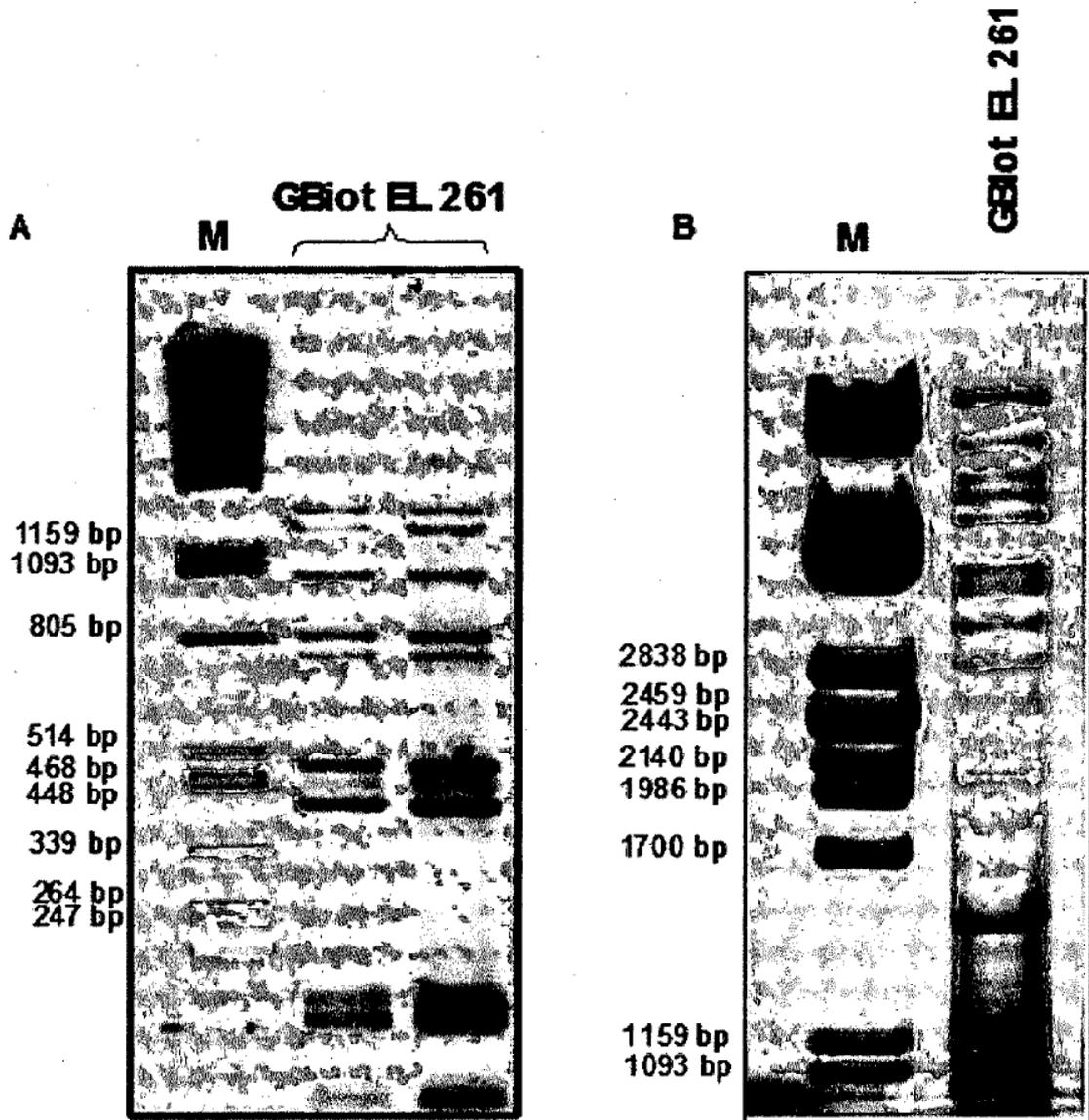


FIG. 1

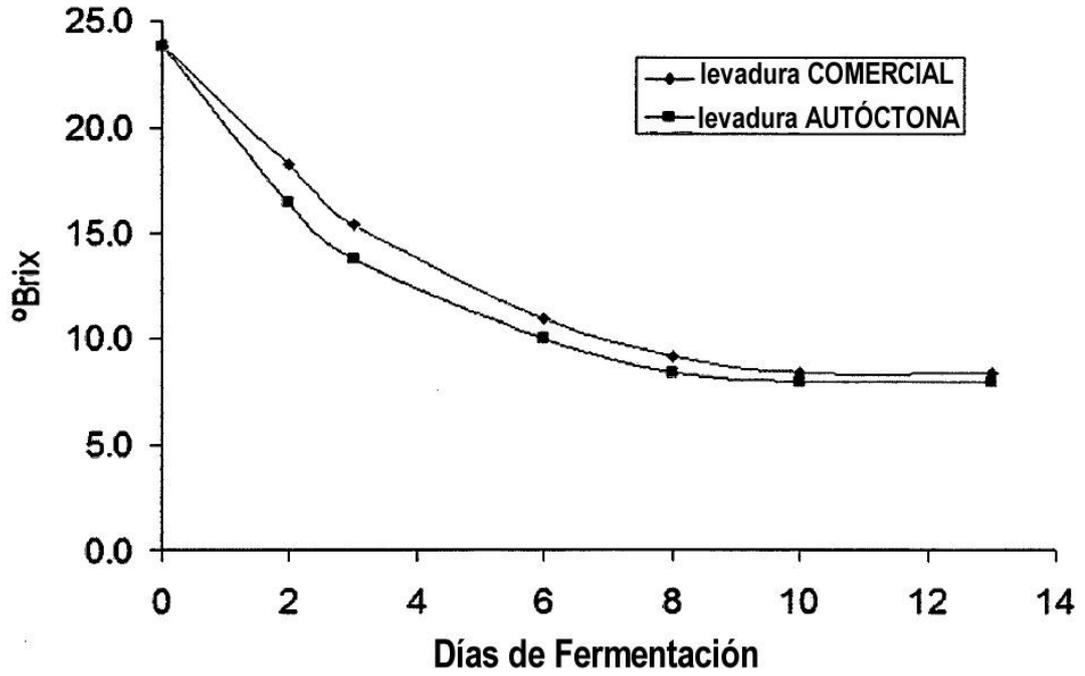


FIG.2

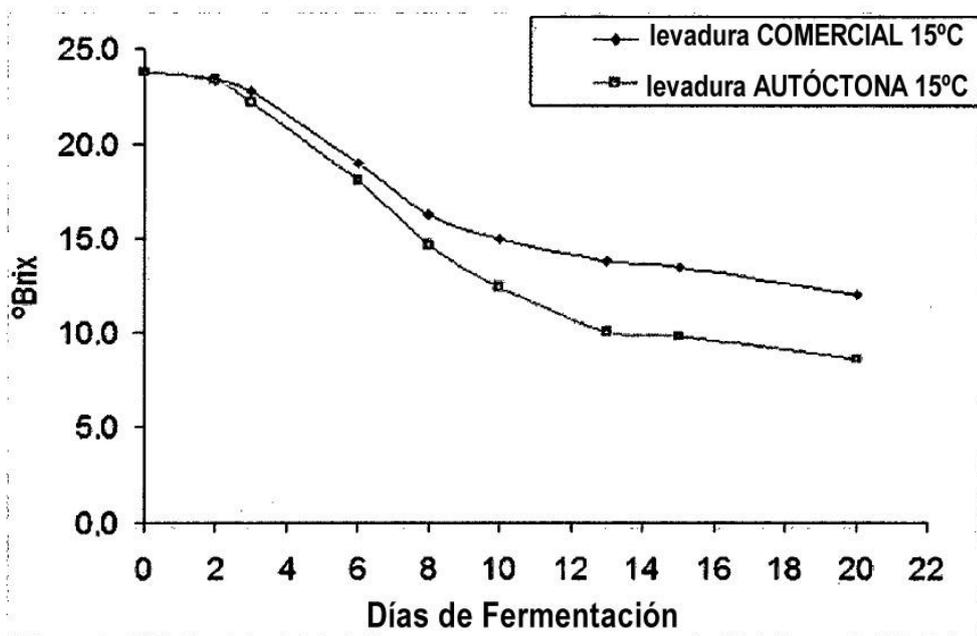


FIG.3

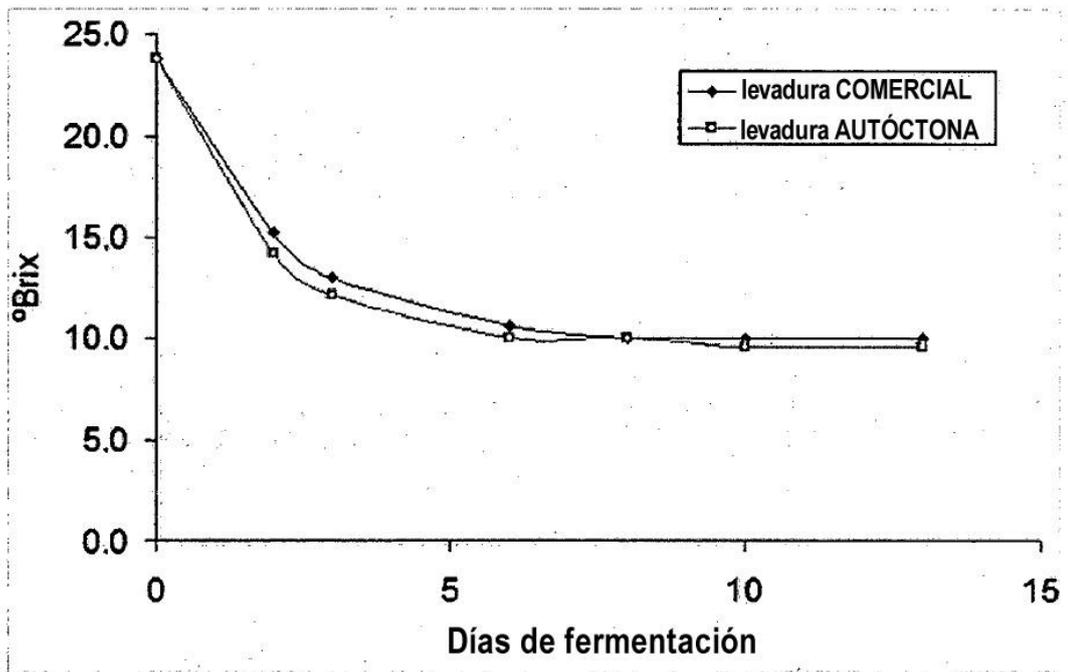


FIG. 4

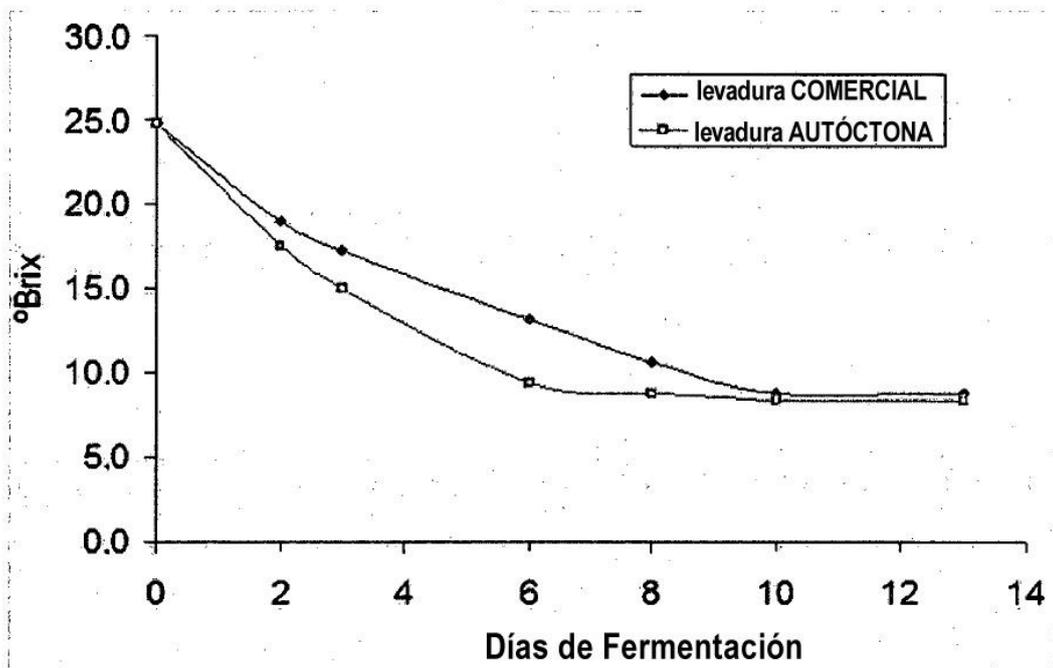


FIG. 5

A

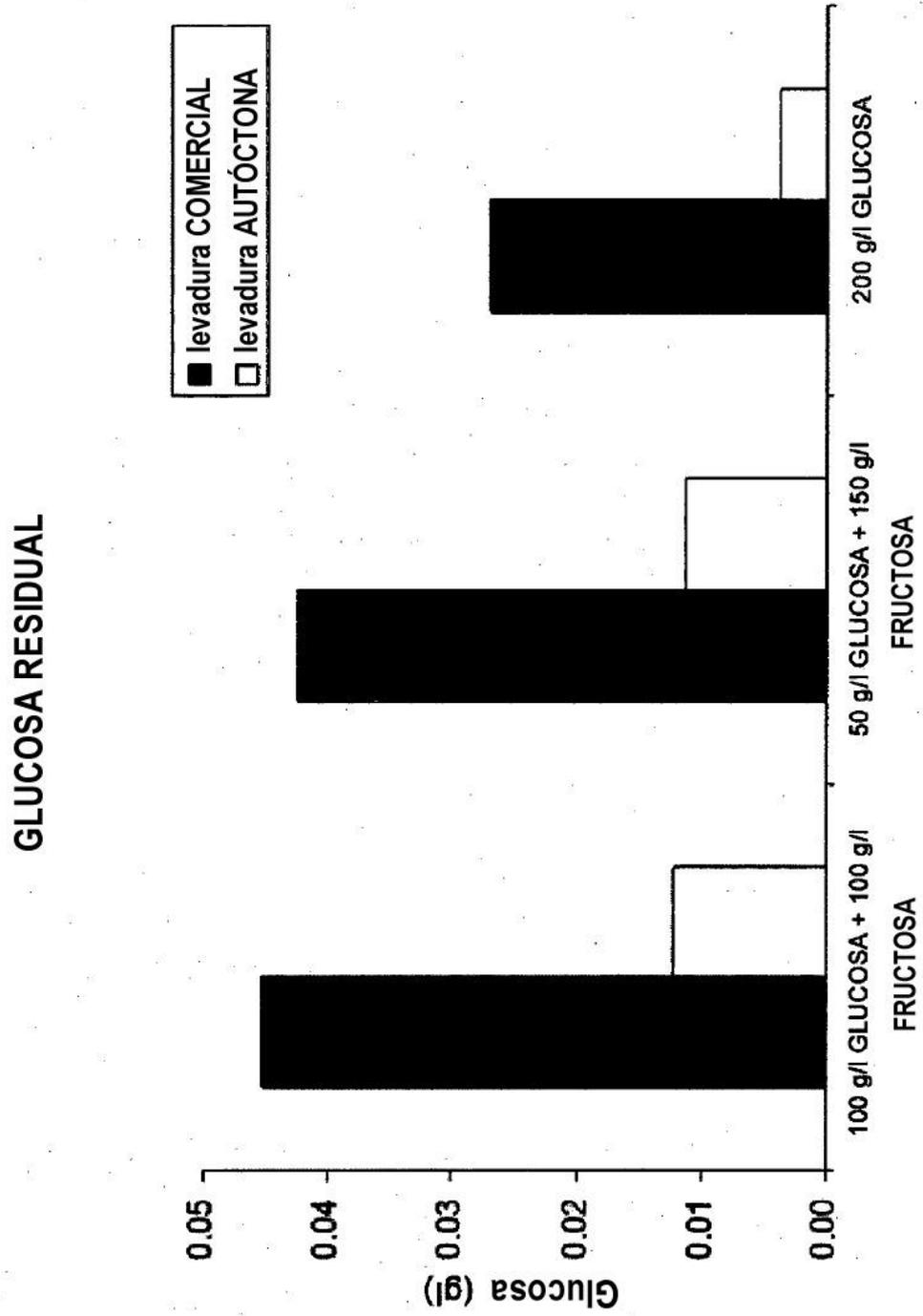


FIG. 6

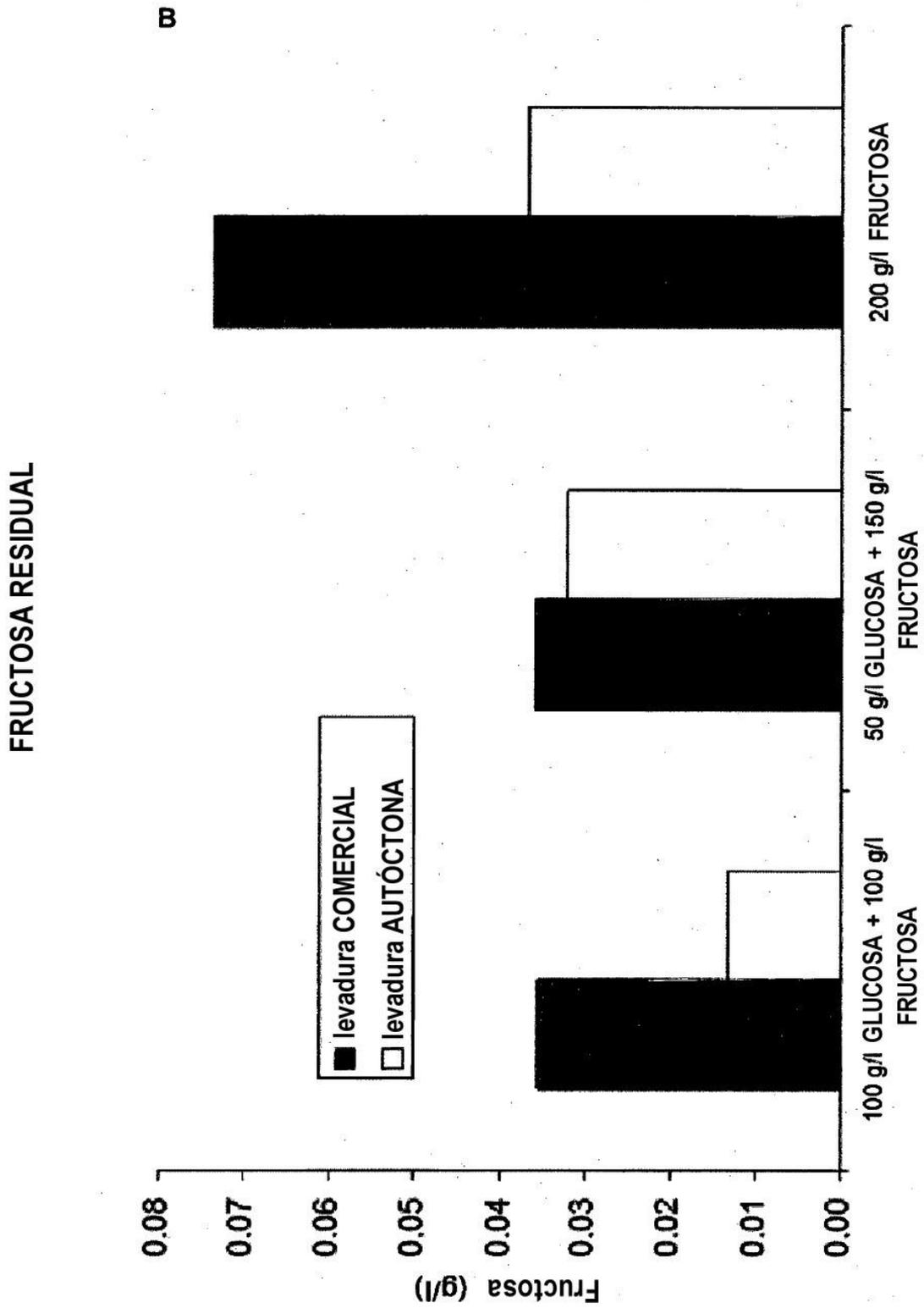


FIG. 6 (cont.)

GLICEROL

c

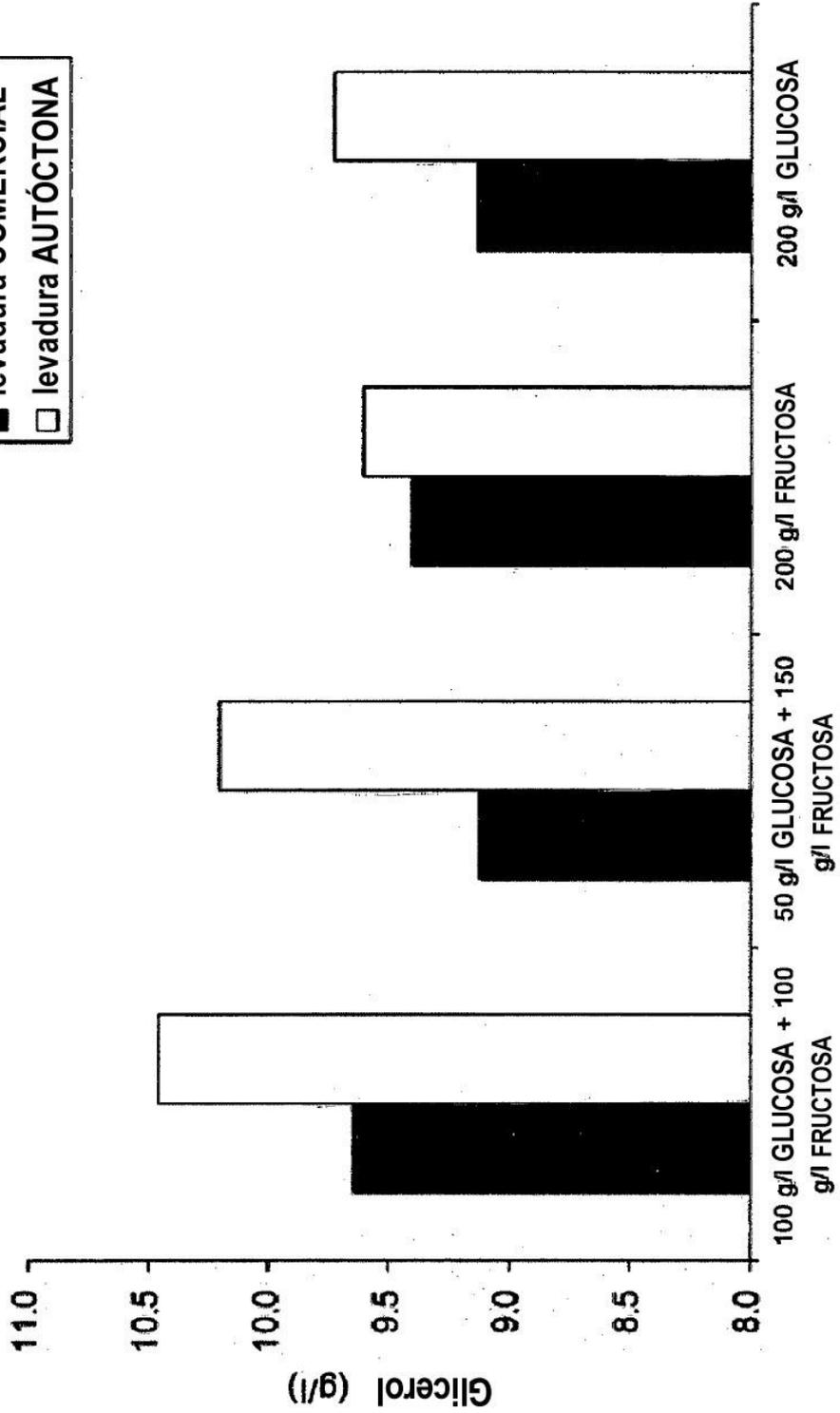


FIG. 6 (cont.)

D

ÁCIDO ACÉTICO

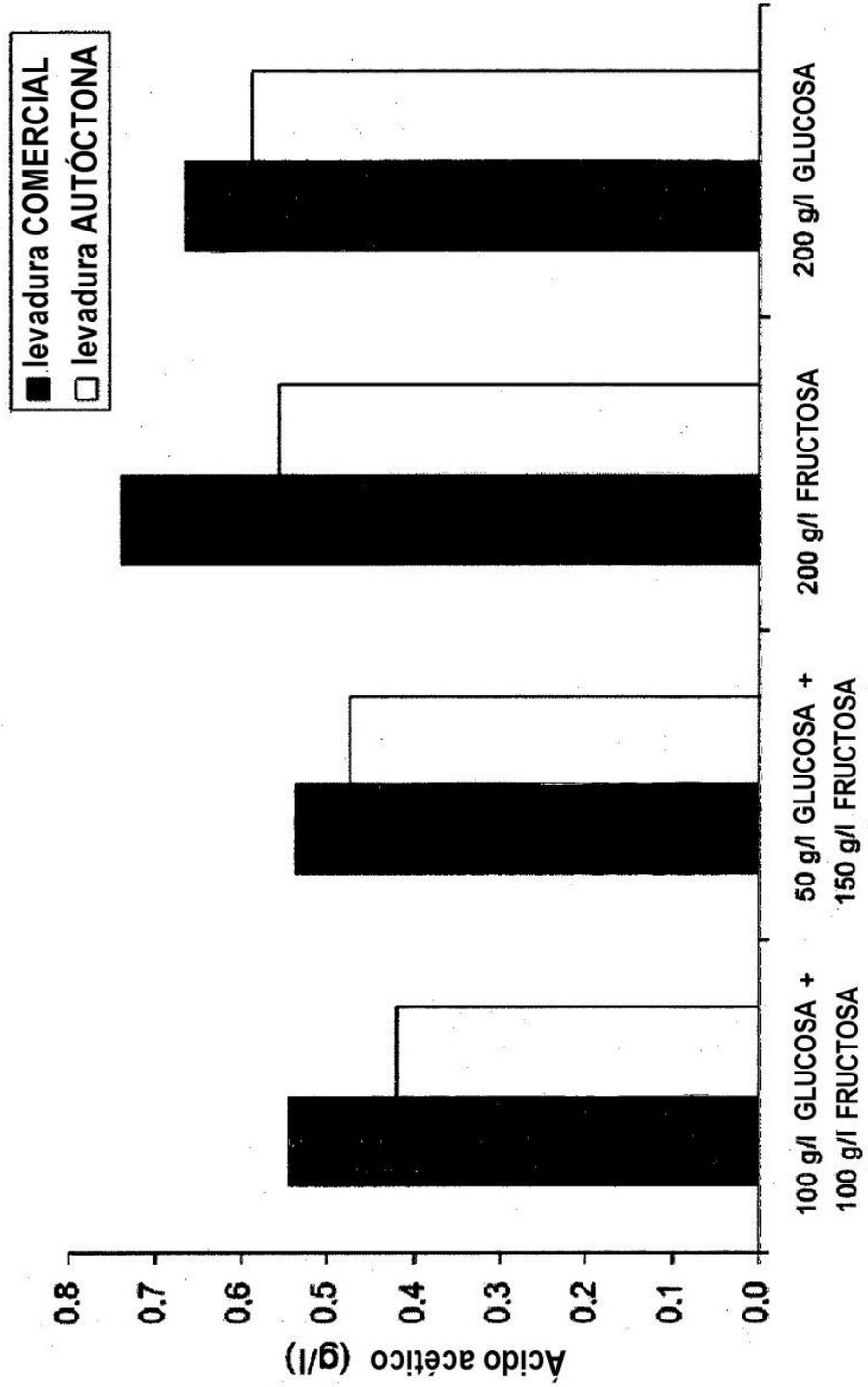


FIG. 6 (cont.)

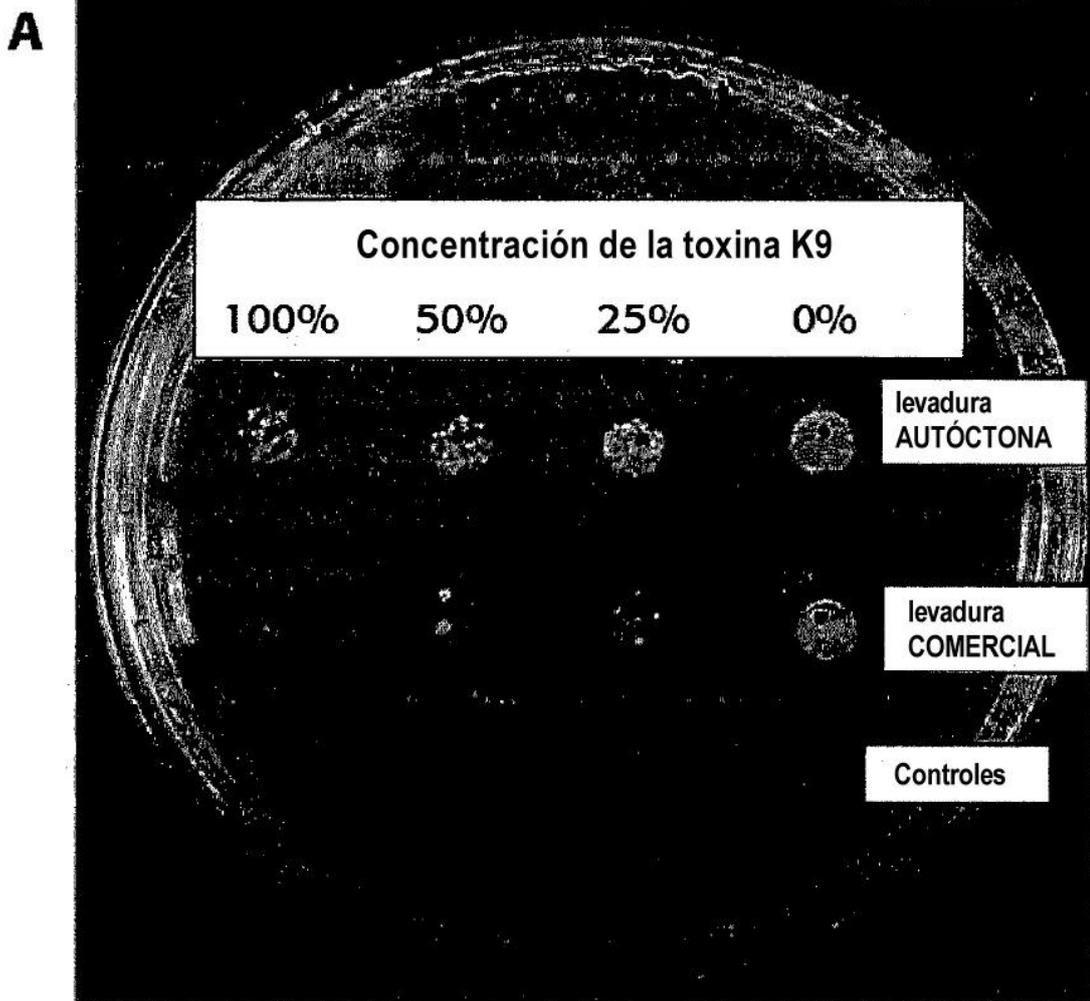


FIG. 7

B

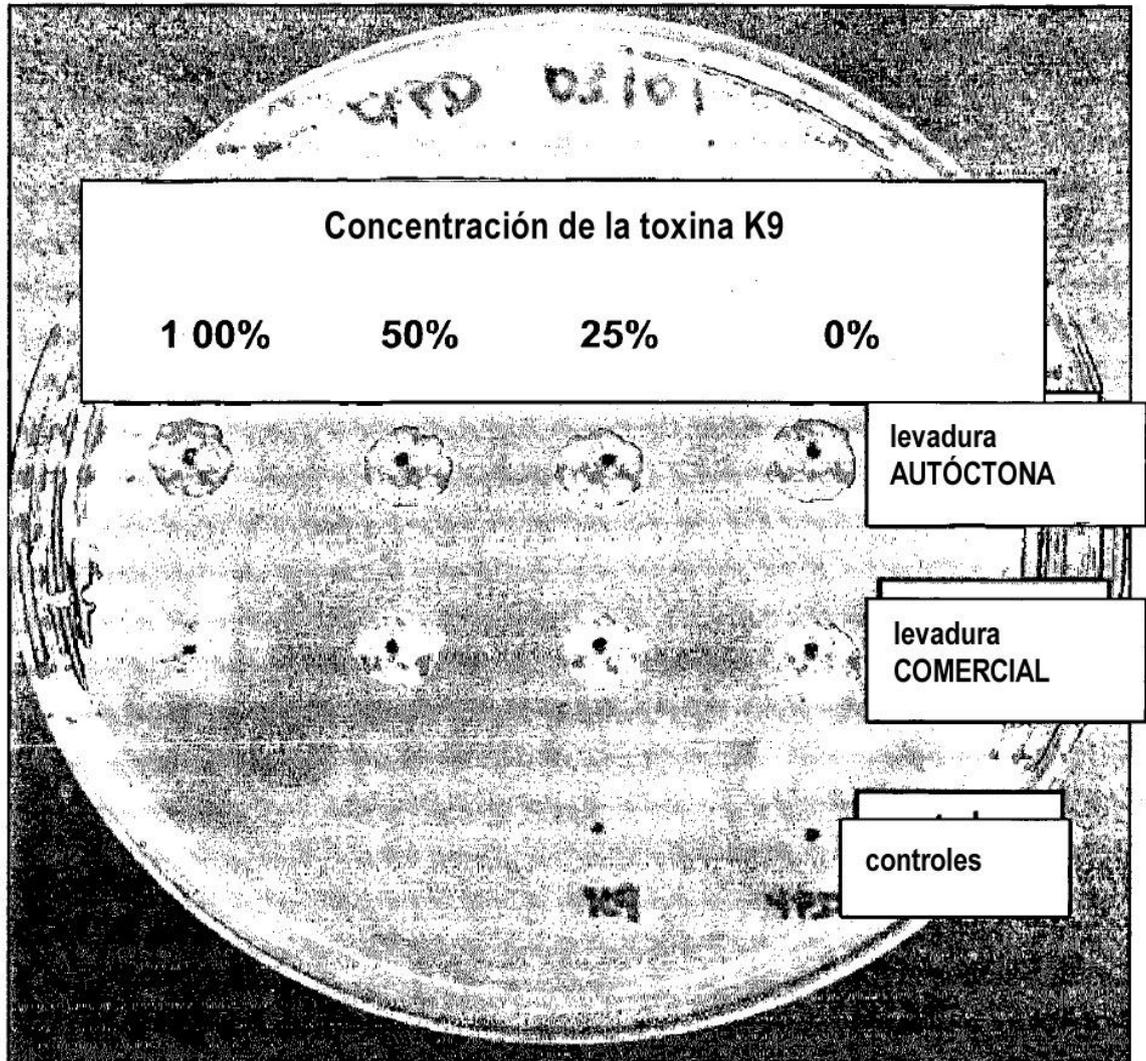


FIG. 7 (cont.)