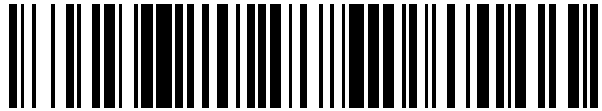


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 119**

21 Número de solicitud: 201531943

51 Int. Cl.:

C12G 1/022 (2006.01)

C12G 1/073 (2006.01)

C12C 11/09 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.12.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.07.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)
Avda. Blasco Ibañez, 13
46010 Valencia ES

72 Inventor/es:

FERRER SOLER, Sergio;
PARDO CUBILLOS, Isabel;
BERBEGAL DE GRACIA, Carmen;
LUCIO COSTA, Olga y
POLO TARÍN, Lucía

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

54 Título: **Virutas de madera con microorganismos, su preparación y su uso**

57 Resumen:

Virutas de madera con microorganismos, su preparación y su uso.

El método de la presente invención permite obtener cultivos de microorganismos inmovilizados en virutas o chips de roble recubiertos de almidón. Utiliza chips de roble sin designificar, de uso permitido en vinos. Los microorganismos quedan inmovilizados en los poros de las virutas o chips, prefiriéndose las especies de roble de alta porosidad y, especialmente, los chips sin tostar, que dan lugar a mejor viabilidad de los microorganismos, junto con la inmovilización por liofilización. Los chips obtenidos son especialmente útiles en la elaboración del vino, porque simultáneamente imparten características de la madera e intervienen en las fermentaciones. Los co-inmovilizados de levaduras y bacterias malolácticas permiten fermentación alcohólica y maloláctica simultáneas, acelerando la producción. Las levaduras de fermentación alcohólica inmovilizadas en estos chips pueden aplicarse en la segunda fermentación de espumosos, donde facilitan la eliminación de levaduras y aportan nuevas características organolépticas.

ES 2 621 119 A1

DESCRIPCIÓN

Virutas de madera con microorganismos, su preparación y su uso

Campo de la invención

La presente invención se refiere a virutas (chips) de roble en las que se han inmovilizado
5 microorganismos. Más concretamente, la invención se refiere a virutas de roble en las
que se han inmovilizado, mediante liofilización, microorganismos que intervienen en la
vinificación, especialmente levaduras capaces de iniciar o de llevar a cabo fermentación
alcohólica, que pueden estar co-inmovilizadas con bacterias que llevan a cabo
10 fermentación maloláctica. El uso de dichas virutas de roble es también parte de la
invención, así como el proceso de obtención de las mismas.

Antecedentes de la invención

Se define el vino como la bebida alcohólica resultante de la fermentación, total o parcial,
de la uva fresca, estrujada o no, o su mosto.

El vino espumoso, por su parte, es el producto obtenido mediante primera o segunda
15 fermentación alcohólica de, entre otros, uva fresca, mosto de uva, vino (todos ellos aptos
para la obtención de vino de mesa) o vino de mesa que, al descorchar el envase,
desprende anhídrido carbónico procedente exclusivamente de la fermentación y que,
conservado a la temperatura de 20°C en envases cerrados, alcanza una sobrepresión
debida al anhídrido carbónico disuelto igual o superior a 3 bares. Habitualmente, los vinos
20 espumosos se obtienen mediante dos fermentaciones, una del mosto de uva que se
transforma en el vino base en depósitos abiertos; en esta primera fermentación los
azúcares del mosto se transforman en etanol y CO₂, que escapa al aire. Luego este vino
base realiza una segunda fermentación en recipientes cerrados. Para que se produzca
esta segunda fermentación es habitual que al vino base se le añada azúcar (licor de
25 tiraje) y levadura; esta levadura transforma este azúcar añadido en etanol y CO₂, que
queda retenido en el líquido al no poder liberarse al exterior. Ello da lugar a que se
produzca una sobrepresión igual o superior a 3 bares en estos depósitos. Existen algunas
excepciones a este procedimiento general, como la de los espumosos denominados “brut
nature”, para cuya segunda fermentación no se añade azúcar adicional, aunque sí
30 levaduras, por lo que su concentración final en azúcar es de sólo 0 – 3 g/litro.

La segunda fermentación de los vinos espumosos puede tener lugar en botellas o en
grandes envases de cierre hermético, de los que se transvasa a botellas para su

comercialización. A estos últimos se les denomina espumosos “de fermentación en cuba cerrada”, “de grandes envases” o “granvas”.

Son muy valorados los vinos espumosos elaborados por el método tradicional originario de la región francesa de la Champagne (método “*champenoise*”), en el que el CO₂ se
5 obtiene mediante una segunda fermentación alcohólica en botella, inducida por la adición de levaduras (generalmente, de la especie *Saccharomyces cerevisiae*) y, habitualmente, azúcar adicional. Durante esta segunda fermentación, la botella se mantiene en posición horizontal durante al menos, 9 meses; luego se inclina con el cuello hacia abajo y, en esta posición, se va haciendo rotar la botella para favorecer que las levaduras muertas y
10 otros sedimentos o posos se depositen en la parte baja del cuello. Estos sedimentos se eliminarán congelando la porción del vino espumoso que las contiene y abriendo el tapón, que sale disparado por efecto de la presión, arrastrando el sedimento congelado. El tapón se sustituye por otro antes de su comercialización. Ese es el método que da lugar al vino espumoso francés que se conoce comúnmente como “champán”, aunque legalmente
15 sólo se puede aplicar esa denominación a los que tienen la denominación de origen de la correspondiente región de Francia. En España, los vinos espumosos que se elaboran mediante dicho método tradicional reciben la denominación cava si cumplen los demás requisitos impuestos por el consejo regulador de la denominación de origen, entre ellos haber sido elaborados en la región tradicional del cava en España, que comprende
20 fundamentalmente municipios de las provincias de Barcelona y Tarragona, pero también algunos otros en La Rioja, Lérida, Gerona, Álava, Zaragoza, Navarra, Badajoz y Valencia.

El proceso de vinificación incluye dos etapas llevadas a cabo por microorganismos, la fermentación alcohólica (FA) y la fermentación maloláctica (FML).

La FA es imprescindible. En esta fermentación se transforman los azúcares del mosto en
25 etanol. Esta fermentación la realizan levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, aunque no es la única que interviene en el proceso. Existe una gran diversidad de especies, conocidas en general como no-*Saccharomyces* que participan en la FA, sobretodo en las primeras fases dando una mayor complejidad aromática al vino. Entre los generos más destacados encontramos *Hanseniospora*, *Kloeckera*, *Torulospora*
30 o *Metschnikovia* (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000).

Tal como puede encontrarse en distintas referencias, como el artículo sobre “Levaduras vínicas” publicado por R.I. Viramontes Álvarez y R. Pérez Leal en la revista Acenología (http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas_cor0214.htm), tradicionalmente, la producción de vinos se realizaba a partir de la fermentación

espontánea de los mostos llevadas a cabo tanto por cepas de levaduras endémicas residentes en la superficie de las uvas como por cepas presentes en los equipos de las bodegas que se incorporaba al mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación. La fermentación espontánea es de gran importancia, porque las
5 levaduras endémicas aportan características organolépticas típicas de la zona y se obtienen vinos que se consideran más “naturales”; sin embargo, la calidad del producto puede ser muy variable (Escalante et al., 2007). Por ello, en los últimos tiempos, se ha ido pasando de esa fermentación espontánea a la inoculación de cepas de interés enológico, seleccionadas en base a criterios tecnológicos y de calidad del producto final,
10 como la buena capacidad fermentativa o la producción de características organolépticas adecuadas. Dicha selección se ha visto posibilitada por los estudios que se han ido realizando sobre las distintas especies de levaduras implicadas en la fermentación, las fases del proceso en las que aparecen y los compuestos aromáticos a los que dan lugar.

Aunque en la primera fase (desde el encubado al inicio de la fermentación) parece haber
15 una dominancia clara de especies de otros géneros, las levaduras del género *Saccharomyces* y, en particular, *Saccharomyces cerevisiae*, pasan a ser predominantes a las pocas horas del inicio de la fermentación y son mayoritarias durante toda la fermentación alcohólica siendo las principales responsables de la producción de alcohol que tiene lugar. Por ello, se ha venido considerando a *Saccharomyces cerevisiae* la
20 especie de levadura más importante en el proceso de producción del vino. Así, como se ha comentado previamente, es frecuente que se aluda a las levaduras presentes durante la vinificación clasificándolas en dos grupos: *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras no *Saccharomyces*.

Aunque algunas especies de levaduras no *Saccharomyces* aisladas de mostos en los
25 momentos iniciales de vinificación también son fermentadoras su actividad es menor que la de *S. cerevisiae* por lo que ésta rápidamente las supera en número. Sin embargo, las levaduras no *Saccharomyces* se consideran importantes para definir el perfil aromático de los vinos, debido a que estas levaduras dan lugar a reacciones enzimáticas que dan lugar a una amplia gama de productos finales volátiles y no volátiles (Romancino et al.,
30 2008). Aunque la mayoría muere durante las etapas iniciales de la fermentación debido a que el aumento de la concentración de alcohol resulta tóxico para ellas, se ha demostrado que algunas sobreviven durante la fermentación y que los metabolitos generados por algunas especies no *Saccharomyces* pueden contribuir a la calidad del vino.

La FML, por su parte, es fundamental para la calidad del vino, especialmente en el vino tinto. Esta fermentación es llevada a cabo por bacterias lácticas (BAL), principalmente por *Oenococcus oeni*, y en ella se transforma el ácido L-málico presente en el vino en L-láctico liberándose CO₂ (Kunkee 1991). El ácido láctico contiene sólo un grupo ácido, en lugar de dos del ácido málico, la FML por tanto, hace que disminuya la acidez total del vino y que aumente el pH del mismo. Por otro lado, el sabor del ácido málico es más desagradable (gusto herbáceo, agresivo) que el del ácido láctico (gusto lácteo agradable y suave). Esta transformación se realiza mediante el enzima maloláctico que contienen las BAL del vino (Lonvaud-Funel 1995), y puede verse afectada por diferentes factores que determinan el crecimiento de estas bacterias como la temperatura, el contenido en sulfuroso libre, el grado alcohólico y el pH del vino. De hecho, la mayor parte de las BAL son inhibidas por el etanol y el SO₂ añadido. De las BAL que se pueden aislar en muestras de mostos y vinos (y que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* y *Oenococcus*), *O. oeni* parece ser la principal responsable de la fermentación maloláctica, junto con alguna otra especie como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus casei*.

Para el control de la FA y FML existen cultivos iniciadores comerciales de levaduras y BAL. Empresas de productos para enología como Agrovin (www.agrovin.com, con sus oficinas centrales en Alcázar de San Juan, Ciudad Real, España), Lallemand (www.lallemand.com, particularmente la división de enología www.lallemandwine.com, con oficinas en California (EEUU), Rivas-Vaciamadrid (Madrid, España) y otros puntos de Europa), Hansen (www.chr-hansen.com), etc., fabrican y distribuyen cultivos iniciadores de diferentes especies y cepas dependiendo del tipo de vino con el que se va a trabajar. Habitualmente, estos cultivos se encuentran en forma liofilizada, congelada, en forma líquida o deshidratada (únicamente en el caso de levaduras) y se aplican directamente al mosto o al vino. En los años noventa, se introdujeron en el mercado enológico cultivos de bacterias para llevar a cabo la FML. Los primeros cultivos iniciadores necesitaban varias fases de acondicionamiento preliminar en la bodega antes de su utilización. Posteriormente se desarrollaron cultivos iniciadores con una única etapa de adaptación, en los cuales el producto contenía bacterias ya pre-aclimatadas y con un activador de crecimiento. A principios de los años 2000 se desarrollaron los cultivos de inoculación directa. En éstos tan solo se necesita una simple rehidratación del preparado antes de la inoculación en el vino, facilitando así su aplicación. Sin embargo, existen vinos cuyas condiciones físico-químicas tras la FA son demasiado adversas para el desarrollo óptimo de la FML.

La búsqueda de alternativas al proceso tradicional de realización de la FML (tras la FA) llevó al desarrollo de una nueva técnica: la co-inoculación levadura-bacteria maloláctica, en el mosto o durante la FA. Esta técnica adelanta la inducción de la FML, que tiene lugar durante el transcurso de la FA, pudiendo inocularse las bacterias en diferentes momentos
5 de ésta.

Los trabajos realizados en investigación enológica hasta la fecha muestran que la co-inoculación aporta una serie de ventajas con respecto a la inoculación tradicional. Por un lado, se obtiene una buena implantación de la bacteria maloláctica, debido a que las condiciones del mosto son más favorables para el desarrollo de la bacteria que las del
10 vino. Se mantiene controlada la población de microorganismos durante la vinificación, evitando la desprotección del vino en la interfase final de FA y principio de FML, como ocurre en la inoculación tradicional; de esta manera se evita así el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Bergal et al., 2012). Numerosos trabajos mostraron que *S. cerevisiae* no resultaba afectada por la inoculación simultánea de bacterias durante la
15 FA si la compatibilidad entre ambos microorganismos era buena, pudiendo acabar la fermentación alcohólica al mismo tiempo que los vinos tradicionales. (Krieger 1991; Jussier et al. 2006). Esto implica otra importante ventaja porque el vino completa tanto la FA como la FML en un periodo de tiempo más corto, con lo cual se minimiza el tiempo de exposición al posible desarrollo de microorganismos indeseables. Según Krieger et al., un
20 vino sometido a co-inoculación acabaría en torno a 20-30 días mientras que un vino que sigue un proceso tradicional tardaría 70-80 días (Krieger 1991). Nehme et al. también demostraron que la tasa de consumo del ácido málico de la bacteria durante el co-cultivo con la levadura es 2,82 veces más rápida que cuando la bacteria está sola tras la FA, lo cual demuestra que esta estrategia resulta más favorable para el metabolismo de la
25 bacteria (Nehme et al. 2009).

Para ofrecer un mayor abanico de posibilidades al sector enológico y continuar mejorando el difícil proceso de la FML se siguen desarrollando técnicas alternativas para su inducción. Nuevas tendencias apuntan al uso de cultivos iniciadores de BAL inmovilizadas. Esta tecnología proporciona numerosas ventajas en comparación con la
30 utilización de células libres, ya que el soporte de inmovilización actúa como un agente de protección contra los efectos fisicoquímicos del pH, la temperatura, solventes o incluso metales pesados, mejorando así la actividad y estabilidad celular. La alta concentración de bacterias de estos sistemas permite realizar la FML en tiempos más cortos y la eliminación de la fase de crecimiento. Del mismo modo, facilita la fermentación a bajas
35 temperaturas, lo que aumenta la calidad del vino debido a una mayor retención de

aromas, permite una fácil recuperación, regeneración y reutilización de microorganismos inmovilizados y reduce el riesgo de contaminaciones microbianas debido a las altas densidades celulares iniciales (Y. Kourkoutas 2004). Prueba de ello son los numerosos trabajos que se han realizado con el fin de inmovilizar bacterias lácticas en diferentes
5 soportes desde los años 80 y los trabajos de revisión realizados hasta la fecha (Maicas 2001; Y. Kourkoutas 2004; Divies *et al.* 1994). Ejemplo de estos ensayos son los trabajos de Rossi y Clementi (1984), que estudiaron el catabolismo del ácido málico de *O. oeni* inmovilizado en gel de poliacrilamida. En este caso, las propiedades de las células inmovilizadas eran similares a las de las células libres pero el cultivo inmovilizado era
10 más fácil de recuperar y reutilizar. Otros materiales de inmovilización para *O. oeni* con mejores perspectivas para su utilización a nivel industrial estudiados fueron el κ-carragenano (McCord and Ryu 1985; Crapisi *et al.* 1987) y el alginato cálcico (Spettoli *et al.* 1982). Más tarde se trabajó con poliacrilamida, silicagel y quitosano para la inmovilización de *Lactobacillus* con resultados satisfactorios (Kosseva *et al.* 1998; Naouri
15 *et al.* 1991). La inmovilización de *L. casei* en gel de Ca-pectato y quitosano modificado químicamente para la realización de la FML en vino, mostró que la tasa de degradación de ácido málico por parte de las células inmovilizadas fue dos veces superior al de las células libres. Maicas *et al.* (2001) estudiaron la posibilidad de emplear células de *O. oeni* inmovilizadas en una esponja de celulosa cargada positivamente para la realización de la
20 FML en vino. Estos autores evaluaron los efectos de la carga de la superficie del material de inmovilización, el pH y la composición de medio y mostraron tasas de degradación del ácido málico 3-4 veces mayores que con células libres. Aougurdis *et al.* (2008) inmovilizaron células de *O. oeni* en material celulósico deslignificado y evaluaron la actividad del inmovilizado en sucesivas FML y la formación de productos volátiles en
25 comparación con los resultados obtenidos al inmovilizar *L. casei* en un estudio anterior (Agouridis *et al.* 2005). Los datos mostraron que el material celulósico era un buen soporte para la inmovilización de *O. oeni*. Recientemente se han realizado ensayos utilizando la combinación de diferentes materiales para la inmovilización. Ejemplo de ello, son los trabajos de Callone *et al.* (Callone *et al.* 2008), quienes estudiaron la
30 inmovilización de levaduras y bacterias en microesferas de alginato cubiertas de una capa de sílice. Esta capa de sílice se obtuvo por tres metodologías diferentes. Se estudiaron las diferencias existentes entre los tres tipos de capas en cuanto al intercambio de masa y al mantenimiento de la viabilidad de las células. Los resultados confirmaron la eficacia de la inmovilización de las células en esta matriz de doble capa y
35 que el recubrimiento de sílice mejoraba la estabilidad mecánica de las microesferas de alginato y reducía la fuga de células.

Servetas *et al.*, en 2008, investigaron la posibilidad de utilizar un material compuesto de celulosa y almidón para inmovilizar, en diferentes capas del mismo, células de *S. cerevisiae* y *O. oeni*. Utilizaron un material celulósico que, como en el trabajo de Aougourdis *et al.* antes citado, fue deslignificado antes de su utilización. Sobre dicho material se inmovilizaron células de *Oenococcus oeni*, cubiertas con un gel de almidón que contenía a las células de *Saccharomyces cerevisiae* que quedó completamente depositado sobre el material celulósico deslignificado. Tras incubar el material compuesto a 30°C durante 24 h, se secó por calor, a 35°C durante 48 h. Los autores informaron de que se prefirió el secado por calor a la liofilización porque el coste era menor. Los experimentos de fermentación llevados a cabo añadiendo este biocatalizador al mosto de uva mostraron que ambos microorganismos actuaban simultáneamente, obteniendo la conversión del ácido málico en ácido láctico en 5 días y consumiéndose los azúcares entre 9 (en el caso de la glucosa) y 13 días (en el caso de la fructosa).

Dentro del proceso de vinificación, la etapa de crianza es un proceso largo y delicado cuyo objetivo es conferir unos caracteres distintos al vino. El punto de partida es un vino cuyas cualidades pueden verse mejoradas mediante el envejecimiento. El proceso de envejecimiento se realiza en dos fases: oxidativa y reductora. La primera tiene lugar en la barrica de madera, donde pequeñas cantidades de oxígeno penetran en el interior del recipiente modificando de forma natural y oxidativa la estructura química de muchos de los componentes del vino. La segunda se realiza en el interior de la botella y es de carácter reductor. En ella no penetra prácticamente oxígeno, a excepción de pequeñísimas cantidades de gases que se filtran a través del corcho, por lo que los elementos del vino reaccionan entre sí en su ausencia. La madera cede al vino sus propios taninos y valores aromáticos, que se van fundiendo lentamente con los taninos del vino. Sin embargo, es necesario buscar un equilibrio entre ambos socios: si el vino permaneciera largo tiempo en la barrica, los taninos ásperos de la madera terminarían por sobresalir sobre los aromas originales del vino.

Según los expertos, la madera más adecuada es la de roble, que es la más empleada actualmente en todo el mundo, aunque tradicionalmente se han empleado también maderas de castaño, cerezo y acacia. Dentro del roble, las maderas mejor valoradas son la de roble americano (tanto el llamado roble rojo americano, de la especie *Quercus rubra*, como el roble blanco americano, *Quercus alba*) y el llamado roble francés (de las especies *Quercus petraea* o *Quercus robur*). También se utiliza en Europa madera de otras especies de roble, como *Quercus pyrenaica*. En las regiones septentrionales de la Península Ibérica se encuentran las especies *Quercus pyrenaica* (roble pirenaico),

Quercus petraea o *Quercus robur* (esta última también conocida como carballo, cajiga o haritza).

- La etapa de envejecimiento en barrica de madera encarece mucho la producción del vino y actualmente existe una alternativa a la crianza en barrica que consiste en el uso de
- 5 chips de madera de roble, que se ponen en contacto con el mosto de fermentación o con el vino ya fermentado. Se conocen como “chips” a los trozos, partículas o virutas de madera, que se añaden con la finalidad de conferir al vino ciertos constituyentes provenientes de la mencionada madera. Los chips de roble están permitidos por la legislación según la Organización Internacional del Vino (RESOLUCIÓN OENO 3/2005,
- 10 ES-COEI-1-MADTRO, contenida en el capítulo I del Codex Enológico Internacional como la monografía titulada “Trozos de madera de roble”) y por la legislación comunitaria del sector vitivinícola, que ya autorizaba su uso en el Reglamento (CE) 1493/99 del Consejo, de 17 de mayo, habiendo quedado complementadas las normas para su aplicación en el Reglamento (CE) Nº 1507/2006. En ambos casos, la adición a los vinos sólo queda
- 15 autorizada para trozos de madera provenientes exclusivamente de especies de *Quercus*, que pueden utilizarse sin tostar o tostarse en diferentes grados, sin llegar a su combustión. También vienen fijadas las dimensiones de las partículas de madera, que deben ser tales que al menos el 95% de ellas, expresado en peso, sean retenidas por un tamiz con mallas de 2 mm.
- 20 Los chips de madera de roble son materiales porosos, proceden de un material muy abundante en la naturaleza, la madera, y son mucho más baratos que las barricas, por lo que su uso en la elaboración de vino está actualmente muy extendido. Las empresas de productos enológicos como Agrovin S.A (www.agrovin.com, con sus oficinas centrales en Alcázar de San Juan, Ciudad Real, España), Lamothe-abiet (www.lamothe-abiet.com,
- 25 particularmente la división de madera para enología, <http://www.lamothe-abiet-bois.com/>, establecida en Canejan, Burdeos, Francia), Arobois (www.arobois.com, Gagnac-sur-Cère, Francia), Christian Hansen (www.chr-hansen.com, Hørsholm, Dinamarca) etc., han creado una amplia gama de chips de madera de roble de diferentes orígenes, tamaños y tostados, que están comercialmente disponibles.
- 30 A diferencia de los vinos normales, en la elaboración de los vinos espumosos tipo cava se realizan dos fermentaciones sucesivas que son llevadas a cabo por levaduras, generalmente de la especie *S. cerevisiae*. Una vez acabada la primera fermentación y obtenido el vino base, este se embotella para que sufra una segunda fermentación en la botella. Esta segunda fermentación requiere, en gran parte de los vinos espumosos, la

adición de azúcar (licor de tiraje) y levadura. En estas condiciones el CO₂ producido a partir de la fermentación del azúcar queda retenido en el interior de la botella y hace que el vino adquiera el carácter burbujeante típico de los vinos espumosos. Además de la fermentación de los azúcares, durante la estancia en botella parte de la levadura se lisa
5 comunicando al vino nuevas características que afectan al sabor, a la suavidad y al cuerpo del cava. Al final del periodo de crianza es necesario eliminar la levadura a fin de que el cava tenga un aspecto totalmente transparente. Para ello, las botellas que están en posición horizontal durante la crianza (la llamada disposición en rimas) se inclinan con el cuello hacia abajo con el fin de que la levadura se deposite en la parte baja del mismo.

10 A ello ayuda el removido que consiste en hacer giros sucesivos a la botella cada cierto tiempo. La duración de esta segunda fermentación en botella es como mínimo de 9 meses. La duración del periodo de estancia de la levadura dentro de la botella, una vez agotados los azúcares, determina que un espumoso se califique como reserva, reserva especial y gran reserva, para éstos últimos el reglamento establece un periodo que
15 alcanza los cinco o seis años, tiempo considerado máximo para la crianza de esta bebida. Con la crianza, el espumoso pierde frescura y aromas afrutados pero gana en complejidad y cuerpo a consecuencia del prolongado contacto con las levaduras. La preparación de la levadura para esta segunda fermentación es muy importante, ya que de ella depende completamente el buen funcionamiento de esta segunda parte del ciclo.

20 Habitualmente tras la crianza, se utilizan adyuvantes como la bentonita para facilitar que las levaduras se agrupen y sedimenten con más facilidad y no queden suspendidas en el líquido. La extracción de las levaduras de la botella se consigue con el procedimiento denominado degüelle. Para llevarlo a cabo, se congela el cuello de la botella del cava en la zona donde se ha depositado el sedimento de levaduras a -4°C, se abre la botella y
25 como consecuencia de la presión se dispara el tapón congelado. El vacío que queda en la botella se rellena con licor de expedición que es una mezcla de vino añejo y mosto concentrado (este último no se añade en el caso de los *brut nature*).

Dado que todos los procesos arriba descritos (fermentación alcohólica, fermentación maloláctica, crianza o segunda fermentación de espumosos) conllevan un tiempo de
30 realización y suponen un tiempo de ocupación de los correspondientes recipientes, sería interesante continuar el desarrollo de métodos que permitieran reducir el tiempo de procesado en la medida en que el tipo de vino a obtener lo permitiera, por ejemplo, realizando simultáneamente la FA, la FML y la crianza sobre madera, o también facilitando la decantación más rápida de la levadura en el proceso de fabricación de los
35 vinos espumosos. También sería conveniente que el método desarrollado facilitara la

aplicación de levaduras no *Saccharomyces* con *Saccharomyces*, con lo que se conseguiría, de forma simultánea, conferir al vino las características beneficiosas de ambos tipos de levaduras y dar ligeros matices a roble. Otra ventaja deseable es que el control del proceso sea mucho más fácil que en la actualidad, porque se puedan elegir

5 las combinaciones de levaduras y de levaduras con bacterias más convenientes para cada tipo de vino y también, porque la retirada de los microorganismos fuera mucho más rápida, con lo que se puede conseguir aumentar enormemente la diversidad de los vinos producidos. Para que el método desarrollado tuviera realmente interés industrial, sería conveniente que se realizara utilizando productos permitidos por la legislación para su

10 adición a vinos. Además, el coste de los productos utilizados no debería ser elevado, para que su utilización no encareciera el proceso de obtención del vino y el precio del producto final obtenido.

La presente invención proporciona una solución a ese problema.

Sumario de la Invención

15 La presente invención proporciona inmovilizados de microorganismos que forman parte de la microbiota asociada a la fermentación y que pueden intervenir en mayor o menor grado durante la misma, concretamente bacterias lácticas que sintetizan la enzima que convierte el ácido málico en ácido láctico, y/o levaduras. Estos dos tipos de microorganismos pueden inmovilizarse bien separados o bien juntos sobre un soporte

20 cuya adición durante el proceso de vinificación está permitida por la legislación y que es fácilmente accesible de forma comercial: los chips de roble, preferentemente los chips de la especie *Quercus pyrenaica* sin tostar. La inmovilización conjunta de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias lácticas presenta las ventajas que se han mencionado previamente: acortamiento del tiempo del proceso de vinificación (FA y FML

25 simultáneas), y adquisición de las características propias del roble, fundamentalmente. Si los microorganismos inmovilizados son levaduras que realizan la fermentación alcohólica, particularmente *S. cerevisiae*, es posible también su utilización en la segunda fermentación de vinos espumosos, particularmente los espumosos tradicionales tipo cava. Las ventajas de esta tecnología es que además de llevar a cabo dicha

30 fermentación, se facilita la eliminación posterior de los microorganismos (depositados en este caso con los propios chips) y se consiguen vinos espumosos que presentan aromas adicionales, aumentando de esta manera la diversidad de los vinos espumosos en el mercado.

La presente invención se refiere a dichos chips de roble, al proceso para su obtención y a su uso en el proceso de preparación de vinos, ya sea durante la vinificación como tal o durante la segunda fermentación de vinos espumosos.

Así, un primer aspecto de la presente invención es un método para obtener virutas o
5 chips de roble que comprenden microorganismos de vinificación inmovilizados sobre su superficie exterior y/o la de sus poros que comprende las etapas de:

- a) incubar los chips de roble con células de al menos una de la especies de microorganismos a inmovilizar sobre ellos;
- b) mezclar los chips con microorganismos ya adheridos obtenidos en la etapa a) con
10 un gel de almidón, gel que opcionalmente se ha mezclado previamente con células de al menos una de las especies de microorganismos a inmovilizar sobre los chips;
- c) inmovilizar los microorganismos sobre los chips mediante secado o liofilización.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un chip de roble caracterizado porque
15 comprende microorganismos de vinificación inmovilizados sobre su superficie exterior y/o sobre la superficie de sus poros. Se incluyen los chips obtenidos mediante el método de la presente invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de los chips de roble de la invención en la producción de un vino, ya sea durante la vinificación de un mosto o en el proceso de
20 la segunda fermentación de un vino espumoso, en este caso preferiblemente tipo cava.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra fotografías de chips de roble:

- Panel A: fotografías a tamaño natural de distintos chips de roble: a) ibérico natural (chips de *Quercus pyrenaica* sin tostar), b) ibérico tostado alto (chips de *Quercus pyrenaica* sometidos a tostado alto), c) ibérico tostado medio (chips de *Quercus pyrenaica* sometidos a tostado medio), d) francés tostado medio (mezcla chips de *Quercus petraea* y *Quercus robur* con tostado medio)
 - Panel B: Fotografías de microscopía electrónica de chips de roble ibérico sin tostar, donde se observa su porosidad.
- 25

La Fig. 2 corresponde a fotografías de microscopía electrónica mostrando células de *S. cerevisiae* y *O. oeni* co-inmovilizadas en chips de roble ibérico sin tostar fijadas: panel a) mediante secado, panel b) mediante liofilización.

La Fig. 3 muestra gráficos del consumo de azúcares (glucosa y fructosa) y ácido málico durante el proceso de vinificación a partir de curvas que muestran la variación de su concentración en función del tiempo:

- Fig. 3A: resultados obtenidos mediante inoculación secuencial de células libres de *S. cerevisiae* y *O. oeni* (método tradicional). Se incluye también la cinética de aparición de ácido láctico, glicerol y etanol a partir de su concentración en gramos por litro o, en el caso del etanol, el porcentaje detectado a lo largo de los días.
- Fig. 3B: resultados obtenidos mediante inoculación simultánea de *S. cerevisiae* y *O. oeni*, bien en forma de células libres o co-inmovilizadas en chips de roble ibérico sin tostar, según se indica entre paréntesis junto a la leyenda de cada curva.

La Fig. 4 muestra el consumo de azúcares y ácido málico durante el proceso de vinificación mediante la inoculación de co-inmovilizado de *S. cerevisiae* y *L. plantarum* en chips de roble ibérico sin tostar.

La Fig. 5 muestra el consumo de azúcares y la formación de etanol durante la segunda fermentación del cava en botella, A) mediante inoculación de células libres de *S. cerevisiae* y B) inoculación de inmovilizado de *S. cerevisiae* en chips de roble ibérico sin tostar.

La Fig. 6 corresponde a fotografías de las etapas de elaboración de un vino espumoso tipo cava en el que la segunda fermentación tiene lugar mediante la inoculación de *S. cerevisiae* inmovilizada en chips de roble ibérico sin tostar, en las que se observa, A) la posición de rima de las botellas durante la crianza, B) botellas con el cuello congelado para su degüelle y C) vino espumoso tipo cava acabado de aspecto transparente tras el degüelle.

Descripción detallada de la invención

La presente invención resulta de un proyecto que tiene como objetivo el desarrollo de cultivos iniciadores co-inmovilizados de levaduras y bacterias lácticas malolácticas para la realización de la FA y FML simultáneas en vino y la inmovilización de levaduras para la segunda fermentación del cava en un soporte apto para ser utilizado en los procesos de

vinificación, como son los chips de madera de roble, cuyo uso está permitido por la legislación.

Concretamente, la invención se refiere a chips de roble recubiertos de almidón que comprenden microorganismos de vinificación inmovilizados sobre su superficie exterior
5 y/o sobre la superficie de sus poros y sobre la película externa de almidón, al uso de dichos chips en el proceso de producción de bebidas alcohólicas, particularmente en el proceso de producción de un vino, y al método para obtener dichos chips que comprende las etapas de: a) incubación de células de al menos una de las especies de microorganismos a inmovilizar con los chips de roble; b) recubrimiento de los chips en los
10 que hay ya microorganismos adheridos con el gel de almidón, poniendo en contacto y mezclando los chips con el gel de almidón; dicho gel de almidón, opcionalmente, puede haberse mezclado previamente con células de al menos una las especies de microorganismos a inmovilizar, especie que puede ser la misma de la etapa a) u otra distinta; c) inmovilización de los microorganismos sobre los chips mediante secado o
15 liofilización.

Tal como se discutió anteriormente, se denomina “chips” a los trozos, partículas o virutas de madera, que se añaden con la finalidad de conferir al vino ciertos constituyentes provenientes de la mencionada madera. En la presente solicitud se prefiere el término chip, además de por estar ampliamente extendido entre los expertos en la técnica, por la
20 vinculación que dicho término tiene con su uso en vinificación y con la definición de los trozos o virutas de madera cuyo uso está permitido por la legislación, trozos que, como se discutió anteriormente, sólo pueden añadirse a los vinos si provienen exclusivamente de especies de *Quercus*. Estos chips pueden estar al natural (sin tostar) o tostarse en diferentes grados, sin llegar a su combustión, y cuyas dimensiones deben ser tales que al
25 menos el 95% de los trozos o virutas, expresado en peso, sean retenidas por un tamiz con mallas de 2 mm. Así, tal como se utiliza en la presente solicitud, se entiende que los trozos de madera o virutas denominados chips cumplen con dichos requisitos legislativos.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que dichos chips, si se tratan según el método de la presente invención, pueden servir de forma efectiva como soporte de
30 microorganismos que intervienen en el proceso de producción del vino, ya sea en la vinificación de vinos de mesa o de vinos espumosos, y, en el caso de estos últimos, especialmente en la segunda fermentación de los mismos. Según se muestra en los Ejemplos que se describen más adelante, los chips de roble recubiertos de almidón son un soporte adecuado para que queden inmovilizados distintos microorganismos, tanto

levaduras como bacterias, sin necesidad de un procesamiento previo de los chips tal como la deslignificación, proceso que se encuentra siempre realizado en documentos previos referidos al uso de materiales celulósicos como soporte de microorganismos, tanto si los microorganismos son únicamente bacterias lácticas como *O. oeni* (Agouridis et al., 2008) como si se procura la co-inmovilización de bacterias y levaduras (Servetas et al., 2008).

Los chips sobre los cuales se inmovilizan los microorganismos son chips de roble, es decir, de una especie del género *Quercus*. Frente a otros soportes utilizados para la inmovilización de microorganismos, la ventaja que suponen los chips de roble recubiertos de almidón es que son soportes naturales y aceptados frente a otros soportes estudiados y con difícil aceptación en vino como alginato, sílica, poliacrilamida, manzana, etc. (Rossi and Clementi 1984; Fumi et al. 1987; Kourkoutas et al. 2006; Callone et al. 2008). Los chips de roble, como se ha mencionado anteriormente, son un material aceptado para su uso en vino según la Organización Internacional del Vino (RESOLUCIÓN OENO 3/2005). Los chips de roble aportan al vino propiedades organolépticas propias de la madera. Su utilización como alternativa a la crianza en barrica reduce el tiempo del proceso y evita la inversión en barricas y por tanto se reducen los costes del proceso de vinificación (Gómez García-Carpintero et al. 2012).

Entre las distintas especies del roble y, en particular, de entre las especies que se utilizan habitualmente en los procesos de vinificación, se tiene preferencia por chips de especies de alta porosidad, como el roble francés (*Quercus petraea* y *Quercus robur*) y, muy especialmente, el roble ibérico (*Quercus pyrenaica*), pues su alta porosidad favorece una mayor adsorción de células. Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de chips sin tostar, especialmente de *Quercus pyrenaica*, favorece el mantenimiento de la viabilidad celular, presentando las células una alta viabilidad tras el contacto con la madera, por lo que son los chips de roble ibérico sin tostar los preferidos en la presente invención. Los chips de roble ibérico sin tostar además potencian los aromas florales y varietales del vino, poseen elevada capacidad antioxidante y potencian la estabilización del color debido a su alta concentración de un cierto tanino, el elagitanino, lo que supone un importante refuerzo tánico en boca incrementando untuosidad y volumen. Además, son productos comercialmente disponibles, como es el caso del que se utiliza en los Ejemplos de la presente invención (Spirit NATURE, de Agrovin S.A. ver ficha técnica Spirit NATURE, Agrovin S.A.: http://www.agrovin.com/agrv/pdf/enologia/roble/es/Spirit_pyrenaica_es.pdf).

Los chips de roble recubiertos de almidón de la presente invención comprenden microorganismos de vinificación inmovilizados sobre su superficie exterior y/o sobre la superficie de sus poros, así como sobre la propia cubierta de almidón. Tal como se utiliza en la presente solicitud, se denomina microorganismo de vinificación a cualquier
5 microorganismo que intervenga en dicho proceso, incluyendo no sólo las levaduras que son capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica o a las bacterias que transforman en ácido málico en ácido láctico (BAL) sino a otros microorganismos tales como levaduras o bacterias que, independientemente de si son capaces o no de dar lugar a las fermentaciones alcohólica o maloláctica, puedan producir sustancias que modifiquen o
10 mejoren el perfil organoléptico en las condiciones de producción de un vino, incluidas las de los crianza o los espumosos. Con ello, los chips de la presente invención pueden utilizarse no sólo para facilitar las fermentaciones alcohólica y maloláctica, impartiendo al mismo tiempo al vino aromas propios de la madera, sino también para conferir al vino aromas producidos por levaduras no *Saccharomyces*.

15 Dado que los microorganismos implicados en el arranque y desarrollo de la FA son principalmente levaduras, la invención contempla que los microorganismos de vinificación sean levaduras de vinificación. Generalmente, se utiliza *S. cerevisiae* como cultivo iniciador para llevar a cabo la FA, por lo que una realización preferida de la invención implica que se inmovilicen sobre los chips de roble microorganismos que al menos
20 comprendan levaduras de dicha especie. Los Ejemplos de la presente solicitud incluyen ensayos en los que se utilizan chips de roble en los que están inmovilizadas sólo levaduras de *S. cerevisiae*, describiéndose también su procedimiento de preparación, en el que primero se incuban las células de levaduras con los chips, luego se mezclan los chips en los que han quedado adheridas las células de levadura con gel de almidón (en
25 este caso, de trigo), procediéndose después a la inmovilización de los microorganismos. Este procedimiento es igualmente el preferido cuando se deseen inmovilizar otras levaduras de vinificación, que pueden ser de una única especie o de varias. Y, entre las distintas especies que pueden tener interés se encuentran otras especies de levaduras no *Saccharomyces* como *Hanseniaspora uvarum* (también conocida como *Kloeckera*
30 *apiculata*), que juegan un papel importante en la vinificación, ya que aportan una mayor complejidad aromática al vino y por ello pueden ser interesantes como cultivos iniciadores, como se demuestra también en ensayos incluidos en los Ejemplos de la presente solicitud. De acuerdo con la definición de microorganismos de vinificación y, en particular, con la de levaduras de vinificación utilizada en la presente solicitud, está
35 comprendido dentro del alcance de la invención que los microorganismos inmovilizados

en los chips y los que se inmovilizan en el método de preparación de los mismos sean levaduras capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica, del género *Saccharomyces* y/o no *Saccharomyces*, pero también otras levaduras que sintetizen otras sustancias que puedan conferir al vino características organolépticas deseadas, con preferencia por aquellas especies que se conozca que se han aislado de mostos, vinos en elaboración o de los recipientes en los que se lleve a cabo el proceso de vinificación. Para encontrar posibles levaduras que puedan cumplir estas condiciones pueden consultarse, por ejemplo, revisiones como el artículo sobre “Levaduras vínicas” de R.I. Viramontes Álvarez y R. Pérez Leal publicado en 2014 en la revista *Acenología* (http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas-Cor0214.htm), cuya Tabla 3 en particular menciona una lista de especies utilizadas dependiendo del efecto que se desee conseguir en el vino; también pueden ser útiles las fichas de especificaciones técnicas de empresas que comercializan estos tipos de cultivos iniciadores, como la de Agrovin S.A. antes citada (<http://www.agrovin.com/agrv/index.php/web/enologia/es>), donde pueden encontrarse diversas cepas de levaduras para vinos blancos, tintos o rosados, o levaduras no *Saccharomyces* como *Torulaspota delbruecki*.

Está también comprendido dentro del alcance de la invención la co-inmovilización de levaduras de vinificación y bacterias lácticas malolácticas (BAL). Tal como se utiliza en la presente solicitud, se ha denominado así a las bacterias lácticas que son capaces de llevar a cabo la fermentación maloláctica, es decir la transformación del ácido málico en ácido láctico, por lo que tienen que poder sintetizar enzimas capaces de catalizar dicha reacción en las condiciones en las que tiene lugar el proceso de vinificación, al menos durante un período del mismo. Como ya se discutió, se considera que la principal responsable de la FML durante el proceso de elaboración del vino es *Oenococcus oeni*, que es la bacteria generalmente utilizada como cultivo iniciador para llevar a cabo la FML. La misma es una posible BAL para los propósitos de la invención y, de hecho, en ensayos de los Ejemplos de la presente invención se describe la co-inmovilización *S. cerevisiae* y *O. oeni* y los resultados obtenidos en ensayos de fermentación de mostos realizados con chips de roble de la presente invención en los que están co-inmovilizados ambos microorganismos. Sin embargo, además de *O. oeni*, otras BAL, principalmente de la especie *L. plantarum*, son capaces de llevar la FML en vino al igual que *O. oeni*, aportando otras características organolépticas (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000; Kunkee 1991). Esta bacteria puede ser igualmente de elección para los propósitos de la presente invención. De hecho, los resultados de ensayos descritos en Ejemplos de la presente

invención muestran que *Hanseniaspora uvarum* y *L. plantarum* son capaces de inmovilizarse en chips de roble con alta eficacia, dando lugar a chips de roble en los que están co-inmovilizados ambos microorganismos. Por tanto, la novedosa tecnología de la presente invención puede aplicarse a diferentes especies, tanto de levaduras como de

5 bacterias.

Cuando los microorganismos que se co-inmovilizan sobre los chips de roble recubiertos de almidón de la presente invención comprenden levaduras de vinificación y bacterias lácticas malolácticas, se prefiere llevar a cabo el método de la presente invención de manera que: i) son las células bacterianas las que se adhieren inicialmente sobre los

10 chips, mezclando e incubando con agitación una muestra de biomasa de células bacterianas con los chips y con un medio líquido que incluye, o bien medio de cultivo de las bacterias o, en el caso de que se vaya a proceder a liofilización, un compuesto crioprotector; ii) las levaduras se mezclan con el gel de almidón previamente a la mezcla con los chips; iii) a la mezcla de gel de almidón con levaduras se le añaden poco a poco

15 los chips en los que se han inmovilizado las células bacterianas hasta que el gel no es capaz de embeber más inmovilizado; iv) finalmente se produce la inmovilización final de ambos microorganismos tras haber realizado la mezcla del gel de almidón previamente mezclado con levaduras y de los chips con células bacterianas previamente inmovilizadas. Por tanto, en esa posible realización del método de la invención, cuando

20 los chips se mezclan con el gel de almidón, este último ya se ha mezclado previamente con levaduras, mientras que los chips ya tienen bacterias adheridas sobre los mismos cuando se produce dicha mezcla.

Respecto al proceso en su definición más general y, en concreto, en lo que se refiere a la primera etapa del mismo, la de incubación, en la que células de microorganismos se

25 mezclan y se mantienen en contacto durante un tiempo con los chips de roble, es importante que las células se homogenicen bien con los chips para que queden adheridas a los mismos, pero no es necesario prolongar el tiempo de incubación para que haya replicación celular pues, como se utiliza un cultivo con una alta concentración de células (cultivo concentrado al que se alude en varios puntos de la solicitud como

30 "biomasa"), las células no tienen espacio para crecer. Se considera un tiempo de incubación adecuado un valor comprendido entre 30 minutos a 1 hora, teniendo especial preferencia por la incubación durante 30 minutos, como en los ensayos de los Ejemplos de la presente solicitud, pues prolongarlo hasta 1 hora no dio lugar a observar diferencias en los resultados. En cuanto a la temperatura de incubación, debe elegirse teniendo en

35 cuenta los microorganismos que se desee inmovilizar sobre los chips. Puesto que la

presente invención va dirigida preferentemente a inmovilizados de microorganismos que intervienen o están presentes durante el proceso de vinificación, o en una posible segunda fermentación, el intervalo de 10-15°C a 30°C puede ser un intervalo adecuado de referencia para la elección de dicha temperatura. Cuando al menos una de las especies de microorganismos a inmovilizar sea de levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, se recomienda no superar los 30°C, para no comprometer su viabilidad. Así, en los Ejemplos de la presente solicitud, se utiliza el valor de 28°C, que es una temperatura habitual para los microorganismos utilizados en dichos Ejemplos, compatible con todos ellos.

- 10 En lo que se refiere al almidón a partir del cual se genera el gel, puede utilizarse cualquier almidón con propiedades gelatinizantes, siempre y cuando se tenga en cuenta el intervalo de temperatura dentro del cual se produce su gelatinización, que varía de unos a otros. Se prefiere el almidón de trigo, cuya gelatinización total se produce en el intervalo medio de 80-90°C, incluso 80-95°C, aunque también pueden utilizarse otros almidones naturales
- 15 tales como el almidón de maíz ordinario (que contiene aproximadamente un 27% de amilosa y presentan un intervalo medio de gelatinización de 70-72°C) o el de patata (intervalo medio de gelatinización: 60-75°C). Son menos recomendables los almidones llamados "céreos", que proceden de algunas variedades naturales de cebada, maíz, arroz y sorgo y que, por su bajo contenido en amilosa, tienen menor capacidad de formar
- 20 geles. Además, pueden utilizarse también almidones modificados con capacidad de gelatinización, teniendo en cuenta también que, para los propósitos de la invención, se prefieren almidones cuyo uso esté admitido en productos alimentarios. Para información en ese aspecto, puede consultarse el Real Decreto 142/2002 de 1 febrero, y el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de
- 25 diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.

Para llevar a cabo el proceso de la presente invención, tal como está descrito en los Ejemplos de la presente invención, debe procederse primero a la gelatinización del almidón, por lo que se incluye una etapa de calentamiento del mismo en agua hasta la temperatura apropiada para que se produzca dicha gelatinización: la captación de agua

30 por parte de los gránulos de almidón, que se incrementa según se aumenta la temperatura, dando lugar a que los gránulos se hinchen, a la salida de cadenas de amilosa de los gránulos de almidón, la desintegración de los gránulos y a la formación de una pasta. En el caso del almidón de trigo, pueden ser adecuadas temperaturas del rango de 80°C-95°C, por ejemplo 90°C, como en los Ejemplos de la presente solicitud.

35 Posteriormente, se procede a su enfriamiento para su estabilización y adecuada

formación de un gel: un sólido elástico que supone un sistema de dos fases con una fase continua sólida de polímeros de amilosa que forma una red tridimensional que retiene una fase dispersa líquida. En el caso del almidón de trigo, puede ser adecuado el enfriamiento, por ejemplo, hasta 45°C, como en el caso de los Ejemplos de la presente
5 invención. El gel de almidón se mezcla entonces o bien con las células de microorganismos directamente (por ejemplo, con células de levaduras, como en los casos de co-inmovilizados de bacteria y levadura descritos más adelante en los Ejemplos de la presente invención), previamente al mezclado con los chips, o bien con chips sobre los que ya han quedado adherido microorganismos (microorganismos que se prefiere que
10 sean las BAL en los casos de inmovilización de bacterias lácticas y levaduras, pero que pueden ser también levaduras, como en el Ejemplo 4 de la presente solicitud). Esta etapa puede ser más corta, casi instantánea, que la etapa inicial de incubación de células de microorganismos y chips, pues en ella se busca la homogeneización del almidón (mezclado o no previamente con microorganismos) con los chips que llevan ya
15 microorganismos adheridos.

Respecto a las técnicas para la fijación e inmovilización de los microorganismos, la presente invención considera el secado y la liofilización. Cuando se utiliza el secado para la co-inmovilización de bacterias y levaduras, el método de la presente invención preferiblemente comprende un primer secado de las bacterias tras su incubación con los
20 chips, previamente a la mezcla con las levaduras, y un segundo secado final para la fijación conjunta de ambos microorganismos tras la mezcla del gel de almidón de trigo con levaduras y los chips con células bacterianas inmovilizadas. El secado puede llevarse a cabo, por ejemplo, tal como se indica en la subsección metodológica inicial incluida en la sección de Ejemplos de la presente invención, tanto el primer secado de las bacterias
25 como el segundo secado para la inmovilización conjunta de bacterias y levaduras se realizan a 35°C durante 24 horas.

En la presente invención, sin embargo, se prefiere la liofilización. Según se muestra en ensayos de los Ejemplos de la presente solicitud, la liofilización, en combinación con el método de la presente invención, permite conseguir una mayor viabilidad celular que
30 otras técnicas como el secado, por lo que es la técnica preferida para llevar a cabo el método de la presente invención. Además, la fijación de ambos microorganismos se produce en una única etapa de liofilización, que tiene lugar una vez que los chips se han mezclado con el gel de almidón y, con ello, se han mezclado ya con todos los microorganismos que deban quedar inmovilizados sobre los mismos, lo que reduce el
35 tiempo de procesado y reduce la muerte celular en comparación con los estudios en los

que se aplica dos etapas de secado consecutivas (véase, por ejemplo, Servetas *et al.* 2013, donde se muestra preferencia por el secado respecto a la liofilización). Asimismo, los costes de producción del co-inmovilizado se reducen al liofilizar simultáneamente 2 cultivos iniciadores en un único soporte, evitando 2 etapas de secado por separado.

- 5 Cuando se utiliza la liofilización en el método de la presente invención, se prefiere incluir también un crioprotector. En concreto, se prefiere que en la etapa a) de incubación de los microorganismos con los chips, cuando se mezcla una muestra de biomasa de microorganismos con los chips de roble, ambos se mezclan junto con una solución acuosa que comprende un crioprotector. Así, los chips de roble recubiertos de almidón de
- 10 la presente invención comprenderán también, preferiblemente, un crioprotector.

Para elegir el crioprotector, es conveniente tener en cuenta el tipo de microorganismo o microorganismos que se quieran liofilizar. Para las BAL se recomienda glutamato monosódico, mientras que para las levaduras en general es habitual la glucosa. Así, se prefiere el glutamato monosódico como crioprotector para llevar a cabo el proceso de

15 fijación por liofilización en el caso de la producción de co-inmovilizado de levaduras y BAL, porque estas últimas son más sensibles frente a las condiciones del vino que las levaduras y conviene protegerlas más. Como ya han indicado otros autores, el uso de este crioprotector incrementa la viabilidad y la actividad celular durante la liofilización (Zhao and Zhang 2005; Zhao and Zhang 2009). También pueden utilizarse otros

20 crioprotectores, como por ejemplo, como ya se ha indicado la glucosa. En el caso de los ensayos de la presente solicitud, la glucosa se ha utilizado como crioprotector cuando son levaduras (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) los microorganismos de la muestra de biomasa que se mezclan e incuban con los chips de roble y con la solución de crioprotector, situación en la que igualmente la liofilización se lleva a cabo tras la mezcla

25 de los chips y las levaduras adheridas a ellos y posteriormente recubiertas con gel de almidón de trigo. Se ha encontrado que la viabilidad de las levaduras es semejante tanto en los ensayos realizados con los co-inmovilizados con BAL, donde el crioprotector fue glutamato monosódico, como en los ensayos realizados con los chips del Ejemplo 4, chips en los que las levaduras eran los únicos microorganismos fijados y en los que se

30 utilizó la glucosa como crioprotector. Así, puede utilizarse el glutamato monosódico tanto en uno como en otro caso, no siendo necesario un crioprotector distinto según el microorganismo.

El proceso de inmovilización de células en chips de roble, preferiblemente sin tostar y mediante liofilización, ha sido diseñado especialmente para la mejora del proceso de

vinificación. Los resultados que se muestran en Ejemplos de la presente solicitud que esta tecnología es directamente aplicable a nivel de bodega.

Estudios previos confirman que con la co-inoculación de levadura y bacteria se acorta considerablemente el proceso de vinificación (Jussier *et al.* 2006; Nehme *et al.* 2008; 5 Nehme *et al.* 2009). Según Krieger *et al.* (2007) un vino en que se ha utilizado la estrategia de co-inoculación acabaría en torno 20-30 días mientras que un vino vinificado por el procedimiento tradicional tardaría 70-80 días. La ventaja de la estrategia de inocular el co-inmovilizado de chips de roble en mosto es que se acorta aún más el periodo necesario para que la BAL realice la FML. En el presente trabajo, los resultados 10 muestran que en tan sólo 8 días el co-inmovilizado realiza la FA y la FML y, en el caso del co-inmovilizado de *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, se realizó la FA y la FML en tiempo incluso más cortos, necesitándose únicamente 6 días.

Por tanto, los inmovilizados y co-inmovilizados de cultivos iniciadores sobre chips de roble recubiertos de almidón de la presente invención tienen una aplicación clara en el 15 proceso de producción del vino, ya sea añadiéndolos durante el proceso de vinificación de un mosto (donde se pueden añadir tanto al mosto no fermentado, como cuando ya ha comenzado el proceso de fermentación, en algún momento a lo largo de la misma), como en otros procesos a los que pueda someterse el vino como es el la segunda fermentación que tiene lugar en vinos espumosos, como se demuestra en el Ejemplo 4 de la presente 20 solicitud. Para esta última aplicación se tiene preferencia por los chips en los que se han inmovilizado sólo levaduras, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, como los utilizados en el mencionado Ejemplo 4; dichos chips pueden ser también una posible opción para la fermentación de vinos blancos, en muchos de los cuales no suele tener lugar la FML o es menos importante que en vinos tintos en general.

25 En cuanto a vinos espumosos, en el trabajo realizado por Fumi *et al.* (1987) se inmovilizó *S. cerevisiae* en alginato sódico para su utilización como cultivo iniciador para llevar a cabo la segunda fermentación en botella. La inmovilización de *S. cerevisiae* en chips de roble sin tostar no alteró el proceso de la segunda fermentación respecto al que se obtenía con células libres. Sin embargo, el uso de chips de roble proporciona mejoras 30 organolépticas a los vinos espumosos tipo cava, a diferencia del alginato sódico. El vino espumoso tipo cava elaborado con levaduras inmovilizadas en chips de roble obtuvo una valoración más alta en los atributos de “cuerpo” y “persistencia en boca” que el realizado con células libres. Además la eliminación de la levadura mediante el removido, fue mucho más rápida y no necesitó de la adición de adyuvantes. La inmovilización de la levadura

sobre los chips de roble presenta además la ventaja de que es un material más aceptado que el alginato monosódico en enología por ser utilizado habitualmente, aunque con fines diferentes a los que aquí se describen (Gómez García-Carpintero *et al.* 2012).

Aunque el Ejemplo 4 describe la aplicación en un proceso de segunda fermentación en botella como los que tienen lugar en los vinos espumosos tipo cava obtenidos por el método tradicional, añadiendo los chips a la botella en la etapa en la que tradicionalmente se añade al vino base el licor de tiraje, es perfectamente compatible con la presente invención el uso para la segunda fermentación alcohólica de otros vinos espumosos, como los que se producen en grandes recipientes o tanques, en los que el vino se embotella cuando ya está gasificado, método de producción al que se hace a veces referencia como charmat o granvas.

Así, el desarrollo de este producto permite a las empresas productoras de productos enológicos la fabricación de un abanico más amplio de nuevos cultivos iniciadores con distintas finalidades para la elaboración de vinos. Mediante esta novedosa tecnología los enólogos pueden elaborar vinos de gran complejidad aromática en poco tiempo y con precios muy competitivos. Pero, además, otras aplicaciones del cultivo iniciador co-inmovilizado podrían incluir su uso en la elaboración no sólo de vinos, sino de otras bebidas cuya obtención incluye la fermentación alcohólica y maloláctica, como puede ser la sidra. El caso de la sidra puede ser de especial interés, pues las manzanas son frutas ricas en ácido málico y la elaboración de una sidra de calidad requiere que tenga lugar fermentación maloláctica proceso que, de forma tradicional, tiene lugar una vez finalizada la fermentación alcohólica; la adición de los cultivos iniciadores de levaduras y BAL co-inmovilizados sobre chips de roble recubiertos de almidón, preferiblemente sin tostar, podría ayudar también a acortar el proceso de producción de la sidra.

Por tanto, está incluido también dentro del alcance de la presente invención el uso de los chips de roble de la invención, es decir, los cultivos iniciadores de microorganismos inmovilizados sobre chips de roble, en el proceso de producción de una bebida alcohólica en general, con particular preferencia por el vino y la sidra. En el caso concreto del vino, quedan incluidas todas las particularidades que se han discutido en los párrafos previos, incluidas con el uso para la segunda fermentación de vinos espumosos.

Respecto a los microorganismos, el diseño abierto del sistema permite la planificación de diferentes tipos de co-inmovilizaciones (bacteria-bacteria), (bacteria-levadura), (levadura-levadura) o inmovilizaciones simples, que pueden diseñarse según la aplicación preferida y los efectos concretos que se deseen obtener.

La invención se discute ahora con más detalle con ayuda de los Ejemplos y Figuras que se encuentran a continuación.

Ejemplos

Los ensayos que se describen a continuación en los Ejemplos de la presente solicitud
5 han sido realizados con los siguientes materiales y con las siguientes metodologías.

- Microorganismos:

Los ensayos que se describen a continuación se realizaron con la cepa de levadura
Saccharomyces cerevisiae (Enolab 5021), una levadura apta para llevar a cabo la FA en
mosto o la segunda fermentación del cava, *H. uvarum* CECT 1444 (levadura utilizada
10 para la mejora aromática de los vinos) y las cepas bacterianas *Oenococcus oeni* Enolab
5003 (Berbegal *et al.* 2015), y *Lactobacillus plantarum* Enolab 4608 (Lucio 2014), que son
BAL seleccionadas para realizar la FML en mosto o vino, aislada todas durante la
fermentación del mosto o vino. Los microorganismos citados de la colección Enolab,
(<http://www.uv.es/enolab/>: laboratorio de Microbiología Enológica adscrito al
15 Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad de Valencia, sita en el Campus de Burjassot, C/Doctor Moliner, 50, 46100,
Burjassot, Valencia), son accesibles bajo petición.

- Soportes de inmovilización

Como soporte de inmovilización se utilizaron chips de roble de la Península Ibérica
20 (*Quercus pyrenaica*) sin tostar (Spirit NATURE, Agrovin S.A.), con tostado medio (Spirit
STRUCTURE, Agrovin S.A.) y con tostado alto (Spirit ELEGANCE, Agrovin S.A.), además
de chips de roble francés (*Quercus petraea* y *Quercus robur*) con tostado medio (Spirit
CLASSIC, Agrovin S.A.). Los chips fueron esterilizados mediante calor seco (160°C, 2 h)
previamente a su uso. La Fig. 1 muestra una fotografía de dichos chips.

25 - Co-inmovilización de levadura y bacteria láctica mediante secado.

En primer lugar, se realizó la inmovilización de *O. oeni* en chips de roble. Para ello, se
procedió a la generación de biomasa bacteriana en medio de cultivo OPM (*Oenococcus*
Production Medium) (Berbegal *et al.* 2015) hasta alcanzar una concentración de 2×10^9
UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1 S-R) y
30 se eliminó el sobrenadante. Se realizó una incubación en agitación (120 rpm/min) de una
mezcla compuesta por el 7% de biomasa celular, 15% chips de roble y 78% de OPM
durante 30 min a 28°C para promover la adherencia de las bacterias al soporte. Se

eliminó la parte líquida por filtrado a través de una gasa y se eliminó la humedad restante mediante secado en una estufa de aire (Selecta) a 35°C durante 24 h. A continuación, se realizó la inmovilización de las levaduras sobre el inmovilizado bacteriano. Para ello, se generó biomasa de levadura en medio de cultivo GPY (*Glucose Yeast Extract Peptone*,
 5 Khondar et al., 2002: glucosa 40 g/l, peptona 40 g/l, extracto de levadura 3 g/l) líquido hasta alcanzar una concentración de 5×10^8 UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1 S-R) y se eliminó el sobrenadante. Se realizó una mezcla de almidón de trigo (Fluka, actualmente disponible de Sigma Aldrich con código S5127) en agua al 8% y se calentó a 90°C hasta conseguir una consistencia de gel.
 10 Cuando la temperatura bajó hasta 45°C, se añadió a la mezcla biomasa de levaduras al 13%. A esta mezcla se le fue añadiendo poco a poco el inmovilizado de *O. oeni* hasta que el gel no fue capaz de embeber más inmovilizado. Seguidamente, se realizó un segundo secado del inmovilizado con ambos microorganismos a 35°C durante 24 h. El cultivo iniciador desecado se conservó a 4°C en oscuridad al abrigo del aire. La
 15 inmovilización de los microorganismos se comprobó mediante microscopía electrónica (microscopio electrónico de barrido JSM-6300 de JEOL).

- Co-inmovilización de levadura y bacteria láctica mediante liofilización:

Como en el caso de la inmovilización con secado, primero se realizó la inmovilización de las células bacterianas de *O. oeni* o *L. plantarum* en chips de roble sin tostar. Se generó
 20 biomasa bacteriana en medio de cultivo OPM (*O. oeni*) o MRS (Scharlau 02-135-500) (de Man et al., 1960) (*L. plantarum*) hasta alcanzar una concentración de 2×10^9 UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1 S-R) y se eliminó el sobrenadante. Se realizó una incubación en agitación de una mezcla compuesta por el 7% de biomasa celular, 15% chips de roble y 78% de crioprotector (0,067 mM L-
 25 glutamato sódico, Panreac) durante 30 min a 28°C para promover la adherencia de las bacterias al soporte. Sobre el inmovilizado bacteriano se realizó la inmovilización de las levaduras (*S. cerevisiae* o *K. apiculata*). Se procedió previamente a la generación de biomasa celular en medio de cultivo GPY líquido hasta alcanzar una concentración de 5×10^8 UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1
 30 S-R) y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se realizó una mezcla de almidón de trigo (Sigma Aldrich S5127) en agua al 8% y se calentó a 90°C hasta conseguir una consistencia de gel, y cuando la temperatura bajó hasta 45°C se añadió la mezcla biomasa de levaduras al 13%. A esta mezcla se le fue añadiendo poco a poco el inmovilizado con *O. oeni* hasta que el gel no fue capaz de embeber más inmovilizado.
 35 Seguidamente, la eliminación del agua se realizó mediante sublimación. Para ello se

congeló el inmovilizado conteniendo ambos microorganismos a -20°C durante 6 h. La liofilización se llevó a cabo durante 27 h en condiciones de vacío (15,9 militorrs) en un equipo Virtis Sentry. El cultivo iniciador liofilizado se conservó a 4°C en oscuridad al abrigo del aire. La eficacia de la inmovilización se comprobó mediante microscopía
5 electrónica (microscopio electrónico de barrido JSM-6300 de JEOL).

- *Inmovilización de levadura mediante liofilización:*

Se cultivó la levadura *S. cerevisiae* Enolab 5021 en medio de cultivo GPY líquido hasta alcanzar una concentración de 2×10^9 UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1 S-R) y se eliminó el sobrenadante. Se realizó la
10 incubación en agitación de una mezcla compuesta por el 7% de biomasa celular, 15% chips de roble y 78% de crioprotector (glucosa 15%, Panreac) durante 30 min a 28°C para promover la adherencia de las levaduras al soporte. A continuación se realizó una mezcla de almidón de trigo (Fluka, actualmente disponible de Sigma Aldrich con código S5127) en agua al 8% y se calienta a 90°C hasta conseguir una consistencia de gel,
15 cuando la temperatura bajó hasta 45°C se añadió a la mezcla el inmovilizado. Seguidamente se congeló el inmovilizado a -20°C durante 6 h. La liofilización se llevó a cabo durante 27 h en condiciones de vacío (15,9 militorrs) mediante un equipo Virtis Sentry. El cultivo iniciador liofilizado se conservó a 4°C en oscuridad y al abrigo del aire. La eficacia de la inmovilización de la levadura se comprobó mediante microscopía
20 electrónica (microscopio electrónico de barrido JSM-6300 de JEOL).

- *Determinación de la concentración de células viables inmovilizadas:*

En primer lugar se realizó un recuento de levaduras (*S. cerevisiae* o *K. apiculata*) y bacterias (*O. oeni* o *L. plantarum*) viables por gramo de biomasa obtenida (UFC/g) tras la centrifugación, mediante siembra de diluciones seriadas en placas de GPYA (Martorell *et al.* 2005) para levaduras y de MLO (Zúñiga *et al.* 1993), MRS (Scharlau 02-135-500)
25 para *O. oeni* y MRS (Scharlau) y *L. plantarum*, respectivamente. Teniendo en cuenta el peso total húmedo del conjunto (levadura, bacteria, chips de roble y almidón) se calculó el número de células por gramo de inmovilizado. Tras la liofilización o secado se calculó el porcentaje de células viables y células muertas mediante el kit LIVE/DEAD BacLight
30 bacterial Viability Kit (Invitrogen). Para ello se resuspendieron 0,1 g de inmovilizado en 100 µL de agua destilada y de añadió 0.3 µL del mix (1v solución A: 1v solución B) del kit. Se incubó durante 20 min en oscuridad y se observaron las muestras a 100X con aceite de inmersión en un microscopio de fluorescencia (Leica). Las células viables presentan fluorescencia verde y las células muertas presentan fluorescencia roja. Teniendo en

cuenta el porcentaje de células viables, se calculó el número de células viables por gramo de inmovilizado.

- Estrategias de inoculación en mosto tinto:

Se utilizó un mosto de la variedad Tempranillo (glucosa 65 g/L, fructosa 65 g/L, ácido L- málico 3.0 g/L, pH 3,5). Se siguieron tres estrategias de inoculación en mosto. Las vinificaciones se realizaron por triplicado a 25°C.

- Vinificación secuencial de células libres: se inoculó *S. cerevisiae* en una concentración final de 1×10^6 UFC/mL. Tras la finalización de la FA se inoculó *O. oeni* en una concentración final de 1×10^6 UFC/mL.
- 10 - FA y FML simultáneas usando células de levadura y bacteria libres: se co-inoculó *S. cerevisiae* y *O. oeni* en una concentración final de 1×10^6 UFC/mL.
- FA y FML simultáneas mediante el uso de células de levaduras y bacterias: se inocularon 0.6 g/L de co-inmovilizado en mosto (esta concentración celular correspondía aproximadamente a 1×10^6 UFC/g).

- 15 - Comparación de la evolución de la FA y FML en mosto con células libres e inmovilizadas con diferentes estrategias de inoculación:

La evolución del consumo de compuestos relacionados con la FA y FML (glucosa, fructosa, etanol, ácido láctico y ácido málico, se analizó mediante un equipo de HPLC (Agilent serie 1200), AMINEX HPX-87H (BIORAD). La fase móvil consistió en una solución de 0.75 ml de H_3PO_4 al 85% (Frayne 1986).

- Segunda fermentación en espumoso tipo cava con células libres e inmovilizadas:

Se repartió el vino base (Macabeo y Chardonnay, etanol 11% (v/v)) en botellas de cava transparentes, al que se le añadió licor de tiraje (12 g/L de glucosa y 12 g/L de fructosa). Las botellas se inocularon con la levadura inmovilizada en chips de roble ibérico sin tostar (1 g/L que correspondía aproximadamente a 2×10^6 UFC/mL) o con un cultivo de células libres (2×10^6 UFC/mL) y se realizó una crianza de 9 meses en botella. Los experimentos se realizaron por triplicado. El consumo de azúcares y la formación de etanol durante la fermentación se analizó mediante un equipo de HPLC (Agilent serie 1200), AMINEX HPX-87H (BIORAD). La fase móvil consistió en una solución de 0.75 ml de H_3PO_4 al 85%. La formación de compuestos aromáticos se realizó mediante un equipo cromatografía de gases. La cata fue llevada a cabo mediante un panel de 10 expertos catadores.

- Ejemplo 1. Viabilidad y eficacia de la inmovilización de *S. cerevisiae* y *O. oeni* en los diferentes tipos de chips de roble.

1.1. Selección del tipo de chips

Como soporte de inmovilización se utilizaron chips de roble de la Península Ibérica
 5 (*Quercus pyrenaica*) sin tostar, con tostado medio y con tostado alto. Además de chips de roble francés (*Quercus petraea* y *Quercus robur*) con tostado medio. El roble americano (*Quercus alba*) quedó descartado por su baja porosidad. El roble francés y el ibérico son muy porosos, favoreciendo una mayor absorción de células.

Tras el contacto de las células bacterianas con los chips durante 30 min en agitación con
 10 el crioprotector, se observó que la viabilidad celular descendía drásticamente al utilizar chips con tostado medio o alto, reduciéndose ésta a valores inferiores al 20%. Sin embargo la utilización de chips de roble ibérico sin tostar mantuvo la viabilidad entre un 86%. El roble ibérico sin tostar (Spirit NATURE, Agrovin S.A.) fue seleccionado por tanto para llevar a cabo la inmovilización (ver las fotografías de microscopía electrónica de la
 15 Fig. 1B, donde puede observarse su porosidad).

1.2. Eficacia de la inmovilización de células sobre los chips de roble

La inmovilización y la disposición de las células de levadura (*S. cerevisiae* o *K. apiculata*)
 y de las células bacterianas (*O. oeni* o *L. plantarum*) co-inmovilizadas se comprobaron
 mediante microscopía electrónica. Se estudiaron dos técnicas de adhesión de los
 20 microorganismos al chip para la obtención de los co-inmovilizados levadura-bacteria, el secado y la liofilización. Como ejemplo, en la Fig. 2 puede observarse que las células de *S. cerevisiae* y de *O. oeni* quedan adheridas en el interior del chip de roble y recubiertos por una capa de almidón tanto si se fijan por secado como por liofilización. Las levaduras quedan en la propia película de recubrimiento, mientras que las bacterias quedan por
 25 debajo. Los resultados mostrados corresponden a un tiempo inicial de incubación de los chips con células de microorganismos de 30 minutos, pero la incubación durante 1 hora no dio lugar a diferencias.

Los resultados muestran que tras el secado se obtuvo concentración de células viables
 que, en el caso concreto de la co-inmovilización de *O. oeni* y *S. cerevisiae*, fue de 2.5×10^7
 30 UFC/g (bacterias) y 7.1×10^7 UFC/g (levaduras), mientras que tras la liofilización se obtuvo entre 5.59×10^9 - 1×10^{10} UFC/g (bacterias) y entre 7.1×10^7 - 7×10^8 UFC/g (levaduras). Así, la liofilización permitió una viabilidad celular más alta que el secado a 35°C, técnica estudiada previamente (Servetas *et al.* 2013).

- Ejemplo 2. Evolución de la FA y FML en mosto con células libres inoculadas simultáneamente, secuencialmente y con células inmovilizadas en chips de roble

Se comparó la evolución de diversos compuestos relacionados con la FA y la FML durante la vinificación en mosto tinto al inocular secuencialmente o simultáneamente
5 células libres de *S. cerevisiae* (1×10^6 UFC/mL) y *O. oeni* (1×10^6 UFC/mL), con la inoculación del co-inmovilizado (0,6 g/L) de *S. cerevisiae* y *O. oeni*.

Los resultados muestran que, mientras que en una inoculación secuencial (Fig. 3A) se necesitan 14 días para que tenga lugar una vinificación completa, en la que se ha consumido el ácido málico, al inocular 2 microorganismos simultáneamente (células
10 libres) se acorta el proceso de vinificación (Fig. 3B): Sin embargo, tras 8 días, no se consumió todo el ácido málico presente en el mosto por parte de las BAL.

Mediante la utilización del co-inmovilizado de levadura-bacteria en chips de roble ibérico sin tostar, la FA y la FML se redujeron a una sola etapa, consumiéndose todos los azúcares y ácido málico en 8 días (Fig. 3B).

15 - Ejemplo 3: Evaluación de la inmovilización de otros microorganismos de interés enológico

Los resultados que se obtuvieron con el co-inmovilizado de *L. plantarum* - *S. cerevisiae* mostraron que tras la liofilización se obtuvo una concentración de células viables de entre 2×10^9 - 3×10^9 UFC/g (bacterias) y 4×10^8 - 5×10^8 UFC/g (levaduras).

20 La inoculación del co-inmovilizado en mosto tinto mostró que se llevó a cabo tanto la FA como la FML. *L. plantarum* consumió todo el ácido málico en tan sólo 2 días y *S. cerevisiae* agotó todos los azúcares presentes en el mosto en 6 días (Fig. 4).

La inmovilización de una levadura no-*Saccharomyces* presente en etapas tempranas de la vinificación, *H. uvarum* mostró que la concentración de células viables tras la
25 liofilización fue de $2,5 \times 10^8$ - 3×10^8 UFC/g.

- Ejemplo 4. Evaluación del comportamiento de la levadura inmovilizada durante la segunda fermentación del cava

Se comprobaron los resultados de un inmovilizado de *S. cerevisiae* Enolab 5021 en chips de roble sin tostar en el vino base y se comparó con la levadura libre para llevar a cabo la
30 segunda fermentación de un espumoso tipo cava. La fermentación se desarrolló en ambos casos consumiéndose los azúcares en aproximadamente 60 días y aumentando el grado alcohólico en 1,5% (Fig. 5).

Durante los 9 meses de crianza en la botella, la levadura inmovilizada se depositó sin ayuda de adyuvantes como la bentonita como puede apreciarse en la Fig. 6A. En el removido todos los restos de levadura inmovilizadas en chips de roble se situaron en el cuello de la botella 3 veces más rápido que en las botellas que contenían células libres.

5 Además, se consiguió una transparencia un 75% superior en las botellas que contenían la levadura inmovilizada sobre las que presentaban células libres. En la Fig. 6B se observa el tapón congelado formado por las levaduras y el soporte de inmovilización. Tras el degüelle el cava ya listo para ser consumido presentó un aspecto transparente y sin restos del cultivo iniciador inmovilizado (Fig. 6C).

10 En la cata elaborada por un panel de 10 expertos, se observó que la tonalidad del color, la intensidad, la brillantez y la transparencia eran las mismas en el espumoso tipo cava realizado con células libres y en el espumoso tipo cava realizado con células inmovilizadas. En cuanto a la fuerza de la espuma y al tamaño de las burbujas también presentaban valores similares. Los atributos en cuanto a intensidad y aromas en ambos

15 cavas fueron valorados como placenteros e intensos. En cuanto al cuerpo, el espumoso tipo cava elaborado con levaduras inmovilizadas en chips de roble presentó una valoración más positiva que el realizado con células libres. También la persistencia en boca fue más larga en el cava realizado con el inmovilizado de levaduras. Y, a pesar de haber mantenido chips de roble durante 9 meses en la botella, el cava no presentó una

20 mala valoración de astringencia y además la madera potenció la percepción de un espumoso tipo cava más equilibrado y armonioso.

Bibliografía

- Agouridis N, Bekatorou A, Nigam P, Kanellaki M (2005) Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2546-2551
- 5 Agouridis N, Kopsahelis N, Plessas S, Koutinas AA, Kanellaki M (2008) *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresour Technol* 99:9017–9020
- Berbegal C, Benavent-Gil Y, Pardo I, Ferrer S (2015) A novel culture medium for *Oenococcus oeni* malolactic starter production. *LWT - Food Science and*
 10 *Technology* 64:25-31
- Callone E, Campostrini R, Carturan G, Cavazza A, Guzzon R (2008) Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *J Mater Chem* 18:4839-4848
- 15 Crapisi A, NUTI MP, ZAMORANI A, SPETTOLI P (1987) Improved stability of immobilized *Lactobacillus* spp. cells for the control of malolactic fermentation in wine. *Am J Enol Vitic* 38: 310-312
- deMan, Rogosa and Sharpe (1960). *J. Appl. Bacteriol* 23:130.
- Divies C, Cavin JF, Prevost H (1994) Bactéries lactiques immobilisées. In: *Bactéries*
 20 *lactiques (II)* Roissart & Luquet
- Escalante-Minakata, Ibarra Junquera: Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. *BioTecnología* 2007; 11 (3).
- Frayne RF (1986) Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am J Enol Vitic* 37:281-287
- 25 Fumi MD, Trioli G, Colagrande O (1987) Preliminary assessment on the use of immobilized yeast cells in sodium alginate for sparkling wine processes. *Biotechnol Lett* 9:339-342
- Gómez García-Carpintero E, Gómez Gallego MA, Sánchez-Palomo E, González Viñas MA (2012) Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or
 30 in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chem* 134:851-863
- Jussier D, Dubé Morneau A, Mira de Orduña R (2006) Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay. *Applied Environmental Microbiology* 72:221-227

- Kosseva M, Beschkov V, Kennedy JF, Lloyd LL (1998) Malolactic fermentation in chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochemistry* 33:793-797
- 5 Kourkoutas Y, Kanellaki M, Koutinas AA (2006) Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Science and Technology* 39:980-986
- Krieger S, Palacios A, Herreros R, Romero S, Suárez C, Heras JM (2007) Momento óptimo de la fermentación maloláctica en el vino blanco. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos* 387:58-63
- 10 Krieger S, Palacios, A., Herreros, R., Romero, S., Suarez, C., Heras, J.M. Momento óptimo de la fermentación maloláctica en el vino blanco. www.enoreports.com
- Kunkee RE (1991) Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol Rev* 88:55-72
- Lonvaud-Funel A (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters* 126:209-214
- 15 Lucio O (2014) Acidificación biológica de vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia
- Maicas S (2001) The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:35-39
- 20 Maicas S, Pardo I, Ferrer S (2001) The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme and Microbial Technology* 28:415-419
- McCord JD, Ryu DDY (1985) Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes. *Am J Enol Vitic* 36: 214-218
- 25 Martorell P, Querol A, Fernández-Espinar MT (2005) Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6823–6830
- Naouri P, Chagnaud P, Arnaud A, Galzy P, Mathieu J (1991) A new technology of malolactic bioconversion in wine. *J Wine Res* 2:5-20.
- 30 Nehme N, Mathieu F, Taillandier P (2008) Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *J Ind Microbiol Biotech* 35:685-693
- Nehme N, Mathieu F, Taillandier P (2009) Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial

characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiology* 27:150-157

Ribéreau- Gayon J, Dubordieu D, Donèche B, Lonvaud A (2000) *Handbook of Enology. Vol I. The microbiology of wine and vinifications.*

- 5 Romancino DP, Di Maio S, Muriella R, Oliva D. Analysis of non- *Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology* 2008.

Rossi J, Clementi F (1984) L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am J Enol Vitic* 35:100-102

- 10 Rossi J, Clementi F ((1984).) L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am J Enol Vitic* 35::100-102.

Servetas I, Berbegal C, Camacho N, Bekatorou A, Ferrer S, Nigam P, Drouza C, Koutinas AA (2013) *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* immobilized in different layers of a cellulose/starch gel composite for simultaneous alcoholic and malolactic wine fermentations. *Process Biochem* 48:1279-1284

15

Spettoli P, Bottacin A, Nuti MP, Zamorani A (1982) Immobilization of *Leuconostoc Oenos* ml 34 in Calcium Alginate Gels and its Application to Wine Technology. *Am J Enol Vitic* 33:1-5

Y. Kourkoutas AB, I.M. Banat, R. Marchant, A.A. Koutinas (2004) *Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.* *Food Microbiology* 21:377-397

20

Zhao G, Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* 99:333-338

- 25 Zhao G, Zhang G (2009) Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Int J Food Microbiol* 135:64-67

Zhao G, Zhang G (2009) Influences of protectants, rehydration media and storage on the viability of freeze-dried *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1801-1806

- 30 Zúñiga M, Pardo I, Ferrer S (1993) An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 18:37-42.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener cultivos de microorganismos de vinificación inmovilizados sobre la superficie exterior y/o la superficie de los poros de virutas o
5 chips de roble recubiertos de almidón, que comprende las etapas de:
- a. incubar los chips de roble con células de al menos una de las especies de microorganismos a inmovilizar sobre ellos;
 - b. mezclar los chips con microorganismos ya adheridos obtenidos en la
10 etapa a) con un gel de almidón, gel que opcionalmente se ha mezclado previamente con células de al menos una de las especies de microorganismos a inmovilizar sobre los chips ;
 - c. inmovilizar los microorganismos sobre los chips mediante secado o liofilización.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que se parte de chips de roble sin tostar.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el roble es de la especie *Quercus pyrenaica*.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gel de almidón es un gel de almidón de trigo.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el
25 que los microorganismos de vinificación son levaduras de vinificación y la etapa c) de inmovilización se lleva a cabo tras la etapa a) de incubación de las células de microorganismos con los chips y tras la etapa b) de mezcla de los chips con gel de almidón de trigo.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los microorganismos de vinificación comprenden levaduras de vinificación y bacterias lácticas malolácticas co-inmovilizadas y en el que:
- i. en la etapa a), son las células bacterianas las que se adhieren
35 sobre los chips mezclando e incubando con agitación una muestra de biomasa de células bacterianas con los chips y con un medio líquido que incluye o medio de cultivo de las bacterias

- o, en el caso de que se vaya a proceder a liofilización, un compuesto crioprotector;
- ii. las levaduras se mezclan con el gel de almidón previamente a la mezcla con los chips,
 - 5 iii. en la etapa b), a la mezcla de gel de almidón de trigo con levaduras se le añaden poco a poco los chips en los que se han inmovilizado las células bacterianas hasta que el gel no es capaz de embeber más inmovilizado,
 - 10 iv. en la etapa c) se produce la inmovilización final de ambos microorganismos tras haber realizado la mezcla del gel de almidón de trigo previamente mezclado con levaduras y de los chips con células bacterianas previamente inmovilizadas.

7. El método según la reivindicación 6, en el que los microorganismos
15 se inmovilizan por secado.

8. El método según la reivindicación 7, que comprende un primer secado de las bacterias tras su incubación con los chips, previamente a la mezcla con las levaduras, y un segundo secado final para la inmovilización conjunta de
20 ambos microorganismos tras la mezcla del gel de almidón de trigo con levaduras y los chips con células bacterianas inmovilizadas.

9. El método según la reivindicación 8, en el que tanto el primer secado de las bacterias como el segundo secado para la inmovilización conjunta de
25 bacterias y levaduras se realizan a 35°C durante 24 horas.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la inmovilización de los microorganismos se realiza por liofilización.

30 11. El método según la reivindicación 10, en el que la liofilización se produce tras la etapa b) de mezcla de los chips con el gel de almidón.

12. El método según la reivindicación 11, en el que en la etapa a) de incubación de los microorganismos con los chips se mezclan las células de
35 microorganismos con los chips de roble y con una solución acuosa que comprende un crioprotector.

13. El método según la reivindicación 12, en el que la mezcla está compuesta por 7% de biomasa de células de microorganismos, 15% de chips de roble y 78% de solución de crioprotector.

5 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que las células de microorganismos que se mezclan e incuban con los chips de roble y la solución de crioprotector son células de levaduras, el crioprotector es glucosa, y la liofilización se produce tras la mezcla de los chips y los levaduras adheridas a ellos con gel de almidón de trigo.

10 15. El método según la reivindicación 14, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

15 16. El método según las reivindicaciones 6 y 12 ó 13, en el que las células de microorganismos que se mezclan e incuban con los chips de roble y la solución de crioprotector son células de bacterias lácticas malolácticas, el crioprotector es L-glutamato sódico y la liofilización se produce se produce tras la mezcla de los chips y las bacterias adheridas a ellos con gel de almidón de trigo que ha sido previamente mezclado con levaduras.

20 17. El método según la reivindicación 16, en el que las bacterias lácticas malolácticas se seleccionan entre las especies *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*.

25 18. El método según la reivindicación 16 o 17, en el que las levaduras se seleccionan entre las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* o mezclas de las mismas.

30 19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que los chips a los que se han adherido ya todos los microorganismos se congelan a -20°C durante 6 horas y la liofilización se lleva a cabo durante 27 horas en condiciones de vacío.

35 20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19, en el que el gel de almidón se prepara previamente a partir de almidón de trigo, mediante gelatinización por calentamiento hasta una temperatura del rango de 80°C-95°C, y su posterior enfriamiento.

21. Un chip de roble recubierto de almidón, caracterizado porque comprende microorganismos de vinificación inmovilizados sobre su superficie exterior y/o sobre la superficie de sus poros.

5 22. Chip de roble según la reivindicación 22, en la que los microorganismos están inmovilizados mezclados con un gel de almidón de trigo.

23. Chip de roble según la reivindicación 21 o 22, en el que los microorganismos están además inmovilizados junto con un crioprotector.

10

24. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que el crioprotector se selecciona entre glutamato sódico y glucosa.

15 25. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, que no ha sido sometido a tostado.

26. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, que es de la especie *Quercus pyrenaica*.

20 27. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en el que los microorganismos de vinificación comprenden levaduras.

25 28. Chip de roble según la reivindicación 27, en el que las levaduras se seleccionan del grupo de *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras no *Saccharomyces* o mezclas de las mismas.

29. Chip de roble según la reivindicación 28, que comprende levaduras no *Saccharomyces* de la especie *H.uvarum*.

30 30. Chip de roble según la reivindicación 28, que comprende levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

35 31. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que adicionalmente comprende bacterias lácticas malolácticas capaces de convertir el ácido málico en ácido láctico.

32. Chip de roble según la reivindicación 31, en el que las bacterias lácticas malolácticas se seleccionan del grupo de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*.

33. Chip de roble según la reivindicación 32, que comprende levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias de la especie *Oenococcus oeni* o *Lactobacillus plantarum*.

5

34. Chip de roble según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 33, obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

35. Uso de un chip de roble de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 34 en el proceso de producción de una bebida alcohólica.

10

36. El uso según la reivindicación 35, en el proceso de producción de un vino.

37. El uso según la reivindicación 36, en el proceso de vinificación de un mosto.

15

38. El uso según la reivindicación 37, en el que los chips de roble se añaden al mosto no fermentado.

20

39. El uso según la reivindicación 37, en el que los chips de roble se añaden cuando ya ha comenzado la fermentación.

40. El uso según la reivindicación 36, en el proceso de la segunda fermentación de un vino espumoso.

25

41. El uso según la reivindicación 40, en el que el chip de roble es un chip de la reivindicación 28.

42. Uso según la reivindicación 40 o 41, en el que los chips de roble se añaden al vino base.

30

43. Uso según la reivindicación 40, 41 o 42, en el que el vino espumoso se elabora siguiendo proceso tradicional que da lugar a los vinos espumosos tipo cavas.

35

44. Uso según la reivindicación 43, en el que los chips se añaden a la botella en la etapa en la que tradicionalmente se añade al vino base el licor de tiraje.

40

45. El uso según la reivindicación 35, en el proceso de producción de sidra.

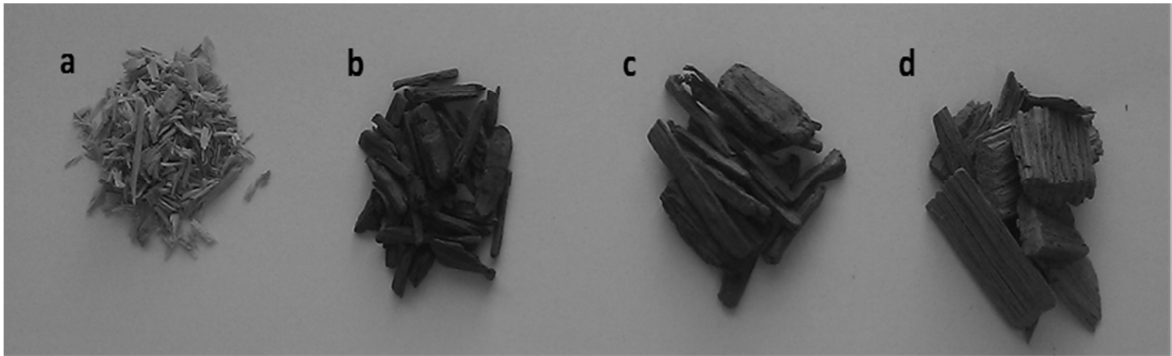


Fig. 1A

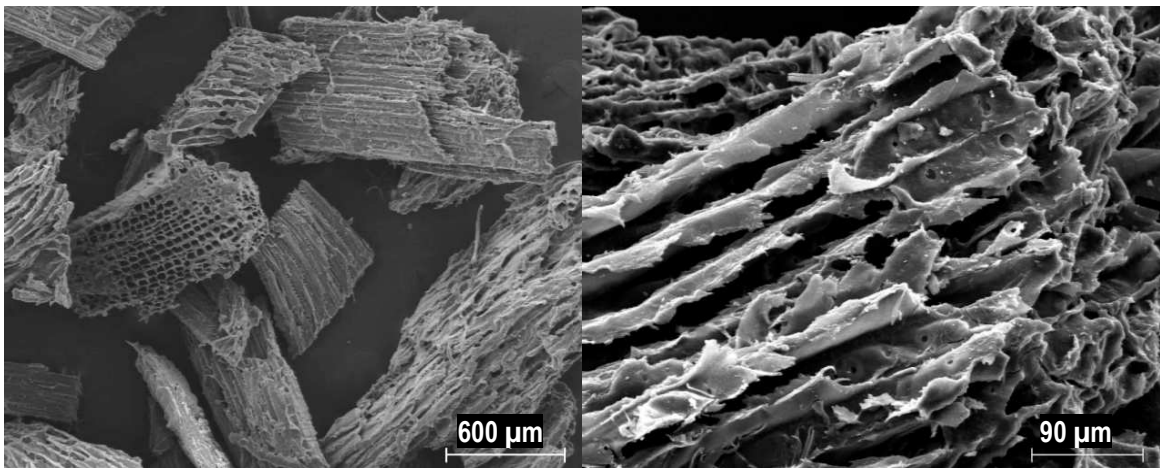


Fig 1B

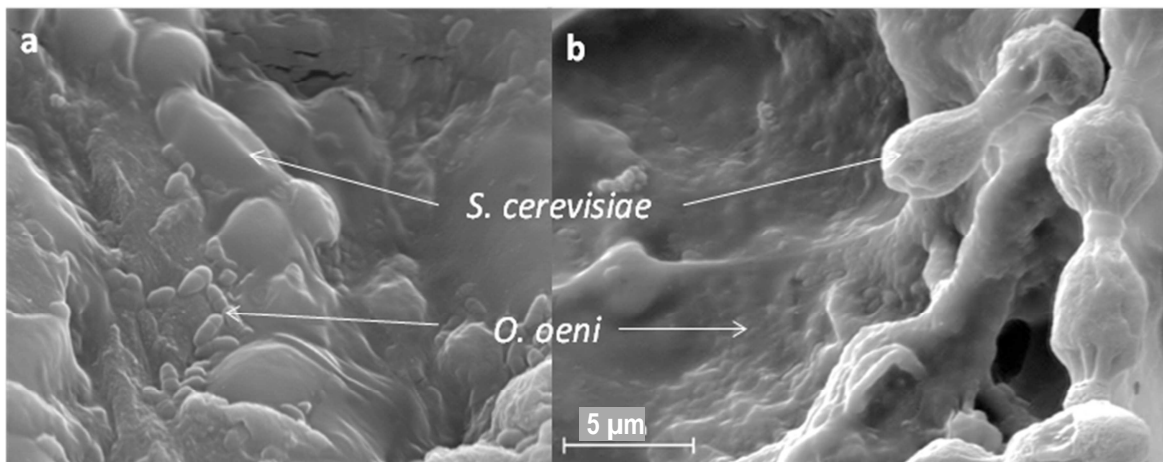


Fig. 2

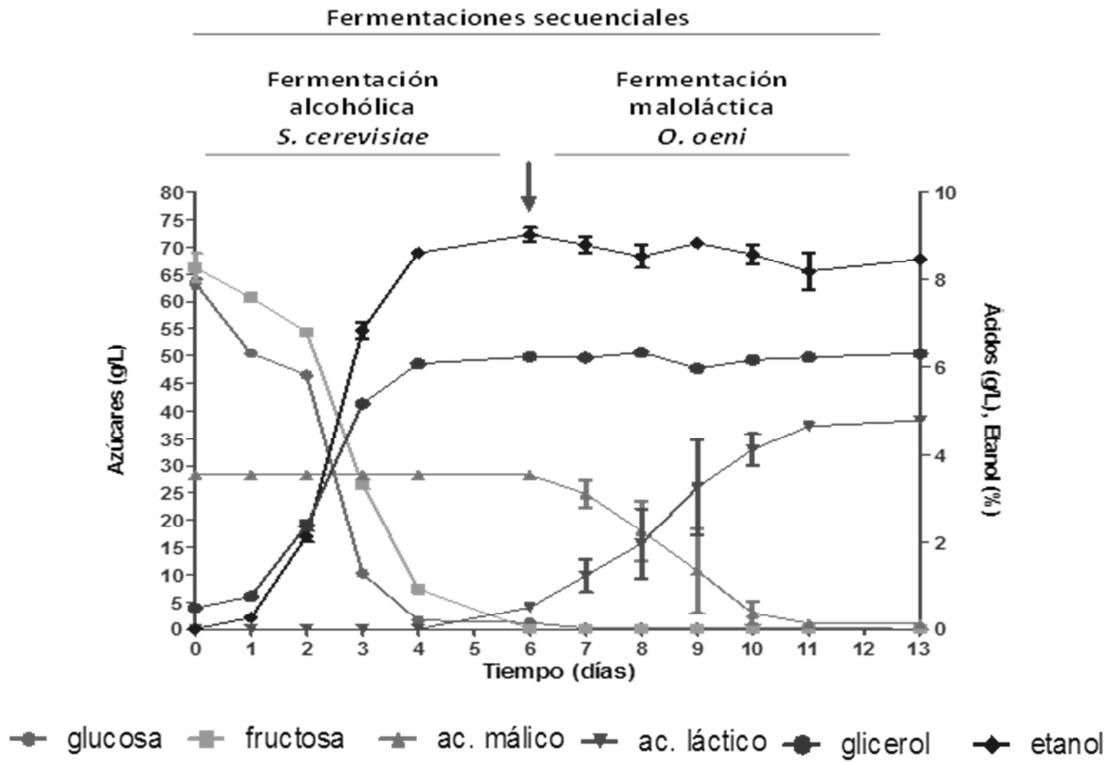


Fig. 3A

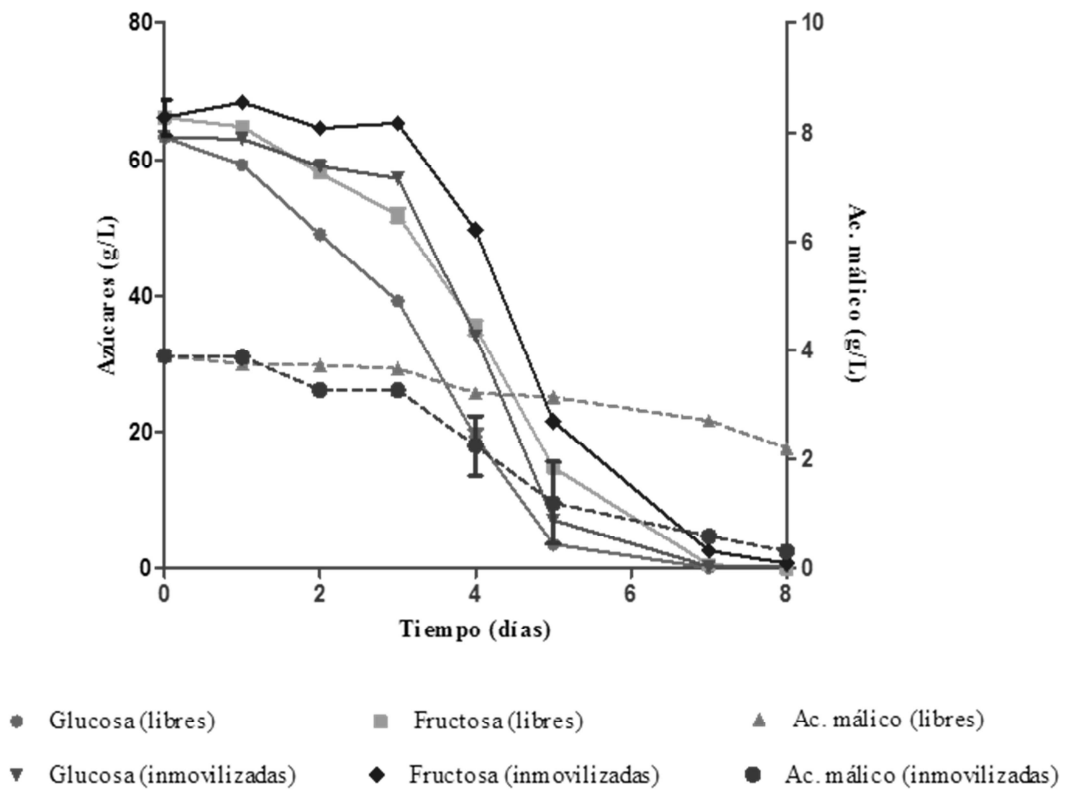


Fig. 3B

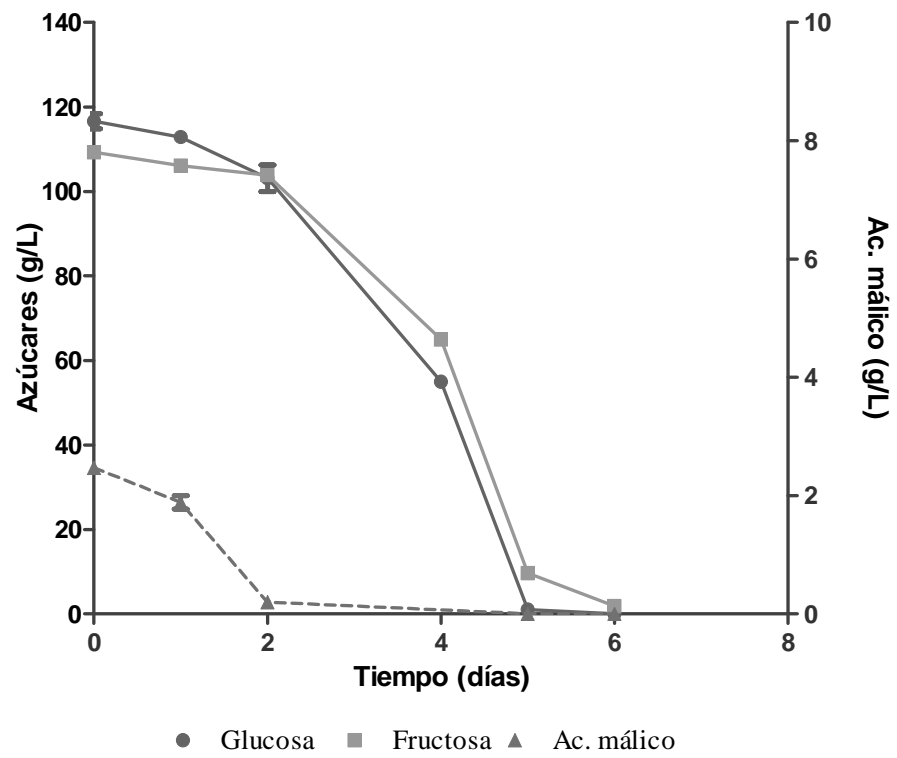


Fig. 4

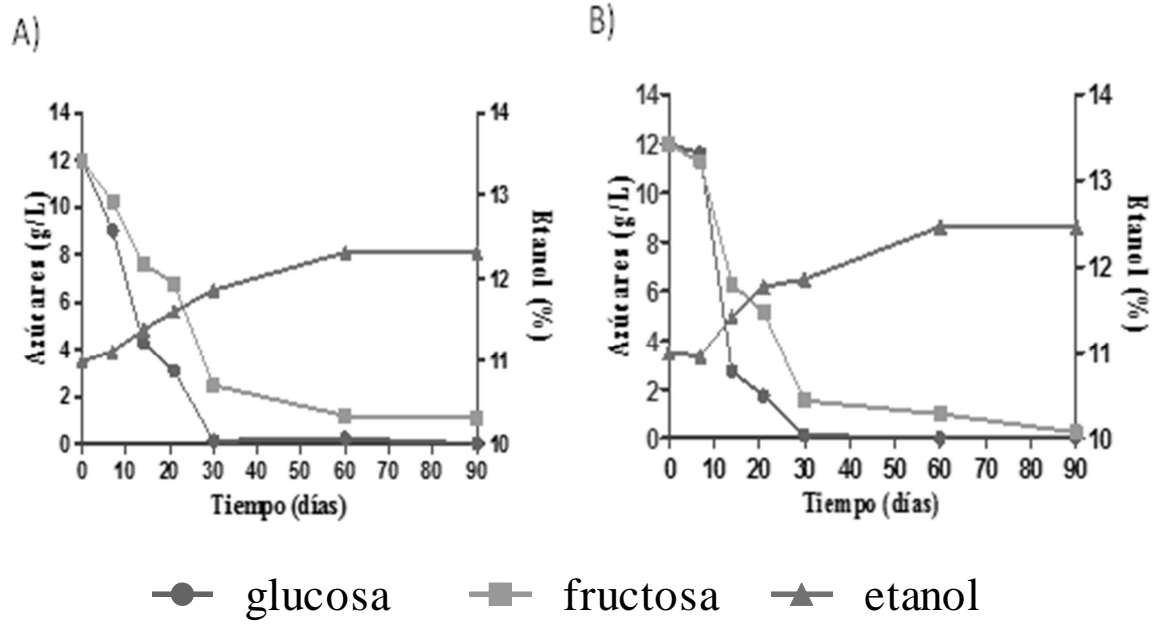


Fig. 5



Fig. 6



- ②① N.º solicitud: 201531943
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2015
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9849264 A1 (PANIMOLABORATORIO BRYGGERILABO et al.) 05.11.1998, resumen; reivindicaciones.	1-45
X	WO 2013079797 A1 (KEMIRA OYJ) 06.06.2013, reivindicaciones.	1-45
X	HONG S K et al. Degradation of malic acid in wine by immobilized Issatchenkia orientalis cells with oriental oak charcoal and alginate. Letters in Applied Microbiology MAY 2010 (05.2010) VOL: 50 No: 5 Págs: 522-529 ISSN 0266-8254 Doi: doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02833.x.	1-45
X	KOURKOUTAS Y et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. FOOD MICROBIOLOGY, 20040801 ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, GB 01.08.2004 VOL: 21 No: 4 Págs: 377-397 ISSN 0740-0020 Doi: doi:10.1016/j.fm.2003.10.005. Poutanen Kaisa; Katina Kati	1-45

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 10.05.2016</p>	<p>Examinador J. Manso Tomico</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12G1/022 (2006.01)

C12G1/073 (2006.01)

C12C11/09 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12G, C12C

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-45	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-45	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9849264 A1 (PANIMOLABORATORIO BRYGGERILABO et al.)	05.11.1998
D02	WO 2013079797 A1 (KEMIRA OYJ)	06.06.2013
D03	HONG S K et al. Degradation of malic acid in wine by immobilized <i>Issatchenkia orientalis</i> cells with oriental oak charcoal and alginate. Letters in Applied Microbiology MAY 2010 (05.2010) VOL: 50 No: 5 Págs: 522-529 ISSN 0266-8254 Doi: doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02833.x.	30.04.2010
D04	KOURKOUTAS Y et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. FOOD MICROBIOLOGY, 20040801 ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, GB 01.08.2004 VOL: 21 No: 4 Págs: 377-397 ISSN 0740-0020 Doi: doi:10.1016/j.fm.2003.10.005. Poutanen Kaisa; Katina Kati	01.08.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a virutas (chips) de robles recubiertas de almidón, en las que se han inmovilizado microorganismos mediante liofilización.

Las reivindicaciones 1-20 se refieren al método de elaboración de los chips de roble. Las reivindicaciones 20-34 se refieren al chip como compuestos, y las reivindicaciones 36-45 se refieren al uso de los chips de roble en el proceso de producción de una bebida alcohólica.

Tanto los documentos del estado de la técnica, como los citados en la descripción de la presente solicitud, divulgan chips de madera de roble. En concreto el solicitante menciona en la descripción que el uso de chips de madera de roble para la elaboración de vino está actualmente muy extendido, haciendo referencia a una serie de empresas que ofrecen una amplia gama de chips de madera de distinto origen y tamaño.

En cuanto a los documentos del estado de la técnica anterior, D01 se refiere a un método para la maduración de cerveza después de la fermentación principal, en el que la cerveza no madurada, después de la eliminación de la levadura y un tratamiento térmico, se hace pasar en un bioreactor lleno con un material de soporte con levaduras inmovilizadas en él, consistiendo dicho material de soporte principalmente en partículas de madera.

D02 divulga una matriz de inmovilización de microorganismos compuestas por virutas de madera para ser usados en procesos de fermentación.

D03 hace referencia a un procedimiento para detectar la degradación del contenido de ácido málico en el vino, inmovilizando células de *Issatchenkia orientalis* KMBL aisladas del orujo de vino de Corea. Las levaduras se inmovilizaron sobre una mezcla de carbón de roble oriental (*Quercus variabilis*) con alginato de sodio.

D04 comprende una revisión de diversos soportes y técnicas de inmovilización que se han propuesto para su aplicación en la elaboración de vino, sidra, o para la elaboración de la cerveza. Entre los soportes sólidos referidos están las virutas de madera.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan virutas de madera de roble recubiertas de almidón para su uso en la elaboración de bebidas alcohólicas, ni un procedimiento de elaboración de las mismas, tal y aparecen en las reivindicaciones 1-45, por lo que tales reivindicaciones cumplirían con el requisito de novedad según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Las reivindicaciones 1-45 no cumplirían con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/9/1986, puesto que, de la diferencia de que los chips de roble se encuentren recubiertos de almidón, o de que los microorganismos se fijan tras un proceso de liofilización, no se deriva ningún efecto técnico sorprendente que hiciera de la invención divulgada una aportación sobre el estado de la técnica. Así pues la invención contenida en las reivindicaciones 1-45 equivaldría a una alternativa equivalente a los chips de madera de roble actualmente disponibles en el estado de la técnica anterior.