

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 880**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

C12G 3/02 (2009.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2016** **PCT/EP2016/062705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16193465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2016** **E 16729825 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023** **EP 3303551**

54 Título: **Método para producir una bebida fermentada con una levadura comprimida congelada**

30 Prioridad:

04.06.2015 EP 15170659

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

17.04.2024

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)

Boege Allé 10-12

2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es:

BJERRE, KRISTINE;

SWIEGERS, JAN HENDRIK;

BADAKI, MANSOUR y

JENSEN, KATJA SANDER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 965 880 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir una bebida fermentada con una levadura comprimida congelada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una bebida fermentada que comprende las siguientes etapas: a) proporcionar un sustrato de fruta o vegetal para la producción de la bebida; b) añadir levadura comprimida congelada con un contenido de materia seca de entre el 35% y el 90% (p/p) al sustrato de fruta o vegetal sin ninguna etapa de rehidratación o reactivación; y c) fermentar el sustrato con la levadura comprimida para obtener la bebida fermentada.

Antecedentes de la invención

El documento US 3.615.685 se titula "Preparación de levadura seca activa" y divulga la producción de levadura de panadería incluyendo levadura seca activa (columna 1, líneas 1-2). El documento US 3.615.685 no proporciona ninguna divulgación de un método para producir una bebida fermentada. El único ejemplo de uso proporcionado es la mezcla con harina (columna 2, líneas 43-50), es decir, una matriz completamente diferente,

"Technique: Fresh Yeast", 12 Mayo 2011, XP0055227553, describe que "la congelación [de levadura fresca] es un método perfectamente aceptable" y también se refiere claramente al uso de levadura para hornear pan. Es evidente del documento que la congelación tenía algún impacto negativo sobre la supervivencia y/o rendimiento de la levadura.

Como sabe bien el experto en la materia en las técnicas del horneado, no son necesarias etapas de rehidratación o reactivación.

En la industria del vino la levadura usada es normalmente levadura seca activa (ADY por sus siglas en inglés) con un contenido de materia seca de más del 90% (p/p) lo cual necesita rehidratación y reactivación que consume tiempo a temperatura específica antes de inoculación en el vino.

La producción de ADY implica varias etapas donde la levadura primero se produce en un fermentador, se concentra, filtra y por último incluye el secado en lecho fluido de la levadura comprimida. Sin embargo, este proceso significa que el producto necesita pasar a través de varias etapas (rehidratación, reactivación y aclimatación) antes de que pueda usarse para la inoculación.

Debido al secado del producto, las células de levadura se deshidratan y por lo tanto necesitan ser rehidratadas y después reactivadas en medio adecuado con el fin de ser metabólicamente activas antes de aplicación al sustrato (por ejemplo, zumo de uva como es el caso de fabricación de vino). Esto es un proceso muy delicado para las células de levadura y requiere una cantidad significativa de tiempo y atención ya que factores tales como temperatura, sincronización y medios de activación son importantes para asegurar la supervivencia de las células. De esta forma, la rehidratación de ADY habitualmente demanda un gran número de horas hombre experto en una cava comercial durante el proceso de fabricación de vino.

Durante el proceso de secado de la producción de levadura seca activa, las membranas celulares de las células de levadura pierden su función de barrera de permeabilidad (Roger Boulton et al, 1996, página 124). Por lo tanto, para reestablecer esta función, es importante rehidratar las membranas añadiendo la levadura en agua a 40°C durante 20 minutos. Por lo tanto, el proceso de rehidratación de levadura implica típicamente una rehidratación de 20-30 minutos en agua no clorada o una mezcla de agua/zumo de uva (2:1) a una temperatura de entre 35-38°C, seguido por la adición de zumo de uva del mismo volumen (mezcla de zumo/agua 50:50) que se mantiene durante otros 20-30 minutos antes de agregarla al vino. Es importante que el zumo de uva no contenga nada de SO₂, que podría matar las células de levadura durante el proceso sensible de rehidratación (O'Kennedy, 2008). Además, la mezcla de rehidratación debe enfriarse con zumo después de 20 minutos en agua, 5°C cada vez. El fracaso de enfriar desde la temperatura de rehidratación después de 30 minutos puede producir muerte celular significativa (O'Kennedy, 2008). Además, debe tenerse cuidado para usar zumo de uva no contaminado para el protocolo de rehidratación ya que la rehidratación con zumo de uva contaminado producirá contaminación de toda la fermentación de vino inoculada usando la mezcla de rehidratación. Diferentes fabricantes proponen variaciones en este protocolo, pero la etapa crítica es que las células deshidratadas necesitan ser expuestas a agua o una mezcla de agua/zumo a temperaturas específicas, en condiciones sanitarias y durante tiempos específicos con el fin de hidratar apropiadamente, por lo mismo evitando muerte celular y consecuente inactividad. No se recomienda agregar la levadura seca activa directamente al zumo ya que la concentración alta de azúcar, SO₂, y otros compuestos en el zumo de uva no permite la rehidratación óptima de la levadura. Por esta razón, ninguno de los fabricantes de levadura de vino propone la inoculación directa de levadura seca activa a mosto de uva.

La levadura seca activa (ADY) pierde actividad cuando no se rehidrata óptimamente (Soubeyrand et al. 2006). La rehidratación incorrecta de ADY puede también llevar a atascar la fermentación alcohólica (O'Kennedy, 2008), es decir la levadura no fermenta todo el azúcar presente en el sustrato lo que produce una bebida que es demasiado dulce.

Otra forma de agregar levadura a un sustrato es usar levadura congelada que se puede añadir directamente al sustrato (documento WO2011/134952). En este método el producto es levadura en crema congelada con un contenido de materia seca por debajo del 28% (p/p) que permite la inoculación directa y supervivencia alta durante la inoculación directa. El concentrado se congela a -50°C. La desventaja de este método es que es crucial que el producto se congele a -50°C, se distribuya por cadena fría, y almacene a -50°C. Además, las condiciones de congelación severas del concentrado son dañinas para las células de levadura afectando su viabilidad. Como resultado, con frecuencia se añaden aditivos, que estabilizan las células de levadura durante y después de la congelación y/o secado, al concentrado líquido antes de la congelación.

Dziezak J D: "Yeasts and yeast derivatives: Definition characteristics and processing," Food technology, Institute of Food Technologists, Chicago, IL, US, vol. 41, no. 2, 1 febrero 1987, p. 104-121, XP008178060, divulga ADY. La figura 6 de la presente solicitud divulga a la izquierda ADY, es decir, el concepto divulgado en Dziezak, 1987, y a la derecha los resultados usando levadura comprimida congelada según la presente invención. De los resultados es evidente que no es necesaria la rehidratación para este concepto al contrario que el formato divulgado en Dziezak, 1987. En resumen, ni el documento WO2011/134952 ni Dziezak, 1987, que se refieren ambos al mismo campo que la presente invención, proporciona ninguna sugerencia o pista a la presente invención.

Hay una demanda creciente de los consumidores para los así llamados productos alimenticios "de etiqueta limpia", donde el número de aditivos agregados a los productos es limitado. La industria alimentaria se esfuerza en seguir las regulaciones específicas del país y las recomendaciones de las autoridades alimentarias y organizaciones intergubernamentales, tal como OIV (International Organisation of Vine and Wine (Organización Internacional del Vino): <http://www.oiv.int>), EBC (European Brewery Convention (Convención cervecera europea) y ASBC (American Society for Brewing Chemists (Sociedad Americana para Químicos Cerveceros)). Además, el uso de aditivos diluye el concentrado produciendo una concentración menor de células de levadura (unidades formadoras de colonia (UFC) por volumen de concentrado) en la formulación de levadura comprimida final.

Compendio de la invención

La formulación mejorada de levadura para la fermentación de bebidas por inoculación directa de una fruta o vegetal permite una viabilidad mayor de la levadura en la ausencia de aditivos agregados, tal como emulsionantes, aceite, agentes modificadores de actividad de agua y agentes agregados para mejorar la estabilidad de las células de levadura durante la congelación, secado y/o almacenamiento en frío. Además del uso en la fermentación de bebidas, se contempla que la formulación de levadura es adecuada para la fermentación de etanol por inoculación directa de un sustrato líquido rico en hidratos de carbono.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que levadura comprimida, tal como levadura de vino y de cerveza, con un contenido de materia seca de entre el 35% al 90% (p/p) muestra alta supervivencia cuando se congela a pesar del contenido de humedad relativamente alto y en la ausencia de agentes agregados para mejorar la estabilidad de las células de levadura durante la congelación, secado y/o almacenamiento en frío. Además, la levadura comprimida es ideal para inoculación directa de sustratos de fruta o vegetales produciendo cerca del 100% de capacidad de supervivencia y la levadura comprimida puede almacenarse a 4°C durante varios meses en condiciones sanitarias, por ejemplo, embalada al vacío para evitar contaminación, o almacenada durante periodos prolongados de tiempo congelada.

Descripción detallada de la invención

La figura 1 muestra las diferentes etapas para procesos posteriores para la producción de ADY e inoculación de un sustrato con ADY (superior) así como la producción de levadura comprimida (inferior). Como se puede ver en la figura 1 (inferior) tanto la producción de levadura comprimida, así como la inoculación con levadura comprimida se acorta significativamente produciendo costes reducidos de producción.

La levadura comprimida para inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal tiene un contenido de materia seca de entre el 35% y el 90% (p/p).

En una forma de realización preferida, el contenido de materia seca de la levadura comprimida está entre el 45% y el 75% (p/p).

El contenido de materia seca de la muestra se mide calentando a 105°C +/- 5°C con el fin de evaporar contenido de agua. La muestra se mide antes y después de secar y los cálculos posteriores se llevan a cabo para obtener el contenido de materia seca expresado como % (p/p):

El contenido de materia seca (W_{dm}) como un porcentaje de masa o gramos por kilogramo se calcula usando las siguientes ecuaciones:

$$W_{dm} = \frac{M_c - M_a}{M_b - M_a} \times f$$

donde:

W_{dm} es la materia seca de la muestra, en porcentajes o gramos por kilogramo;

5 m_a es la masa de la placa o crisol vacío en gramos;

m_b es la masa de la placa o crisol que contiene la muestra en gramos;

f es un factor de conversión, $f=100$ para la expresión de resultados como un porcentaje y $f=1000$ para la expresión en gramos por kilogramo.

10 Los valores deben redondearse al 0,1% más cercano (p/p) o alternativamente al 1 g/kg más cercano.

En una forma de realización preferida la levadura comprimida no comprende ningún aditivo agregado.

15 En una forma de realización preferida, la viabilidad de la levadura comprimida es al menos el 20% después de congelar calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida antes de congelar y la concentración de UFC de la levadura comprimida después de congelar. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 25%, al menos el 30%, tal como al menos el 35%, tal como al menos el 40%, tal como al menos el 45%, tal como al menos el 50%, tal como al menos el 55%, tal como al menos el 60%, al menos el 65%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 75%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 91%, tal como al menos el 92%, tal como al menos el 93%, tal como al menos el 94%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%.

25 En una forma de realización preferida la viabilidad de la levadura comprimida es al menos el 60% después de la inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida y la concentración de UFC del material inoculado. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 65%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 75%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%.

30 En otra forma de realización preferida la viabilidad de la levadura comprimida es al menos el 80% después del almacenamiento durante cinco meses a una temperatura de -20°C seguido por inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida antes de almacenamiento y la concentración de UFC del material inoculado. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%.

35 En una forma de realización preferida, la levadura comprimida se congela a una temperatura por debajo de 0°C. Preferentemente, la levadura comprimida se congela a una temperatura significativamente menor de 0°C, tal como a -5°C, tal como a -20°C, tal como a -50°C.

40 En una forma de realización preferida, la levadura comprimida congelada se congela en ausencia de cualquier aditivo agregado al concentrado de levadura líquida con el fin de estabilizar las células de levadura durante y después de la congelación.

45 En una forma de realización preferida, la viabilidad de la levadura comprimida congelada es al menos el 20% después de congelar calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonias) de la levadura comprimida antes de congelar y la concentración de UFC de la levadura comprimida después de la congelación. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 25%, al menos el 30%, tal como al menos el 35%, tal como al menos el 40%, tal como al menos el 45%, tal como al menos el 50%, tal como al menos el 55%, tal como al menos el 60%, al menos el 65%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 75%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 91%, tal como al menos el 92%, tal como al menos el 93%, tal como al menos el 94%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como al menos el 98%, tal como al menos el 99%.

55 La determinación de la viabilidad de levadura se puede llevar a cabo por cualquier método adecuado conocido para el experto en la materia. En una forma de realización preferida la determinación de cuentas celulares en UFC/g y UFC/ml se realiza como se indica por OIV en el capítulo II del Código Enológico Internacional, edición 2013.

60 En una forma de realización preferida la viabilidad de la levadura comprimida congelada es al menos el 60% después de la inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida y la concentración de UFC del material inoculado. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 65%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 75%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%.

En otra forma de realización preferida la viabilidad de la levadura comprimida congelada es al menos el 80% después del almacenamiento durante cinco meses a una temperatura de -20°C seguido por inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida antes de congelar y almacenar y la concentración de UFC del material inoculado. Preferentemente, la viabilidad de la levadura es al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%.

La levadura comprimida está presente preferentemente en una forma concentrada. En una forma de realización preferida la levadura comprimida contiene al menos 10^9 UFC/g de levadura, tal como al menos 5×10^9 UFC/g de levadura, tal como al menos 10^{10} UFC/g de levadura, tal como al menos 5×10^{10} UFC/g de levadura, tal como al menos 10^{11} UFC/g de levadura, tal como al menos 5×10^{11} UFC/g de levadura, tal como al menos 10^{12} UFC/g de levadura.

En una forma de realización preferida la levadura comprimida se selecciona de los géneros del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamomyces* y *Debaryomyces*.

En una forma de realización preferida la levadura comprimida es una levadura de *Saccharomyces*, preferentemente una levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otra forma de realización preferida la levadura es una levadura de vino o una levadura de cerveza, preferentemente la levadura de vino o levadura de cerveza es una levadura seleccionada del grupo que consiste de levadura de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia* y *Metschnikowia*.

La presente invención se refiere un método para producir una bebida fermentada que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un sustrato de fruta o vegetal para producción de la bebida;
- b) añadir levadura comprimida congelada con un contenido de materia de entre el 35% y el 90% (p/p) al sustrato de fruta o vegetal sin ninguna etapa de rehidratación o reactivación; y
- c) fermentar el sustrato con la levadura comprimida para obtener la bebida fermentada.

La fermentación se puede llevar a cabo en condiciones aerobias o anaerobias o se puede llevar a cabo en una secuencia de condiciones aerobias y anaerobias.

En una forma de realización preferida la bebida fermentada se selecciona del grupo que consiste en vino, cerveza, sidra, sake y refrescos. Preferentemente, la bebida fermentada es vino.

En otra forma de realización preferida la fruta o vegetal para la producción de la bebida es un zumo de fruta.

Preferentemente, el zumo de fruta es zumo de uva y la bebida fermentada es vino.

Se contempla que la levadura comprimida invención será igualmente adecuada para uso en un método similar de inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal acuoso para la fermentación de etanol en condiciones anaerobias. Los sustratos de fruta o vegetales adecuados son sustratos ricos en hidratos que carbono que incluyen, pero no se limitan a soluciones acuosas a base de jarabe de maíz, azúcar de caña/melaza.

Definiciones

El término "levadura en crema" en el presente documento se refiere a levadura líquida con un contenido de materia seca por debajo del 28% (p/p) producida convencionalmente por propagación de levadura en un fermentador seguido por concentración por centrifugación.

El término "levadura comprimida" se refiere en el presente documento a una levadura con un contenido de materia seca de entre el 35% y el 90% (p/p) producida convencionalmente por propagación de levadura en un fermentador seguido por concentración, filtración, extrusión y opcionalmente secado parcial en un secador, tal como un secador de lecho fluido. Por tanto, el término "levadura comprimida parcialmente seca" se refiere en el presente documento a una levadura con un contenido de materia seca de entre el 45% al 90% (p/p) producida por propagación de levadura en un fermentador seguido por concentración, filtración, extrusión y secado parcial en un secador, tal como un secador de lecho fluido.

El término "levadura seca activa" o "ADY" se refiere en el presente documento a levadura con un contenido de materia seca de más de 90% (p/p) producida convencionalmente por propagación de levadura en un fermentador seguido por concentración, filtración, extrusión y secado en un secador de lecho fluido.

El término "vegetal" se refiere en el presente documento a cualquier planta. Preferentemente, el término "vegetal" en el presente documento se refiere a plantas comestibles o partes de plantas comestibles.

El término “fruta” se refiere en el presente documento a la parte comestible de una planta desarrollada de una flor. Fruta puede incluir cualquier tejido accesorio de la parte comestible, como la piel, cáscara o vaina.

- 5 El término “potenciador de levadura” se refiere en el presente documento a nutrientes complementarios, tal como vitaminas, nitrógeno, fosfato o minerales, agregados antes de o durante la propagación de la levadura.

10 El término “aditivos” se refiere en el presente documento a agentes de calidad alimentaria que se añaden al concentrado de levadura en cualquier punto de tiempo durante la producción de la formulación de levadura después de la propagación de la levadura, por ejemplo, para ayudar en la extrusión y corte del concentrado de levadura, por ejemplo, emulsionantes, que incluyen, pero no se limitan a, glicerol, glucosa, sacarosa y trehalosa y aceite, para mejorar la estabilidad de las células de levadura durante la congelación y/o el almacenamiento en frío, para cambiar el punto de fusión de la formulación de levadura congelada, por ejemplo, agentes de modificación de actividad de agua, etc.

15 El término “añadido” cuando se refiere a aditivos en el presente documento se refiere a los aditivos que se introducen en el concentrado de levadura durante producción de la levadura comprimida en una cantidad eficaz para dar el efecto deseado.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa el protocolo para preparar ADY y para la inoculación de ADY (superior) así como el protocolo para preparar levadura comprimida para la inoculación directa para la preparación de bebidas fermentadas (inferior).

- 25 La figura 2 muestra la supervivencia de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* ya sea después de mantener el concentrado en 4°C o congelar el concentrado a -20°C, a -50°C en el congelador o en nitrógeno líquido y almacenar la levadura durante 1 mes a la temperatura indicada.

30 La figura 3 muestra la supervivencia de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* ya sea después de mantener el concentrado a 4°C o congelar el concentrado a -20°C, a -50°C en el congelador o en nitrógeno líquido y almacenar la levadura durante 1 mes a la temperatura indicada seguido por inoculación directa en mosto de uva.

35 La figura 4 muestra supervivencia total de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* que incluye tanto la supervivencia después del tratamiento (Figura 3) como la supervivencia en inoculación directa (Figura 2).

La figura 5 muestra la supervivencia de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* formulada como levadura comprimida o como ADY antes del tratamiento y después del almacenamiento durante diferentes periodos de tiempo a las temperaturas indicadas.

40 La figura 6 muestra una comparación entre la supervivencia de células de levadura de la levadura ADY de *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura comprimida congelada de *Saccharomyces cerevisiae* después de la inoculación directa e inoculación estándar por levadura ADY (“reactivación” de levadura), respectivamente.

45 Ejemplos

Ejemplo 1

50 Durante la producción de una cepa convencional de *Saccharomyces cerevisiae*, se tomaron muestras en tres etapas diferentes durante la producción; 1) como levadura líquida (crema) después de la centrifugación; 2) como levadura comprimida (levadura fresca) con un contenido de materia seca del 40% después de la extrusión; y 3) como levadura seca activa (ADY) con un contenido de materia seca del 92% después del secado por lecho fluido:

55 Estas muestras se analizaron según el recuento celular, supervivencia después de mantener el concentrado a 4°C o congelar el concentrado a -20°C, a -50°C en el congelador o en nitrógeno líquido y almacenar durante 1 mes a la temperatura indicada (Figura 2), supervivencia después de ya sea mantener el concentrado a 4°C o congelar el concentrado a -20°C, a -50°C en el congelador o en nitrógeno líquido y almacenar durante un mes a la temperatura indicada seguido por inoculación directa en mosto de uva (Figura 3), y supervivencia total en inoculación directa en mosto de uva después de ya sea mantener el concentrado a 4°C o congelar el concentrado a -20°C, a -50°C en el congelador o en nitrógeno líquido y almacenar durante 1 mes a la temperatura indicada (Figura 4).

Supervivencia del tratamiento y a lo largo del tiempo

65 Se congeló la levadura líquida con 200 ml de muestra en un congelador de -20°C como no tratada o con trehalosa al 20%. Se midieron las cuentas celulares antes y después otra vez de un mes después de congelar y se siguió a lo largo del tiempo.

La levadura comprimida se congeló en diferentes tamaños y a diferentes temperaturas con el fin de verificar el efecto de la velocidad de congelación en la supervivencia de células de levadura. Los tamaños de las muestras fueron botellas de 200 ml (grandes) y tubos falcon de 50 ml (pequeñas). Las temperaturas de los congeladores fueron -20°C y -50°C, respectivamente.

También se congeló la levadura comprimida en nitrógeno líquido como pellas (1-2 ml de largo (pequeñas) y como grumos de 5 g (grande)).

Para la determinación de supervivencia de la levadura (en porcentajes), se midieron cuentas celulares antes de congelar y otra vez un mes después de la congelación (Figura 2) y se siguió a lo largo del tiempo (Figura 5).

Supervivencia en inoculación directa

Todas las muestras también se usaron para la inoculación directa después de 1 mes de almacenamiento con el fin de ver la supervivencia cuando se expusieron las células de levadura a agua y alta presión osmótica en el zumo de uva. Se añadieron 1,0 g de muestras a 200 ml de zumo Riesling (Tabla 1). Las muestras se disolvieron por agitación suave y después de aproximadamente 10-15 minutos, se realizó la dilución en serie y para la determinación de supervivencia de levadura (en porcentajes), se calculó UFC/g después de la inoculación directa (Figura 3).

Tabla 1: Parámetros de zumo de uva usados para experimentos de inoculación directa después de un mes

Zumo de uva	Azúcar (g/l)	Ácido málico (g/l)	TSO ₂ (mg/l)
Riesling (Alemania)	180	6,6	0

Comparación de supervivencia por inoculación directa y "reactivación" de la levadura

Se comparó la supervivencia de la inoculación mediante el uso de dos métodos diferentes. En ambos métodos el volumen de inoculación fue 0,2 g/l. Para la inoculación directa, se añadió la muestra directamente al zumo Chardonnay (Tabla 2). Para la inoculación estándar, la muestra primero se rehidrató 1:10 en agua no clorada durante aproximadamente media hora. Se añadió después zumo de uva sin azufre al agua en la proporción (1:3) y la suspensión entonces se dejó activar durante aproximadamente otros 20 minutos. La suspensión activada final se añadió después al zumo para alcanzar un nivel de inoculación final de 0,2 g/l. Todas las inoculaciones se realizaron por duplicado.

Se calcularon las UFC/g de los productos antes de la inoculación y después de la inoculación y después se calculó la supervivencia como porcentajes (Figura 6).

Tabla 2: Parámetros del zumo de uva usados para experimentos de inoculación directa después de 8 meses

Zumo de uva	Azúcar (g/l)	Ácido málico (g/l)	TSO ₂ (mg/l)
Chardonnay (Alemania)	180	6,7	0

Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Para la determinación de cuentas celulares en UFC/g y UFC/ml de muestras tomadas de ya sea zumo de uva inoculado o levadura disuelta en agua de peptona se realizaron por vertido en placa en medio YGC (preparado como se indica por OIV en el apéndice VI del Código Enológico internacional, Edición 2013). Se añadió 1 ml de la muestra de la serie de dilución (agua de peptona) a la placa y encima de eso el agar YGC líquido (45°C) se vació sobre la muestra y se mezcló. Después del endurecimiento, las placas se incubaron a 30°C durante 2-3 días. Las determinaciones de las UFC se realizaron en todos los casos en triplicados.

Conclusión:

Los resultados muestran que la supervivencia de la levadura en inoculación directa (Figura 2) es muy alta para levadura especialmente comprimida almacenada a 4°C y levadura comprimida congelada a -50°C o en nitrógeno líquido.

La supervivencia de la levadura después de diferentes tratamientos y almacenamiento de las muestras durante 1 mes a esta temperatura muestra altas variaciones (Figura 3). Sorprendentemente, la levadura comprimida con contenido alto de agua muestra supervivencia cercana al 100% cuando se congela a -20°C y -50°C. Cuando se congela la levadura comprimida en nitrógeno líquido la supervivencia (>60%) es también sorprendentemente alta. La levadura líquida muestra muy baja supervivencia durante la congelación y la ADY también pierde un alto porcentaje de UFC cuando se almacena durante 1 mes a 4°C.

La supervivencia total muestra que la levadura comprimida, incluso cuando se congela, muestra la supervivencia más alta (Figura 4). La supervivencia de la levadura comprimida congelada a -50°C y usada en inoculación directa es cercana al 100%.

5 La estabilidad de los diferentes formatos se mide durante 5 meses y los resultados se muestran en la (Figura 5). Las cuentas celulares de las muestras de levadura comprimida son muy estables incluso aunque la temperatura no ha sido constante ya que las muestras se han sacado varias veces.

10 La levadura comprimida almacenada a 4°C solamente se siguió durante 4 meses ya que la muestra no estaba embalada en una forma sanitaria apropiada para mantenerse durante un periodo más largo de tiempo.

15 Los productos de levadura seca activa (ADY) muestran supervivencia más baja cuando se inocularon directamente comparados a cuando se inocularon después de rehidratación y reactivación (Figura 6). Cuando se usa para inoculación directa la ADY muestra una supervivencia promedio del 53% y cuando se inocula después de rehidratación y reactivación la supervivencia es del 81% en promedio. Para la levadura comprimida congelada la supervivencia en inoculación directa es el 93% y supervivencia cuando se inocula según el procedimiento “estándar” es el 86% que es también superior al promedio de los productos ADY.

Referencias

20 Roger Boulton, Vernon Singleton, Linda Bisson y Ralph Kunkee. 1996. Principles and Practices of Winemaking, pág. 124.

25 Karien O'Kenney. (2008). How to avoid stuck fermentations, The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Noviembre, Número 538, 103-105.

Virginie Soubeyrand, Anne Julien y Jean-Marie Sablayrolles (2006) Rehydration Protocols for Active Dry Wine Yeasts and the Search for Early Indicators of Yeast Activity American Journal Of Enology and Viticulture. 57(4)474-480.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una bebida fermentada que comprende las etapas:
 - 5 a) proporcionar un sustrato de fruta o vegetal para la producción de la bebida;
 - b) inocular directamente el sustrato con una levadura comprimida, en donde la levadura comprimida es una levadura comprimida congelada con un contenido de materia seca de entre el 35% y el 90% (p/p); y
 - c) fermentar el sustrato con la levadura comprimida para obtener la bebida fermentada.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la levadura comprimida es una levadura comprimida congelada, en donde el contenido en materia seca es entre el 45% y el 75% (p/p).
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la levadura comprimida no comprende ningún aditivo añadido.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la levadura comprimida se congela en ausencia de cualquier aditivo añadido adicionado al concentrado de levadura líquida con el fin de estabilizar las células de levadura durante y después de la congelación.
- 20 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viabilidad de la levadura es al menos el 20% después de la congelación calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida antes de la congelación y la concentración de UFC de la levadura comprimida después de la congelación.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viabilidad de la levadura es al menos el 60% después de la inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida y la concentración de UFC del material inoculado.
- 30 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viabilidad de la levadura es al menos el 80% después del almacenamiento durante cinco meses a una temperatura de -20°C seguido por inoculación directa de un sustrato de fruta o vegetal calculado en base a la concentración de UFC (unidades formadoras de colonia) de la levadura comprimida antes de la congelación y la concentración de UFC del material inoculado.
- 35 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la levadura se selecciona de los géneros del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Schizosaccharomyces*, *Wickerhamomyces* y *Debaryomyces*.
- 40 9. El método según la reivindicación 8, en donde la levadura es una levadura *Saccharomyces*.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bebida fermentada es seleccionada del grupo que consiste en vino, cerveza, sidra, sake y refrescos.
- 45 11. El método según la reivindicación 10, en donde el sustrato es un zumo de fruta.
12. El método según la reivindicación 11, en donde el zumo de fruta es zumo de uva y la bebida fermentada es vino.

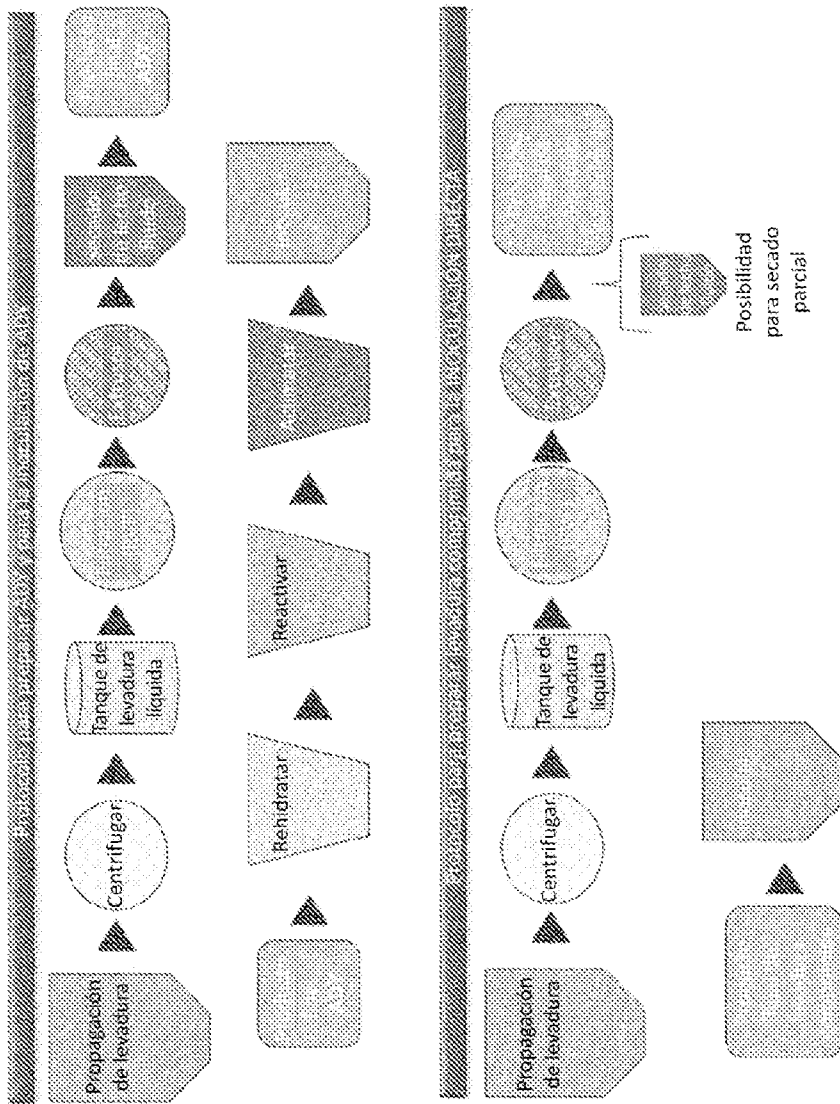


Figura 1

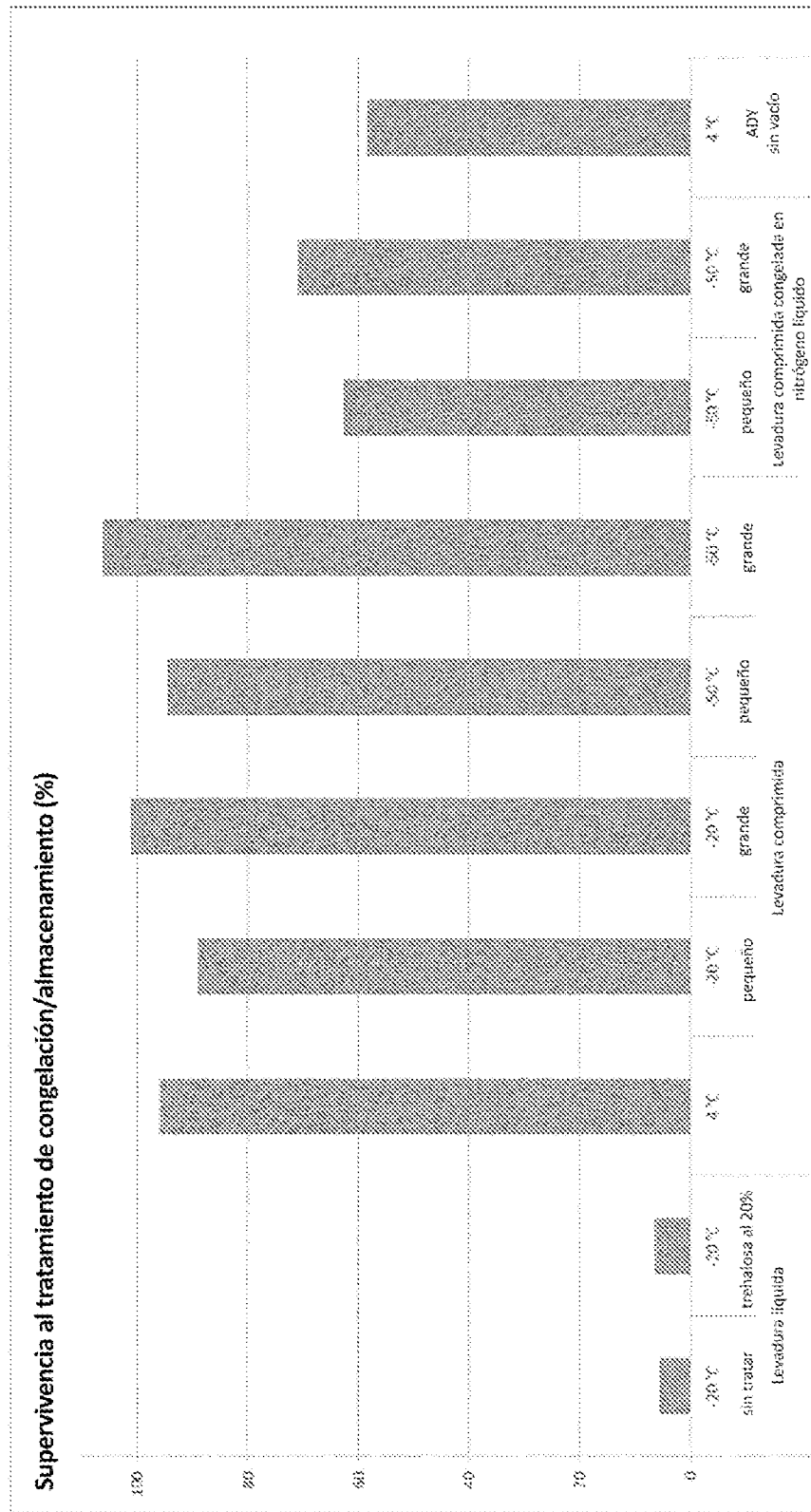


Figura 2

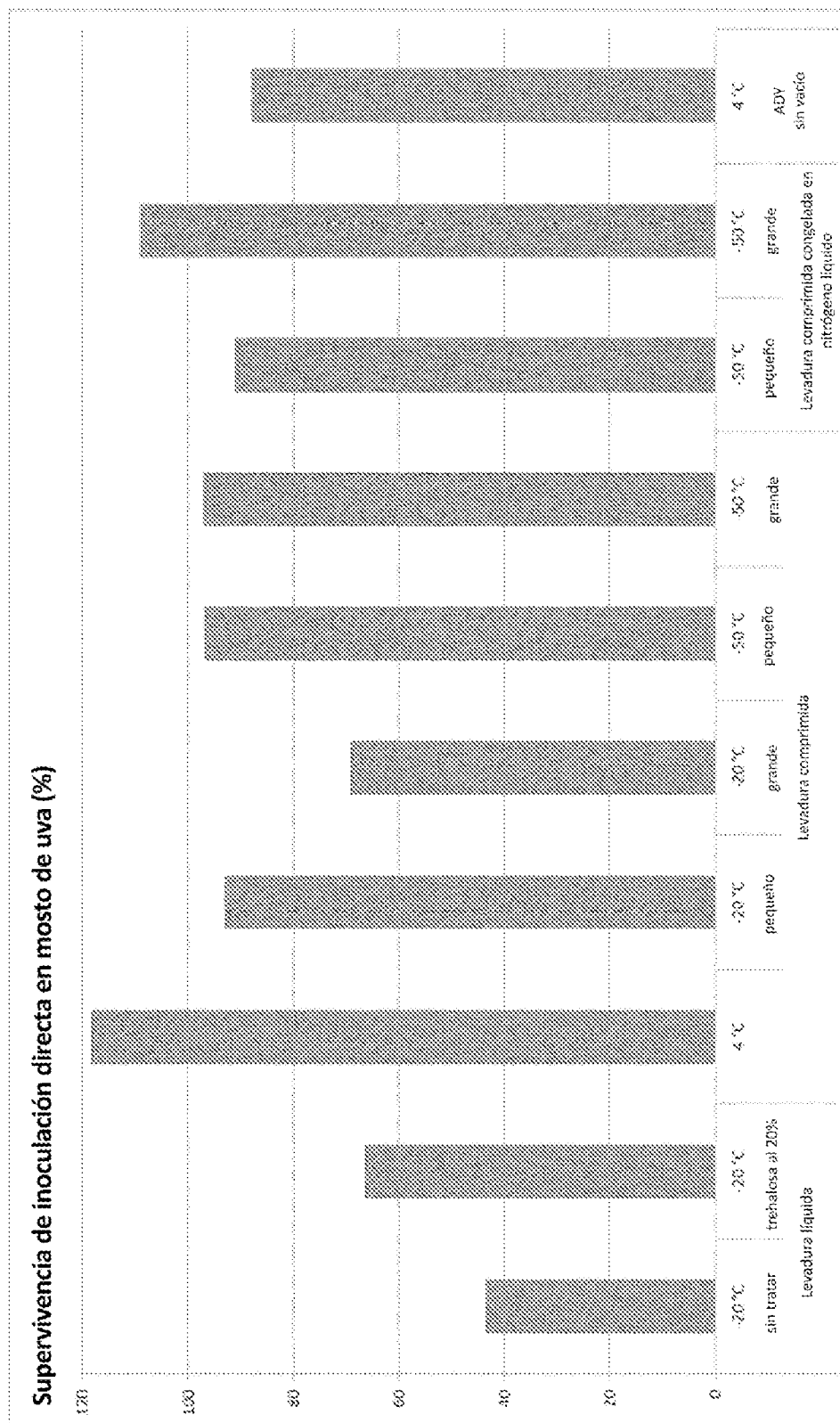


Figura 3

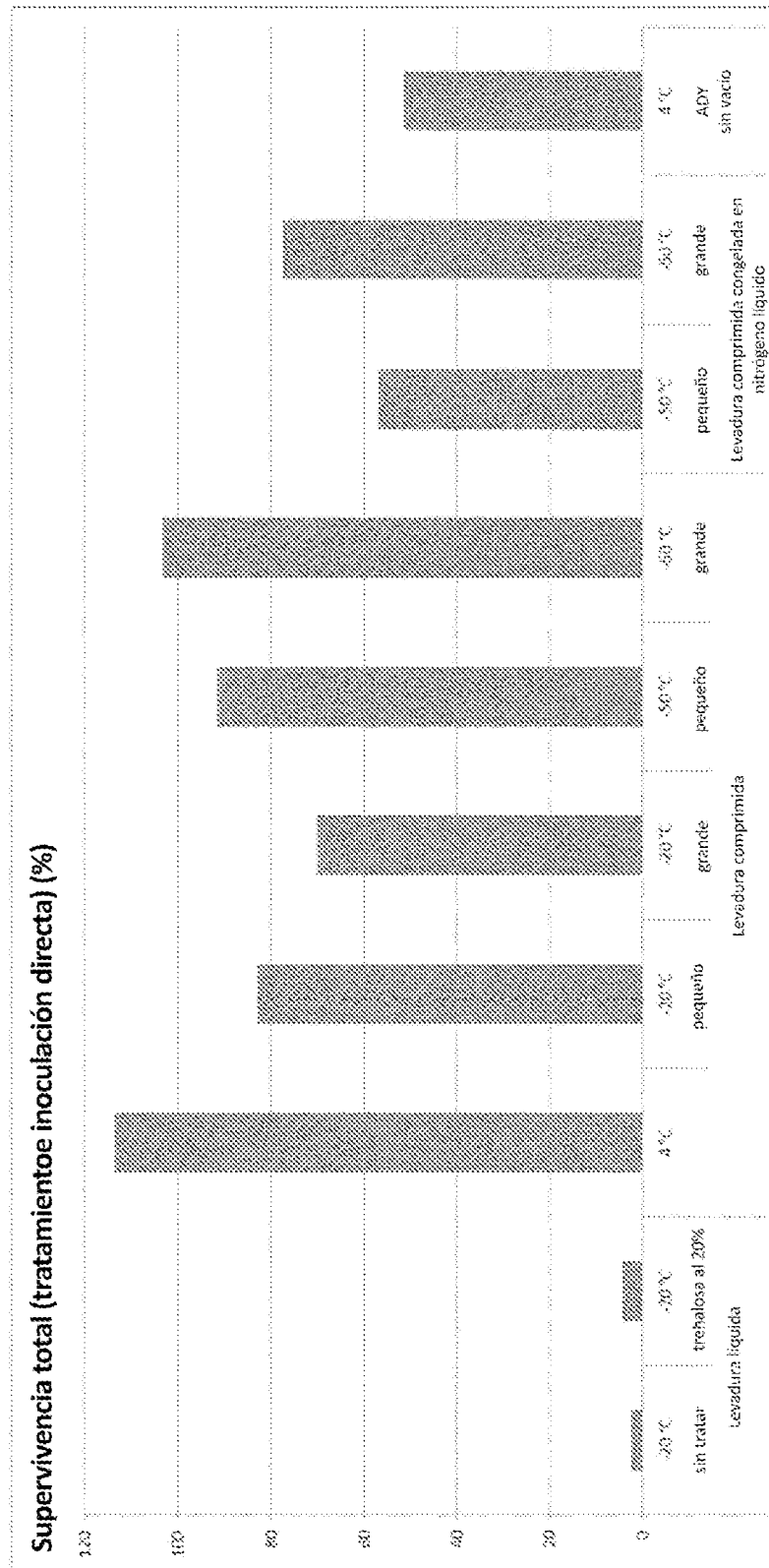


Figura 4

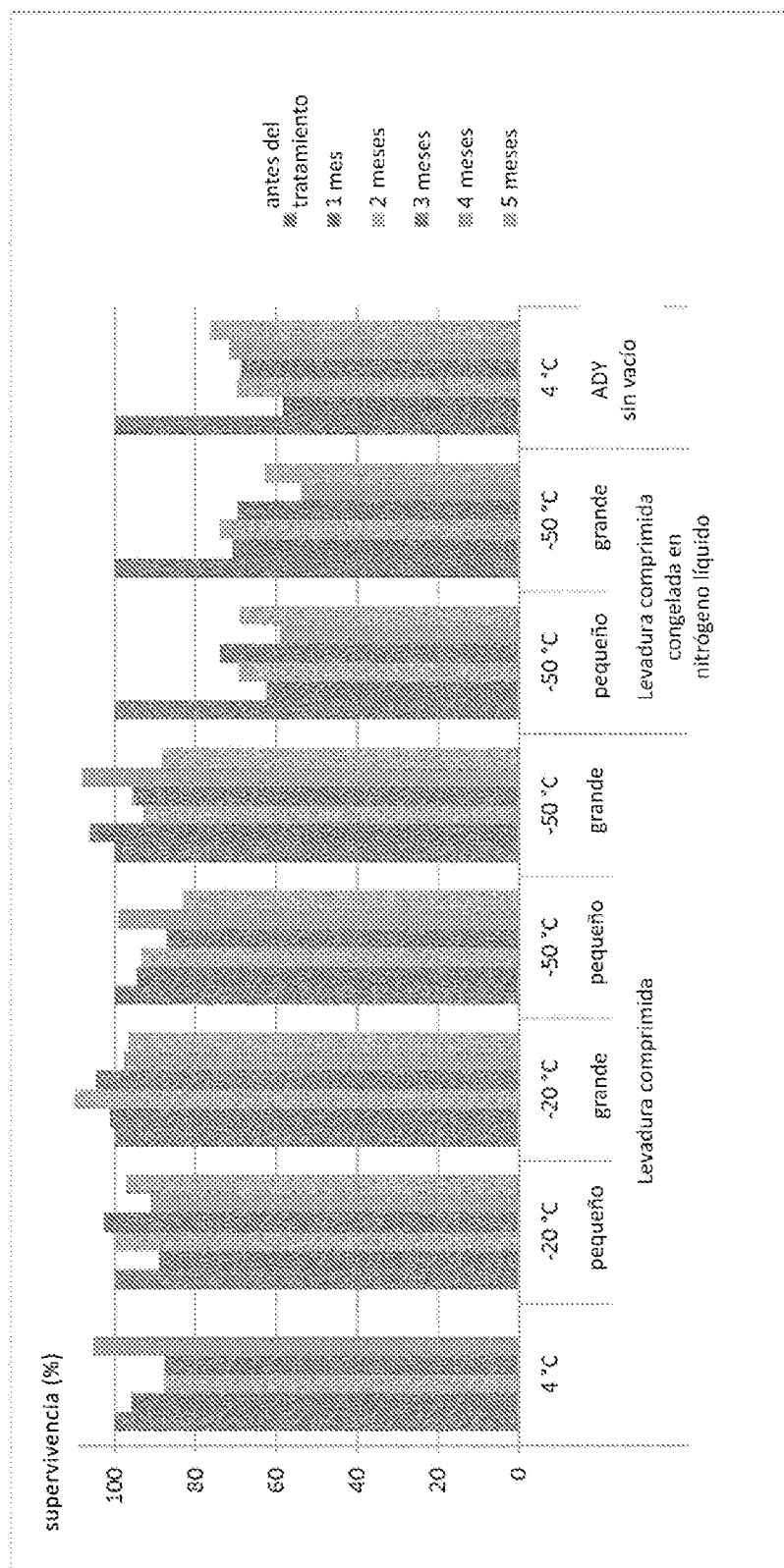


Figura 5

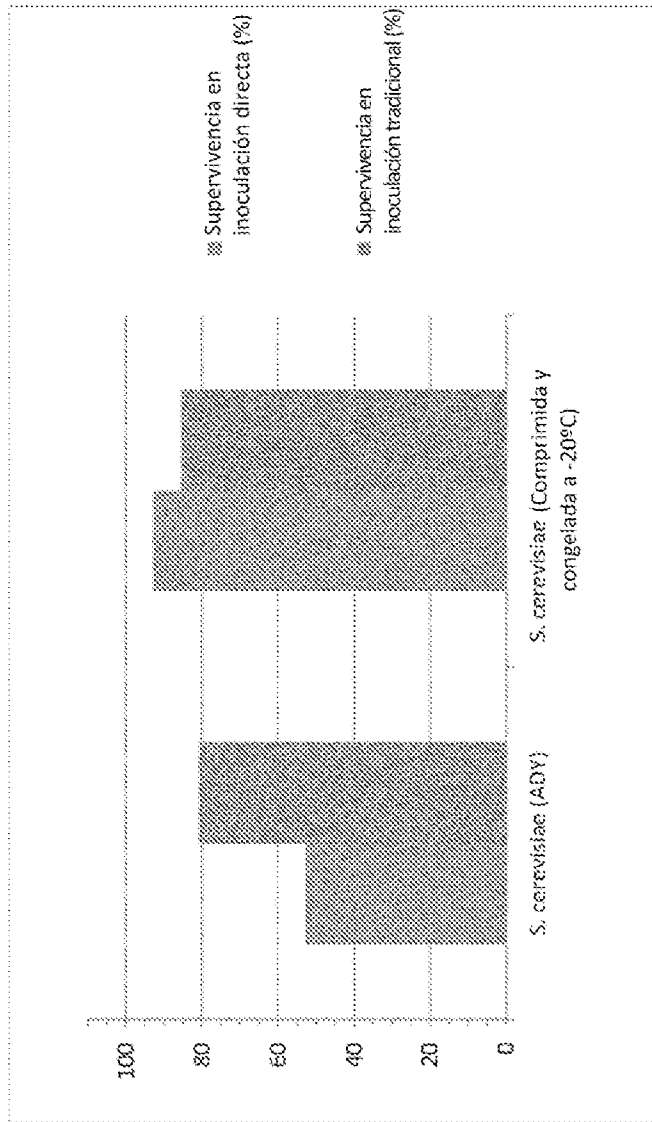


Figura 6