

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de diciembre de 2012 (27.12.2012) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/175774 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12G 1/073 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070452

(22) Fecha de presentación internacional:
20 de junio de 2012 (20.06.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201131039 20 de junio de 2011 (20.06.2011) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA [ES/ES]; Avda. Medina
Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GARCÍA MAURICIO, Juan Carlos** [ES/ES]; Dpto. de Microbiología, Ed. Severo Ochoa, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid s/n, E-14014 - Córdoba (ES). **PUIG PUJOL, Anna** [ES/ES]; Estació de Viticultura i Enologia, Plaça Àgora, 2. Poligon Industrial Domenys II, E-08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona) (ES). **GARCÍA MARTÍNEZ, M^a Teresa** [ES/ES]; Dpto. de Microbiología, Ed. Severo Ochoa, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid s/n, E-14014 - Córdoba (ES). **PEINADO AMORES, Rafael Andrés** [ES/ES]; Dpto. de Química Agrícola y Edafología, Ed. Marie Curie, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid s/n, E-14014 - Córdoba (ES). **LOPÉZ DE LERMA EXTREMERA, M^a Nieves**

[ES/ES]; Dpto. de Química Agrícola y Edafología, Ed. Marie Curie, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid s/n, E-14014 - Córdoba (ES). **MORENO VIGARA, Juan José** [ES/ES]; Dpto. de Química Agrícola y Edafología, Ed. Marie Curie, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid s/n, E-14014 - Córdoba (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF BIOCAPSULES OF YEAST AS FERMENTATION AGENTS IN THE SECOND ALCOHOL FERMENTATION IN THE BOTTLE AND APPLICATION THEREOF IN PREPARING SPARKLING WINE AND SPARKLING ALCOHOLIC BEVERAGES

(54) Título : UTILIZACIÓN DE BIOCÁPSULAS DE LEVADURA COMO AGENTES FERMENTATIVOS EN LA SEGUNDA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN BOTELLA Y SU APLICACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE VINO ESPUMOSO Y BEBIDAS ALCOHÓLICAS ESPUMOSAS

(57) Abstract: The invention relates to the use of immobilizing yeasts in biocapsules and to the application thereof in producing sparkling wine prepared from the second alcohol fermentation in the bottle performed by said yeasts. The invention includes producing biocapsules in a suitable concentration and the application of same as biocatalyzers in a particular industrial fermentation process.

(57) Resumen: Utilización de levaduras inmovilizadas en biocápsulas y su aplicación en la producción de vino espumoso elaborado a partir de la segunda fermentación alcohólica en botella realizada por estas levaduras. La invención comprende la obtención de las biocápsulas en una concentración apropiada y su aplicación como biocatalizador en un proceso fermentativo industrial particular.



WO 2012/175774 A1

Description

Utilización de biocápsulas de levadura como agentes fermentativos en la segunda fermentación alcohólica en botella y su aplicación para la elaboración de vino espumoso y bebidas alcohólicas espumosas

[0001] SECTOR TÉCNICO

[0002] La presente invención se encuadra dentro del marco de la Microbiología Industrial, proporcionando una optimización técnica y cualitativa de un proceso de elaboración ya existente.

[0003] De forma más concreta, el objeto de la invención consiste en provocar la segunda fermentación en botella para la elaboración de una bebida alcohólica espumosa, en particular para la elaboración de vino espumoso, por el método tradicional mediante un sistema de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces bayanus*) co-inmovilizadas de manera natural con un hongo de la especie *Penicillium chrysogenum*. Las pequeñas esferas así formadas, biocápsulas, presentan una serie de ventajas técnicas respecto a los sistemas de inmovilización existentes y utilizados para un fin similar.

[0004] ESTADO DE LA TÉCNICA

[0005] El vino espumoso se elabora a partir de una segunda fermentación alcohólica de un vino base al cual se le añade azúcar y una cepa de levadura de la especie *S. cerevisiae* o *S. bayanus* seleccionada para este fin. La fermentación del vino espumoso elaborado por el método tradicional o 'champenoise' se realiza en el interior de botellas tipo 'champagne' disponibles comercialmente. Cuando la segunda fermentación se completa y después de un período de crianza que establece el organismo regulador de cada país para este tipo de bebidas alcohólicas, las levaduras han de extraerse completamente del medio donde han fermentado para evitar la turbidez del producto antes de su salida al mercado. Este mismo procedimiento también se puede utilizar para obtener otras bebidas alcohólicas espumosas fermentadas en botellas.

[0006] La eliminación de la levadura cuando la crianza ha terminado es

complicada. Las botellas se colocan en posición inclinada en pupitres y se remueven repetitivamente durante un periodo sustancial de tiempo hasta que se consigue que los sedimentos de las levaduras se depositen en el cuello de la botella. Posteriormente en la etapa de degüelle, el cuello se congela, la botella se abre y los sedimentos de las levaduras congelados salen expulsados por la presión adquirida en el interior del recipiente (6 - 7 atmósferas). El removido es una operación larga que necesita una mano de obra importante para cada botella ya que tiene que ser manipulada durante muchos días (alrededor de 24 días).

- [0007] Aunque se han diseñado sistemas automatizados de removido como los gyropalettesTM, esta operación conlleva la ocupación de un espacio físico importante en la bodega: de un 10-15 % en el caso de la clarificación en pupitres y de un 3-5 % en el caso del uso de un sistema automatizado.
- [0008] Según la patente FR2432045 los procesos mencionados anteriormente pueden simplificarse. En FR2432045 las células de levaduras se encuentran inmovilizadas en un gel de alginato cálcico y se concentran en el cuello de la botella rápidamente sin necesidad de agitación. Según la patente ES8609469 (equivalente a EP0173915) las células de levadura para la producción de vino espumoso se inmovilizan en esferas de alginato y posteriormente se recubren con una capa de alginato cálcico con la finalidad de asegurarse de que no se liberen células desde el inmovilizado. Finalmente, según la patente US5070019 se describe un método de inmovilización de levaduras en esferas de alginato cálcico que mejora el sistema propuesto en EP0173915, donde se asegura que no existe liberación de calcio al medio que pueda provocar precipitaciones cristalinas.
- [0009] Los sistemas de inmovilización de levaduras descritos anteriormente se han obtenido mediante soportes artificiales. La unión no natural a estos soportes puede afectar a la actividad catalítica de la levadura. La patente ES2204316 describe el procedimiento de obtención de un nuevo procedimiento de inmovilización para levaduras basado en una co-inmovilización natural y espontánea entre una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y un hongo filamentoso de la especie

Penicillium chrysogenum sin la necesidad de soportes externos o compuestos químicos de unión, utilizando condiciones apropiadas para favorecer la unión simbiótica entre los dos microorganismos.

[0010] La presente invención proporciona un procedimiento para realizar la segunda fermentación alcohólica en un recipiente adecuado para contener un líquido a presión, preferentemente una botella, utilizando este nuevo sistema, biocápsulas de levadura co-inmovilizadas de forma natural y espontánea con un hongo filamentoso de la especie *Penicillium chrysogenum*, para obtener una bebida alcohólica espumosa, en particular vino espumoso, incluidos los cavas y champagnes. Este procedimiento permite, una vez completada la fermentación, retirar la levadura utilizada de forma fácil y eficaz. Así mismo, el procedimiento evita la utilización de soportes externos que puedan afectar la actividad catalítica de la levadura y/o ceder sustancias ajenas al producto que se desea elaborar.

[0011] **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

[0012] La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una bebida alcohólica espumosa, caracterizado porque dicho procedimiento comprende una etapa de fermentación en un recipiente adecuado para contener un líquido a presión utilizando biocápsulas que comprenden una levadura inmovilizada en un hongo filamentoso.

[0013] La novedad de la presente invención reside en aplicar para la elaboración de una bebida alcohólica espumosa un sistema de inmovilización celular que utiliza como sustrato de inmovilización un organismo vivo (el citado hongo filamentoso) en lugar de un soporte físico-químico artificial que puede ceder sustancias ajenas al producto que se quiere elaborar.

[0014] De acuerdo con un aspecto preferente, la presente invención tiene lugar en un recipiente adecuado para contener un líquido a presión que permite la eliminación de las biocápsulas de levadura y hongo filamentoso sedimentadas. Preferentemente, el recipiente adecuado utilizado en el procedimiento de la presente invención es una botella, más preferentemente una botella tipo 'champagne'.

[0015] En particular, el procedimiento de la presente invención permite suprimir

la etapa de removido y aclareo de las botellas en la fabricación de bebidas espumosas, ya que la levadura de fermentación es capaz de sedimentar en el cuello de la botella por gravedad antes del proceso de degüelle. La sedimentación sin removido antes del degüelle permite un ahorro considerable de mano de obra y tiempo, puesto que la sedimentación de levaduras inmovilizadas en biocápsulas es rápida.

- [0016] De acuerdo con un aspecto preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un vino espumoso, caracterizado porque dicho procedimiento comprende una etapa de fermentación en un recipiente adecuado para contener un líquido a presión utilizando biocápsulas que comprenden una levadura inmovilizada en un hongo filamentoso. Preferentemente, el recipiente adecuado utilizado en el procedimiento de la presente invención es una botella, más preferentemente una botella tipo 'champagne'.
- [0017] De acuerdo con otro aspecto preferente adicional, la levadura comprendida en las biocápsulas utilizadas en el procedimiento de la presente invención puede ser una levadura del género *Saccharomyces*, preferentemente la levadura comprendida en las biocápsulas se elige entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*.
- [0018] De acuerdo con otro aspecto preferente adicional, el hongo filamentoso comprendido en las biocápsulas utilizadas en el procedimiento de la presente invención puede ser un hongo del género *Penicillium*, preferentemente el hongo filamentoso comprendido en las biocápsulas es *Penicillium chrysogenum*.
- [0019] El procedimiento de obtención de biocápsulas de levadura se ha descrito en la patente ES2204316. Sin embargo, la aplicación de las biocápsulas de levadura y hongo filamentoso al procedimiento de la presente invención hace necesario controlar el número de levaduras que se van a inmovilizar con el fin de asegurar un inóculo suficiente para cada recipiente de bebida alcohólica espumosa, preferentemente vino espumoso, que se va a producir; es decir, asegurar una conversión completa del azúcar en CO₂ adquiriendo el recipiente en su interior una presión de 6-7 atmósferas.

- [0020] Debido a que el medio de cultivo que se usa para la co-inmovilización espontánea entre el hongo filamentoso y la levadura no es utilizable por la levadura, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se prefiere que el hongo co-inmovilice un mínimo de 1×10^6 células de levadura por ml de bebida alcohólica base en el caso de obtención de vino espumoso para que se formen las biocápsulas necesarias. En el caso particular de utilizar botellas de 750 ml, este número mínimo de células de levadura corresponde a $7,5 \times 10^8$ células por botella.
- [0021] De acuerdo con otro aspecto preferente de la invención, el hongo co-inmoviliza una cantidad máxima de 2×10^6 células de levadura por ml de vino base para que se formen las biocápsulas necesarias. En el caso particular de utilizar botellas de 750 ml, este número mínimo de células de levadura corresponde a $1,5 \times 10^9$ células por botella.
- [0022] Las biocápsulas, una vez formadas, pueden recogerse en un tamiz de 0,2 mm y lavarse abundantemente con agua preferiblemente fría (entre 6°C y 12°C). El agua empleada para el lavado se recomienda parcialmente desmineralizada o desionizada y estéril. Las biocápsulas así resultantes se pueden guardar sumergidas en agua destilada y estéril a una temperatura de 4°C durante 4 semanas o incluso más sin perder su actividad o pueden ser inmediatamente usadas para la elaboración de vino espumoso.
- [0023] Para proceder a la elaboración del vino espumoso, los materiales necesarios se encuentran descritos en una amplia bibliografía (ver ejemplo en: *Tratado de enología*. J. Hidalgo Togores. Tomo II, pp.: 945-994. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (2003).
- [0024] El procedimiento según la presente invención puede realizar el inóculo de las biocápsulas en cada recipiente, preferentemente en cada botella, que contiene el vino y azúcar a fermentar mediante un embudo metálico.
- [0025] Las levaduras inmovilizadas en biocápsulas pueden ser de distinto tamaño según el tiempo y sobre todo la velocidad de agitación orbital a la cual se haya realizado su formación.
- [0026] De acuerdo con otro aspecto preferente, se consiguen biocápsulas de tamaño superior a 0,55 cm de diámetro a una velocidad de agitación de

100 rpm, preferentemente manteniéndolas en agitación durante un tiempo mínimo de 7 días y un tiempo máximo de 14 días. Estas biocápsulas con tamaño mayor pueden presentar fisuras en la superficie debido a un mayor efecto de la presión en el interior en las botellas debido a su mayor superficie de exposición, dando lugar a la liberación de parte de las células de levadura en el medio. Para solucionar este problema los inventores dejaron las biocápsulas más tiempo en el medio de formación, preferentemente 14 días. De esta forma se consigue un mayor desarrollo de las hifas del hongo, repercutiendo en una mayor consistencia y resistencia de la pared de las biocápsulas.

- [0027] De acuerdo con otro aspecto preferente, se consiguen biocápsulas de aproximadamente entre 0,45 y 0,55 cm de diámetro aplicando una velocidad de 150 rpm durante un intervalo de tiempo entre 7 y 14 días.
- [0028] De acuerdo con otro aspecto preferente, se consiguen biocápsulas de tamaño inferior a 0,45 cm de diámetro con una velocidad de agitación orbital de 200 rpm durante un intervalo de tiempo entre 7 y 14 días.
- [0029] Aumentar el tiempo de formación de las biocápsulas entre 10 y 14 días antes de su inóculo en botella mejora la compactación del entramado de hifas del hongo filamentoso con lo que las esferas de biocápsulas adquirirán un aspecto liso, evitando la liberación de hifas al medio, es decir al producto que se desea.
- [0030] El número de biocápsulas inoculadas en cada recipiente depende del diámetro que hayan adquirido. Así, de acuerdo con otro aspecto preferente de la presente invención, el número de biocápsulas por botella de 750 ml según la descripción del proceso de la presente invención corresponde a: (a) 5 biocápsulas/750 ml si presentan un diámetro superior a 0,55 cm; (b) 20 ± 2 biocápsulas/750 ml si el diámetro es 0,45-0,55 cm y (c) de 180 a 200 biocápsulas/750 ml si las esferas presentan un diámetro inferior a 0,45 cm.
- [0031] De acuerdo con otro aspecto preferente de la presente invención, las biocápsulas utilizadas en el procedimiento descrito en la presente solicitud de patente tienen un diámetro con una dispersión máxima de 10 mm. De esta forma todas las biocápsulas del recipiente, y preferentemente del

mismo lote, sedimenten a la misma velocidad en la operación de 'puesta en punta' o clarificación.

- [0032] Las biocápsulas a lo largo del tiempo resisten el incremento de presión que se produce en el transcurso de la segunda fermentación en el interior del recipiente adecuado para contener líquidos a presión para la toma de espuma. Tanto las biocápsulas con un diámetro igual o inferior a 0,55 cm, como aquellas con un tamaño superior a 0,55 cm que permanecen 14 días en el medio de formación, no sufren ningún tipo de deformación ni rotura. Tampoco existe una liberación de células de levadura al medio ya que por el efecto de la presión quedan confinadas dentro de su soporte de inmovilización.
- [0033] Si la fermentación tuviera lugar en depósitos abiertos, sin presión, las biocápsulas liberarían las células de levadura al exterior y se enturbiaría la matriz. Por ese motivo, el procedimiento de la presente invención tiene lugar en un sistema cerrado como, por ejemplo, son las botellas.
- [0034] El proceso de la invención presenta la ventaja de que ninguna sustancia ajena perteneciente al soporte de inmovilización es liberada al medio, o sea, a la bebida alcohólica espumosa producida. Al contrario ocurre con el uso de levaduras inmovilizadas en perlas de alginato cálcico donde se ha detectado una liberación de calcio al medio, como se demuestra en los estudios comparativos detallados en los ejemplos de esta invención.
- [0035] Una vez terminada la fermentación y justo antes de la fase de degüelle, las botellas se colocan en posición vertical boca abajo. La invención aquí descrita ofrece la ventaja de una rápida sedimentación por gravedad de las levaduras inmovilizadas en biocápsulas: menos de dos minutos, ahorrándose la fase de removido. Ello permite un ahorro económico considerable, tanto en tiempo como en mano de obra.
- [0036] El proceso de acuerdo con esta invención produce un inmovilizado de levadura de una manera simple, que puede utilizarse para la fermentación de bebidas alcohólicas espumosas, en particular vino espumoso, durante la cual no se producen enturbiamientos del medio debidos a precipitaciones de cristales de tartrato o malato de calcio o liberaciones de las células de levaduras de su emplazamiento de inmovilización. De esta

manera, se asegura que la bebida espumosa resultante presente un valor de turbidez inferior a los 0,7 NTU, equivalente a un vino espumoso transparente, listo para las etapas finales de degüelle y etiquetaje, antes de su salida al mercado.

- [0037] Las biocápsulas de mayor tamaño sedimentan más rápidamente por tener una mayor densidad. Sin embargo, presentan una menor superficie/volumen de intercambio de nutrientes, lo que se traduce en una cinética fermentativa menor respecto a las biocápsulas de menor tamaño. En cambio, las biocápsulas de menor tamaño presentan una mayor superficie/volumen de contacto y, en consecuencia, una mayor cinética fermentativa.
- [0038] De acuerdo con otro modo de realización preferente, las biocápsulas utilizadas en el procedimiento de la presente invención tienen un diámetro inferior a 10 mm, preferentemente entre 2 y 3 mm.
- [0039] De acuerdo con otro aspecto preferente, el procedimiento descrito en esta solicitud de patente se caracteriza porque la etapa de fermentación comprende la adición de biocápsulas de levadura y hongo filamentoso a un medio de fermentación que comprende al menos vino y azúcar.
- [0040] De acuerdo con otro aspecto preferente, el producto obtenido por el procedimiento de la presente invención se adscribe a una denominación de origen, las características del vino base, azúcar añadido y características del producto final, deberán cumplir con lo establecido en dicho reglamento. En los ejemplos mostrados en la presente invención se han cumplido las disposiciones del reglamento de la Denominación de Origen Cava y de su Consejo Regulador (Orden 14.11.91 (BOE 20.11.91) y modificado mediante órdenes de 09.01.92 (BOE 16.02.02), 08.07.92 (BOE 21.07.92), 06.05.93 (BOE 19.05.93), 15.09.95 (BOE 23.09.95), 06.02.98 (BOE 12.02.98) y 23.02.07 (BOE 27.02.07).
- [0041] De acuerdo con otro aspecto preferente, la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención puede tener lugar en un intervalo de temperatura de entre 10 °C y 16 °C.
- [0042] De acuerdo con otra realización preferente adicional, la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención

puede tener lugar en un periodo de 2 meses, aunque el tiempo de crianza del producto elaborado antes de la fase de degüelle es, por reglamento, de un mínimo de 9 meses.

- [0043] De acuerdo con otra realización preferente adicional, la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención puede comprender sacarosa como fuente de azúcar, preferentemente en una concentración entre 20 y 25 g/l.
- [0044] De acuerdo con otra realización preferente adicional, la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención puede comprender un vino base con un grado alcohólico entre 9,5 % vol. y 11,5 % vol.
- [0045] De acuerdo con otra realización preferente adicional, la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención da lugar a un producto con un grado alcohólico adquirido entre 10,8 % vol. y 12,8 % vol.
- [0046] De acuerdo con otra realización preferente adicional, el medio de reacción de la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención se caracteriza por un pH entre 2,8 y 3,3.
- [0047] De acuerdo con otra realización preferente adicional, el medio de reacción de la etapa de fermentación comprendida en el procedimiento de la presente invención se caracteriza por una acidez total mínima en ácido tartárico de 5,5 g/l.
- [0048] **Breve descripción de las figuras**
- [0049] Figura 1: Evolución de la velocidad de producción de CO₂ por las células de levadura inmovilizadas en perlas de alginato cálcico, biocápsulas y células libres (testigo) obtenidas en el ejemplo 1.
- [0050] Figura 2: Evolución de la velocidad de producción de CO₂ por las células de levadura inmovilizadas en perlas de alginato cálcico, biocápsulas y células libres (testigo) obtenidas en el ejemplo 2.
- [0051] Figura 3: Evolución de la velocidad de producción de CO₂ por las células de levadura inmovilizadas en perlas de alginato cálcico, biocápsulas y células libres (testigo) obtenidas en el ejemplo 3.
- [0052] Figura 4: Evolución de la velocidad de producción de CO₂ por las células

de levadura inmovilizadas en biocápsulas de diferente tamaño obtenidas en el ejemplo 4.

[0053] Figura 5: Evolución de la velocidad de producción de CO₂ por las células de levadura inmovilizadas en perlas de alginato cálcico, biocápsulas y células libres (testigo) a dos temperaturas de fermentación obtenidas en el ejemplo 5.

[0054] EJEMPLOS

[0055] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse, en absoluto, como limitantes del alcance de la invención.

[0056] Ejemplo 1: Elaboración de vino espumoso 'cava': lote 1.

[0057] La levadura utilizada fue la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* QA23 comercializada por Lallemend BIO.

[0058] El vino base utilizado presentó las siguientes características: vino de la Denominación de Origen Cava, mezcla de las variedades Macabeo (28,3%), Xarel·lo (29,2%), Parellada (25,8%) y Chardonnay (16,7%); azúcar residual: 0,3 g/L; grado alcohólico: 11 % vol; pH: 3,06; acidez total: 5,8 g/L (expresados en g/L de ácido tartárico).

[0059] Al vino base se le adicionó 22 g/l de azúcar.

[0060] Para la segunda fermentación, se utilizaron tres formatos de levadura:

[0061]

1. (1) QA23 en forma de células libres.

[0062]

1. (2) QA23 inmovilizadas en alginato cálcico, preparado comercial con el nombre de Proelif. Se adicionaron 1,2 g/botella.

[0063]

1. (3) QA23 inmovilizadas en forma de biocápsulas, según lo explicado en la presente invención. El diámetro de las esferas utilizadas fue de entre 2 y 4 mm.

[0064] La concentración de los inóculos de cada uno de los formatos se calculó para que en cada una de las botellas, al inicio de la segunda fermentación, existiera una concentración de 1×10^6 células/ml.

[0065] Las botellas se dispusieron en posición horizontal y la segunda

fermentación tuvo lugar en una cava a una temperatura de 16°C. Se siguió la evolución de la presión de CO₂ a lo largo del tiempo, cuyos resultados se muestran en la figura 1 adjunta.

- [0066] Al comparar el efecto de la inmovilización sobre la cinética de fermentación, equivalente a la velocidad de producción de CO₂ por las células de levaduras inmovilizadas y libres, se pudo comprobar que en el caso de las levaduras libres e inmovilizadas en biocápsulas el comportamiento fue paralelo, observando un incremento de la presión a partir del día 6. Sin embargo, las levaduras inmovilizadas en perlas de alginato cálcico fueron más lentas en fermentar: se observó un incremento de la presión a partir del día 29. El retraso observado puede deberse a un período de adaptación más largo al medio de fermentación o a fenómenos de difusión. La duración del proceso en el inóculo con células libres y en los inmovilizados en biocápsulas fue de unos 37 días, mientras que en alginato cálcico tardó 53 días.
- [0067] La velocidad de sedimentación se comprobó una vez terminada la fermentación y transcurrido un periodo de crianza en botella de un mínimo de 9 meses, reglamentarios en la Denominación de Origen Cava. Las levaduras incluidas en esferas de alginato tuvieron una sedimentación muy rápida: entre 5 y 15 segundos, según la botella. Las incluidas en biocápsulas fueron un poco más lentas pero lo hicieron en menos de 2 minutos en comparación a la sedimentación de varios días de las botellas elaboradas con células libres. Así pues, según el ejemplo descrito sobre esta invención se demuestra que el uso de levaduras inmovilizadas en biocápsulas permite prescindir de la etapa de removido o aclareo, pudiendo efectuar la etapa de degüelle inmediatamente.
- [0068] Los datos analíticos más representativos de los cavas una vez acabada la segunda fermentación, transcurridos 11 meses desde su inicio y una vez realizado el degüelle son los que se expresan en la Tabla 1.
- [0069] Tabla 1. Análisis de los cavas del ejemplo 1
- [0070]

CEP	FOR	Azúc	Grad	pH	Acide	Acide	Ca
A	MAT	ar	o		z total	z	(mg/L

	O	(g/L)	alcoh ólico (% vol)		(g/L)	volátil (g/L)	)
QA23	Libre	0,4	12,4	3,00	5,8	0,15	50
	s						
QA23	Algin	1,5	12,25	3,05	5,8	0,19	60
	ato						
QA23	Biocá	0,5	12,35	3,02	5,4	0,15	50
	psula						
	s						

[0071] El análisis enológico del producto resultante de las tres variantes de inóculo de levaduras mostró que el vino espumoso elaborado con levaduras inmovilizadas en perlas de alginato presentaba un contenido de calcio y azúcar superior a los otros dos sistemas de inóculo. Ello sugiere que los inmovilizados en biocápsulas, además de no liberar ningún tipo de sustancia al medio presentaban una la capacidad fermentativa superior respecto al otro formato de inmovilización testado y similar al de las células libres.

[0072] **Ejemplo 2: Elaboración de vino espumoso 'cava': lote 2.**

[0073] Se reprodujo el ejemplo 1, pero en este caso se usó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* P29 (CECT 11770), aislada en la Denominación de Origen Penedés.

[0074] Los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los obtenidos con la cepa QA23.

[0075] La figura 2 muestra la evolución de la presión a lo largo del tiempo. De nuevo, los formatos de inóculo de las levaduras en células libres e inmovilizadas en biocápsulas presentaron cinéticas más o menos paralelas. El arranque de fermentación con inmovilizados en alginato cálcico fue más lento. La duración total de la fermentación, detectada a partir del momento de la estabilización de la presión, fue de 27 días para las biocápsulas, 35 para las células libres y 63 días para los cavas elaborados con levaduras incluidas en perlas de alginato cálcico.

[0076] La velocidad de sedimentación se repitió respecto al ejemplo 1.

[0077] Los parámetros enológicos más representativos de los cavas resultantes aparecen en la Tabla 2.

[0078] Tabla 2. Análisis de los cavas del ejemplo 2

[0079]

CEP	FOR	Azúc	Grad	pH	Acide	Acide	Ca
A	MAT	ar	o		z total	z	(mg/L
	O	(g/L)	alcoh		(g/L)	volátil	)
			ólico			(g/L)	
			(%				
			vol)				
P29	Libre	0,6	12,4	3,03	5,4	0,17	50
	s						
P29	Algin	2	12,3	3,05	5,6	0,18	61
	ato						
P29	Biocá	0,3	12,45	3,01	5,6	0,17	49
	psula						
	s						

[0080] De nuevo, los niveles del ión calcio y de azúcar presentaban la misma tendencia que en el ejemplo 1: mayor concentración de calcio y azúcar en los cavas elaborados a partir de levaduras inmovilizadas en alginato cálcico.

[0081] Ejemplo 3: *Elaboración de vino espumoso 'cava': lote 3.*

[0082] Se estudió el comportamiento de la misma cepa de levadura del ejemplo 2 pero partiendo de un vino base de distintas características: vino de la Denominación de Origen Cava, mezcla de las variedades Macabeo (30%), Xarel·lo (33%) y Parellada (37%); azúcar residual: 0,3 g/L; grado alcohólico: 10,85 % vol; pH: 2,96; acidez total: 6,0 g/L (expresados en g/L de ácido tartárico). La principal diferencia respecto al vino base de los ejemplos 1 y 2 era el pH por debajo de 3,00 que presentaba este vino, factor limitante que podía dificultar el funcionamiento de las levaduras para realizar la segunda fermentación.

[0083] En la figura 3 se puede observar la evolución de la presión en los tres

casos de ensayo. En el vino base de estas características, los dos formatos de inóculo con levaduras inmovilizadas presentaron un periodo de adaptación al medio superior (entre 11 y 14 días) al que presentaron las células libres (7 días). La segunda fermentación terminó a los 43 días para el caso de las levaduras libres y se retrasó hasta los 52 días para el caso de las levaduras inmovilizadas en alginato y biocápsulas.

[0084] La velocidad de sedimentación se repitió respecto al ejemplo 1 y 2.

[0085] Los parámetros enológicos más representativos de los cavas resultantes aparecen en la Tabla 3.

[0086] Tabla 3. Análisis de los cavas del ejemplo 3

[0087]

CEP	FOR	Azúc	Grad	pH	Acide	Acide	Ca
A	MAT	ar	o		z total	z	(mg/L
	O	(g/L)	alcoh		(g/L)	volátil	)
			ólico			(g/L)	
			(%				
			vol)				
P29	Libre	0,9	12,2	2,96	5,5	0,16	43
	s						
P29	Algin	2,9	12,1	2,97	5,8	0,18	56
	ato						
P29	Biocá	2	12,15	2,95	5,4	0,18	43
	psula						
	s						

[0088] Siguiendo la misma tendencia de los otros dos ejemplos, el cava elaborado con perlas de alginato cálcico presentó concentraciones de calcio superiores. Respecto al azúcar fermentable, en los dos formatos de inmovilización se detectaron concentraciones más elevadas que en las botellas con células libres. Igual que en los ejemplos anteriores, el formato alginato fue el que contenía mayor cantidad.

[0089] Ejemplo 4: *Elaboración de vino espumoso 'cava' con biocápsulas de distinto tamaño.*

[0090] Se emplearon biocápsulas obtenidas a partir de *S. cerevisiae* cepa P29 y

Penicillium chrysogenum. La velocidad de agitación orbital, según el procedimiento de obtención de biocápsulas, se varió para conseguir esferas de distinto tamaño.

[0091]

- esferas entre 0,6 y 1 cm de diámetro a una velocidad de agitación de 100 rpm
- esferas entre 0,55 y 0,45 cm de diámetro aplicando una velocidad de 150 rpm y
- entre 0,2 y 0,3 cm de diámetro con una velocidad de agitación orbital de 200 rpm.

[0092] El vino base de partida para la elaboración de cava fue el mismo que el del ejemplo 1 y 2, al que se añadió 22 g/L de azúcar.

[0093] El número de biocápsulas inoculadas en cada botella dependió de su diámetro: (a) 5 biocápsulas/750 ml si presentaban un diámetro superior a 0,5 cm; (b) 20 ± 2 biocápsulas/750 ml si el diámetro es aproximadamente de 0,5 cm, y (c) de 180 a 200 biocápsulas/750 ml si las esferas presentan un diámetro inferior a 0,5 cm.

[0094] Con este número de biocápsulas se aseguraba un inóculo de 1×10^6 células/ml de vino base.

[0095] La segunda fermentación tuvo lugar a una temperatura estable de 14°C.

[0096] En la figura 4 se muestra la velocidad de fermentación de algunas botellas representativas de estos lotes. En ella se puede comprobar que las que tuvieron mejor cinética de fermentación fueron las correspondientes a los inóculos con biocápsulas de menos de 0,5 cm de diámetro, en segundo lugar la botella con esferas de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y por último la que se inoculó con biocápsulas de mayor tamaño. Este comportamiento puede explicarse por la relación superficie/volumen y el número de esferas en cada botella: las botellas que contenían más biocápsulas aunque de más pequeño tamaño presentaban una mayor superficie de contacto (y por tanto, de intercambio de nutrientes) con el medio a fermentar.

[0097] Así pues, la presente invención hace referencia a distintas velocidades de toma de espuma, o de segunda fermentación, dependiendo del tamaño

aplicado de inmovilizados de levaduras en biocápsulas.

- [0098] Las pruebas de sedimentación mostraron que las biocápsulas con un diámetro superior a 0,5 cm sedimentaban en el cuello de la botella a los 8 segundos, las botellas que contenían biocápsulas de 0,5 cm de diámetro sedimentaban totalmente entre 15 y 20 segundos y las de menos de 0,5 cm lo hacían entre 40 y 45 segundos.
- [0099] **Ejemplo 5: *Elaboración de vino espumoso 'cava' con biocápsulas a dos temperaturas de fermentación.***
- [0100] El procedimiento de esta experiencia presenta los mismos condicionantes que los del ejemplo 2: cepa *S. cerevisiae* P29, vino base descrito en el ejemplo 1 y tres formatos de inoculación de levaduras descritos también en el ejemplo 1.
- [0101] La variable a experimentar fue la influencia que podía tener una temperatura de segunda fermentación considerada límite: 10°C, frente a una temperatura estándar: 14°C.
- [0102] En la figura 5 se representan las cinéticas fermentativas de los 6 casos estudiados. En ambas temperaturas, las levaduras inmovilizadas en biocápsulas y las levaduras libres tuvieron un comportamiento paralelo, evolucionando a la misma velocidad. Los inóculos de levadura en formato de perlas de alginato cálcico presentaron un retraso tanto al inicio como al final de la fermentación respecto a los otros dos casos tanto a 10°C como a 14°C.
- [0103] Por lo tanto, la presente invención muestra que las levaduras vínicas inmovilizadas en biocápsulas pueden fermentar perfectamente a temperaturas límites, comportándose de igual manera que la inoculación tradicional de levaduras en forma libre.

1. Procedimiento de obtención de una bebida alcohólica espumosa, caracterizado porque dicho procedimiento comprende una etapa de fermentación en un recipiente adecuado para contener un líquido a presión utilizando biocápsulas que comprenden una levadura inmovilizada en un hongo filamentoso.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el recipiente adecuado para contener un líquido a presión es una botella.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la bebida alcohólica espumosa es un vino espumoso.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la levadura se elige entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el hongo filamentoso es *Penicillium chrysogenum*.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque se adiciona una cantidad de biocápsulas adecuada para que número mínimo de células de levadura sea 1×10^6 células/ml de vino base.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las biocápsulas tienen un diámetro con una dispersión máxima de 10 mm.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las biopcapsulas tienen un diámetro inferior a 10 mm.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la etapa de fermentación comprende la adición de biocápsulas de levadura y hongo filamentoso a un medio de fermentación que comprende al menos vino y azúcar y se realiza dentro de una botella herméticamente cerrada.

1/3

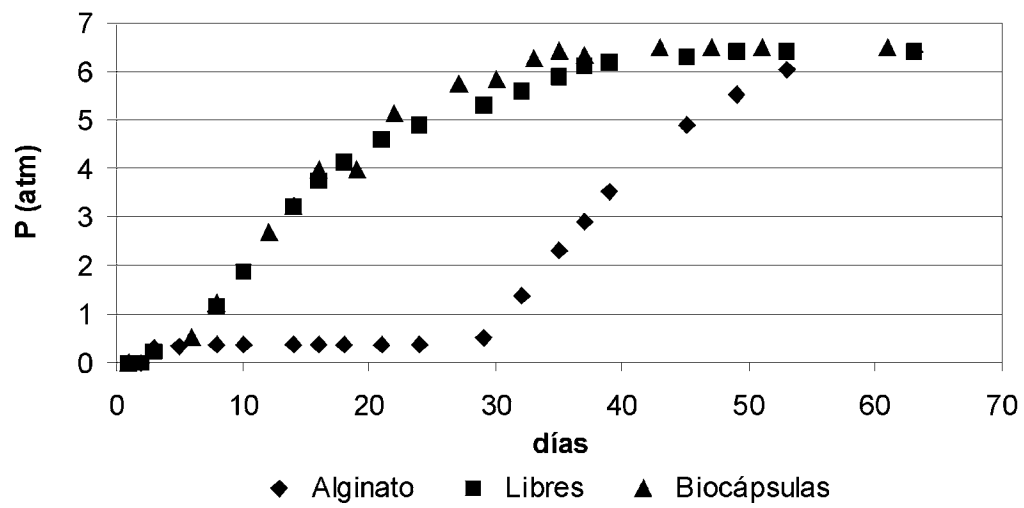


Fig. 1

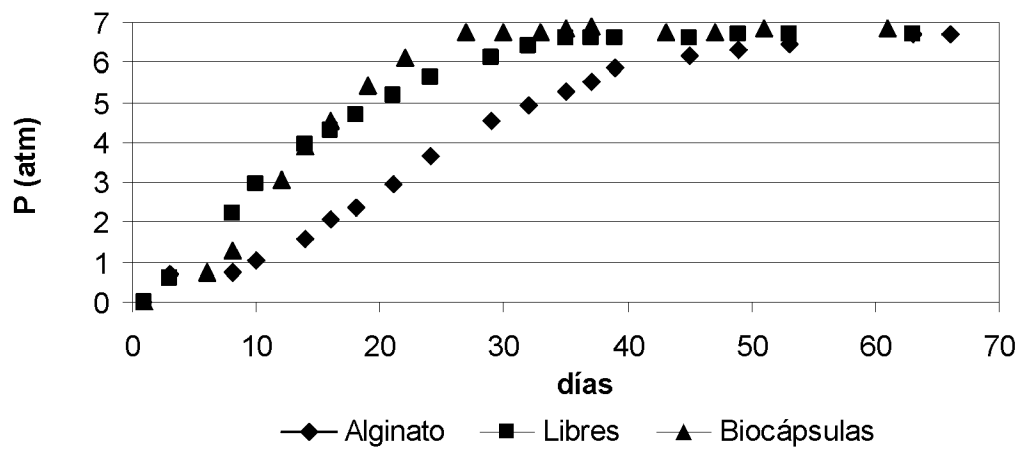


Fig. 2

2/3

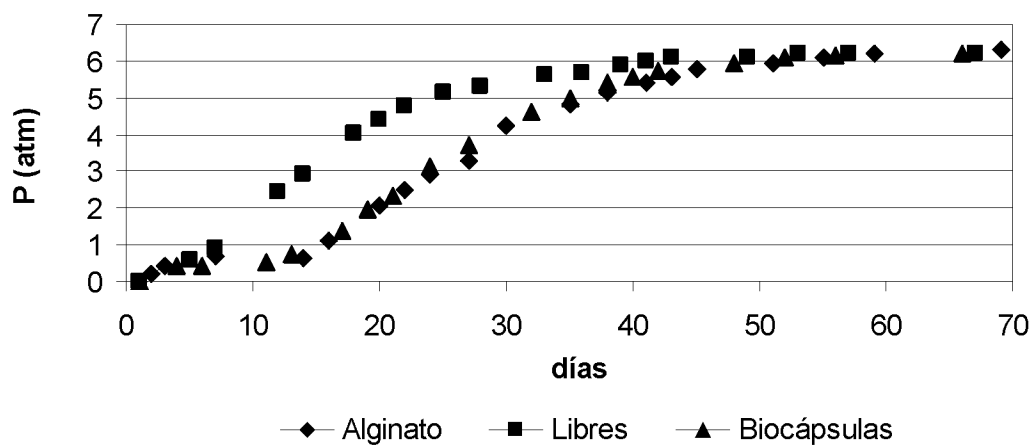


Fig. 3

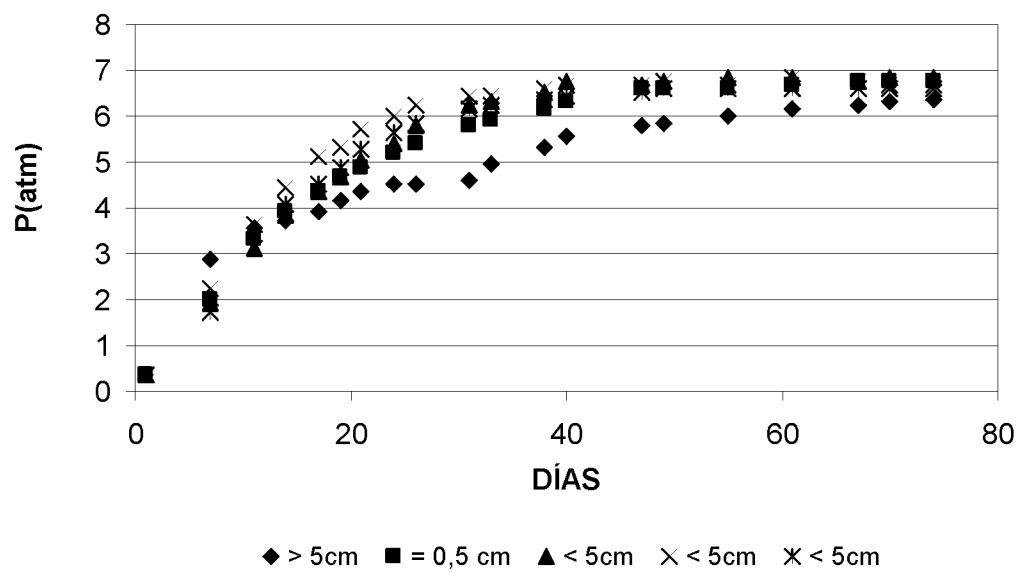


Fig. 4

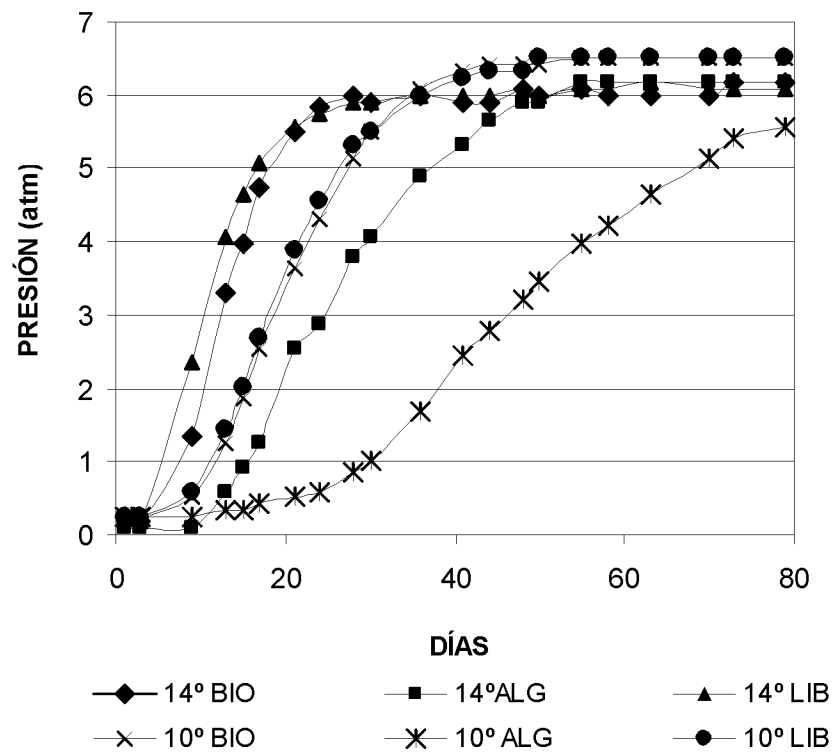


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12G1/073 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HIDALGO TOGOIRES, J. Elaboración of vinos espumosos con levaduras inmovilizadas. Agricultura, 1986, vol. 651, pages 721-724.	1-9
Y	PUIG, A. et al. Levaduras inmovilizadas: Evaluación of su potencial enológico. Trabajos presentados con motivo del VII Foro Mundial del vino. 12-14 of May 2010. Logroño, The Rioja España. 2010. ISBN 978-84-8125-336-8, page 86.	1-9
A	US 5070019 A (HILL) 03.12.1991, column 1-column 2, line 33.	2-4, 7-9
A	PEINADO, R. et al. Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications. Enzyme and microbial technology, 2006, vol. 40, pages 79-84.	1,4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01/10/2012

Date of mailing of the international search report
(10/10/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Polo Diez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495524

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070452

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2204316 A1 (UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA) 16.04.2004, the whole document.	1,4,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070452

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US5070019 A	03.12.1991	CA2012409 A AU5139990 A DE3908997 A EP0388588 AB EP19900101144 PT93491 A ZA9002026 A HU207123 B HUT56131 A NZ232951 A AU618455 B DK0388588 T AT102990 T	18.09.1990 20.09.1990 20.09.1990 26.09.1990 20.01.1990 07.11.1990 28.12.1990 01.03.1993 29.07.1991 25.09.1991 19.12.1991 05.04.1994 15.04.1994
----- ES2204316 AB -----	----- 16.04.2004 -----	----- WO2004029240 A AU2003268959 A -----	----- 08.04.2004 19.04.2004 -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/070452

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12G1/073** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12G

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, FSTA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	HIDALGO TOGORES, J. Elaboración de vinos espumosos con levaduras inmovilizadas. Agricultura, 1986, vol. 651, páginas 721-724.	1-9
Y	PUIG, A. et al. Levaduras inmovilizadas: Evaluación de su potencial enológico. Trabajos presentados con motivo del VII Foro Mundial del vino. 12-14 de Mayo 2010. Logroño, La Rioja España. 2010. ISBN 978-84-8125-336-8, página 86.	1-9
A	US 5070019 A (HILL) 03.12.1991, columna 1-columna 2, línea 33.	2-4, 7-9
A	PEINADO, R. et al. Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications. Enzyme and microbial technology, 2006, vol. 40, páginas 79-84.	1,4,5

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
01/10/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de octubre de 2012 (10/10/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Polo Diez
Nº de teléfono 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070452

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ES 2204316 A1 (UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA) 16.04.2004, todo el documento.	1,4,5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070452

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US5070019 A	03.12.1991	CA2012409 A AU5139990 A DE3908997 A EP0388588 AB EP19900101144 PT93491 A ZA9002026 A HU207123 B HUT56131 A NZ232951 A AU618455 B DK0388588 T AT102990 T	18.09.1990 20.09.1990 20.09.1990 26.09.1990 20.01.1990 07.11.1990 28.12.1990 01.03.1993 29.07.1991 25.09.1991 19.12.1991 05.04.1994 15.04.1994
----- ES2204316 AB -----	----- 16.04.2004 -----	----- WO2004029240 A AU2003268959 A -----	----- 08.04.2004 19.04.2004 -----