

(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
13 de agosto de 2009 (13.08.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/098342 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 1/16 (2006.01) C12G 1/022 (2006.01)
C12P 7/20 (2006.01) C12P 1/02 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01) C12G 3/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2009/070008

(22) Fecha de presentación internacional:

27 de enero de 2009 (27.01.2009)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200800286 4 de febrero de 2008 (04.02.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **BODEGAS MURVIEDRO, S. A.** [ES/ES]; Calle Ampliación Polígono El Romeral, s/n, 46340 Requena (Valencia) (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BELLOCH TRINIDAD, Carmela** [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, 46100 Burjassot (Valencia) (ES). **TARÍN, José** [ES/ES]; BODEGAS MURVIEDRO, S. A., Calle Ampliación Polígono El Romeral, s/n, 46340 Requena (Valencia) (ES). **MARTORELL GUEROLA, Patricia** [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, 46100 Burjassot (Valencia) (ES). **GÓMEZ, Ramón** [ES/ES]; BODEGAS MURVIEDRO, S. A., Calle Ampliación Polígono El Romeral, s/n, 46340 Requena (Valencia) (ES).

FERNÁNDEZ-ESPINAR GARCÍA, María Teresa [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, 46100 Burjassot (Valencia) (ES). **OSSORIO GONZALEZ, Pablo** [ES/ES]; BODEGAS MURVIEDRO, S. A., Calle Ampliación Polígono El Romeral, s/n, 46340 Requena (Valencia) (ES). **QUEROL SIMÓN, Amparo** [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, 46100 Burjassot (Valencia) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (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, SE, SI, SK, 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: FERMENTATIVE MICROORGANISM THAT PRODUCES HIGH CONCENTRATIONS OF GLYCEROL AND THE USES THEREOF IN THE PRODUCTION OF ALCOHOLIC BEVERAGES/WINE

(54) Título: MICROORGANISMO FERMENTADOR PRODUCTOR DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLICEROL Y SUS APLICACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS/VINO

(57) Abstract: The present invention describes two yeast strains - BM58 (CECT13003) and BM60 (CECT13004) - that belong to the *Saccharomyces bayanus* (var. *uvarum*) and *S. cerevisiae* species, respectively, that are not genetically manipulated and are selected from natural wine fermentations with good must fermentative capacity for the production of alcoholic beverages, preferably wine. The wines produced with said yeast are characterized in that they have high concentrations of glycerol without an increase in acetic acid and an increase in the production of certain secondary bouquets. The two yeasts produce, in the main, bouquets of the ethyl ester type, such as ethyl caproate, ethyl caprylate, diethyl succinate and ethyl caprate. Lastly, attention should be drawn to the high implantation capacity in wine fermentations and the ability to grow at low temperatures (10°C) of said yeasts.

(57) Resumen: La presente invención describe dos cepas de levadura, BM58 (CECT13003) y BM60 (CECT13004), pertenecientes a las especies *Saccharomyces bayanus* (var. *uvarum*) y *S. cerevisiae* respectivamente, no manipuladas genéticamente, seleccionadas de fermentaciones vínicas naturales con buena capacidad fermentativa de mostos para la obtención de bebidas alcohólicas, preferentemente vino. Los vinos obtenidos con dicha levadura se caracterizan por tener elevadas concentraciones de glicerol sin incrementar el ácido acético y un aumento en la producción de ciertos aromas secundarios. Ambas levaduras producen mayoritariamente aromas del tipo ésteres etílicos como el caproato de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo y caprato de etilo. Por último, cabe destacar la elevada capacidad de implantación en fermentaciones vínicas y la capacidad de crecer a bajas temperaturas (10°C) de estas levaduras.



WO 2009/098342 A1

**MICROORGANISMO FERMENTADOR PRODUCTOR DE ALTAS
CONCENTRACIONES DE GLICEROL Y SUS APLICACIONES EN LA
PRODUCCIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS / VINO**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el área Agroalimentaria y en concreto en el sector de la enología. Se trata de dos cepas de levadura de origen vínico, pertenecientes a la especie *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* (BM58) y *Saccharomyces cerevisiae* (BM60), que tienen la capacidad de producir un aumento de la concentración de glicerol en vino de aproximadamente 100%, variando la concentración entre 9 y 22 g/L dependiendo de la temperatura de fermentación e incrementar la producción de aromas secundarios, aumentando la calidad organoléptica del vino.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

La composición química del vino está determinada por varios factores, entre los que se incluyen la variedad de la uva, las condiciones geográficas, la ecología microbiana de la uva, los procesos fermentativos y las prácticas de vinificación (Cole and Noble, 1997). Los microorganismos, especialmente las levaduras, juegan un papel importante en la composición química del vino y, por tanto, en el aroma final del mismo.

Durante la fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras, se producen diversos mecanismos que contribuyen a la calidad organoléptica del vino: (i) utilización de los constituyentes del zumo de uva, (ii) producción de etanol y otros solventes que ayudan a extraer los componentes aromáticos de las uvas, (iii) producción de enzimas que dan lugar a componentes aromáticos, (iv) producción de cientos de metabolitos secundarios (ácidos, alcoholes, ésteres, polialcoholes, aldehídos, cetonas, compuestos azufrados), y (v) degradación autolítica de células muertas de levadura (Cole and Noble, 1997; Lambrechts and Pretorius, 2000).

El glicerol, es un triol incoloro, inodoro y con elevada viscosidad, comercialmente conocido como glicerina. Es el componente más abundante en el vino después del etanol y se forma durante la fermentación alcohólica como consecuencia de la oxidación de los azúcares llevada a cabo por las levaduras (Scanes y colaboradores, 1998).

Análisis sensoriales han mostrado que el glicerol proporciona dulzor por encima de unos 5,2 g/L en vino blanco seco. Las concentraciones de glicerol en vinos secos y semi-dulces varían entre 5 y 14 g/L, aunque pueden encontrarse concentraciones superiores (hasta 21 g/L) en vinos blancos elaborados con mosto cuyas uvas han sido infectadas por el hongo *Botrytis cinerea* (Calderone et al., *J. Agric. Food Chem.*, 52 (19), 5902 -5906, 2004).

El aroma de los vinos es una de las características más importantes en la valoración de su calidad. Se puede dividir en tres grandes grupos: (i) los aromas procedentes de la variedad de la uva o aromas primarios, producidos por sustancias volátiles, transferidas por los granos de la uva al mosto; (ii) los aromas producidos durante la fermentación o aromas secundarios, entre los que se incluyen dos tipos de compuestos aromáticos mayoritarios, alcoholes superiores y ésteres; y (iii) el "bouquet", también conocido como aroma terciario, producido por la transformación final de los anteriores durante el envejecimiento. De esta manera, una forma de mejorar el contenido aromático de los vinos contribuyendo a la mejora de su calidad, y que en la actualidad se ha traducido en una tendencia de la industria vinícola, es desarrollar la etapa de fermentación a bajas temperaturas. En estas condiciones se ralentiza la producción de etanol por parte de la levadura y se ven favorecidas otras rutas metabólicas responsables de la generación de aromas secundarios.

Aunque el glicerol no tiene un impacto directo en las características aromáticas del vino, sí que contribuye al sabor y cuerpo final del vino, proporcionando dulzor, de ahí que en algunos países europeos se utilice

como indicador de calidad en el vino. Por estas razones, el glicerol es añadido en ocasiones de forma fraudulenta en el vino disminuyendo así su calidad. Teniendo en cuenta que la adición de glicerol al vino es una práctica no permitida por las regulaciones de la Comisión Europea (EC Regulation 822/87, appendix IV), resulta de gran interés utilizar una cepa

5 Regulation 822/87, appendix IV), resulta de gran interés utilizar una cepa de levadura que, tras su adición al mosto de uva, produzca un incremento de la concentración de glicerol durante la fermentación alcohólica.

Hasta el momento, se conoce la existencia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya sobreexpresión en los genes GPD1 y

10 GPD2, da lugar a una sobreproducción de glicerol (de Barros Lopes y col., 2000). Sin embargo, estas cepas también incrementan las concentraciones de ácido acético a niveles inaceptables. Por otra parte estas cepas son microorganismos modificados genéticamente (GMO) lo que supone un rechazo por parte de los consumidores y por tanto las

15 empresas de alimentos son reacias a utilizar GMO. Además, los alimentos que contienen organismos modificados genéticamente fueron regulados en 1997 por la Unión Europea, y exige el etiquetado de los productos destinados a la alimentación cuando contenían organismos modificados genéticamente legalmente autorizados que representen al menos el 1%

20 del producto.

En el mosto están presentes distintos géneros y especies de levaduras, pero el género *Saccharomyces*, y principalmente la especie *S. cerevisiae*, es responsable de la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000). Sin embargo, existen otras especies del complejo *Saccharomyces* “*sensu stricto*” que también se han encontrado en procesos fermentativos. En

25 concreto, *S. bayanus*, es típica de fermentaciones vínicas realizadas a bajas temperaturas, y algunas cepas presentan propiedades fermentativas mejores que algunas cepas de *S. cerevisiae* como incremento en la concentración de glicerol (S.S. González 2006. Tesis doctoral).

30 Por tanto, la utilización de cepas de *S. cerevisie* o *S. bayanus* aisladas de vino, y que durante la fermentación alcohólica produzcan un

incremento de la concentración de glicerol, resulta muy interesante para su aplicación en la industria vínica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Descripción breve

De entre las herramientas fundamentales que hoy posee la industria vinícola para ser competitiva en el mercado es poseer vinos de alta calidad. Una de esas herramientas consiste en mejorar la composición del vino, y por tanto su calidad, seleccionando los microorganismos utilizados en la fermentación.

De esta manera, el objeto de la presente invención es un microorganismo útil para la fermentación de bebidas alcohólicas, preferentemente vino, caracterizado por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de fermentaciones naturales, que produce altas concentraciones de glicerol y que genera una serie de aromas secundarios, mejorando las cualidades organolépticas del producto de la fermentación.

Asimismo, objetos particulares de la presente invención consisten esencialmente en que el microorganismo objeto de la presente invención es una levadura del género *Saccharomyces* que comprende las especies *S. cerevisiae* ó *S. bayanus*, y más concretamente las cepas de levadura *S. bayanus* var. *uvarum* (BM58) (CECT 13003) ó *S. cerevisiae* (BM60) (CECT 13004).

Por otra parte, el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por ser aislado y seleccionado de fermentaciones naturales de vinos de áreas de producción (denominación de origen D.O.) controlada Utiel-Requena, Valencia y Alicante, por presentar una implantación mayoritaria en fermentación vínica, de hasta el 100% con cualquier tipo de variedad de uva y que se caracteriza por tolerar: pH bajos, de hasta 2,8; temperatura de crecimiento y fermentación tanto alta como baja, entre 10 y

30°C; presión osmótica de hasta 300 g/l de azúcares; y altas concentraciones de alcohol en el medio, hasta 15%.

Otro objeto de la invención consiste esencialmente en que el microorganismo de la presente invención produce un aumento de la concentración de glicerol superior a 9 g/L alcanzando incluso hasta 22,27 g/L, lo que equivale hasta un 150% más de glicerol.

En otra realización particular de la invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por producir un aumento de la producción de aromas secundarios respecto a una levadura comercial que se caracteriza por ser una levadura muy aromática que se ha usado como control. Estos aromas secundarios pueden pertenecer al grupo de los acetatos, ésteres etílicos, y/o alcoholes.

Un último objeto de la presente invención consiste en el uso del microorganismo objeto de la presente invención para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas, y de forma particular en la elaboración de cualquier tipo de vino a partir de mostos de uva de cualquier variedad.

Descripción detallada

Hoy en día, una de las herramientas fundamentales de la industria vinícola para ser competitiva en el mercado es poseer vinos de alta calidad. Ello lleva a una búsqueda continua de mejoras en todas aquellas variables que condicionen la calidad del vino. Dado que la calidad de las bebidas alcohólicas, concretamente del vino, depende fundamentalmente de su composición química conseguir mejorar sus procesos de forma natural, sin recurrir a microorganismos modificados genéticamente o aditivos, cumpliendo la normativa legal, supone una clara ventaja en el mercado.

Una de las formas de mejorar la composición, y por tanto la calidad del vino, radica en los microorganismos utilizados en la fermentación, lo que se pone de manifiesto en el amplio número de investigaciones que se realizan en esta área. En el mercado hay un gran número de levaduras. La

selección de levaduras se realiza teniendo en cuenta una serie de características enológicas generales tales como un elevado poder fermentativo, baja acidez volátil, regularidad en la fermentación, ausencia de efectos olfativos, la no formación de espuma y que la viabilidad de las levaduras no disminuya tras el proceso de producción de levadura seca activa e incluso que no sean muy exigentes nutricionalmente (Querol et al., 1992a y Suárez e Iñigo, 2004). También podemos hablar de otros criterios más específicos tales como levaduras productoras de aromas, que degraden el ácido málico o incluso que incremente la concentración de glicerol (Pretorius, 2000).

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un microorganismo útil para la fermentación de bebidas alcohólicas, preferentemente vino, caracterizado por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de fermentaciones naturales, que produce altas concentraciones de glicerol y que genera otros aromas secundarios, mejorando las cualidades organolépticas del producto de la fermentación.

En un trabajo previo (S. S. González 2006. Tesis doctoral), se comprobó que especies del género *Saccharomyces* distintas a *S. cerevisiae* tales como *S. bayanus*, producían una mayor cantidad de glicerol que las cepas de *S. cerevisiae*. Teniendo en cuenta este dato, y puesto que esta especie crece mejor a bajas temperaturas, se procedió al aislamiento de estas levaduras en bodega (ver ejemplo 1). Posteriormente, fueron seleccionadas dos cepas, BM58 y BM60, teniendo en cuenta una serie de criterios de interés enológico tales como capacidad fermentativa, capacidad de fermentar distintas concentraciones de azúcar, buena tasa fermentativa, buen rendimiento de etanol, producción elevada de glicerol y baja de ácido acético, etc. En la Tabla 1 se muestra la analítica resultante de los vinos obtenidos tras fermentar con mosto de la variedad Tempranillo de las cepas, BM58 y BM60, y se compara con la levadura comercial T73 (cepa vínica *S. cerevisiae* aislada en Alicante, España, comercializada por

Lalvin, Lallemand y seleccionada por A.Querol y bajo depósito de patente CECT 1894). Esta cepa comercial fue seleccionada como una cepa que produce altas concentraciones de glicerol (ver descripción de características técnicas en <http://www.lallemandwine.us/cellar/zinfandel.php>. Tal y como se puede observar en la tabla, la cepa BM58 produce 22,27 g/L, la BM60 12 g/L y la cepa T73 9,62 g/L fermentando a 28°C y a 12°C la producción de glicerol es de 12g/L BM58, 9,5 BM60 y de 5,65 T73, indicando estos valores que la producción de glicerol en las cepas BM58 y BM60 superior al producido por T73 fermentando a 28°C y 12°C.

Un objeto particular de la presente invención consiste en que el microorganismo objeto de la presente invención es una levadura del género *Saccharomyces* que comprende las especies *S. cerevisiae* ó *S. bayanus*.

Con el objetivo de caracterizar genéticamente las cepas aisladas se utilizaron distintas técnicas moleculares cuyos resultados mostraron para la cepa BM58 los patrones típicos de *S. bayanus* y para la cepa BM60 los patrones típicos de *S. cerevisiae* (ver Figuras 1 y 2).

Tradicionalmente, varias especies del género *Saccharomyces* han estado relacionadas con la producción de bebidas alcohólicas, dentro de las que destacan: *S. cerevisiae*, *S. bayanus* (*var. bayanus* y *var. uvarum*) y *S. pastorianus*, entre otras. La taxonomía clásica de las levaduras se basa en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, criterios con los que surgieron todos estos nombres de levaduras relacionados con la fermentación alcohólica, aunque a menudo sean insuficientes para establecer con precisión la filogenia (relación de microorganismos en diferentes linajes o estirpes) de las levaduras. En los últimos años, la biología molecular ha aportado valiosas herramientas para establecer con mucha mayor precisión la clasificación de las levaduras (Fernández-Espinar et al., 2003). De esta manera, diferencias funcionales entre cepas del género *Saccharomyces* que resultan de gran importancia para los

procesos de producción de bebidas alcohólicas, y aunque aparentemente muy significativas, no son sino el resultado de pequeñas mutaciones en su material genético (García Garibay y col, 1993).

En la actualidad, la especie *S. bayanus* incluye dos variedades, *S. bayanus* var. *bayanus* y *S. bayanus* var. *uvarum*. Se ha sugerido que la cepa tipo de *S. bayanus* (aislada de cerveza) pudiera tratarse de un híbrido entre *S. uvarum* (levaduras vínicas incluidas en el taxón *S. bayanus*) y *S. cerevisiae*, con lo que se ha propuesto recuperar el nombre específico *S. uvarum* para las cepas no híbridas incluidas en el taxón *S. bayanus* y aisladas mayoritariamente de vinos (Nguyen y col., 2000).

Otra realización particular de la invención consiste en que el microorganismo objeto de la presente invención es la cepa de levadura *S. bayanus* var. *uvarum* (BM58) (CECT 13003) ó *S. cerevisiae* (BM60) (CECT 13004). Dicha identificación se ha realizado mediante la amplificación por PCR de la región ribosomal 5,8S-ITS utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4 y su posterior digestión con el enzima de restricción *Hae* III siguiendo la metodología desarrollada por Fernández-Espinar et al. (2000) y comparando con los patrones de especie ya obtenidos por nuestro grupo y disponibles en una base de datos accesible a través de la hoja web del IATA (<http://yeast-id.com/>). Los resultados se muestran en la Figura 1 donde se puede observar que la cepa BM60 corresponde a la especie *S. cerevisiae* al dar un patrón de restricción de de 325, 230, 170, 125 pb y la cepa BM 58 es *S. bayanus* var. *uvarum* al dar el patrón típico de esta especie, 495, 230, 125 pb con el enzima *Hae*III.

Para la caracterización a nivel molecular de clon o cepa se hizo uso de la técnica rápida de análisis de restricción del mtDNA. El análisis de polimorfismos mediante restricción del DNA mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como método de caracterización de cepas de levadura de origen vínico. Esta técnica permite determinar el perfil molecular de cada cepa de una forma precisa y muy reproducible. Para realizar esta caracterización en la presente invención, se utilizó el DNA

extraído según el protocolo descrito por Querol et al. (1992). El patrón de las cepas, BM58 y BM60 se muestra en la Figura 2 donde se puede observar un patrón de bandas totalmente distinto entre ambas cepas indicando que son distintas cepas. Estos patrones se han comparado con el de otras levaduras comerciales (Fernández-Espinar et al., 2001), donde hemos podido comprobar que el patrón presente de las levaduras BM58 y BM60 no corresponden con el de ninguna de las levaduras habitualmente utilizadas por las bodegas Españolas.

Una realización particular de la invención consiste esencialmente en que el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por ser aislado y seleccionado de fermentaciones naturales de vinos de áreas de producción (denominación de origen D.O.) controlada Utiel-Requena, Valencia y Alicante, por presentar una implantación mayoritaria en fermentación vínica, de hasta el 100% con cualquier tipo de variedad de uva y que se caracteriza por tolerar: pH bajos, de hasta 2,8; temperatura de crecimiento y fermentación tanto alta como baja, entre 10 y 30°C; presión osmótica de hasta 300 g/l de azúcares; y altas concentraciones de alcohol en el medio, hasta 15%.

Durante la vinificación se producen una serie de estreses y no todas las cepas de levaduras se adaptan bien a estas condiciones de crecimiento afectando negativamente tanto a la capacidad de crecer en estas condiciones, a la capacidad fermentativa de las levaduras y a las características enológicas de los vinos obtenidos. Dichos estreses son, de manera ilustrativa y sin que limite el alcance de la invención: bajos pH, estrés osmótico debido a altas concentraciones de azúcares y de alcohol. En el ejemplo 2 se expone el estudio realizado con las cepas BM58 y BM60 a distintos estreses y en la Tabla 2 se muestran los datos de crecimiento de la cepa BM58 y de las cepas control tanto de vino como de cerveza en distintas condiciones de estrés.

Las altas concentraciones de alcohol en el medio también tienen un efecto negativo para el crecimiento de las levaduras. Las levaduras

tolerantes a altas concentraciones de alcohol, son de gran interés para la industria vínica en general, y más concretamente en la elaboración de espumosos, donde las levaduras tienen que fermentar azúcar en presencia de altas concentraciones de alcohol (~11% de alcohol) y pocas levaduras se adaptan a estas condiciones y se producen paradas de fermentación.

En la tabla 2 se aprecia como en presencia de 5, 10, 12 y 15% de alcohol las cepas cerveceras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* son más sensibles al crecimiento en presencia de alcohol, y tan sólo crecen bien en presencia de 5% de alcohol, y no observándose crecimiento en presencia de 10, 12 ó 15% de alcohol. Las cepas vnicas pertenecientes a esta especie son más resistentes al alcohol observándose crecimiento tanto en presencia de 10 y 12% de alcohol; sin embargo, no todas son capaces de crecer en presencia de 15% de alcohol. Respecto a la capacidad de crecer en presencia de alcohol las cepas pertenecientes a *S. bayanus* especie a la que pertenece la cepa BM58, las diferencias son más significativas en presencia de 12 y 15% de alcohol, siendo la cepa BM58 la que crece sin ningún problema en presencia de 12 y 15% de alcohol y cabe destacar que a esta última concentración de alcohol mostró crecimiento hasta la quinta dilución y el resto de cepas de esta especie no crecieron a ninguna dilución excepto la cepa de cerveza CECT 1991 que solo creció hasta la tercera dilución, indicando estos datos unas características fisiológicas especiales no presentes en otras cepas de levaduras de la misma especie.

Por otra parte, se ha podido comprobar que las cepas descritas en la presente invención son capaces de crecer a temperaturas más bajas que las cepas vnicas. La cepa BM60 mostró buena capacidad de crecer a temperaturas bajas de 10 y 16°C e incluso una adaptación a fermentar a bajas temperaturas mejor que la mostrada por el resto de cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* analizadas y es más sensible a crecer a 37°C que otras levaduras vnicas pertenecientes a las especies *S.*

cerevisiae analizadas (ver Tabla 2). También cabe destacar que la cepa BM58 perteneciente a *S. bayanus* (var. *uvarum*) también creció a 10°C.

Al igual que ocurre con la temperatura, ambas cepas, no se vieron afectadas por los estreses por bajos pH y altas concentraciones de azúcar (hasta 300 mg/L). Respecto al resto de estreses se puede concluir que todas las levaduras son capaces de crecer a bajos pH y no les afecta altas concentraciones de azúcar.

Por otra parte, se ha averiguado que la cepa BM58 se implanta en las fermentaciones llevadas a cabo en bodega (ver ejemplo 3). La cepa *S. bayanus* var *uvarum* (BM58), está presente de forma mayoritaria durante los primeros días de fermentación (hasta el 6^a día), detectando entre un 40 y un 70% de implantación. Este elevado grado de implantación, de manera ilustrativa y sin que limite el alcance de la invención, se observó tanto en vinos blancos elaborados con variedad de uva Merseguera (fermentadores V22, V34-17 y V35), vinos rosados elaborados con uva Tempranillo (fermentadores V29, V30 y V31) y Monastrell, y vinos tintos elaborados con uva Bobal y Tempranillo (Tabla 3 y Figura 3).

En cuanto a la adaptación a fermentar diversas variedades de uva no se han detectado diferencias fermentativas en cuanto a velocidad de fermentación y azúcares residuales entre las variedades tempranillo y bobal.

Otro objeto de la invención consiste esencialmente en que el microorganismo de la presente invención produce un aumento de la concentración de glicerol superior a 9 g/L alcanzando incluso hasta 22,27 g/L, lo que equivale hasta un 150% más de glicerol.

Una levadura comercial habitual produce como máximo 9 g/L de glicerol a 28°C, temperatura normal de fermentación (ver tabla 1). Sin embargo, tanto BM58 como BM60 producen niveles de glicerol superiores a los de una levadura comercial tanto a bajas temperaturas como a temperaturas óptimas de fermentación, alcanzando hasta los 22,27 g/L a 28°C.

El glicerol contribuye al sabor y cuerpo final del vino, proporcionando dulzor tanto en vinos blancos, rosados y tintos, de ahí que en algunos países europeos se utilice como indicador de calidad en el vino. Además, en el caso de vinos tintos, el glicerol interviene en suavizar el carácter astringente de los polifenoles tales como los taninos, típicos en vinos tintos, consiguiendo de esta forma vinos más suaves al paladar y facilitando la obtención de vinos tintos envejecidos en barricas. Otra de las necesidades del sector es la obtención de levaduras cuyo rendimiento en alcohol durante la fermentación alcohólica sea vinos con alto grado alcohólico, necesidad que se hace en la actualidad más crucial con el cambio climático, ya que se obtienen mostos con mayor grado de madurez. Las levaduras que son capaces de desviar el consumo de azúcar para producir glicerol durante la glicolisis, también tiene como característica que disminuye el rendimiento en la obtención de alcohol (Pretorius, 2000). Por lo tanto, la selección de levaduras que además de cumplir los criterios generales sean capaces de incrementar la concentración de glicerol en los vinos es de gran interés para las industrias.

Hasta ahora no se ha obtenido ninguna levadura comercial que tenga la capacidad de incrementar la síntesis de glicerol y disminuya el rendimiento en alcohol con la posibilidad de disponer de este tipo de levaduras con todas las ventajas que conlleva su utilización o bien la única posibilidad de ello era recurriendo a GMO. En la presente invención, se presenta la selección de dos levaduras naturales no recombinantes que tienen la capacidad de producir entre un 40 a un 60% más de glicerol, dependiendo de las condiciones de fermentación y una disminución de 0,5g/L de alcohol que otras levaduras comerciales analizadas en la bodega (datos de la bodega).

En otra realización particular de la invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por producir un aumento de la producción de aromas secundarios respecto un mismo producto control.

Estos aromas secundarios pueden pertenecer al grupo de los acetatos, ésteres etílicos, y/o alcoholes. A modo ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, se muestra en las tablas 4, 5 y 6 las concentraciones de los compuestos aromáticos analizados obtenidos con la cepa BM58, y en su caso con BM60, en vinos blancos, tintos y espumosos, respectivamente.

Una vez realizadas la fermentaciones con la cepa *S. bayanus* BM58 se cuantificó un conjunto de compuestos volátiles que se forman durante la fermentación: ésteres y alcoholes superiores en dos vinos donde se implantó la levadura en porcentajes altos (ver Tabla 3 y Ejemplo 3). La contribución de todos estos compuestos en el aroma final del vino fue muy variable. Para alguno de ellos, se encontró correlaciones positivas entre su concentración y la calidad del aroma final. Un ejemplo son los ésteres etílicos, cuya presencia es muy importante, sobretudo en vinos blancos jóvenes. Sin embargo, para otros parece existir un umbral superior por encima del cual la calidad de vino disminuye. Este es el caso de los alcoholes superiores y el acetato de etilo, aunque en este último compuesto se ha correlacionado con algunas prácticas enológicas no adecuadas. Las concentraciones de los distintos compuestos obtenidos en la elaboración de vinos blancos se muestran en la Tabla 4 y vinos tintos Tabla 5.

En otra realización particular de la invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por producir un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los acetatos, y más concretamente el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de acetato de hexilo, acetato de bencilo y acetato de fenil etanol (ver tablas 4, 5 y 6).

En general, en el estudio de la producción de aromas secundarios del grupo de los acetatos obtenidos en los vinos analizados utilizando las cepas BM58 y BM60, se presentaron elevados niveles de acetato de etilo, el principal éster formado a partir del etanol durante la fermentación. Las

concentraciones estuvieron entre 20,5-37,7 mg/L, siendo más elevadas en vinos blancos y rosados. Los niveles encontrados en las fermentaciones con la cepa BM58 se encontraron dentro de los límites establecidos como concentraciones normales en vinos que es de 50mg/L (Scanes et al.,
5 1998). El acetato de etilo, produce un aroma afrutado (piña).

De los ésteres de acetato que se encontraron en mayor concentración cabe destacar el acetato de isoamilo. Este compuesto se caracteriza por un aroma a plátano. Los niveles cuantificados en los vinos, entre 0,16 y 2,52 mg/L, superan el umbral de detección y se consideran
10 como concentraciones habituales descritas en vinos. En general se han determinado concentraciones mayores en los vinos rosados, aunque este acetato se encontró en menor concentración en el caso del vino elaborado con la cepa Noblesse, los vinos fermentados con BM58 tuvieron las concentraciones más elevadas de acetato de isoamilo.

Finalmente, se cuantificó la concentración de acetato 2 feniletanol, que se caracteriza por proporcionar aromas a rosa, miel y tabaco. Todos los vinos presentaron niveles de entre 0,69 y 3 mg/L, que se encuentran en los límites habituales en vinos y por encima del umbral de percepción (0,25 mg/L). Sin embargo, el grupo de vinos R-120 Merseguera, R-120
15 Tempranillo y V44 (todos obtenidos en el ensayo 1 donde se impuso la cepa BM58), presentaron concentraciones muy elevadas (108-199,4 mg/L), por encima de los límites descritos.

En otra realización particular de la invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por producir un aumento en
25 la producción de aromas secundarios del grupo de los ésteres etílicos, y más concretamente el caproato de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo, lactato de etilo y caprato de etilo (ver tablas 4, 5 y 6).

El caproato de etilo y caprilato de etilo son ésteres relacionados con descriptores de aromas afrutados de manzana y piña. Son compuestos
30 que se encuentran comúnmente en los vinos tintos como base del aroma. En el estudio de la producción de aromas secundarios del grupo de los

ésteres etílicos obtenidos en los vinos analizados utilizando las cepas BM58 y BM60, se ha observado que todos los vinos se caracterizan por presentar concentraciones muy elevadas de caproato de etilo (hexanoato de etilo), que proporciona aromas afrutados, a piel de manzana. Así, en 5 vinos tintos se han cuantificado valores entre 0,6-1,16 mg/L, que son niveles superiores a los descritos para un vino tinto joven. Se observó que los vinos elaborados con BM58 presentan mayor concentración de caproato de etilo que el vino control (V17), siendo los tintos Bobal de Los Marcos donde se impone la BM58 los de mayor contenido en este compuesto. En los vinos blancos se han determinado 1,48-2,52 mg/L y en 10 rosados 1,27-3,47mg/L, niveles bastante más elevados de lo habitual (como máximo 1,02 mg/L en blancos y 0,542 mg/L en rosados).

El caprilato de etilo (octanoato de etilo) que da lugar a aromas afrutados, se ha encontrado en elevadas concentraciones en los vinos blancos y rosados. En los blancos, valores entre 6,87-12,24 mg/L, y en 15 rosados entre 5,20-11,30 mg/L, superan la concentración normal descrita (0,82 mg/L y 0,20 mg/L respectivamente). Los vinos tintos presentan entre 2,1 y 4,45 mg/L, que también son concentraciones más elevadas de lo habitual (0,78 mg/L). Cabe destacar que en los vinos tintos bobal de Los Marcos elaborados con la BM58 se observó mayor producción de este 20 compuesto.

El succinato de etilo y el lactato de etilo están relacionados con aromas lácteos y de café. En particular el lactato de etilo contribuye a amortiguar las aristas amargas y ácidas en el gusto y según algunos 25 autores contribuye a enriquecer el volumen y redondez en boca. Los vinos analizados presentaron una extraordinaria producción de succinato de dietilo, siendo ésta mayor en los vinos tintos (8,8-26,5 mg/L). En estos casos, se apreció además que los vinos elaborados con BM58 contenían más succinato de dietilo que el control V17. Los vinos blancos y rosados 30 también tienen concentraciones elevadas (0,8-35,8 mg/L). En el caso del

lactato de etilo, se han determinado concentraciones de entre 6,8 y 38,80 mg/L.

El caprato de etilo (decanoato de etilo) tiene también una importancia significativa en la calidad del aroma final del vino, proporcionando un aroma a fruta, uva y dulzón. El umbral de detección de este compuesto es de 0,2 mg/L, por lo que las concentraciones que se han cuantificado en los vinos, exceden este umbral (entre 0,8 y 5,23 mg/L). Los vinos elaborados con BM58 presentan en general mayor concentración de caprato de etilo que los vinos control. Algunos vinos, tienen un contenido mucho mayor al descrito hasta el momento (0,21mg/L en vinos blancos y 0,42 mg/L en tintos). Cabe destacar la elevada concentración de caprato de etilo en los vinos R-120 Tempranillo y SAUT26 San Antonio bobal y V44 todos elaborados con la BM58.

En otra realización particular de la presente invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por producir un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los alcoholes, y más concretamente del isobutanol, alcohol isoamílico, 1-hexanol y 2-feniletanol (ver tablas 4, 5 y 6).

El isobutanol es un compuesto que da lugar a aromas que recuerdan a vino, solvente o amargo. En el estudio de la producción de aromas secundarios del grupo de los alcoholes obtenidos en los vinos analizados utilizando las cepas BM58 y BM60, se han podido determinar concentraciones entre 1,3 y 6,8 mg/L de isobutanol, que están por debajo de la concentración umbral de detección (40 mg/L). Estos valores observados son mucho más bajos que los niveles descritos en vinos y que están entre 25,7 y 103 mg/L.

Los vinos analizados se caracterizan por presentar también elevadas concentraciones de alcohol isoamílico, que proporciona aromas a whiskey, malta. Se cuantificaron concentraciones entre 143,41 y 347,16 mg/L, que superan los niveles habituales en vinos. El umbral de detección es de 30 mg/L.

Los alcoholes 1-hexanol y el 2-feniletanol se relacionan con descriptores que recuerdan a la hierba y a las rosas respectivamente. Sin embargo, los niveles de 1-hexanol en los vinos analizados, entre 0,8 y 2,36 mg/L, están por debajo del umbral de detección (8 mg/L). Por otra parte, cabe destacar la elevada concentración de 2 feniletanol observada. En concreto, los vinos blancos y rosados elaborados con BM58 tienen incrementada la concentración de este compuesto (hasta 28,79 mg/L). Según datos bibliográficos, la percepción del aroma del 2 feniletanol (a miel, picante, rosas), se produce cuando se superan los 10-14 mg/L en el vino. En nuestro caso, los niveles de 2 feniletanol están dentro de las concentraciones habituales, aunque en el límite inferior. (De 6 a 166 mg/L, dependiendo del tipo de vino).

Otro objeto de la presente invención consiste en el uso del microorganismo objeto de la presente invención para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas, y de forma particular en la elaboración de cualquier tipo de vino a partir de mostos de uva de cualquier variedad.

Además de comprobar la capacidad a nivel industrial para elaborar vinos de primera fermentación, también se probó su capacidad para realizar la segunda fermentación en la elaboración de vinos espumosos. A partir de vinos blancos y rosados se realizó una segunda fermentación (ver ejemplos 4 y 5).

Ambas levaduras fueron capaces de fermentar en estas condiciones y los aromas producidos durante este proceso se detallan en la Tabla 6 y se compararon con una fermentación control. Cabe destacar que las características observadas previamente respecto a la BM58 se repiten en estos vinos, en general altas concentraciones de ésteres etílicos como el caproato de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo y caprato de etilo. En el caso de la BM60 podemos analizar con detalle el perfil aromático de estos vinos y cabe destacar que los vinos elaborados con la cepa BM60 al igual que en la BM58 son mayoritariamente ésteres etílicos como caproato

de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo y caprato de etilo y acetato de isoamílico.

En el estudio realizado con las levaduras BM58 y BM60 en la elaboración de vinos blancos, rosados y tintos, a partir de mostos de uva de diferentes variedades, así como de la elaboración de vinos espumosos (ver tablas 4, 5 y 6, ejemplos 4 y 5. y figura 3), se pudo concluir que el microorganismo objeto de la presente invención resulta idóneo para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas, preferentemente vino. Por otro lado, tanto *S. cerevisiae* como *S. bayanus* son especies que desarrollan la fermentación alcohólica en procesos industriales que dan lugar a otros tipos de bebidas alcohólicas distintas al vino, a modo ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención en cerveza y sidra (ver tabla 2).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Análisis mediante RFLP's con el enzima *HaeIII* de la región ribosomal ITS-5,8S amplificada mediante PCR de DNA de colonias aisladas de las cepas BM60 que corresponde a la especie *S. cerevisiae*, obteniendo un patrón de restricción de 325, 230, 170, 125 pb, y de la cepa BM 58 que es *S. bayanus* var. *uvarum* al obtener el patrón de 495, 230, 125 pb.

1: banda de DNA de 325 pb

2: banda de DNA de 230 pb

3: banda de DNA de 170 pb

4: banda de DNA de 125 pb

5: banda de DNA de 495 pb

6: banda de DNA de 230 pb

7: banda de DNA de 125 pb

Figura 2. Patrón molecular correspondiente a las cepas *S. bayanus* var. *uvarum* BM58 y *S. cerevisiae* BM60, obtenido mediante restricción del

DNA mitocondrial con *Hinfl*. M, corresponde al marcador de peso molecular de lambda digerido con el enzima *PstI*.

A: Banda de DNA típica de BM60 por debajo de 5000 pb

B: banda de DNA típica de BM58 de 5000 pb

- 5 **Figura 3.** Ejemplo de los patrones moleculares obtenidos mediante restricción del DNA mitocondrial con el enzima *Hinfl* en cepas de levadura aisladas durante las fermentaciones en vino rosado (Tempranillo).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

10

Ejemplo 1. Aislamiento y selección de las cepas

1.a. *Saccharomyces bayanus* (BM58)

A la vista de los resultados de un trabajo previo del grupo (S. S. González 2006. Tesis doctoral) se procedió al aislamiento de levaduras de fermentaciones llevadas a cabo a menos de 22 °C en la bodega Murviedro. Las levaduras aisladas a lo largo de distintas fermentaciones fueron identificadas por técnicas moleculares (Esteve-Zaroso et al., 1999). Se aislaron mayoritariamente cepas pertenecientes a *S. cerevisiae*, ningún aislado de *S. kudriavzevii*, y tan sólo 5 aislados de *S. bayanus*. Dicha identificación se realizó según el protocolo descrito por Fernández-Espinar (2000).

Teniendo en cuenta una serie de criterios de interés enológico tales como capacidad fermentativa a 12 y 28°C se procedió a la selección de la cepa BM58 puesto que era la cepa que crecía más rápidamente a las 2 temperaturas ensayadas y a las dos concentraciones de azúcar. Además también se tuvieron en cuenta otros criterios tales como buena tasa fermentativa; buen rendimiento de etanol; producción elevada de glicerol y baja de ácido acético. Del total de 5 cepas aisladas previamente se seleccionó la cepa BM58 al ser también la que presentó los valores más apropiados para la fermentación alcohólica cuyos resultados se muestran en la Tabla 1. En dicha Tabla se muestra la concentración de azúcar

30

residual, glicerol, ácido acético y alcohol de los vinos obtenidos tras fermentar mosto de la variedad Tempranillo. En dicha tabla se observa que a 28°C BM58 fermenta bien aunque se obtiene 2,8 g/L de azúcar residual y lo más interesante es que la concentración de glicerol es muy alta, de 22,27g/L. A 12°C la levadura fermenta mejor, obteniendo solo 1,8g/l de azúcares residuales y la concentración de glicerol es de 12 g/L mientras que el de la cepa T73 es de 5,65. El resto de parámetros se encuentran dentro de los rangos normales en vinos.

1.b. *S. cerevisiae* (BM60)

Al realizar los estudios de implantación de la cepa BM58 en las bodegas Murviedro, se aisló una cepa denominada BM60 e identificada como *S. cerevisiae* dominante en un gran número de depósitos de la bodega donde se elaboran vinos blancos y rosados y que se caracterizaban por tener un elevado aroma afrutado. En la Tabla 1 se muestran la concentración de azúcar residual, glicerol, ácido acético y alcohol de los vinos obtenidos tras fermentar mosto de la variedad Tempranillo. Respecto al tiempo de fermentación la cepa BM60 tarda menos días en fermentar a ambas temperaturas que la BM58 y la concentración de glicerol también es alta de 12g/L y 9,5 a 28°C y 12°C respectivamente, siendo en ambas temperaturas al igual que ocurre con la cepa BM58 superiores a lo normal en levaduras vínicas (7-9g/L). El resto de parámetros se encuentran dentro de los rangos normales en vinos.

Tabla 1. Analítica de los vinos obtenidos con las cepas BM58, BM60 y el control T73. Tiempo de fermentación, azúcares reductores, alcohol, glicerol y ácido acético producido por las levaduras BM58 y BM60 comparado con la cepa comercial de *S. cerevisiae* (T73).

	Temperatura de fermentación					
	28°C			12°C		
	T73	BM58	BM60	T73	BM58	BM60
Tiempo de fermentación (días)	5	9	5	21	18	14
Azúcares residuales (g/L)	1,0	2,7	2,4	0,2	1,8	0,5
Glicerol (g/L)	9,62	22,27	12	5,65	12	9,50
Ácido acético (g/L)	0,16	0,28	0,43	0,12	0,13	0,11
Alcohol (%)	10,4	10,6	11	10,1	9,0	10,0

Ejemplo 2. Tolerancia a distintos estreses de las cepas BM58 y BM60

5 Para conocer si la cepa BM58 se adapta bien a estos estreses se realizó un estudio comparativo creciendo la cepa BM58, así como otras cepas vínicas usadas como controles pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (ver tabla 2). Los distintos estreses analizados son bajos pH (2,8; 3,0; 3,2), temperatura tanto alta como baja (10, 16, 30,
10 37°C), osmótico (200, 250, 300 g/l de azúcares), altas concentraciones de alcohol en el medio (5, 10, 12 y 15%).

Del mismo modo, realizó un estudio similar al descrito para la cepa BM58 de adaptación a distintos estreses (pH, osmótico, temperatura y etanol). En la tabla 2 se muestran todos los resultados obtenidos.

15

Tabla 2. Crecimiento de las cepas BM58 y BM60 a distintos estreses.

Cepas de *S. cerevisiae*:

C1: CECT 1942^T=CBS 1171^T; Origen: Cerveza ale (Holanda)

C2: CECT 11001=NCYC 2340; Origen: Cerveza lager (Bélgica)

20

- C3: Lalvin T73, Lallemand; Origen: Vino (Alicante, España)
- C4: Uvaferm CEG, Danstar; Origen: Vino (Eppernay, Francia)
- C5: Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc.; Origen: Vino (Cognac, Francia)
- 5 C6: Fermicru Primeur DSM-Gist Broc.; Vino (Beaujolais, Francia)
- C7: UCLM S-377, Springer Oenologie; Origen: Vino, La Mancha, España)
- C8: BM-60
- Cepas de *S. bayanus*:
- B1: CECT 11035^T=CBS 380^T; Origen: Cerveza
- 10 B2: 1991=DSM 70411; Origen: Cerveza
- B3: CECT 12627; Origen: Vino (Valladolid, España)
- B4: CECT 12629, Origen: Mosto (Zaragoza, España)
- B5: CECT 12638; Origen: Mosto (Cadiz, España)
- B6: CECT 12669; Uva (La Rioja, España)
- 15 B7: BM-58; Vino (Requena, España)

Especie	Cep a	pH			Glucosa (g l ⁻¹)			Temperatur a (°C)				Etanol (%)			
		2, 8	3, 0	3, 2	20 0	25 0	30 0	10	16	30	37	5	1 0	1 2	1 5
S.	C1	6	6	6	6	6	6	3	5	6	0	4	0	0	0
cerevisiae	C2	6	6	6	6	6	6	3	6	3	0	3	0	0	0
	C3	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
	C4	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	5
	C5	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	5	2
	C6	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	5
	C7	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	2
	C8	6	6	6	6	6	6	4	4	6	3	6	5	3	0

S. bayanus	B1	6	6	6	6	6	6	5	6	6	0	6	6	2	0
	B2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	5	3
	B3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	2	0
	B4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	2	0
	B5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	4	0
	B6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	3	0
	B7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	6	5

Ejemplo 3. Análisis de la capacidad de implantación de la cepa BM58 en las fermentaciones vínicas.

5

Para determinar si la cepa BM58 estaba presente de forma mayoritaria en los cultivos obtenidos durante el escalado y en el pie de cuba, así como el grado de implantación durante las distintas fermentaciones vínicas, se aplicó la técnica de mtDNA con *Hinfl*, ya que permite analizar el patrón molecular de cada una de las cepas aisladas del vino. El análisis de polimorfismos mediante restricción del DNA mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como método de caracterización de cepas de levadura de origen vínico (Querol et al., 1992). Esta técnica permite determinar el perfil molecular de cada cepa de una forma precisa y muy reproducible. Sin embargo, la obtención de resultados precisa de mayor tiempo que la técnica de PCR, ya que previamente es necesario aislar las levaduras del vino utilizando un medio de cultivo adecuado.

20 **Tabla 3.** Porcentajes de implantación de la cepa BM58 en las fermentaciones realizadas en bodega mediante la aplicación de distintas técnicas moleculares (PCR de la región ribosomal PCR del gen COX1 y RFLPs del mtDNA).

Ensayo		Implantación (PCR del gen Cox1)	Nombre Fermentador	Implantación (RFLPs mtDNA, Hinfl.)
1	Variedad Merseguera	Positiva	V22	60%
			V34-17	40%
			V35	60%
	Variedad Tempranillo	Positiva	V29	70%
			V30-15	30%
			V31-16	70%
2	Variedad Monastrell	Positiva	Villena	50%

5 **Ejemplo 4. Determinación de los compuestos volátiles en los vinos obtenidos con la cepa BM58.**

Una vez realizadas la fermentaciones con la cepa *S. bayanus* BM58, interesa conocer la contribución de dicha cepa en el aroma final del vino. Para ello se cuantificó, mediante cromatografía de gases, un conjunto
10 de compuestos volátiles que se forman durante la fermentación: ésteres y alcoholes superiores en dos vinos donde se implantó la levadura en porcentajes altos, en el depósito V35 y en el depósito V31-16 (ver Tabla 3).

Los resultados obtenidos en el caso de los vinos fermentados con la
15 cepa *S. bayanus* BM58, se compararon con los obtenidos en vinos fermentados con otras cepas comerciales de levaduras (vino blanco elaborado con la variedad merseguera y con la cepa 18-2.007, y vino tinto con la variedad Tempranillo mediante una fermentación espontánea). Las concentraciones de los distintos compuestos obtenidos en la elaboración
20 de vinos blancos se muestran en la Tabla 4 y vinos tintos Tabla 5.

Tabla 4. Concentraciones de los compuestos aromáticos presentes en los vinos blancos analizados y umbral olfatorio.

5

COMPUESTOS	Cepa BM58	Control cepa 18-2.007)	Umbral detección (mg/L)
	Depósito V35	Depósito R118	
Acetato de etilo	36,3584381	37,71824697	12,264
Acetato de isobutilo	0,549343951	0,580496878	?
Isobutanol	1,994714151	1,375775273	40
Acetato de isoamilo	5,293014239	3,754168297	0,03
Alcohol isoamílico	143,4196854	150,3457462	30
Caproato de etilo	2,146014072	2,526635015	0,014
Acetato de hexilo	1,970306027	0,192903017	0,67
Lactato de etilo	6,918434276	0	?
1-hexanol	0,86772131	0,986341087	8
Caprilato de etilo	11,8389207	12,24131134	0,005
Succinato de dietilo	5,510782948	3,883318345	?
Acetato de bencilo	0	0	?
Acetato de 2-feniletanol	108,4657406	3,01586393	0,25
2-feniletanol	9,394271705	3,936247342	10-14
Alcohol bencílico	0	0	¿
Caprato de etilo	2,297892509	2,521495129	0,2

Tabla 5. Concentraciones de los compuestos aromáticos presentes en los vinos tintos analizados y umbral olfatorio.

COMPUESTOS	Cepa BM58	Control	Umbral detección (mg/L)
	Depósito V31- 16	Depósito V17	
Acetato de etilo	23,7176726	20,5255943	12,264
Acetato de isobutilo	0,19997069	0,37383906	?
Isobutanol	4,02180932	4,86301384	40
Acetato de isoamilo	1,9463642	1,26164807	0,03
Alcohol isoamílico	281,817064	242,850057	30

Caproato de etilo	1,16870227	0,76672294	0,014
Acetato de hexilo	0,28178472	0,28637435	0,67
Lactato de etilo	10,4303073	10,8949996	?
1-hexanol	1,39941572	1,30604123	8
Caprilato de etilo	4,02124454	2,39755663	0,005
Succinato de dietilo	26,5729626	8,80705434	?
Acetato de bencilo	0	0	?
Acetato de 2-feniletanol	0,91934278	0,69836775	0,25
2-feniletanol	5,69147434	4,69580231	10-14
Alcohol bencílico	0	0	¿
Caprato de etilo	2,55144629	0,83446822	0,2
Acetato de etilo			

Ejemplo 5. Elaboración de vinos espumosos con las cepas BM58 y BM60.

5 Además de comprobar la capacidad a nivel industrial para elaborar vinos de primera fermentación, también se han probado para realizar la segunda fermentación en la elaboración de vinos espumosos. A partir de vinos blancos y rosados se ha realizado una segunda fermentación en fermentadores adicionando 24 g/l de sacarosa y 1×10^6 ufc/ml de cada
10 levadura.

Ambas levaduras fueron capaces de fermentar en estas condiciones y los aromas producidos durante este proceso se detallan en la Tabla 6 y se comparan con una fermentación control.

15

Tabla 6. Concentraciones de los compuestos aromáticos presentes en vinos espumosos analizados y obtenidos mediante fermentación con las cepas BM58 y BM60, así como el umbral olfatorio.

COMPUESTOS	Vinificación control	Vino elaborado con BM58	Vino elaborado con BM60
Acetato de etilo	11,7921905	22,17979347	39,84164284
Acetato de isobutilo	0	0	0
Isobutanol	6,533790194	0,97516543	0,929235508
Acetato de isoamilo	0,727904742	4,646680905	4,790927642
Alcohol isoamílico	264,7841923	190,4422287	169,5289455
Caproato de etilo	0,428538021	1,507863303	2,72351595
Acetato de hexilo	0,192903017	1,116819911	1,528916201
Lactato de etilo	0	0	0
1-hexanol	0	0	0
Caprilato de etilo	1,100045201	7,487393903	12,2311913
Succinato de dietilo	20,76214939	14,08747932	23,98976605
Acetato de bencilo	0	0	0
Acetato de 2-feniletanol	17,90395014	35,58550557	1,52878092
Alcohol bencilico	0	0	0
2-feniletanol	8,731795571	23,76347309	2,522081255
Caprato de etilo	1,042525675	10,67540698	5,720409437

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 Biddenne C, Blondin B, Dequin S, Vezinhet F. (1992) Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22:1-7.
- Calderone, G, Naulet N, Guillou C, Reniero F. (2004). Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (19), 5902 -5906
- 10 Cole, V.C.; Noble, A.C. Flavour chemistry and assessment. In *Fermented Beverage Production*; Law, A.G.H.; Piggot, J.R. Eds.; Blackie Academic & Professional: London, United Kingdom, 1997; pp. 361-385.
- de Barros Lopes M, Rehman A-U, Gockowiak H, Heinrich AJ, Langridge P, Henschke PA (2000) Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate
- 15

- dehydrogenase gene (*GPD2*). *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 208-215.
- de Barros Lopes M, Bellon JR, Shirley NJ, Ganter PF (2002) Evidence for multiple interspecific hybridation in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res.* 1: 323-331.
- 5 Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. 1999. Identification of ascomycetous, basidiomycetous and deuteromycetous yeasts by RFLP's analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Systematic. Bacteriol.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 329-337.
- 10 Fernández-Espinar, M.T.; Esteve-Zarzoso, B.; Querol, A. and E. Barrio. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78, 87-97.
- 15 Fernández-Espinar, M.T.; Barrio, E.; Querol, A. 2003. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeasts*, 20: 1213-1226.
- Fernández-Espinar, M.T. V. López, D. Ramón, E. Bartra and A. Querol. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology.* 70, 1-10 Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 86, 11-22.
- 20 García Garibay, M.; Quintero Ramírez,R.; López-Munguía Canales, A. 1993. *Biotechnología Alimentaria*. Editorial Limusa,SA.
- 25 González González S. S. (2006). *Caracterización enológica y molecular de híbridos entre de especies del grupo Saccharomyces "sensu stricto"*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia
- Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Viticul.* 2000, 21, 97-129.
- 30

- Nguyen, H.-V., Lepingle, A. y Gaillardin, C. (2000). Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *C. Syst. Appl. Microbiol.* 23, 71-85.
- 5
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Pronk JT, Steensma YH, van Dijken JP (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607-1633
- 10
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. 1992a. Strain for use as dry yeast in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. *J. Food. Sci.* 57: 183-185.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. 1992b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains.
- 15
- Appl. Microbiol. Environ.* 58: 2948-2953.
- Ramón, D., González, R., Pérez-González, J.A., y Querol, A. Levadura vínica CECT 1973, su método de obtención por técnicas de DNA recombinante y su aplicación como levadura vínica de uso industrial, útil para mejorar el aroma de los vinos. Patente Española
- 20
- ES2059280. 1994.11.01
- Scanes KT, Hohmann S, Prior BA (1998) Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S Afr J Enol Vitic* 19:17-22.
- Suárez, J.A. and Iñigo, B. 2004. Microbiología enológica. Fundamentos de
- 25
- vinificación. (3ª edición). Ediciones Mundi-Prensa.

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo útil para la fermentación de bebidas alcohólicas, preferentemente vino, caracterizado por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de fermentaciones naturales, que produce altas concentraciones de glicerol, y genera mayor cantidad de aromas secundarios, mejorando las cualidades organolépticas del producto de la fermentación.
2. Microorganismo según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es una levadura del género *Saccharomyces*.
3. Microorganismo según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la levadura pertenece a las especies *S. cerevisiae*, ó *S. bayanus*.
4. Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado porque la cepa de levadura es *S. bayanus* var. *uvarum* (BM58) (CECT 13003) ó *S. cerevisiae* (BM60) (CECT 13004).
5. Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado por ser aislado y seleccionado de fermentaciones naturales, preferentemente de vinos de áreas de producción (denominación de origen D.O.) controlada Utiel-Requena, Valencia y Alicante, y por presentar una implantación mayoritaria en fermentación vínica, de hasta el 100% con cualquier tipo de variedad de uva y por tolerar: pH bajos, de hasta 2,8; temperatura tanto alta como baja, entre 10 y 30°C; presión osmótica de hasta 300 g/l de azúcares; y altas concentraciones de alcohol en el medio, hasta 15%.
6. Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizado por producir un aumento de la concentración de glicerol rindiendo concentraciones superiores a 9 g/L.
7. Microorganismo según reivindicación 6, caracterizado por producir un aumento de la concentración de glicerol de hasta 22,27 g/L, lo que equivale hasta un 150% más de glicerol.

8. Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado por producir un aumento, en la producción de aromas secundarios del grupo de los: acetatos, ésteres etílicos, alcoholes.
- 5 9. Microorganismo según reivindicación 8, caracterizado por producir un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los acetatos, y más concretamente el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de acetato de hexilo, acetato de bencilo y acetato de fenil etanol.
- 10 10. Microorganismo según reivindicación 8, caracterizado por producir un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los ésteres etílicos, y más concretamente el caproato de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo, lactato de etilo y caprato de etilo.
- 15 11. Microorganismo según reivindicación 8, caracterizado por producir un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los alcoholes, y más concretamente el isobutanol, alcohol isoamílico, 1-hexanol y 2-feniletanol.
- 20 12. Uso del microorganismo según las reivindicaciones 1 a la 11 para elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.

20

25

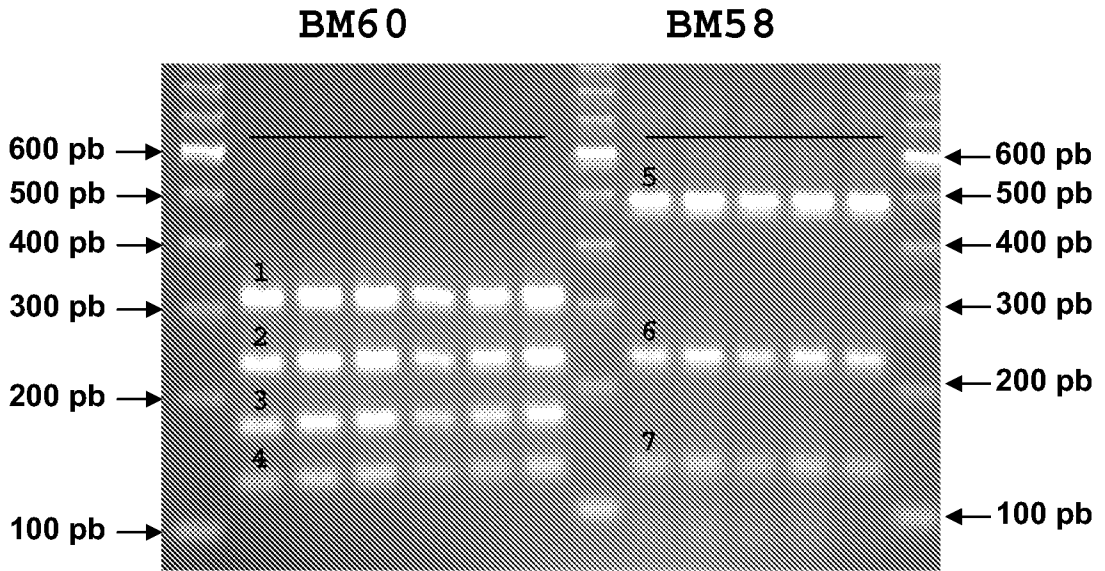


FIG 1

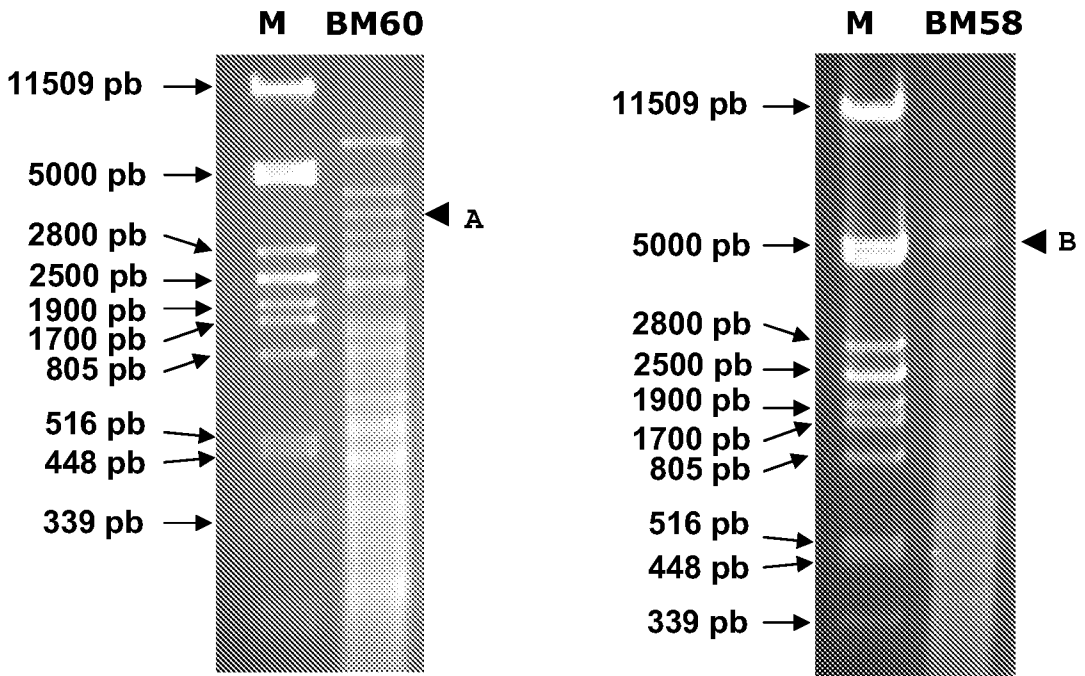


FIG 2

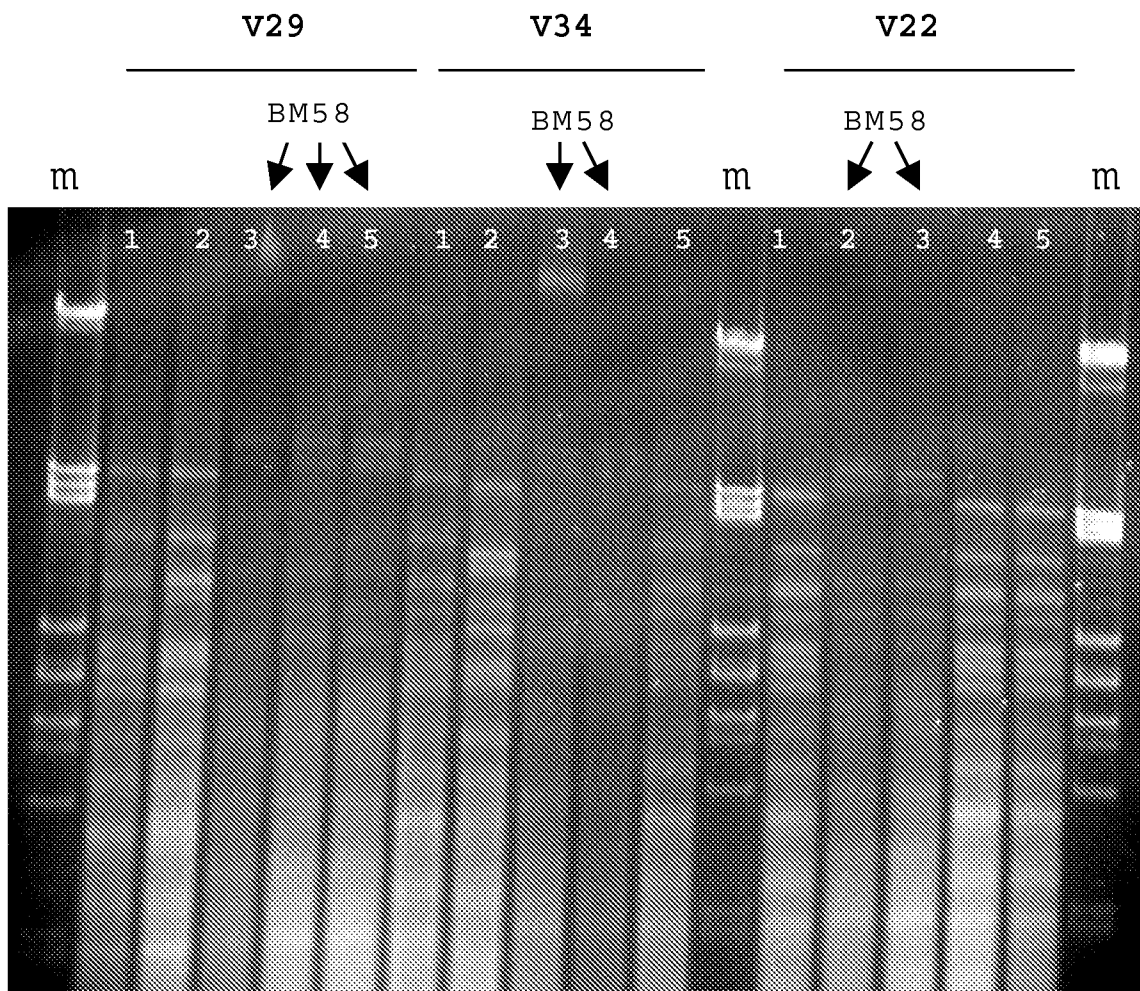


FIG 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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)

C12N, C12P, C12R, 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)

INVENES, EPODOC, WPI, HCPLUS, FSTA, SCISEARCH, AGRICOLA, CABA, CROPU, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP, XPOAC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Garcia, M. J. et al; <i>Influenza del ceppo di lievito e della temperatura su la concentrazione di alcuni composti volatili</i> . Rivista di Viticoltura e di Enologia, 1994, Vol. 47 No. 4, pages 29-37. In particular, page 30, paragraphs 5 and 7, page 35, paragraph 13, tables 1a y 2a.	4-6, 8-12
A	Regodón, J. A. et al.; <i>Elaboración de vinos en bodega con levaduras autóctonas seleccionadas</i> . Alimentación, Equipos y Tecnología 2000, Vol.19 No.2, pages 139-145. In particular tables III and IV, figure 1, page 141 column 1.	4-6, 8-12
A	RONCHI, A. et al. <i>Esperienze di fermentazione con il ceppo S6U, R.F. uvarum</i> Vignevini 1996, Vol. 23. N. 7-8, pages 57-61. In particular page 57, column 2, page 58, column 2, figure 1.	4-6, 8-12

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

23 April 2009 (23.04.2009)

Date of mailing of the international search report

(29/04/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

N. Urquía Fernández

Telephone No. +34 93045

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070008

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tosi, E. et al; I lieviti ibridi impiegati in enologia: l'esempio del ceppo industriale S6U, ibrido naturale <i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces uvarum</i> , nella produzione di vino amarone della Valpolicella. Rivista Internet di Viticoltura ed Enologia 2005, N.11/2 (en line) retrieved from the internet in <URL: http://www.dalcin.com/ita/news/ita/S6Uvinidea.pdf >. In particular page 3 paragraph 3, figure 1, page 5 figure 3.	4-5, 7-12
A	Eglinton, J.M. et al; The effect of <i>Saccharomyces bayanus</i> -mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 2000 No. 6 pages 190-196. In particular page 191 column 1, page 192 table 1, page 193, table 2.	4-5, 7-12
A	JP 2008000042 A (AKITA PREFECTURE) 2008-01-10 (abstract). [online] [retrieved on 14.04.2009]. retrieved from the database EPOQUE EPODOC.	4-6, 8-12

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **Claims 1-3 (6-7 in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The technical features described in claims 1 to 3 are so broad and so general that these claims include a number of micro-organisms which are not the subject of the application description (see additional sheet).

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The application concerns two strains of two different species with different technical features, for example glycerol concentration ranges in wine, resulting in two independent inventive concepts which are linked only in that they belong to the same genus and are used in wine production. Consequently, the International Searching Authority is of the view that the application contains two inventions, which are covered by the following claims:

Invention 1: yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* (BM60) (CECT number 13004); (claims 4 and 5 in part, claims 8 to 12 in part and claim 6 in full).

Invention 2: yeast strain *Saccharomyces bayanus* (BM58) (CECT number 13003); (claims 4 and 5 in part, claims 8 to 12 in part and claim 7 in full). The fact of belonging to the same genus and of applying to the same process does not involve a single general inventive concept pursuant to PCT Rule 13.1.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070008

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2008000042 A	10.01.2008	NONE	-----

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/16 (2006.01)
C12P 7/20 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12G 1/022 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C12G 3/02 (2006.01)

Claim 6 refers to a glycerol concentration range that applies only to strain BM60 of *Saccharomyces cerevisiae*, and not to strain BM58 of *S. bayanus*. Claim 6 was examined exclusively to determine novelty, inventive step and industrial applicability in relation to strain BM60.

Claim 7 refers to a glycerol concentration range that applies only to strain BM58 of *Saccharomyces bayanus*, and not to strain BM60 of *S. cerevisiae*. Claim 7 was examined exclusively to determine novelty, inventive step and industrial applicability in relation to strain BM58.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/070008

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

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)
C12N, C12P, C12R, 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)

INVENES, EPODOC, WPI, HCPLUS, FSTA, SCISEARCH, AGRICOLA, CABA, CROPU, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP, XPOAC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Garcia, M. J. et al; Influenza del ceppo di lievito e della temperatura sulla concentrazione di alcuni composti volatili. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 1994, Vol. 47 No. 4, páginas 29-37. En particular, página 30, párrafos 5 y 7, página 35, párrafo 13, tablas 1a y 2a.	4-6, 8-12
A	Regodón, J. A. et al.; Elaboración de vinos en bodega con levaduras autóctonas seleccionadas. Alimentación, Equipos y Tecnología 2000, Vol.19 No.2, páginas 139-145. En particular tablas III y IV, figura 1, página 141 columna 1.	4-6, 8-12
A	RONCHI, A. et al. Esperienze di fermentazione con il ceppo S6U, R.F. "uvarum". Vignevini 1996, Vol. 23. N. 7-8, páginas 57-61. En particular página 57, columna 2, página 58, columna 2, figura 1.	4-6, 8-12

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“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).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“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.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“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.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

23 Abril 2009 (23.04.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

29 de Abril de 2009 (29/04/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

N. Urquía Fernández

N° de teléfono +34 93045

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070008

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Tosi, E. et al; I lieviti ibridi impiegati in enologia: l'eseempio del ceppo industriale S6U, ibrido naturale Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces uvarum, nella produzione di vino amarone della Valpolicella. Rivista Internet di Viticoltura ed Enologia 2005, N.11/2 (en línea) recuperado de internet en <URL: http://www.dalcin.com/ita/news/ita/S6Uvinidea.pdf >. En particular página 3 párrafo 3, figura 1, página 5 figura 3.	4-5, 7-12
A	Eglinton, J.M. et al; The effect of Saccharomyces bayanus-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Reasearch 2000 No. 6 páginas 190-196. En particular página 191 columna 1,página 192 tabla 1, página 193, tabla 2.	4-5, 7-12
A	JP 2008000042 A (AKITA PREFECTURE) 2008-01-10 (resumen). [en línea] [recuperado el 14.04.2009]. recuperado de la base de datos EPOQUE EPODOC.	4-5, 8-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070008

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N°s: 1-3 (6-7 parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Las características técnicas descritas en las reivindicaciones 1 a 3 son tan amplias y generales que resultan en la inclusión de numerosos microorganismos que no son objeto de la descripción de la solicitud. (Ver hoja adicional).

3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

El objeto de la solicitud comprende dos cepas de dos especies distintas con características técnicas distintas, por ejemplo los rangos de concentración de glicerol en el vino, resultando en dos conceptos inventivos independientes, cuyo único vínculo es pertenecer al mismo género y aplicarse en la producción vínica. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay 2 invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

Invención 1: cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (BM60) número de depósito (CECT 13004); (parte de las reivindicaciones 4 y 5, parte de las reiv. 8 a 12 y la reiv. 6 en su totalidad).

Invención 2: cepa de levadura *Saccharomyces bayanus* (BM58) número de depósito (CECT 13003); (parte de las reivindicaciones 4 y 5, parte de las reiv. 8 a 12 y la 7 en su totalidad) El hecho de pertenecer al mismo género y aplicarse en el mismo procedimiento no implica un único concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT.

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:

4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070008

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
JP 2008000042 A	10.01.2008	NINGUNO	-----

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/20 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070008

La reivindicación 6 se refiere a un rango de concentración de glicerol que sólo se aplica a la cepa BM60 de *Saccharomyces cerevisiae*, no a la cepa BM58 de *S. bayanus*. La reivindicación 6 se ha examinado exclusivamente para determinar la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial en relación a la cepa BM60.

La reivindicación 7 se refiere a un rango de concentración de glicerol que sólo se aplica a la cepa BM58 de *Saccharomyces bayanus*, no a la cepa BM60 de *S. cerevisiae*. La reivindicación 7 se ha examinado exclusivamente para determinar la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial en relación a la cepa BM58.