



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 330 710**

② Número de solicitud: 200801500

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.12.2009

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 49 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Bodegas Terras Gauda, S.A. (Titular al 51 %)

⑱ Inventor/es:
Carrascosa Santiago, Alfonso-Vicente;
Martínez-Rodríguez, Adolfo José;
Cebollero Presmanes, Eduardo;
Núñez Gutiérrez, Yolanda del Pilar;
León Romero, Ángela María;
Martínez Rodríguez, María del Carmen y
Rodríguez Canas, Emilio

⑳ Agente: **Pons Ariño, Angel**

⑳ Título: **Procedimiento para obtener vinos de la variedad de uva Albariño (y otras) con alto contenido aromático mediante el uso de una levadura ecotípica.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para obtener vinos de la variedad de uva Albariño (y otras) con alto contenido aromático mediante el uso de una levadura ecotípica.

Microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* capaz de inducir un alto nivel de terpenos volátiles además del uso de los mismos para la elaboración de vinos a partir de mosto de uva, de cualquier fruta o de cualquier solución hidroazucarada.

ES 2 330 710 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener vinos de la variedad de uva Albariño (y otras) con alto contenido aromático mediante el uso de una levadura ecotípica.

Sector de la técnica

La invención se encuadra dentro del Área Agroalimentaria, en el sector de la producción de bebidas alcohólicas, más concretamente en el enológico.

Estado de la técnica

El primer estudio científico de la microbiota de mostos de Galicia se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC [IÑIGO, B. Y BRAVO, F. (1977). Estudio de mostos y vinos de Galicia. A.T.A. 17,2,268-276; QUECEDO, C.R., SOMAVILLA, J.F., ARROYO, V. Y IÑIGO, B. (1976). Agentes de fermentación de mosto de uva de la zona de Galicia. A.T.A 16, 123-129]. Con un enfoque ecológico, se obtuvieron levaduras autóctonas de potencial interés para la vinificación de las zonas estudiadas, zonas de albariño y de ribeiro. Ya entonces se observó la lentitud de la fermentación de los mostos estudiados, y se relacionó con la escasa incidencia de microbiota epifítica, originada por el uso indiscriminado de plaguicidas y las lluvias previas a la vendimia. La escasa presencia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en las fermentaciones espontáneas estudiadas retrasaba en exceso el final de la fermentación.

El vino elaborado con mosto de uva de la variedad Albariño de *Vitis vinifera* es un vino blanco, joven, caracterizado por su frescor y su estructura en boca, que lo hace diferente del resto de los vinos blancos jóvenes de España. La variedad Albariño de *Vitis vinifera* es el cultivar de mayor importancia económica en Galicia (noroeste de España), y se cultiva también en el norte de Portugal. Desde el punto de vista aromático se caracteriza por tener aromas frutales y florales [CARBALLEIRA, L.; CORTÉS, S.; GIL, M.L.; FERNÁNDEZ, E. (2001). Determination of aromatic compounds, during ripening, in two white grape varieties, by SPE-GC Chromatographia 53 (Suppl.): S350-S355; DIEGUEZ, S.C.; LOÍS, L.C.; GÓMEZ, E.F.; DE LA PEÑA, M.L. (2003). Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño. LWT-Food Science and Technology 36: 585-590]. El tipo de uva empleada en su elaboración es la albariña, cultivada en la región de "Rías Baixas". Su área de producción fundamental en España es la Denominación de Origen Rías Baixas que engloba cinco comarcas de la provincia de Pontevedra (el Valle del Salnés, O Rosal, el Condado del Tea, Soutomaior y el Val do Ulla), en cuyo reglamento la establece como variedad preferente.

La uva albariña se caracteriza por ser una uva pequeña, concentrada y densa, que posee una gran capacidad de producción de azúcares, pudiendo alcanzar hasta 13% vol. de alcohol en buenas cosechas. Una vez transformada la uva en vino, mantiene una riqueza en ácidos y en componentes aromáticos y sápidos que muy pocas variedades consiguen en todo el mundo, convirtiéndolo en un tipo de vino muy identificable siendo fundamentales para el reconocimiento de los mismos.

Una de las desventajas que presentan los vinos elaborados para ser consumidos jóvenes es que la concentración de los compuestos aromáticos está sujeta a cambios de año en año. Además, pierden rápidamente y gradualmente el frescor y su carácter afrutado tan característico, por lo que se tiene que tener un cuidado especial en las condiciones de comercialización de los mismos, ya que si éstas condiciones no son las adecuadas las pierden con mucha más facilidad, así por ejemplo al año y medio de estar en el mercado en condiciones poco controladas, se atenúan drásticamente todas las virtudes del vino joven y a los dos años de la vendimia manifiestan el llamado "gusto a especias".

Si estos vinos se comercializaran en condiciones refrigeradas (5-10°C), el periodo de vida útil se prolongaría unos seis meses y conservarían aceptablemente sus atributos de vino joven unos dos años, dependiendo de la variedad.

Los compuestos responsables del aroma varietal o primario que aportan connotaciones florales o afrutadas a los vinos blancos, como el Albariño, son los terpenos, aunque existen otros que contribuyen en menor medida como los norisoprenoides, los alcoholes lineales y aromáticos, siempre que se encuentren en forma libre, es decir no unida a ninguna molécula de azúcar.

Los terpenos son originados por la actividad glicosidásica de las levaduras vínicas como *Saccharomyces cerevisiae* y son característicos del tipo de uva empleada en cada variedad aunque pueden modificarse según las características del terruño, del manejo del viñedo pudiendo cambiar incluso de año en año. Además se pueden encontrar presentes en la uva en dos fracciones distintas: una libre que es la que contribuye al aroma, y otra ligada, formando diglicósidos no aromáticos, fundamentalmente 6-O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosidos y 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosidos. Esta segunda fracción es cuantitativamente superior a la primera y apenas sufre cambios durante el proceso de fermentación llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*.

Como se ha comentado anteriormente la concentración de terpenos depende de muchos factores externos como las características del terreno y manejo del viñedo, o la climatología, por esa razón hasta la fecha las estrategias empleadas para aumentar para conseguir vinos con un carácter afrutado más intenso han sido la maceración del mosto con los hollejos de la uva, o el tratamiento de los vinos cuando están a medio fermentar con preparados comerciales no específicos o cócteles enzimáticos perfectamente definidos que hidrolizan los glicósidos disacáridicos unidos a los

terpenos. Esta última práctica no siempre es posible legalmente o incluso es escasamente recomendable, ya que puede afectar a la calidad del vino.

5 La liberación de la parte de la fracción ligada de los terpenos supone una fuente potencialmente aprovechable para paliar los problemas ocasionados por la falta de compuestos que contribuyen al aroma de los vinos.

10 La alternativa idónea es disponer de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* silvestres y autóctonas, también denominadas ecotípicas, como la cepa de la presente invención *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378, capaces de liberar terpenos conjugados y convertirlos en terpenos libres y volátiles no dependiendo de la suerte o de la climatología de la vendimia y asegurando una buena calidad sensorial de los vinos de Albariño.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

15 Un objeto de la presente invención corresponde a un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* útil para la elaboración de vinos que induce un alto nivel terpenos volátiles y porque es el microorganismo depositado en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares de referencia DSM 21378.

20 Otro objeto de la invención es el empleo de la cepa de DSM 21378 en la elaboración de vinos a partir de mosto de uva o de cualquier fuente vegetal rica en azúcares, con el objeto de producir vino o soluciones hidroalcohólicas que se utilicen como materia prima para obtención de alcohol de grado alimentario por destilación.

25 Una realización particular de la invención es el empleo de una mezcla que contenga la cepa de la invención para elaboración de vinos o soluciones hidroalcohólicas utilizables p.ej.- para obtener alcohol de destilación.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención consiste en la identificación por parte de los inventores de una cepa *Saccharomyces cerevisiae*, más concretamente la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 aislada del mosto obtenido a partir de uvas *Vitis vinifera* para la elaboración de vinos a partir de uva de la variedad Albariño, y la idoneidad de la misma para la obtención de vinos con alta concentración en compuestos volátiles terpenos, mejorando de esa manera el aroma de los mismos y por tanto su calidad sensorial.

35 Se seleccionó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 y se observó el predominio de la misma en el transcurso de las fermentaciones, frente a la microbiota indígena del mosto de la albariña ya que, al no ser esterilizado, se encuentra microbiológicamente contaminado.

40 El presente estudio pretende en el fondo paliar en alguna medida las limitaciones del planteamiento de la fermentación espontánea, que ya entonces se apuntaban, que son el retraso en la realización de la fermentación y la no reproducibilidad de una vendimia a otra del aseguramiento de los caracteres que dependen de la actividad microbiana.

45 Por tanto, un aspecto de la presente invención es un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* útil para la elaboración de vinos con un alto nivel terpenos volátiles, en adelante microorganismo de la invención, constituido por el microorganismo depositado en la colección de microorganismos y células de cultivo alemana de referencia DSM 21378, que es capaz de inducir la producción de terpenos en el mosto del vino.

50 Otro aspecto de la invención lo constituye la utilización del microorganismo de la invención, DSM 21378, para la elaboración de vinos, ya sean vinos blancos, rosados, tintos o achampanados.

Ejemplo de realización de la invención

Ejemplo 1

55 *Aislamiento, mantenimiento y conservación de Saccharomyces cerevisiae DSM 21378*

60 Para llevar a cabo el aislamiento de la cepa se seleccionaron viñas de la variedad Albariño que a partir de las uvas procedentes de dichas viñas se obtuvieron mostos monovarietales que fueron sometidos a una fermentación espontánea, durante la cual se llevaron a cabo por métodos convencionales de microbiología los aislamientos en medio sólido, fundamentalmente agar YPD, incubando a 30°C durante 48-72 h.

65 Una vez aislada, la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 debe ser mantenida y conservada, para garantizar su empleo año tras año. Han de mantenerse cultivos stock y de trabajo. Para ello la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 se creció de la manera correcta en placas de YPD para obtener un césped de levaduras tras 48 horas de incubación a 30°C y se conservó a -70°C en una solución de YPD con glicerol al 10%. Adicionalmente puede procederse a la obtención de levaduras secas activas mediante liofilización de la biomasa disuelta en un medio de leche desnatada al 10%. Para ello las muestras se congelaron a -70°C durante 48 horas antes de proceder a su liofilización, posteriormente se liofilizaron de manera convencional utilizada en microorganismos.

ES 2 330 710 A1

Ejemplo 2

Obtención de vinos a partir de la variedad de uva albariña con alto contenido en terpenos mediante el uso de la cepa Saccharomyces cerevisiae DSM 21378 de la invención.

2.1.- Inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378

Las colonias aisladas de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 se inocularon en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de YPD. Tras 12 h de incubación a 30°C y 200 rpm, matraces con 1 l de YPD, se inocularon con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 a una densidad inicial de 10 cel/ml. Tras 36 horas de incubación a 30°C con agitación, las células de los cultivos se sedimentaron por centrifugaron a 3000 X g durante 5 min a 4°C, realizándose dos lavados con NaCl 0.9% estéril para eliminar los restos de YPD. Finalmente, aproximadamente 3×10^{10} células de la cepa se disolvieron en 100 ml de NaCl 0.9% estéril y se conservaron a 4°C hasta el momento de su inoculación en el mosto de la variedad de uva albariña. Este inóculo es el idóneo para un volumen entre 1 y 99 de mosto. Los escalados se hicieron en proporción de entre un 1 y 99% hasta alcanzar el volumen final deseado.

2.2.- Seguimiento molecular de la vinificación

El seguimiento molecular de la vinificación es necesario para comprobar que la cepa inoculada, *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378, es la que se ha impuesto y poder así decidir sobre la marcha si añadir o no más inóculo. Para ello ha de procederse al aislamiento de colonias de levadura a partir del mosto en fermentación. A lo largo de la fermentación de cada mosto se extrajeron muestras para proceder al aislamiento de las colonias de levadura provenientes de las diferentes fases del proceso fermentativo. El objetivo del aislamiento era el de contar con ejemplares sobre los cuales realizar el estudio de DNA-mitocondrial que permitiese comprobar la predominancia de la cepa inoculada. Para ello se realizaron diluciones en NaCl 0.9% estéril de las muestras extraídas y 100 μ l de cada una de ellas se extendieron sobre placas de YPD. Tras dos días de incubación a 30°C se procedió al recuento de viables en placa así como a la conservación en YPD con 10% de glicerol de 30 de las colonias aisladas en cada toma de muestra. Finalmente, cada una de estas colonias se caracterizó molecularmente mediante extracción del DNA total y posterior digestión con Hinfl.

2.3.- Análisis del DNA-mitocondrial

El objetivo de estos análisis del DNA-mitocondrial es el de poder tener la certeza de que las cepas de levadura seleccionada se imponían en las fermentaciones, frente a la microbiota indígena del mosto Albariño suministrado que, como no se esterilizó, se encontraba microbiológicamente contaminado. Para la extracción de DNA genómico de levaduras se utilizó un método publicado con anterioridad [QUEROL, A., BARRIO, E., HUERTA, T. Y RAMON, D (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts. Appl. Environm. Microbiol. 58, 2948-2953]. Se realizaron inóculos de 5 ml de YPD con cada una de las 30 colonias de levaduras aisladas de los mostos inoculados con la cepa y del mosto sin inocular (o mosto control) a lo largo de las diferentes fases del proceso fermentativo. Tras 12 horas de incubación a 30°C con agitación, las células del cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 500 μ l de solución SE con zymoliasa 20T (10 mg/ml). Después de 2 horas de incubación a 37°C, cada muestra se centrifugó 1 min para sedimentar los esferoplastos y posteriormente se resuspendieron en 500 μ l de 50 mM Tris-HCl-20 mM EDTA, pH 7.4. Para favorecer la tisis celular se añadieron 25 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 20% y la muestra se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ l de acetato potásico 5 M, se incubó la muestra durante 30 min en hielo y se centrifugó durante 5 min. Un volumen de isopropanol se añadió sobre la fracción del sobrenadante y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min antes de una centrifugación de 10 min para favorecer la precipitación del DNA. Para eliminar restos de sales se hizo un lavado con etanol al 70% y finalmente se resuspendió el DNA en 20 μ l de TE. Para determinar la eficiencia del proceso de extracción 3 μ l de las muestras de DNA se cargaron en un gel de agarosa para su posterior visualización. Una vez determinadas las concentraciones relativas de DNA mediante su visualización por medio de geles de agarosa, se digirieron cantidades similares de DNA empleando diferentes volúmenes de cada muestra (entre 3 y 8 μ l). Las digestiones del DNA total se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l, durante 12 horas a 37°C empleando la enzima de restricción Hinfl (U/ μ g) y el tampón recomendado por el proveedor (H). La separación y visualización de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.7% sumergidos en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, ácido acético 4 M, EDTA 1 mM pH 8). Para la migración del DNA se aplicó un voltaje de 5 V/cm y el patrón de DNA utilizado fue el de λ H + E (DNA de fago lambda digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI). Para visualizar el DNA, los geles previamente incubados durante 15-20 minutos en una solución de bromuro de etidio (5 μ g/ml) se irradiaron con luz ultravioleta ($\lambda=312$ nm) en un transiluminador.

Todas estas operaciones generaron un determinado patrón de restricción del mit-DNA específico de cada cepa que permitió comprobar la predominancia de la cepa inoculada en las fermentaciones (Figura 1).

2.4.- Estudio y determinación de los terpenos libres en el mosto

En cuanto al necesario estudio de terpenos libres a llevar a cabo para comprobar la efectividad de la invención, se procedió del siguiente modo. En principio los compuestos a determinar pueden ser los siguientes: Limoneno, Linalool, Terpin-4-ol, Terpineol, Citronerol, Nerol, Geraniol, β -Damascenona, α -Ionona, β -Ionona, Eugenol y 2-Feniletanol. Los terpenos libres y conjugados se fraccionaron por retención selectiva en columnas SepPak Vac C-18 (1 g) (Waters, Milford, Massachussets, Ireland).

ES 2 330 710 A1

Para llevar a cabo la preparación de las muestras, se mezclaron 100 mL de vino diluidos con 100 mL de agua destilada y se le adicionaron 1 mL de patrón interno (10 ppm de 3-Octanol preparado en una solución de etanol al 100%). Se pasaron a través de la columna, lavando el residuo con 25 mL de agua destilada. La fracción libre fue eluída con 10 mL de pentano-diclorometano (2:1), la solución fue desecada con sulfato de sodio anhídrido y concentrada hasta 0,5 mL en un rota-vapor Büchi (Büchi Labortechnik AG, Fawil, Suiza) para su posterior análisis en GC.

La fracción conjugada fue disuelta en 5 mL de un buffer citrato-fosfato pH 5,0 y con 200 μ L de la enzima de acción α -glicosidasa (AR-2000 Gist Brocades, France) (0,5 g de en 5 mL de citrato-fosfato pH 5,0) e incubada a 40°C por 18 horas. Posteriormente se eluyó con 10 mL de metanol y concentró hasta llegar a sequedad por rota-evaporación.

El aglicón se extrajo en la columna de SePack Vac C-18 (1 g). Las operaciones de determinación se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard M-5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con inyector split/splitless. La separación se realizó en una columna capilar Carbowax 20 M de 50 m de longitud y 0,25 μ m de espesor de película de fase. En el control del equipo, la adquisición y el procesado de datos, se empleó el programa HP-Chem. La separación se llevó a cabo con una temperatura inicial del horno de entre 50 y 150°C durante entre 2 y 19 minutos, aumentando entre 1 y 7°C/min hasta entre 10 y 500°C y 3°C/min hasta entre 150 y 250°C, durante entre 1 y 30 minutos. El gas portador utilizado fue el helio, con una presión de 14,5 psi. La temperatura del inyector utilizada comprendió los 250 y 500°C y la del detector lo mismo.

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención, relativos a patrones internos y la cuantificación por comparación del área de cada compuesto, relativa al patrón interno, con la obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema. Trabajando en estas condiciones, un total de al menos 12 compuestos incluyendo 10 terpenos y 2 norisoprenoides pudieron ser identificados.

Los resultados obtenidos en vinos Albariños elaborados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378 están reflejados en las siguientes tablas 1 y 2. En ellos se observa la presencia de un alto contenido de terpenos libres (p.ej.- 1240,4 μ g/L), más del doble de los vinos control no inoculados (p.ej.- 420 μ g/L), perceptible en la fase olfativa y gustativa de la cata. El limoneno es el monoterpeno más abundante, presentando una concentración de p. ej.-489 μ g/L y el linalool p.ej.- 283 μ g/L.

TABLA 1

Concentración de terpenos libres Y NORISOPRENOIDES en los vinos obtenidos mediante fermentación controlada con la levadura ecotípica Saccharomyces cerevisiae DSM 21378

Concentración mg/L	<u>Nerol</u>	Geraniol	B-Damascenona	α-ionona	2feniletanol+β-ionona
CEPA A DSM 21378					
Fermentación	0.010 \pm 0.001	0.054 \pm 0.001	0.146 \pm 0.021	0.076 \pm 0.018	6.106 \pm 1.065
Vino	nd	0.169 \pm 0.000	0.576 \pm 0.000	0.212 \pm 0.000	16.146 \pm 0.000
CONTROL					
Fermentación DSM 21378	nd	0.047 \pm 0.000	nd	0.107 \pm 0.004	13.170 \pm 1.368
Vino	0.031 \pm 0.007	0.117 \pm 0.012	0.033 \pm 0.004	0.066 \pm 0.001	0.683 \pm 0.000

ES 2 330 710 A1

TABLA 2

Concentración de terpenos libres en los vinos obtenidos mediante fermentación controlada con la levadura ecotípica *Saccharomyces cerevisiae* DSM 21378.

Concentración mg/L	<u>α-pineno</u>	β - Pineno	Limoneno	Linalool	α -Terpineol
CEPA A					
DSM 21378					
Fermentación	0.057± 0.000	0.043 ± 0.006	0.268 ± 0.018	0.131± 0.026	nd
Vino	0.124± 0.000	nd	nd	0.283 ± 0.000	nd
CONTROL					
DSM 21378	nd	nd	nd	nd	0.041± 0.000
Vino	nd	nd	nd	0.006 ± 0.000	0.014± 0.001

REIVINDICACIONES

5 1. Microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* útil para la elaboración de vinos **caracterizado** porque induce un alto nivel terpenos volátiles y porque es el microorganismo depositado en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares de referencia y de referencia DSM 21378.

10 2. Utilización del microorganismo según la reivindicación 1 para la elaboración de vinos a partir de mosto de uva, de cualquier fruta o de cualquier solución hidroazucarada.

15 3. Utilización del microorganismo según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque puede estar contenido en una mezcla de levaduras para la elaboración de vinos a partir de mosto de uva, de cualquier fruta o de cualquier solución hidroazucarada.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 330 710

② Nº de solicitud: 200801500

③ Fecha de presentación de la solicitud: 22.05.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VILANOVA, M. et al. Determination of Free and Bound Terpene Compounds in Albariño Wine. J. Food Comp. Anal. 2006, Vol. 19. Páginas 694-697.	1-3
A	ZÁMUZ, S. et al. Volatile Compounds after Spontaneous Fermentation of Musts from Vitis Vinifera cv. Albariño Grapes Cultivated in Different Origins from Rias Baixas AOC, Spain. Flavour Fragr. J. 2006. Vol. 21. Páginas 743-748. En particular página 746, columna 1 y tabla 3.	1-3
A	FALQUÉ et al. Volatile Profile and Differentiation Between Albariño Wines from Different Regions. International Journal of Food Science and Technology. Marzo 2008. Vol. 43. Páginas 464-475. En particular, página 466, columna 1 y tabla 1.	1-3
A	VILANOVA et al. Characterization of Yeast Strains from Rías Baixas (NW Spain) and their Contribution to the Fermentation of Albariño Wine. Annals of Microbiology. 2005. Vol 55, No. 1, páginas 23-26.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.11.2009

Examinador

N. Urquía Fernández

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

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

C12N, C12G, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, XPAIP, XPOAC, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, PUBCHEM, GOOGLE SCHOLAR, PAPI,

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VILANOVA, M. ET AL. Determination of Free and Bound Terpene Compounds in Albariño Wine. J. Food Comp. Anal. 2006, Vol. 19. Páginas 694-697.	2006
D02	ZÁMUZ, S. ET AL. Volatile Compounds after Spontaneous Fermentation of Musts from Vitis Vinifera cv. Albariño Grapes Cultivated in Different Origins from Rias Baixas AOC, Spain. Flavour Fragr. J. 2006. Vol. 21. Páginas 743-748. En particular página 746, columna 1 y tabla 3.	2006
D03	FALQUÉ ET AL. Volatile Profile and Differentiation Between Albariño Wines from Different Regions. International Journal of Food Science and Technology. Marzo 2008. Vol. 43. Páginas 464-475. En particular, página 466, columna 1 y tabla 1.	Marzo 2008
D04	VILANOVA ET AL. Characterization of Yeast Strains from Rías Baixas (NW Spain) and their Contribution to the Fermentation of Albariño Wine. Annals of Microbiology. 2005. Vol 55, No.1, páginas 23-26.	2005

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

1. Novedad y Actividad inventiva según artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes

1.1 La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir altos niveles de terpenos volátiles y norisoprenoides que contribuyen al aroma del vino de Albariño. El problema que va a resolver la presente invención es identificar una cepa de levadura que aumente las concentraciones de terpenos libres y norisoprenoides en el vino con el fin de potenciar su aroma. En la invención no se describen las condiciones de fermentación por lo que se asumen condiciones de fermentación similares a cualquiera de los documentos del estado de la técnica más próximo.

El estado de la técnica más cercano viene definido por los documentos D01 y D02, que describen las concentraciones de terpenos y norisoprenoides en vinos de Albariño fermentados espontáneamente en diferentes regiones de las Rias Baixas gallegas.

En D01 se indica que los compuestos terpénicos que más impacto tienen en el aroma final del vino son el linalool y el eugenol, mientras que el alfa-pineno es detectado por encima del umbral de percepción en solo uno de los vinos analizados (D01 pág. 697, col. 1).

En D02 se indica además que la beta-damascenona y la alfa-ionona contribuyen de forma importante al aroma final del vino puesto que la concentración detectada se encuentra por encima del umbral de percepción (D02 pág. 746, col. 1, tabla 3).

En D03 se analizan los compuestos volátiles libres de vinos albariño de la zona "O rosal" y se indica que los compuestos de mayor contribución al aroma final del vino albariño son linalool y geraniol, con concentraciones entre 94 y 145 microgramos/litro y entre 16 y 69 microgramos/litro respectivamente (D03 página 466, columna 1, párrafo 6), ambos muy inferiores a los determinados en la presente invención.

Comparando las concentraciones de los terpenos linalool, geraniol y alfa-pineno (el eugenol no está determinado en la presente invención) y de los norisoprenoides alfa-ionona y beta-damascenona con los descritos en el estado de la técnica más cercano (D01 tabla 2, D02 tabla 3, D03 tabla 1), se comprueba que los niveles de linalool, alfa-ionona y de beta-damascenona producidos por la cepa descrita en la presente invención son superiores a los niveles descritos en el estado de la técnica más cercano, mientras que la concentración de geraniol es similar a la descrita en D02 y la concentración de alfa pineno es similar a la descrita en D01.

Hoja adicional

En D04 se analiza la contribución de la cepa al sabor y aroma final del vino Albariño. Se describe que se aíslan cepas locales aisladas de mostos de la región que pertenecen a *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta cepa mayoritaria en las fermentaciones espontáneas. En D04 se indica igualmente que en condiciones de fermentación similares, el sabor del vino es característico de la variedad mientras que el aroma final del vino depende esencialmente de la cepa de levadura utilizada. El linalool, el geraniol, la alfa-ionona y la beta-damascenona son componentes importantes en el aroma final del vino, tal y como se ha indicado. Por tanto la cepa de levadura utilizada está directamente relacionada con los niveles de monoterpenos volátiles y norisoprenoides detectados en el vino. En la presente invención los valores de estos compuestos son muy superiores a los descritos en el estado de la técnica, por tanto se considera que la cepa descrita en la reivindicación 1 es nueva y posee actividad inventiva.

El uso de la cepa para la elaboración de vinos según la reivindicaciones 2 y 3 es por consiguiente nuevo y tiene actividad inventiva.

1.2 Las reivindicaciones 1 a 3 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva conforme a los Artículos 6 y 8 de la ley de Patentes.