



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 095**

② Número de solicitud: 200900436

⑤ Int. Cl.:
C12N 1/18 (2006.01)
C12G 1/022 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **16.02.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2010**

Fecha de la concesión: **01.04.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **13.04.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
13.04.2011

⑰ Titular/es: **Bodegas Vega Sicilia S.A. Unipersonal
Finca Vega Sicilia - Ctra. N-122, Km. 323
47359 Valbuena de Duero, Valladolid, ES**

⑱ Inventor/es: **Rubio Coque, Juan José;
Álvarez Pérez, José Manuel;
Álvarez Rodríguez, María Luisa y
Alonso Monroy, Alberto**

⑲ Agente: **Urizar Barandiarán, Miguel Ángel**

⑳ Título: **Asociación microbiana de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en procesos de vinificación de mostos.**

㉑ Resumen:

Asociación microbiana de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en procesos de vinificación de mostos.

Asociación microbiana de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 y su aplicación en procesos de vinificación de mostos.

Estas tres cepas de levadura se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en la Universidad de Valencia, correspondiéndoles respectivamente a cada una de ellas el siguiente número de acceso en la colección: CECT13020, CECT13021 y CECT13022.

Las tres cepas se han aislado a partir de fermentaciones espontáneas sucesivas en Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión (Denominación de Origen Ribera de Duero), donde forman una asociación microbiana altamente competitiva por su capacidad para imponerse en vinificaciones espontáneas repetidas a otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (y a otras especies de levaduras comúnmente presentes en vino) limitando al máximo su crecimiento, e impidiendo su implantación en la fase tardía de la fermentación alcohólica.

ES 2 344 095 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Asociación microbiana de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en procesos de vinificación de mostos.

Una asociación microbiana altamente competitiva de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 y su aplicación en procesos de vinificación de mostos.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a 3 cepas de levaduras vínicas que pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, seleccionadas por investigadores de la Universidad de León y del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) a partir de fermentaciones espontáneas realizadas con mosto procedente de uvas de la variedad Tempranillo. Se trata de levaduras vínicas autóctonas de la microbiota de la zona acogida a la Denominación de Origen Ribera de Duero, y más concretamente de microbiota autóctona de Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión, ya que su patrón genético elaborado en base a la técnica del RFLP de ADN mitocondrial no ha sido detectado ni en levaduras existentes en el mercado ni en levaduras aisladas en otros estudios.

Estas cepas forman una asociación o consorcio microbiano novedoso, altamente efectivo en el control de fermentaciones espontáneas, puesto que se han mostrado como dominantes a lo largo de 4 vendimias consecutivas. De hecho la asociación de cepas aquí descrita desplaza de manera absoluta a decenas de otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* detectadas en mosto y fase temprana de fermentación alcohólica, y que sin embargo nunca se detectan en la fase tardía del proceso fermentativo, que esta asociación de cepas domina totalmente.

Aunque estas cepas podrían ser usadas individualmente, o en distintas combinaciones, es especialmente recomendable su uso conjunto como agentes de vinificación para la fermentación de mostos para la obtención de vinos con excelente calidad y características organolépticas y físico-químicas reproducibles.

Antecedentes de la invención

Existen dos grandes estrategias de vinificación para fermentar mosto de uva: la realización de fermentaciones espontáneas o el empleo de levaduras comerciales [Pretorius, 2000; Yeast 16, 675-729].

Tradicionalmente el vino se ha venido produciendo por fermentación espontánea del mosto realizada por la microbiota indígena de levaduras autóctona presentes en cada bodega y/o región geográfica. Esta estrategia de vinificación puede producir problemas de reproducibilidad en la calidad de los vinos, ya que la microbiota de levaduras presentes en una bodega, o en el hollejo de la uva, puede variar de año a año dependiendo sobre todo de factores climáticos y ambientales. Sin embargo, esta estrategia genera vinos con un mayor tipismo organoléptico.

Para corregir estos problemas de reproducibilidad en la calidad de los vinos en los últimos años se ha desarrollado una mayoritaria tendencia a emplear levaduras comerciales seleccionadas o levaduras secas activas (LSAs). Esta metodología, aunque permite desarrollar fermentaciones más rápidas y reproducibles, y por tanto permite obtener vinos con unas propiedades finales más fácilmente predecibles tiene sus inconvenientes. En primer lugar el empleo de levaduras comerciales seleccionadas de otras áreas geográficas o de otras variedades de uva puede plantear problemas de implantación, por su pobre adaptación a las características del mosto, tecnología de vinificación, etc., siendo desplazadas por las levaduras autóctonas. Por otro lado, por tratarse de levaduras ajenas pueden generar aromas y sabores distintos de los típicos y tradicionales de un determinado tipo de vino. Además su empleo masivo y continuado año tras año puede acabar desplazando a las levaduras locales autóctonas, con la consiguiente pérdida de poblaciones microbianas y características genéticas de interés. Por último, y dado que el número de levaduras comerciales en el mercado es limitado su empleo sistemático genera vinos organolépticamente más parecidos, con menores diferencias y más difíciles de distinguir por el consumidor.

Una alternativa al empleo de levaduras comerciales es la selección y empleo de levaduras autóctonas, que en muchos casos son típicas de una bodega. Su utilización como herramienta fermentativa permitiría por un lado evitar los problemas de reproducibilidad y por otro dotar al vino de una serie de características organolépticas propias más acordes con los vinos de una determinada región, y que además permitirían acentuar el carácter distinto de un vino frente a otros vinos competidores [Querol *et al.*, (1992). J. Food Sci. 57,183-185. Ciani *et al.*, (2006). Int. J. Food Microbiol. 108, 239-245. Romano *et al.*, (2003). Int. J. Food Microbiol. 86, 169-180].

La selección de levaduras vínicas se realiza generalmente entre cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que poseen una serie de características enológicas básicas (elevada capacidad fermentativa, elevado rendimiento alcohólico, producción de toxina killer, resistencia al anhídrido sulfuroso, o baja producción de acidez volátil entre otras y suele realizarse empleando la metodología descrita por distintos autores [Caridi y Tini, (1991). Vignevini. 12, 62-66; Delteil y Lozano, (1995). Rev. Fr. Oenol. 153, 79-82].

Se han descrito numerosas levaduras locales seleccionadas de distintas regiones productoras de vinos españoles, como por ejemplo, Alicante [Querol *et al.*, (1992). J. Food Sci. 57, 183-185], Bajo Miño [Angulo *et al.*, (1993). Viticultura/Enología Profesional, 27, 28-36], Castilla-La Mancha [patente española ES 2180397, Pérez-Coello *et al.*,

ES 2 344 095 B1

(1999). Food Microbiol. 16, 563-573], El Penedés [Esteve-Zarzoso, B., *et al.*, (2000), Food Microbiol. 17, 553-562], Extremadura [patente española ES 2089982. Regodón, J.A., *et al.*, (1996). Alimentaria, 269, 73-77], La Rioja [Gutiérrez *et al.*, (1997). Viticultura/Enología Profesional, 51, 36-43], Navarra [De León, M.A., *et al.*, (1994). Navarra Agraria, 86, 50-58], Valdepeñas [patente española ES 2091723], etc.

5 Si embargo, algunos estudios indican que existe una gran variabilidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, incluso entre bodegas muy cercanas pertenecientes a una misma Denominación de Origen o región geográfica, o lo que es lo mismo, que la mayor parte de las bodegas pueden poseer levaduras vínicas autóctonas típicas o exclusivas (especialmente en aquellas bodegas más antiguas y que serían consecuencia de largos procesos evolutivos de las poblaciones microbianas asentadas en esas bodegas) que podrían ser seleccionadas y empleadas industrialmente para obtener vinos con características organolépticas distintivas de otras bodegas cercanas [Versavaud *et al.*, (1995). Appl. Environ. Microbiol., 61, 3521-3529; Le Jeune *et al.*, (2006). Food Microbiol, 23, 709-716].

15 Este hecho ha sido investigado por el solicitante, a fin de poder desarrollar esta asociación de levaduras seleccionadas autóctonas de estas bodegas, con el objetivo de elaborar vinos con características organolépticas más acusadas y típicas. Además, no se han descrito previamente levaduras locales seleccionadas de la Denominación de Origen Ribera de Duero.

Descripción detallada de la invención

20 A).- Cepas *Saccharomyces cerevisiae* VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

25 En un aspecto la invención se relaciona con 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas a partir de la microbiota de levaduras presente en Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión, autóctonas de dichas bodegas y de la Denominación de Origen Ribera de Duero y que forman un consorcio o asociación altamente efectiva para el control de fermentaciones alcohólicas de mostos.

30 Los cultivos respectivos de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* denominadas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 están conservadas y depositadas de forma permanente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en Universidad de Valencia; Edificio de investigación; Campus de Burjassot; 46100-Burjassot (Valencia), con los números de acceso respectivos CECT 13020; CECT 13021 y CECT 13022.

35 Las mencionadas cepas han sido aisladas y seleccionadas de entre un total de 980 clones de *Saccharomyces cerevisiae* analizados. Dichos clones se aislaron a partir de muestras correspondientes a uvas y muestras de las fases temprana, media y tardía de la fermentación alcohólica de mostos de Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión correspondientes a las cosechas 2004, 2005, 2006 y 2007. Para su aislamiento se recurrió a la realización de diluciones sucesivas y plaqueo en medio selectivo WL. Todas ellas han sido caracterizadas por su perfil genético mediante el análisis RFLP de ADN mitocondrial con las endonucleasas de restricción AluI, HinfI y RsaI de acuerdo a la metodología descrita por Guillamón *et al.* [Int. J. Syst. Bacteriol., (1994), 44: 708-714.] y por sus propiedades enológicas. Todas ellas exhiben una muy eficaz tasa de implantación en mostos frente al resto de la microbiota indígena.

45 Las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 han sido identificadas a nivel de género y especie mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo a los criterios establecidos por Kurtzman y Fell [The yeast. A taxonomic study. 4th Edition. Elsevier Science, Amsterdam (1998)] y pruebas de Biología Molecular (secuenciación de los dominios D1-D2 del ADN ribosomal 26S), de acuerdo a la metodología descrita por Villa-Carbajal *et al.* [FEMS Yeast Research, (2004), 4: 745-750].

Las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 presentan, entre otras, las características que se indican a continuación:

50 A1).- *Morfología*

a).- En medio líquido YPD (extracto de levadura-peptona-glucosa) presentan una morfología elíptica-globosa y multiplicación vegetativa por gemación multilateral.

55 b).- En medio sólido WL colonias redondeadas, ligeramente abombadas, de textura cremosa, inicialmente blancas que van pasando a coloraciones verdosas con el centro más oscuro.

60 c).- La capacidad de esporulación se determinó en un medio pobre en glucosa que contenía acetato potásico, extracto de levadura y agar, formando ascosporas redondeadas en un número de 1-4 por asca.

d).- En caldo extracto de malta dan lugar a sedimento

e).- No crecen en medio selectivo agar lisina.

65 f).- En medio agar-glucosa patata formación de un pseudomicelio (+) rudimentario.

ES 2 344 095 B1

A2).- *Metabolismo de distintos compuestos y otros rasgos fisiológicos*

A2a).- Fermentación de carbohidratos. En condiciones anaerobias todas las cepas son galactosa (+); glucosa (+); lactosa (-); maltosa (+); melibiosa (-); rafinosa (+) y sacarosa (+).

A2b).- Asimilación de compuestos de carbono. En condiciones aerobias todas las cepas son glucosa (+), 2-cetogluconato (-), arabinosa (-), xilosa (-), adonitol (-), xilitol (-), galactosa (+), inositol (-), sorbitol (-), metilglucopiranososa (-), N-acetil-glucosamina (-), celobiosa (-), lactosa (-), trehalosa (-) y melezitosa (-). La cepa VS3/BA17 es glicerol (+), mientras que las cepas VS1/BA2 y VS4/BA5 son glicerol (-). Las cepas VS1/BA2 y VS3/BA17 son maltosa (+) y la cepa VS4/BA5 es maltosa (-). La cepa VS3/BA17 es rafinosa (+), mientras que las cepas VS1/BA2 y VS4/BA5 son rafinosa (-).

A2c).- Asimilación de compuestos nitrogenados. Todas las cepas son amonio (+), nitrato (-) y lisina (-).

A2d).- Resistencia a cicloheximida. Ninguna de las cepas crece en presencia de cicloheximida (100 µg/ml).

A2e).- Crecimiento a distintas temperaturas. El crecimiento de todas las cepas es: 15°C (+), 20°C (+), 25°C (+), 30°C (+), 35°C (+/-) y 40°C (-).

A2f).- Requerimientos de oxígeno. Todas las cepas son anaerobias facultativas.

A3).- *Perfil genético de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5*

Los perfiles genéticos de estas cepas se obtuvieron mediante el análisis RFLP de su ADN mitocondrial empleando las endonucleasas de restricción AluI, HinfI y RsaI, aplicando la metodología descrita por Guillamón *et al.* [Int. J. Syst. Bacteriol., (1994), 44: 708-714.]. Los patrones de bandas de ADN mitocondrial obtenidos analizados en geles de agarosa al 0.7% (figuras 1, 2 y 3) se recogen en las Tablas 1, 2 y 3. Además de los fragmentos de ADN de los tamaños indicados (con una variación natural del ± 5% debido a la variabilidad experimental normal del protocolo empleado) cada cepa puede presentar o no, dependiendo del lote de ADN extraído, una banda adicional de tamaño comprendido entre 4850-5070 pares de bases (señalada en la tabla con un asterisco) y que se puede detectar ocasionalmente en la digestión con cada una de las enzimas empleadas.

Tabla 1).- RFLP de ADN mitocondrial con la endonucleasas de restricción AluI para bandas de un tamaño superior a 2200 pares de bases. Los tamaños (± 5%) se expresan en pares de bases

Cepa VS1/BA2	Cepa VS3/BA17	Cepa VS4/BA5
11900	11800	11800
7800	7330	7720
6280	6000	6010
5900	5290	5810
4990*	5010*	5000*
4200	4300	4310
3412	3451	3433
2540	2448	2419
2350	2323	2245

ES 2 344 095 B1

Tabla 2).- RFLP de ADN mitocondrial con la endonucleasas de restricción HinfI para bandas de un tamaño superior a 1900 pares de bases. Los tamaños ($\pm 5\%$) se expresan en pares de bases

Cepa VS1/BA2	Cepa VS3/BA17	Cepa VS4/BA5
5070*	5000*	6500
4450	4460	5070*
3845	3690	4530
3531	3601	4300
2830	3080	3530
2707	2792	2993
2521	2608	2843
2380	2425	2696
2177	2392	2515
1945	1946	2400
		1951

Tabla 3).- RFLP de ADN mitocondrial con la endonucleasas de restricción RsaI para bandas de un tamaño superior a 1900 pares de bases. Los tamaños ($\pm 5\%$) se expresan en pares de bases

Cepa VS1/BA2	Cepa VS3/BA17	Cepa VS4/BA5
11100	11000	10900
8770	8390	8370
8630	6680	6990
7120	6010	6240
6240	5640	5740
5720	5390	5620
5360	3673	4960*
5030*	2214	3517
3577		3035
2229		2229

ES 2 344 095 B1

5 A4).- *Obtención de los aislados.* El aislamiento de la cepas seleccionadas se describe de manera más detallada en el ejemplo 1.1. Brevemente, las cepas se aislaron a partir de fermentaciones industriales correspondientes a las cosechas 2004, 2005, 2006 y 2007 realizadas en Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión a partir de uva de la variedad Tempranillo. Para ello se tomaron muestras diarias de 50 ml durante todos los días que duró el proceso de la fermentación alcohólica, hasta darlo por finalizado en base a la determinación de niveles residuales de azúcares y estabilización de la densidad del proceso fermentativo.

10 A5).- *Características enológicas.* Como puede apreciarse en el ejemplo 1.2. las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 presentan, entre otras, las siguientes características enológicas de interés industrial: buena cinética fermentativa, con una velocidad de fermentación rápida y regular; alta capacidad fermentativa; muy buena capacidad para degradación de azúcares; adecuada velocidad de sedimentación una vez completada la fermentación alcohólica; cultivo disperso en medio líquido sin mostrar tendencia a la floculación; elevada resistencia al SO₂; buena tolerancia al etanol; presencia de carácter killer resistente (fenotipo killer y neutro); baja producción de acidez volátil y escasos requerimientos nutricionales.

15 A6).- *Grado de implantación en el medio fermentativo.* Las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5, se seleccionaron inicialmente en base a su capacidad para dominar las fases media y tardía de fermentaciones industriales realizadas en los años 2004, 2005, 2006 y 2007. A lo largo de la fermentación alcohólica estas cepas compitieron con otras muchas cepas a las que acabaron imponiéndose, lo que indica su gran adaptación a las condiciones del mosto, a las instalaciones de bodega y a las prácticas enológicas realizadas. Además y como se indica en el ejemplo 1.3, cuando se emplearon como cultivos iniciadores, todas las cepas mostraron una alta tasa de implantación en el medio fermentativo, debido a su alto grado de competitividad frente a la microbiota indígena. El empleo conjunto de las 3 cepas como un consorcio microbiano, incluso aunque la cantidad de células vivas sembradas sea baja (1500 células por ml de mosto a razón de 500 células por ml de cada cepa de la asociación) evita la implantación en fase tardía de cualquier otra cepa de levadura.

20 A7).- *Capacidad de floculación.* La capacidad de floculación se determinó según el método de Caillet (1991) como se describe en el ejemplo 1.2. Todas las cepas tienen baja capacidad floculante.

25 A8).- *Pruebas de congelación y liofilización.* Las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 mostraron una alta tasa de viabilidad después de ser sometidas a procesos de congelación (ejemplo 1.4) y liofilización y posterior rehidratación (ejemplo 1.4).

30 B).- *Producción de biomasa de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5*

35 En otro aspecto la invención proporciona un procedimiento para obtención de biomasa que permite cultivar las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 bajo diferentes condiciones de crecimiento que se indican en el ejemplo 2. Tales condiciones caen dentro del ámbito del conocimiento propio de un experto en la materia. El empleo de estas cepas en la producción de biomasa constituye un aspecto adicional de esta invención.

40 C).- *Aplicaciones de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5*

45 La asociación de cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 pueden ser empleadas en la elaboración de vinos blancos, tintos o rosados, por fermentación de mostos de uva de cualquier variedad de *Vitis vinifera*, aunque su empleo está especialmente indicada en la elaboración de vinos tintos cuya base principal sea uva de la variedad tempranillo.

50 Estas cepas pueden ser empleadas en diferentes combinaciones, aunque su mayor efectividad se pone de manifiesto cuando son empleadas conjuntamente como una asociación. En este caso los vinos obtenidos mediante el empleo de estas levaduras son de una calidad superior que los elaborados por procesos de fermentación espontánea. Su empleo además permite homogeneizar el desarrollo del proceso de la fermentación alcohólica, para producir vinos que poseen características físico-químicas y organolépticas reproducibles.

55 El empleo de la asociación de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5 en la elaboración de vinos proporciona numerosas ventajas. En particular, su empleo en bodegas acogidas a la D.O. Ribera de Duero permite: (I).- elaborar vinos con prácticas ecológicas; (II).- elaborar vinos con características físico-químicas y organolépticas que potencian las características varietales propias de la variedad de uva tempranillo, por tratarse de levaduras perfectamente adaptadas a la composición química del mosto obtenido a partir de esta variedad de uva, obteniéndose así vinos de mayor tipicidad; (III).- disponer de una gama de levaduras autóctonas y locales seleccionadas típicas de la D.O. Ribera de Duero para llevar a cabo fermentaciones alcohólicas dirigidas durante el proceso de vinificación; (IV).- controlar el proceso fermentativo del mosto, evitando la aleatoriedad del proceso intrínseca a las fermentaciones espontáneas, ya que no va a depender de variaciones anuales en la composición de la población de levaduras presentes en el hollejo de la uva o las instalaciones de bodega, debida a factores ambientales o de otro tipo; (V).- evitar o limitar el desarrollo de otras especies de levaduras que pueden provocar desviaciones organolépticas; (VI).- potenciar la calidad de los vinos; (VII).- asegurarse de que el proceso fermentativo es dirigido realmente por la levadura o levaduras inoculadas debido a su gran capacidad competitiva frente a otras levaduras autóctonas, hecho que determina que tengan una muy alta tasa de implantación. Ello permite que actúen como agentes biológicos responsables del proceso fermentativo de mostos

ES 2 344 095 B1

de uva no estériles, hecho de gran relevancia en regiones cálidas, donde la implantación de levaduras seleccionadas durante la fermentación es un problema, al no estar garantizada su dominancia, debido al mayor contenido microbiano de los mostos.

5 *Las descripciones y figuras siguientes ilustran la invención, aunque no deber ser consideradas limitativas del alcance de la misma.*

Figura 1: Perfil genético de las cepas obtenido mediante RFLP de ADN mitocondrial con el enzima de restricción AluI. Carril 1).- Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder plus (Fermentans Life Sciences). Se indican a la izquierda los tamaños de las bandas en pares de bases (pb); carril 2).- cepa VS1/BA2 (CECT 13020); carril 3).- cepa VS3/BA17 (CECT 13021); carril 4).- cepa VS4/BA5 (CECT 13022).

Figura 2: Perfil genético de las cepas obtenido mediante RFLP de ADN mitocondrial con el enzima de restricción HinfI. Carril 1).- Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder plus (Fermentans Life Sciences). Se indican a la izquierda los tamaños de las bandas en pares de bases (pb); carril 2).- cepa VS1/BA2 (CECT 13020); carril 3).- cepa VS3/BA17 (CECT 13021); carril 4).- cepa VS4/BA5 (CECT 13022).

Figura 3: Perfil genético de las cepas obtenido mediante RFLP de ADN mitocondrial con el enzima de restricción RsaI. Carril 1).- Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder plus (Fermentans Life Sciences). Se indican a la izquierda los tamaños de las bandas en pares de bases (pb); carril 2).- cepa VS1/BA2 (CECT 13020); carril 3).- cepa VS3/BA17 (CECT 13021); carril 4).- cepa VS4/BA5 (CECT 13022).

Obtención y caracterización de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

1.1).- Aislamiento y caracterización de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

Para el aislamiento y caracterización de estas cepas se rastrearon un total de 980 clones de cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a partir de fermentaciones industriales realizadas con mosto procedente de uva de la variedad Tempranillo. Las uvas procedían de parcelas pertenecientes a las subzonas de Valbuena de Duero, Quintanilla de Arriba, Padilla de Duero y Pesquera de Duero, que están incluidas dentro de la Denominación de Origen Ribera de Duero.

El aislamiento de las cepas se realizó como sigue: muestras de 50 ml de cultivo se tomaron cada 24 horas, comenzando inmediatamente después del encubado y hasta completar la fermentación alcohólica de los mostos, según se determinó en función de los niveles residuales de azúcares y la estabilización de la densidad del mosto fermentado. Las muestras se tomaron a partir de depósitos de fermentación industriales correspondientes a las cosechas 2004, 2005, 2006 y 2007 en Bodegas Vega Sicilia y Bodegas Alión. De cada muestra realizamos diluciones decimales sucesivas en solución salina estéril (cloruro sódico al 0.9%). De cada dilución (por duplicado) se tomaron muestras de 0.1 ml que se sembraron en placas petri conteniendo medio WL nutrient agar suplementado con cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas y seguidamente se seleccionaron aquellas que contenían un número representativo de colonias (comprendido entre 30-300). De cada placa se eligieron aquellas colonias que presentaron características morfológicas diferenciables macroscópicamente (tamaño, color y forma de la colonia, tipo de borde) y un número variable de colonias de idéntica morfología seleccionadas al azar. Los distintos clones fueron purificados mediante resiembra por agotamiento en placas de petri de medio WL. Una vez aislados los distintos clones purificados se conservaron congelados a -20°C en solución de glicerol al 20%.

Para cada clon aislado se procedió a aislar su ADN total y seguidamente cada clon fue sometido a un análisis genético doble: (i). Por un lado se realizó un análisis de tipo RFLP de la región ITS-5.8S que contiene los genes ribosomales de acuerdo con la metodología descrita por Guillamón *et al.* [Arch. Microbiol., (1998), 169: 387-392.] y Villa-Carbajal *et al.* [FEMS Yeast Res., (2004), 4:745-750] entre otros, a fin de confirmar que los clones analizados pertenecían a la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y (ii), seguidamente se procedió a realizar un análisis de tipo RFLP de ADN mitocondrial de acuerdo a la metodología descrita por Guillamón *et al.* [Int. J. Syst. Bacteriol., (1994), 44: 708-714.] a fin de diferenciar entre cepas diferentes de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y determinar a que cepa pertenecía cada clon analizado. De esta manera se identificaron un total de 32 cepas diferentes en función de los perfiles de RFLP de ADN mitocondrial con las enzimas de restricción AluI, HinfI y RsaI.

Del total de 32 cepas diferentes se seleccionaron aquellas que destacaban por su capacidad para imponerse a otras levaduras autóctonas en fermentaciones espontáneas, incluso durante varias añadas sucesivas, demostrando una gran capacidad competitiva, buenas cualidades fermentativas y gran adaptación a las condiciones físico-químicas del mosto y a las prácticas enológicas realizadas en la bodega.

Estas cepas se sometieron a pruebas enológicas excluyentes entre las que se encuentran la determinación de capacidad fermentativa, formación de espuma, capacidad de floculación, resistencia al SO₂, etc. Finalmente se seleccionaron las cepas identificadas como VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5, depositadas en la CECT con los números de acceso CECT 13020; CECT 13021 y CECT 13022, respectivamente. Dichas cepas presentan las características morfológicas, metabólicas, fisiológicas y genéticas (perfil genético) mencionadas en la descripción [subapartados A1, A2 y A3 del

ES 2 344 095 B1

apartado A de la “Descripción detallada de la invención”]. Las características enológicas de dichas cepas se describen a continuación.

1.2).- Características enológicas de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

El poder fermentativo, energía fermentativa, capacidad de degradación de azúcares, cinética de fermentación, velocidad de sedimentación, formación de espuma y tipo de cultivo se determinaron realizando microvinificaciones en botellas de vidrio con mosto estéril. Los frascos con mosto fueron inoculados por duplicado con cada cepa de levadura e incubados a 25°C hasta finalización de fermentación alcohólica (media de unos 20 días) en condiciones de semiaerobiosis. La cinética de fermentación se determinó mediante pesada diaria de las botellas hasta valor constante, efectuándose las correcciones de peso con una botella control que contenía mosto sin inocular, determinándose los gramos de CO₂ desprendidos/día. Una vez finalizada la fermentación alcohólica a los vinos se les determinó el grado alcohólico y el nivel de azúcares reductores residuales (Análisis realizados según la normativa aplicable al sector del vino. Reglamento CEE 2676/90).

Todas las cepas presentan un poder fermentativo superior a 13,8% vol. de etanol. La energía fermentativa de todas las cepas fue muy similar y osciló entre 2.498 y 2.549, expresada en g de CO₂ desprendidos en 48 horas. Su capacidad de degradación de azúcares de mosto es muy elevada, dejando los vinos secos con las siguientes cantidades de azúcares residuales: VS1-BA2 (1.75 g/L), VS3-BA17 (1.88 g/L), VS4/BA5 (2.00 g/L). La cinética de fermentación es correcta: aplicando una cantidad suficiente de inóculo permiten un rápido inicio de la fermentación alcohólica, aún en el caso de bajas temperaturas. La velocidad de fermentación es rápida y regular con formación de poca espuma. La velocidad de sedimentación, expresada en días transcurridos desde la inoculación del mosto, en la que se aprecia una patente sedimentación de los cultivos se estimó entre 7 y 11 días. El tipo de cultivo es, según estimación visual, disperso y no muestran tendencia a la floculación.

La capacidad de floculación se determinó según el método de Caillet, 1991, que consiste en medir la densidad óptica a 620 de una suspensión de células preparada en tampón de Helm, a los 10 minutos de haberla agitado. En cada caso se calculó el % de células que permanecen en suspensión determinándose que más del 96% de las células permanecen en suspensión transcurridos 10 minutos, lo que indica que se trata de cepas poco floculantes (valor 0 en el índice de Caillet).

La resistencia al SO₂ se realizó en tubos que contenían 8 ml de medio YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) ajustado a pH 3.8 y suplementado con 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mg de SO₂ total/L. La concentración de SO₂ en cada caso se alcanzó por la adición de la cantidad correspondiente de una solución estéril de metabisulfito potásico (30 g/L). En paralelo se prepararon tubos control conteniendo YPD a los que no se adicionó metabisulfito potásico. Los distintos tubos se prepararon por duplicado y se inocularon con cantidades idénticas de cada levadura para a continuación incubarse a 25°C durante 15 días. Tras el periodo de incubación la resistencia al SO₂ se determinó utilizando como indicativo de crecimiento el aumento de la turbidez del medio en los tubos inoculados, por comparación con los tubos testigo, mediante espectrofotometría. Todas las cepas resisten 200 mg/de SO₂ total/L.

La tolerancia al etanol se determinó en tubos conteniendo 8 ml de medio YPD ajustado a pH 3.8. Al medio se le añadieron cantidades crecientes de etanol absoluto hasta alcanzar concentraciones finales de 10, 11, 12, 13 y 14% (vol/vol). En paralelo se prepararon tubos control conteniendo YPD pero sin etanol. Los distintos tubos, por duplicado, se inocularon con idéntico número de células de cada levadura y seguidamente se incubaron durante 15 días a 25°C. Tras la incubación se determinó el grado de tolerancia al etanol, utilizándose como indicativo de crecimiento el aumento de la turbidez de los tubos inoculados, frente a los tubos testigo, mediante espectrofotometría visible. Todas las cepas seleccionadas toleran el etanol ya que son capaces de crecer a 13% de etanol.

El fenotipo killer se determinó según la técnica de Somers y Bevan [Somers J.M. y Bevan E.A. (1969). Genet. Res. Camb. 13, 71-83] con ligeras modificaciones. Para ello se utilizaron dos placas de medio YPD sólido y azul de metileno a pH 4.2 por cepa analizada. Una de las placas se sembró por inundación con una cepa killer resistente (K₂+R₂+) y la otra con una cepa killer sensible (K⁻R⁻). Cada cepa a analizar se sembró por estría en el centro de cada placa y a continuación se incubaron a 25°C durante 48 horas.

1.3).- Grado de implantación en el medio fermentativo de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

El grado de implantación de cada cepa en el medio fermentativo se determinó en muestras tomadas al final de la fermentación alcohólica (densidad 993-998 g/L) correspondiente a distintas microvinificaciones realizadas con mosto de uva de la variedad Tempranillo. A partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de Petri conteniendo medio WL. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas y se eligieron aquellas placas que contenían un número de colonias comprendido entre 30 y 300. De cada placa se eligieron al azar 30 colonias, para las que se determinó su perfil genético. La determinación del perfil genético se determinó mediante la técnica del RFLP de ADN mitocondrial ya descrita en el ejemplo 1.1. En este caso cada cepa se analizó empleando únicamente el enzima de restricción AluI. En concreto se realizaron microvinificaciones tanto espontáneas (para reflejar la variedad normal de la microbiota del proceso fermentativo y que por no ser inoculadas nos sirven como testigo), como inoculadas con cada cepa seleccionada (se realizó para cada cepa una inoculación con 1500 células de levadura por ml de mosto). En este caso el grado final de implantación de cada cepa osciló entre el 55-80% dependiendo de la cepa y la cosecha analizada. Además se realizaron microvinificaciones inoculadas con la asociación formada por las 3 levaduras

ES 2 344 095 B1

seleccionadas. Para ello se empleó una mezcla en la que las 3 cepas estaban en la misma proporción, que se añadió al mosto a razón de 1500 células de levadura por ml de mosto. En este caso el grado de implantación de la asociación de levaduras fue siempre del 100% en todas las fermentaciones analizadas.

5 1.4).- Pruebas de congelación y liofilización de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

Las cepas seleccionadas fueron sometidas a pruebas de resistencia a la congelación para su conservación. Para ello se congelaron cultivos crecidos en medio YPD líquido de una densidad óptica de 10 determinada espectrofotométricamente a 600 nm. Los cultivos se congelaron en presencia de glicerol al 40% y se conservaron a -20°C y -80°C por un periodo mínimo de un año. Transcurrido este tiempo se descongelaron los cultivos y se realizó un recuento de células viables por la realización de diluciones seriadas y siembra en medio WL sólido. Todas las cepas mostraron una alta viabilidad a la congelación/descongelación (superior al 88%).

Además todas las cepas fueron sometidas a pruebas de liofilización utilizando un liofilizador Virtis (Modelo: Genesis 12 LE), empleando como solución protectora leche desnatada, glicerol y glucosa. Considerando que todas las cepas sometidas a liofilización experimentan una pérdida de viabilidad, los resultados obtenidos para las 6 cepas ensayadas son aceptables, conservando todas sus propiedades y consiguiéndose una buena viabilidad tras la rehidratación, del mismo rango que la levadura comercial empleada como control.

20 Producción de biomasa de las cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

Se utilizaron tres metodologías diferentes a fin de probar la versatilidad de cada cepa a la hora de producir biomasa.

25 2.1).- Producción de biomasa por crecimiento en matraces en condiciones aeróbicas

Para ello se utilizaron matraces de 2 L que contenían 0.5 L de medio YPD. Cada matraz se inoculó con 2.5 ml de un cultivo desarrollado en YPD de D.O. 1 estimada espectrofotométricamente a 600 nm. Los matraces se incubaron a 25°C con agitación constante de 200 r.p.m en un incubador orbital. El crecimiento se determinó cada 24 horas. Durante el proceso se comprobó la homogeneidad del cultivo mediante observación directa al microscopio óptico. Una vez finalizada la incubación la viabilidad celular se chequeó mediante recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Todas las cepas crecieron con gran rapidez en estas condiciones obteniéndose una gran cantidad de biomasa y una viabilidad igual o superior a la de la levadura comercial empleada como control.

35 2.2).- Producción de biomasa en fermentador

El estudio se realizó en un fermentador de laboratorio Biostat-A de 2.5 L, controlando los distintos parámetros que afectan a las cepas tales como O₂ disuelto, pH, espuma, acidez y temperatura. Para el desarrollo de los cultivos se empleó 1.5 L de medio YPD líquido que fue inoculado con un precultivo de cada levadura hasta obtener una suspensión celular de D.O. = 0.1 (determinada a 600 nm). El pH del cultivo se mantuvo constante en un valor de 5.5 y la temperatura de incubación fue de 30°C. Finalmente la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constante en el 30%. El crecimiento y la viabilidad celular se monitorizaron como se indica en el apartado anterior. En estas condiciones todas las cepas mostraron una producción de biomasa rápida y homogénea con una elevada viabilidad celular, del mismo orden de magnitud que la cepa comercial usada como testigo.

45 2.3).- Obtención de biomasa por crecimiento en cultivo estático en mosto

En este caso se chequeó la producción de biomasa por inoculación de 0.8 L de mosto de uva esterilizado por filtración en un matraz de 1 L. El cultivo se incubó a 28°C hasta consumo casi total de azúcares. El crecimiento y la viabilidad celular se monitorizaron como se indica en los dos apartados anteriores. En este caso la biomasa producida por todas las cepas fue considerablemente menor, pero se trata de células adaptadas a la fermentación alcohólica y con una elevada tolerancia al etanol que se pueden usar como inóculos directos para otros mostos sin fermentar.

55 Ejemplo

Características químicas y sensoriales de los vinos elaborados utilizando la asociación de cepas VS1/BA2, VS3/BA17 y VS4/BA5

Las cepas indicadas han sido empleadas conjuntamente como iniciadores de la fermentación alcohólica para la elaboración de vinos a partir de mostos de uva de la variedad Tempranillo o Tintal del país.

Las elaboraciones se han realizado en bodega experimental utilizando depósitos de acero inoxidable de 1.500 L en los que se encubaron 1.000 Kg de uva, prensada y despalillada.

Cuando se aplica una siembra suficiente (al menos de 1.500 células vivas por ml de mosto) los procesos fermentativos se inician rápidamente, siendo el periodo de latencia corto, aunque en relación con el número de células empleadas en el inóculo. El rendimiento azúcar/etanol para todas las cepas ensayadas es óptimo.

ES 2 344 095 B1

La capacidad de las cepas para imponerse a la microbiota de levaduras autóctona es absoluta, de modo que en las fases media y tardía de la fermentación alcohólica el 100% de las cepas aisladas, e identificadas por la técnica RFLP de ADN mitocondrial pertenecen en cada caso a la cepa utilizada como inóculo. Se evita así el desarrollo de cualquier cepa o especie de levadura que pudiera ser potencialmente nociva.

5

La cinética de la fermentación, realizada a 22-28°C, es muy regular, finalizando el proceso fermentativo a los 7-10 días, dependiendo de nuevo de la cantidad de células inoculadas. El análisis microscópico de muestras tomadas a lo largo del proceso fermentativo muestra células de levadura, de morfología esférica, grandes y en ocasiones gemantes, capaces de consumir totalmente el azúcar del mosto y con muy poca producción de espuma.

10

La acidez volátil de los vinos producidos es escasa, con ausencia de aromas y sabores desagradables y baja producción de acetaldehído y acetato de etilo. El análisis sensorial de los vinos producidos es óptimo, con aromas varietales característicos de la variedad de uva empleada y aromas fermentativos que mejoran las características organolépticas de vinos elaborados por fermentaciones espontáneas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 095 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Asociación microbiana de nuevas Cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, depositadas en la CECT con los números de acceso CECT13020; CECT13021 y CECT13022.

2. Asociación microbiana de Cepas según la reivindicación 1 en forma liofilizada o deshidratada.

10 3. El uso de la asociación microbiana de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CECT13020; CECT13021 y CECT 13022 de la reivindicación 1 para la elaboración de bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación alcohólica.

4. El empleo de la asociación microbiana de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CECT13020; CECT13021 y CECT13022, según la reivindicación 3, en el que dicha bebida alcohólica se selecciona entre vino, cerveza y sidra.

15 5. El uso de la asociación microbiana de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CECT13020; CECT13021 y CECT 13022 de la reivindicación 1, para la elaboración de vinos blancos, rosados o tintos a partir de mostos de uva de cualquier variedad de *Vitis vinifera* española o extranjera, sometidos a cualquier modificación.

20 6. El empleo de la asociación microbiana cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CECT13020; CECT13021 y CECT 13022 de la reivindicación 1, para la producción de biomasa.

25

30

35

40

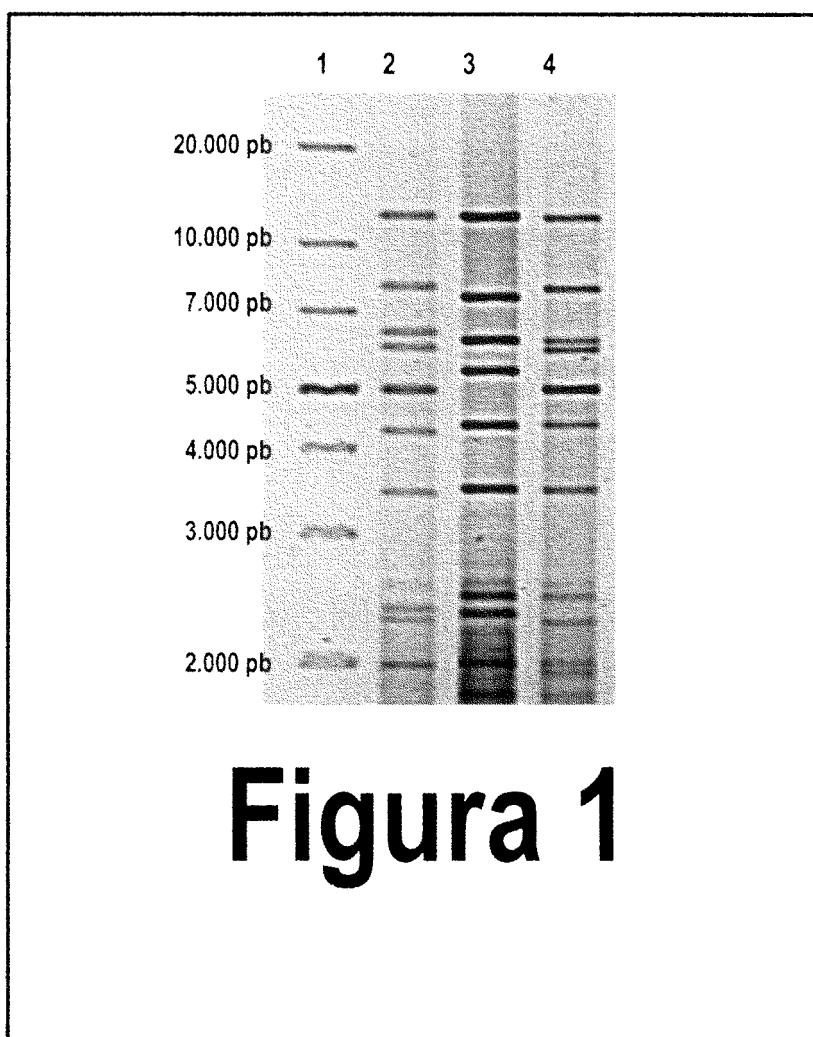
45

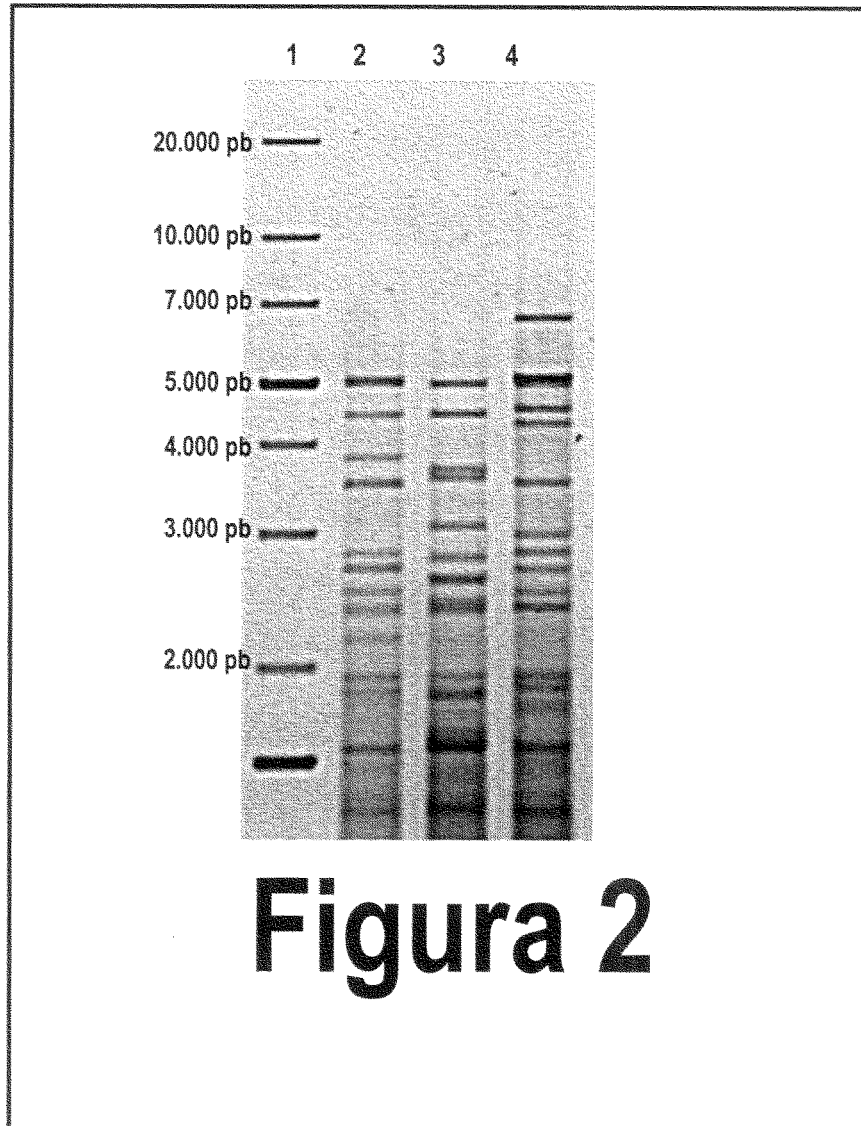
50

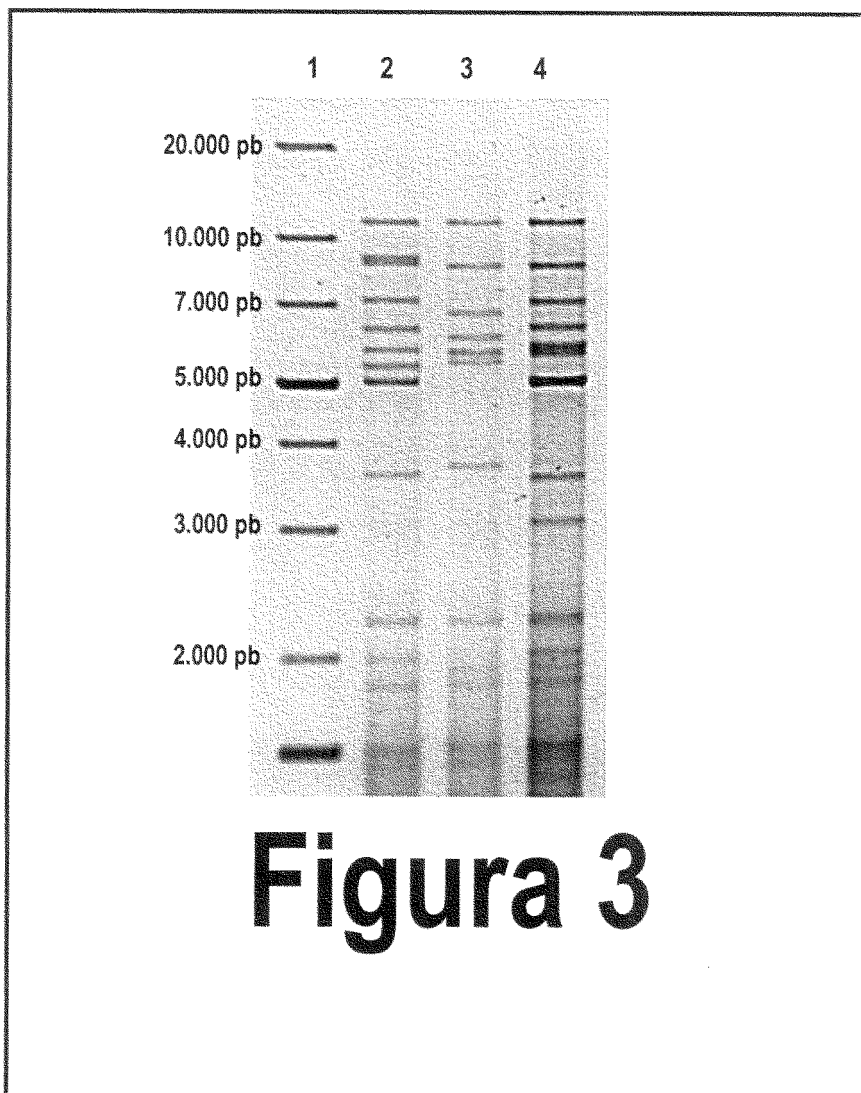
55

60

65









OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 095

② Nº de solicitud: 200900436

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2009

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
X	MORATA, A. Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la biología fermentativa en color, aroma y estructura de vinos tintos. Tesis doctoral, 2004. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros agrónomos. Capítulo III. Selección de levaduras para vinificación en tinto. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 15.06.2010] <URL:http://oa.upm.es/28/1/02200401.pdf	1-5
X	ES 2222088 A1 (IMIA) 16.01.2005, todo el documento.	1-6
X	ES 2180397 B1 (IVICAM) 01.02.2003, todo el documento	1-5
X	ES 2089982 A1 (UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA) 01.10.1996, todo el documento.	1-5
A	MAS, A et al. Selección de levaduras. Tecnología del vino. Marzo-Abril 2002, páginas 39-44. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 15.06.2010] <URL:http://www.alcion.es/DOWNLOAD/ArticulosPDF/tv/03/TVMA1DOC.pdf	
A	PRETORIUS. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 2000, vol. 16, páginas 675-729.	

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

18.06.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/18 (2006.01)

C12G 1/022 (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, FSTA, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-6	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	MORATA, tesis	2004
D02	ES 222088	16-01-2005
D03	ES 2180397	01-02-2003
D04	ES 2089982	01-10-1996
D05	MAS, et al.	2002

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

La invención se refiere a una asociación de 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (con nº de acceso CECT 13020, 13021 y 13022). En la descripción (pagina 12, línea 22-página 17, línea 24), se detalla que cada una de estas cepas ha sido aislada de mosto procedente de uvas de la variedad tempranillo cultivadas en parcelas incluidas en la Denominación de Origen Ribera del Duero y seleccionada en base a sus propiedades enológicas y a su tasa de implantación. Concretamente las características enológicas son las siguientes: un poder fermentativo superior a 13,8% vol. de etanol, una energía fermentativa de aproximadamente 2,5 g de CO₂ desprendidos en 48 horas, una capacidad de degradar azúcares de alta (1,75 a 2 g. de azúcar residual/l), velocidad de sedimentación de 7 a 11 días, poca capacidad de floculación, alta resistencia al SO₂ (200 mg/l), y tolerancia a un 13% de etanol. Las cepas se pueden además congelar a -80°C durante un año y liofilizar con una viabilidad aceptable.

Las reivindicaciones 1 a 2 se refieren a la asociación de las 3 cepas y las 4 a 6 al uso de la misma para la elaboración de bebidas alcohólicas o la producción de biomasa.

Novedad

La asociación de las cepas concretas que se mencionan en la reivindicación 1 no se ha encontrado descrita en ningún documento del estado de la técnica. Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones que se refieren a dicha asociación (1 y 2) y a su utilización (reivindicaciones 3-6) cumplen el requisito de novedad.

Actividad inventiva

Sin embargo, se considera que dicha asociación no cumple el requisito de actividad inventiva por lo siguiente:

En el documento D1 (páginas 99-114, tabla 3) se aíslan varias cepas en la fase final de la fermentación de uvas de la variedad tempranillo en bodegas de la denominación de origen Ribera del Duero, seleccionándose una de ellas (3VA) en base a criterios enológicos semejantes a los utilizados en la invención: alto poder fermentativo (hasta del 15,0%), resistencia al SO₂ (hasta 200 mg/l), baja producción de SH₂, baja acidez volátil (0,2 a 0,27 g de ácido acético/l), etc. En principio, las cepas de la invención no presentan ninguna característica técnica que las diferencie de la ya obtenida en el documento D1. Se trata de una alternativa a la cepa ya existente con las mismas características enológicas y el mismo origen que la cepa de D1. En ausencia de alguna ventaja técnica respecto a la cepa seleccionada en D1, se considera que las reivindicaciones 1 a 5 carecen de actividad inventiva.

Por otra parte, existen en el estado de la técnica diversos documentos que describen cepas aisladas y seleccionadas de diferentes denominaciones de origen, lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas (documentos D2-D4). Estas levaduras tienen la ventaja, frente a las levaduras comerciales, de estar adaptadas a las condiciones climáticas de la zona y son las responsables de las características únicas de los vinos obtenidos (tipicidad). Las cepas se seleccionan por sus características enológicas apropiadas y por su capacidad para imponerse a las demás a lo largo de la fermentación (documento D5).

Hoja adicional

Por ejemplo, el documento D2 describe unas cepas aisladas y seleccionadas de unos mostos de la Comunidad de Madrid. Las cepas tienen unas características enológicas semejantes a las de la invención y una alta tasa de implantación. La diferencia de estas cepas con las de solicitud es el origen geográfico de las cepas. El problema que soluciona la invención es obtener una cepa más apropiada para la vinificación en la denominación de origen Ribera del Duero, siguiendo un protocolo de selección semejante al descrito en D3, pero tomando como origen un mosto de la Ribera del Duero. De esta manera, se obtienen unas cepas con características enológicas muy semejantes a las de D3, pero más adaptada a la vinificación de este tipo de vino. Esta solución la llevaría a cabo un experto en la materia a la vista del documento D3, sin ejercer actividad inventiva, y con razonables probabilidades de éxito. Las cepas que se obtendrían serían cada vez distintas, es decir nuevas (dependiendo de la bodega e incluso del año de vinificación), pero que, en principio, no presentan ninguna característica técnica ventajosa respecto a las demás. Teniendo en cuenta D3, las reivindicaciones 1 a 6 carecen de actividad inventiva.