



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 356 011**

② Número de solicitud: 200930639

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **31.08.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
04.04.2011

⑥ Número de la solicitud inicial: **P 200800286**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
BODEGAS MURVIEDRO, S.A.

⑦ Inventor/es: **Querol Simón, Amparo;**
Ossorio González, Pablo;
Gómez, Ramón;
Martorell Guerola, Patricia;
Belloch Trinidad, Carmela;
Fernández-Espinar García, María Teresa y
Tarín, José

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Microorganismo fermentador productor de altas concentraciones de glicerol y sus aplicaciones en la producción de bebidas alcohólicas/vino.**

⑤ Resumen:

Microorganismo fermentador productor de altas concentraciones de glicerol y sus aplicaciones en la producción de bebidas alcohólicas/vino.

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.

ES 2 356 011 A1

DESCRIPCIÓN

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 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 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 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% 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 concreto, *S. bayanus*, es típica de fermentaciones vínicas realizadas a bajas temperaturas, y algunas cepas presen-

tan propiedades fermentativas mejores que algunas cepas de *S. cerevisiae* como incremento en la concentración de glicerol (S.S. González 2006. Tesis doctoral).

Por tanto, la utilización de cepas de *S. cerevisiae* 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 invención

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.lallemmandwine.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 *HaeIII* 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 *HaeIII*.

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 vinícola 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 vínicas 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 vínicas. 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 vínicas 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 6º 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.

ES 2 356 011 A1

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 las 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 50 mg/L (Scanes *et al.*, 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 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 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 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 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 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 rosados 1,27-3,47 mg/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 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 compuesto.

ES 2 356 011 A1

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 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 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 (0,21 mg/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 *Hae*III 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. *uvorum* al obtener el patrón de 495, 230, 125 pb.

ES 2 356 011 A1

1: banda de DNA de 325 pb.

2: banda de DNA de 230 pb.

5 3: banda de DNA de 170 pb.

4: banda de DNA de 125 pb.

5: banda de DNA de 495 pb.

10 6: banda de DNA de 230 pb.

7: banda de DNA de 125 pb.

15 Figura 2. Patrón molecular correspondiente a las cepas *S. bayanus* var. *uvarum* BM58 y *S. cerevisiae* BM60, obtenido mediante restricción del DNA mitocondrial con *Hinf*I. M, corresponde al marcador de peso molecular de lambda digerido con el enzima *Pst*I.

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

B: banda de DNA típica de BM58 de 5000 pb.

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

Ejemplos de realización de la invención

30 Ejemplo 1

Aislamiento y selección de las cepas

35 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-Zarzoso *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 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 22,27 g/L. A 12°C la levadura fermenta mejor, obteniendo solo 1,8 g/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.

55 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 12 g/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 (7-9 g/L). El resto de parámetros se encuentran dentro de los rangos normales en vinos.

ES 2 356 011 A1

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

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 vnicas 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, 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.

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)

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)

C6: Fermicru Primeur DSM-Gist Broc.; Origen: Vino (Beaujolais, Francia)

C7: UCLM S-377, Springer Oenologie; Origen: Vino, La Mancha, España)

C8: BM-60

ES 2 356 011 A1

Cepas de *S. bayanus*:

B1: CECT 11035^T=CBS 380^T; Origen: Cerveza

5 B2; 1991=DSM 70411; Origen: Cerveza

B3: CECT 12627; Origen: Vino (Valladolid, España)

10 B4: CECT 12629, Origen: Mosto (Zaragoza, España)

B5: CECT 12638; Origen: Mosto (Cádiz, 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,	3,	3,	20	25	30	10	16	30	37	5	1	1	1
		8	0	2	0	0	0					0	0	2	5
S. cerevisiae	C1	6	6	6	6	6	6	3	5	6	0	4	0	0	0
	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

65

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 *HinfI*, 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.

15

TABLA 3

Porcentajes de implantación de la cepa BM58 en las fermentaciones realizados en bodega mediante la aplicación de distintas técnicas moleculares (PCR de la región ribosomal PCR del gen COX1 y RFLPs del mtDNA)

20

Ensayo		Implantación (PCR del gen Cox1)	Nombre Fermentador	Implantación (RFLPs mtDNA, <i>HinfI</i> .)
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%

40

Ejemplo 4

Determinación de los compuestos volátiles en los vinos obtenidos con la cepa BM58

50 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 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).

55 Los resultados obtenidos en el caso de los vinos fermentados con la 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 de vinos blancos se muestran en la Tabla 4 y vinos tintos Tabla 5.

60

65

ES 2 356 011 A1

TABLA 4

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

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

ES 2 356 011 A1

TABLA 5

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

5	COMPUESTOS	Cepa BM58	Control	Umbral detección (mg/L)
		Depósito V31- 16	Depósito V17	
10	Acetato de etilo	23,7176726	20,5255943	12,264
	Acetato de isobutilo	0,19997069	0,37383906	?
	Isobutanol	4,02180932	4,86301384	40
15	Acetato de isoamilo	1,9463642	1,26164807	0,03
	Alcohol isoamílico	281,817064	242,850057	30
20	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	?
25	1-hexanol	1,39941572	1,30604123	8
	Caprilato de etilo	4,02124454	2,39755663	0,005
30	Succinato de dietilo	26,5729626	8,80705434	?
	Acetato de bencilo	0	0	?
	Acetato de 2-feniletanol	0,91934278	0,69836775	0,25
35	2-feniletanol	5,69147434	4,69580231	10-14
	Alcohol bencílico	0	0	¿
40	Caprato de etilo	2,55144629	0,83446822	0,2
	Acetato de etilo			

45

Ejemplo 5

Elaboración de vinos espumosos con las cepas BM58 y BM60

50

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 levadura.

55

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.

60

65

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

5

	Vinificación control	Vino elaborado con BM58	Vino elaborado con BM60
COMPUESTOS			
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

40

Referencias bibliográficas

- Bidene 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.
- 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 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.
- 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.
- 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.

65

ES 2 356 011 A1

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.

García Garibay, M.; Quintero Ramírez, R.; López-Munguía Canales, A. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa, SA.

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.

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.

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.

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. *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 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 vinificación. (3ª edición). Ediciones Mundi-Prensa.

ES 2 356 011 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo que puede ser clasificado taxonómicamente como perteneciente a la cepa BM60 de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número de depósito CECT 13004.
- 10 2. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (BM60) depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número de depósito CECT 13004.
- 15 3. Uso de un microorganismo según la reivindicación 1, o de la cepa según la reivindicación 2, para llevar a cabo la fermentación alcohólica.
- 20 4. Uso de un microorganismo según la reivindicación 1, o de la cepa según la reivindicación 2, para elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.
- 25 5. Uso de un microorganismo o de la cepa según la reivindicación 4, donde las bebidas alcohólicas fermentadas presentan concentraciones de glicerol superiores a 9 g/L.
- 30 6. Uso de un microorganismo o de la cepa según la reivindicación 5, donde las concentraciones de glicerol son de hasta 22,27 g/L.
- 35 7. Uso de un microorganismo o de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde las bebidas alcohólicas fermentadas presentan un aumento en la producción de aromas secundarios del grupo de los: acetatos, ésteres etílicos, ó alcoholes.
- 40 8. Uso de un microorganismo o de la cepa según la reivindicación 7, donde los acetatos se seleccionan del grupo que comprende: el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de acetato de hexilo, acetato de bencilo, el acetato de fenil etanol, o cualquiera de sus combinaciones.
- 45 9. Uso de un microorganismo o de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde los ésteres etílicos se seleccionan del grupo que comprende: el caproato de etilo, caprilato de etilo, succinato de dietilo, lactato de etilo, caprato de etilo, o cualquiera de sus combinaciones.
- 50 10. Uso de un microorganismo o de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde los alcoholes se seleccionan del grupo que comprende: el isobutanol, alcohol isoamílico, 1-hexanol, 2-feniletanol, o cualquiera de sus combinaciones.
- 55 11. Uso de un microorganismo o de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde la bebida alcohólica fermentada es el vino.
- 60 12. Uso de un microorganismo según la reivindicación 11, donde el vino es un vino blanco, un vino rosado o un vino tinto.
- 65

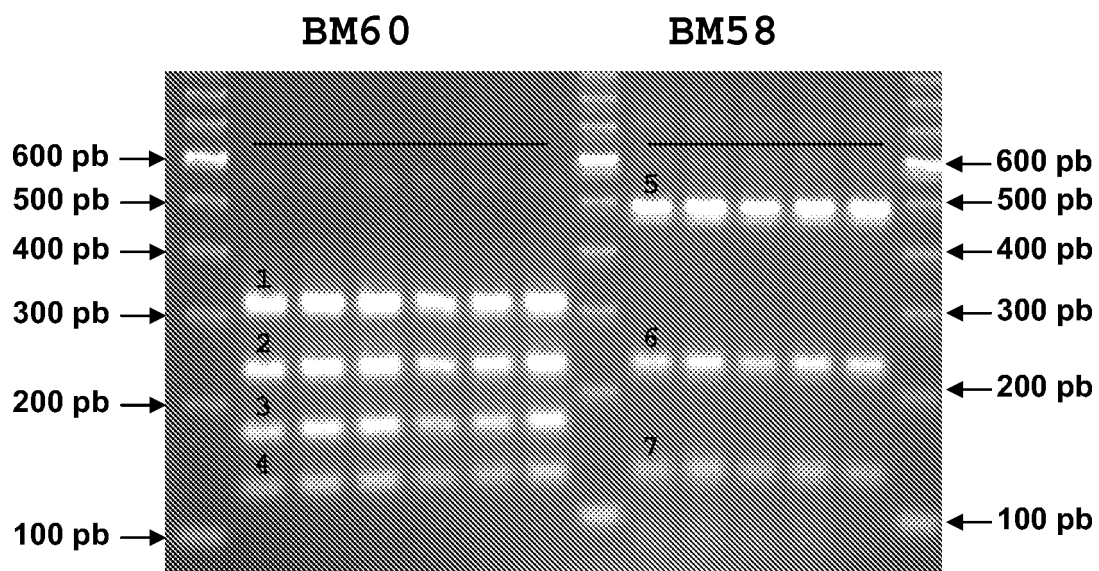


Fig. 1

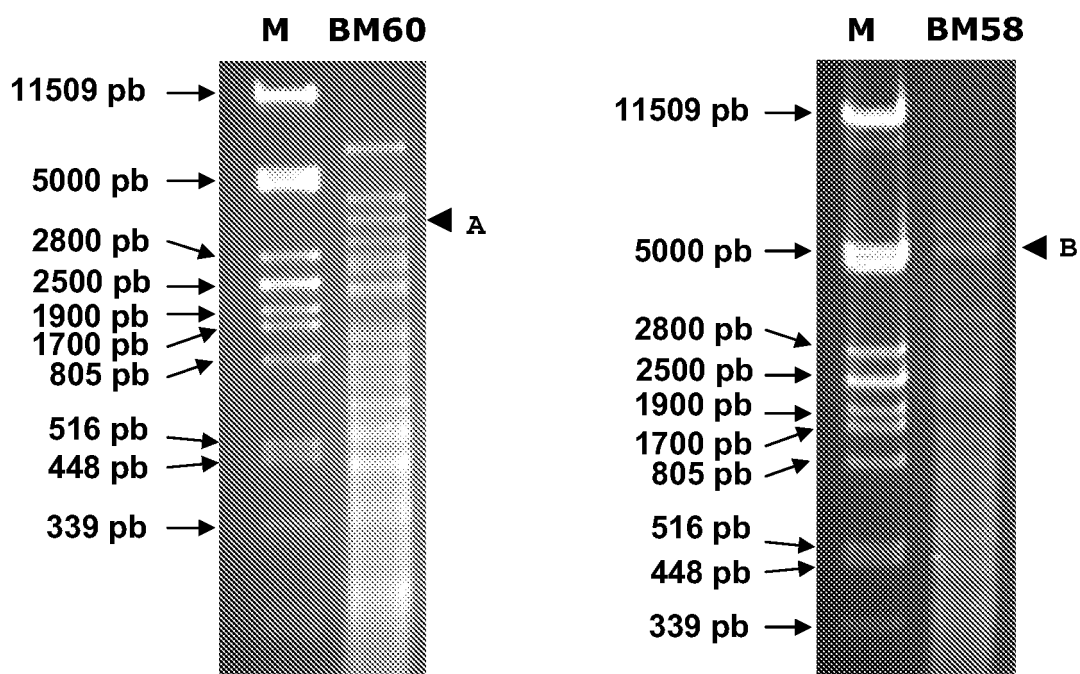


Fig. 2

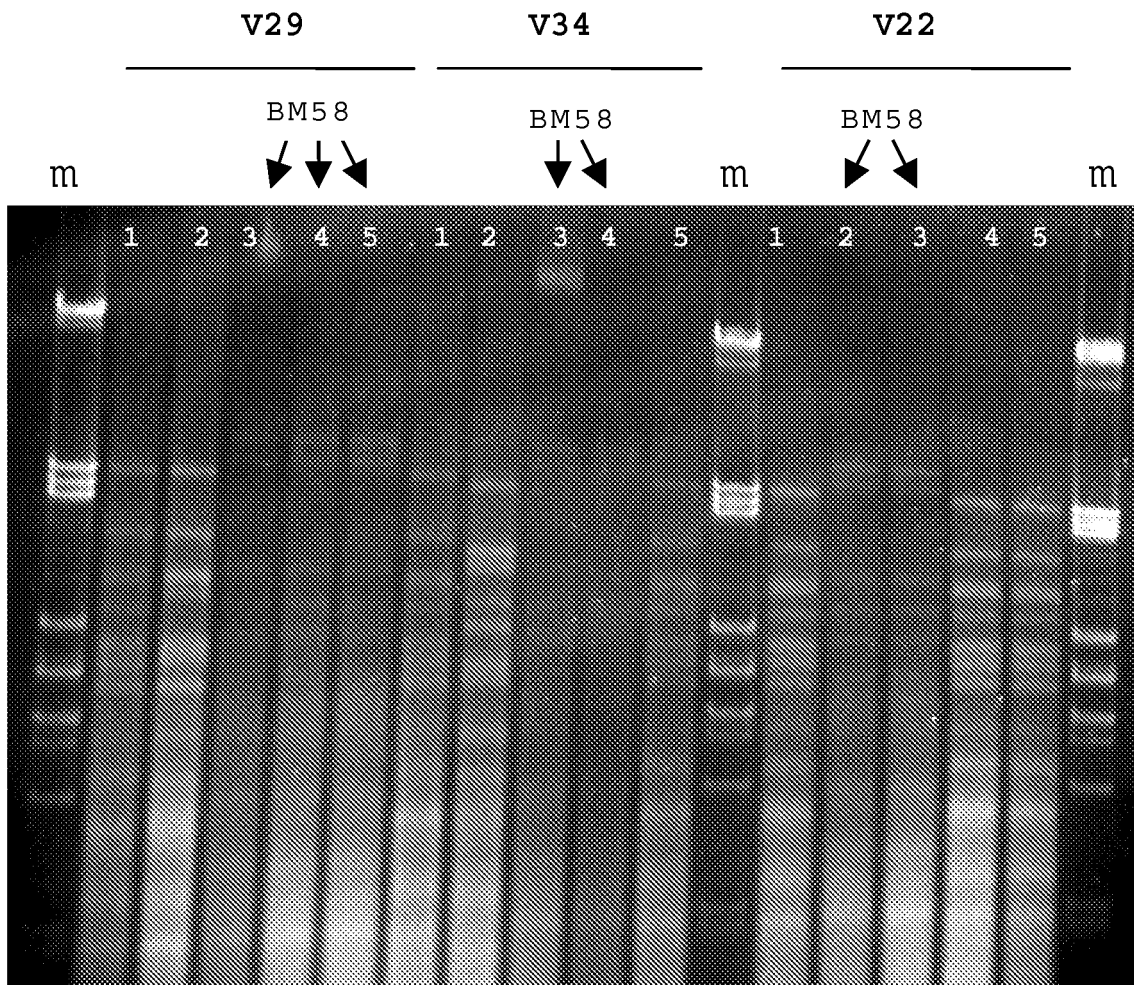


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930639

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.08.2009

③② Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JP 9224638 A (SANWA SHIYURUI KK) 02-09-1997 (resumen) [online] [recuperado 12-11-2010] recuperado de: Base de datos EPODOC/EPO	1-12
A	JP 10276754 A (SANWA SHIYURUI KK) 20-10-1998 (resumen) [online] [recuperado 12-11-2010] recuperado de: Base de datos EPODOC/EPO	1-12
A	JP 7115956 A (SANWA SHIYURUI KK) 09-05-1995 (resumen) [online] [recuperado 12-11-2010] recuperado de: Base de datos EPODOC/EPO	1-12

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: TODAS

Fecha de realización del informe
16.11.2010

Examinador
J. López Nieto

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/16(2006.01)
C12P7/00(2006.01)
C12G1/02(2006.01)
C12P1/02(2006.01)
C12R1/865(2006.01)

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

C12N, C12P, 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, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	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 se publica.

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	JP 9224638 A (SANWA SHIYURUI KK)	02.09.1997
D02	JP 10276754 A (SANWA SHIYURUI KK)	20.10.1998
D03	JP 115956 A (SANWA SHIYURUI KK)	09.05.1995

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 la cepa BM60 de *Saccharomyces cerevisiae*, con número de depósito CECT 13004, aislada de fermentaciones naturales. Produce bebidas alcohólicas fermentadas con una concentración de glicerol superior a 9 g/L. También aumenta la concentración de aromas secundarios del grupo de los acetatos, ésteres etílicos o alcoholes. Los documentos D01 y D02 se refieren a procesos de producción de bebidas alcohólicas con alto contenido en glicerol y aromas secundarios, tal como acetato de isoamilo, utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En D01 se utiliza *S. cerevisiae* H6-7 (FERM P-15,349). En D02 se utiliza *S. cerevisiae* BBR-7 (FERM P-16092). D03 menciona un procedimiento para obtener vino con alto contenido en glicerol mediante el uso de *Saccharomyces cerevisiae* TK-2 (FERM P-13831). Teniendo en cuenta los documentos D01-D03, la cepa *S. cerevisiae* BM60 y su uso para la elaboración de bebidas alcohólicas son nuevos y tienen actividad inventiva.