



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 358 402**

⑫ Número de solicitud: 200901997

⑮ Int. Cl.:

A01G 17/02 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **15.10.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
10.05.2011

⑰ Solicitante/s: **Bodegas Dagón, S.L.N.E.**
c/ Cooperativa, 4
46310 Venta del Moro, Valencia, ES

⑱ Inventor/es: **Navarro Aviñó, Juan Pedro y**
Márquez Sahuquillo, Miguel Jesús

⑳ Agente: **Molinero Zofío, Félix**

㉑ Título: **Método de obtención de levaduras para fermentación con alto grado de alcohol.**

㉒ Resumen:

Método de obtención de levaduras para fermentación con alto grado de alcohol.

La presente invención se refiere a un método natural y ecológico del cultivo de la vid, gracias al cual se desarrollan unas levaduras que intervendrán en el proceso de fermentación del vino y seguirán este proceso de fermentación hasta la total transformación del azúcar en alcohol, por lo que se desarrollarán y se multiplicarán en caldos con un alto grado de alcohol.

ES 2 358 402 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de levaduras para fermentación con alto grado de alcohol.

5 **Sector de la técnica**

El sector al que pertenece la presente invención es el de la viticultura, es decir el cultivo de la vid.

La presente invención se refiere a un método natural del cultivo de la vid, gracias al cual se desarrollan unas
10 levaduras que intervendrán en el proceso de fermentación del vino y seguirán este proceso de fermentación hasta la total transformación del azúcar en alcohol, por lo que se desarrollarán y se multiplicarán en caldos con un alto grado de alcohol.

Objeto de la invención

15 La invención tiene por objeto la consecución de una fermentación espontánea y natural de los azúcares del mosto de vino en alcohol, es decir, con levaduras salvajes, que realicen la fermentación de los azúcares aun con alto grado de alcohol, por lo que se obtendrá un vino con una muy alta graduación de alcohol y con muy buen alcohol. Mediante el cultivo de un viñedo resistente por sí mismo a las inclemencias meteorológicas y/o climáticas, que sean capaces
20 de aprovechar los alimentos en el propio terreno, por lo que desarrollarán unas raíces profundas y fuertes, hará que la planta absorba nutrientes y que las levaduras salvajes que aparezcan en las uvas, nos recuerden al terreno donde se cultiva la vid y transfiera sus cualidades.

Antecedentes de la invención

25 Después de la filoxera, plaga que devastó los cultivos europeos a finales del siglo XIX atacando a las raíces de las cepas, se comenzó a utilizar, en prácticamente todas las vides viníferas, el porta-injerto americano resistente a la mordedura del insecto.

30 Por tanto, las vides que existen en la mayoría de las regiones vitícolas están constituidas por un pie de alguna especie americana o por un híbrido de alguna de ellas, que no ha sido afectada por la filoxera, sobre el que se injerta un tallo de *Vitis vinifera* u otra variedad.

35 La madurez productiva de una vid no llega hasta los cuatro o cinco años y a los 20 años tiene su esplendor con producciones máximas, a partir de los cuales cuánto más viejo es un viñedo mejor es su fruto, disminuyendo su producción pero aumentando su calidad.

40 El efecto del riego respecto al grado alcohólico de los vinos es la disminución de la concentración de los azúcares, debido al efecto de la dilución. La producción aumenta al comparar vides irrigadas y no irrigadas se observa que los compuestos fenólicos e intensidad de los colorantes disminuyen en los vinos procedentes de vides irrigadas. En el mosto se constata un aumento del ácido málico en uvas de vides irrigadas. El efecto de aportaciones de agua al final de la maduración repercute en la composición del vino final y en la calidad por la concentración de elementos debido a la dilución producida en la baya por el agua.

45 Los compuestos fenólicos son muy importantes en bioquímica vegetal, teniendo funciones diversas, desde la coloración de flores y frutos hasta la impregnación de lignina de las paredes pecto-celulósicas.

El papel de los compuestos fenólicos en las variedades de uva tinta es determinante para la calidad del vino cuyo destino es la crianza en bodega.

50 El contenido en compuestos fenólicos del vino depende tanto de la variedad vinífera y del rendimiento de la cosecha como de las condiciones edafoclimáticas y técnicas culturales aplicadas al viñedo. Entre ellos, son especialmente relevantes en la calidad de los vinos tintos de crianza, los compuestos flavonoides, básicamente los flavanoles y las antocianidinas.

55 Los antocianos o antocianinas representan una parte importante, tanto cuantitativa como cualitativamente de los flavonoides de las uvas tintas y, en consecuencia, de los vinos resultantes.

60 La capacidad para el envejecimiento en bodega de los vinos tintos está relacionada en gran medida con la presencia de compuestos fenólicos y la concentración de diferentes elementos en el vino, entre ellas, las antocianinas responsables del color rojo y las procianidinas responsables de parte del color amarillo y del gusto amargo, así como de la astringencia y del cuerpo del vino.

65 La fermentación del vino es de las más conocidas y estudiadas.

Las levaduras responsables de la vinificación son unas levaduras microscópicas que se encuentran de forma natural en los hollejos de las uvas (generalmente en una capa en forma de polvo blanco fino que recubre la piel de las uvas, (*Vitis vinifera* L.), y que se denomina "pruina").

La fermentación se puede realizar con levaduras salvajes, levaduras inoculadas o empleando ambos procedimientos.

Las cepas de levaduras cultivadas específicas, pueden ser capaces de obtener aromas afrutados, alto grado de alcohol, textura agradable a la boca y una habilidad para fermentar a bajas temperaturas o con relativamente bajo pH.

En la elaboración del vino, lo más principal es que las levaduras completen la fermentación de todo el azúcar en el zumo de uva, un alto grado de alcohol, normalmente 12% en volumen o algo más, da al vino su longevidad, cuerpo y otras características muy positivas, sin un buen alcohol el vino muere.

La especie de levadura que se considera mejor para la total fermentación del alcohol es la *Saccharomyces cerevisiae*.

La fermentación, como antes hemos dicho, se puede realizar mediante inoculación de levaduras, esto no es una necesidad sino una elección.

En las bodegas comerciales se inoculan levaduras, aunque no en su totalidad, para convertir el azúcar en alcohol.

En la cosecha, las uvas portan millares de organismos, incluidas las levaduras.

La fermentación con levaduras salvajes o indígenas, aunque es muy minoritaria, la practican algunos elaboradores europeos, que han fermentado desde siempre con levaduras salvajes y con muy buenos resultados. Asimismo, elaboradores de vino Californianos están empezando a poner en marcha esta fermentación espontánea, con resultados también muy favorables.

Una de las características más comunes de las levaduras salvajes es su baja resistencia al alcohol. Muchos tipos de levaduras salvajes son incapaces de actuar una vez se alcance niveles de alcohol del 6% en volumen, resultando un atasco en la fermentación, un vino sin consistencia, con un sistema de baja inmunidad y gran cantidad de azúcar residual no deseado, entre otros problemas.

Otro problema al utilizar levaduras salvajes en la fermentación, es la cantidad de tiempo que necesita la levadura salvaje para establecer colonias, quedando las uvas abiertas a una infección por otros organismos degradados o a la oxidación, además, una vez comienza la fermentación, esta es larga, lenta y a baja temperatura.

Otro problema añadido es la impredecibilidad de los aromas y esteres que las levaduras salvajes pueden introducir en el vino. Sin embargo, con las levaduras comerciales es posible conseguir los sabores deseados.

Por otro lado, el hecho de que se tarde más tiempo en arrancar la fermentación, permite más tiempo de contacto de la piel con las uvas, lo que se traduce en más cuerpo, profundidad de carácter, color y sabores más afrutados.

Se ha constatado que muchos de los impredecibles aromas y esteres comunicados por las levaduras salvajes dan una interesante naturaleza sofisticada al vino, resultando un vino con sabores complejos, buen bouquet y muy buen alcohol.

Los factores que limitan la glicólisis fermentativa del etanol son complejos debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros intervinientes durante el proceso de fermentación.

El documento FR 2844275 tiene por objeto un procedimiento de vinificación natural que se caracteriza por comprender los siguientes pasos; - transferir mediante gravedad las uvas a barricas de madera, - vibrado para asegurar el llenado completo de las barricas, - control de la fermentación de la uva en estos barriles con una oscilación periódica, etc. así como la posterior fermentación malo-láctica del vino y la conservación de este vino en el mismo barril de fermentación. No emplea bombas para el trasiego ni tanques, sólo cubas.

El documento WO2004029193 propone un método de producción de un producto de fermentación, comprendiendo el método una etapa de fermentación que incluye el contacto con un microorganismo en fermentación o medios de fermentación utilizados con al menos una enzima de esterasa, como p.ej. lipasa, fitasas, fosfolipasa y cutinasa.

En cuanto al cultivo de las viñas con objeto de conseguir cepas de levaduras salvajes para que realicen la fermentación total del azúcar de manera natural no hemos encontrado ninguna patente relevante sobre el tema.

Descripción de la invención

Se trata de la obtención de un vino totalmente natural, empezando por la selección de la vid, que sea ésta totalmente natural para que sea la propia vid y por sus propios medios la que se desarrolle y produzca sus frutos.

La intervención por parte del hombre se centrará a la preparación del suelo, para lo que eliminará las hierbas enterrándolas "in situ" sin añadir abono alguno, haciéndose la planta fuerte de una manera natural y adaptándose al terreno por sí sola.

Siguiendo este procedimiento, se ha comprobado a través de los años, que la cosecha se podía retrasar con lo que se conseguía unas uvas con más proporción de azúcar, se ha llegado a recoger en los meses de enero y febrero, aunque en los últimos años se ha adelantado algo y el resultado, en cuanto a calidad, ha permanecido y en cuanto a producción ha aumentado.

En bodega se ha ido viendo una evolución de las levaduras salvajes aportadas por las uvas, los sabores, aromas y el bouquet han ido mejorando y estandarizándose y el alcohol era cada vez mejor, hasta que en el año 2.004 se ha normalizado, dando a partir de entonces unos vinos más regulares.

En la elaboración no se ha aportado ningún tipo de levadura, sólo se ha realizado con las que venían con las uvas, es decir, se ha realizado una fermentación con levaduras salvajes y se ha visto que éstas transformaban los azúcares presentes en los mostos obtenidos hasta su extinción, incluso con altos porcentajes de alcohol.

El proceso de elaboración se ha ido realizando en fases sucesivas obteniendo en cada fase un aumento del tanto por ciento de alcohol.

El método de la presente Invención se basa pues en la obtención de levaduras salvajes o indígenas para la fermentación del azúcar en alcohol y que sean capaces de seguir realizando la fermentación hasta la desaparición de los azúcares, incluso con muy alto grado de alcohol.

El método empieza desde en el mismo momento de la selección de viñas y llega hasta la consecución de la levadura de estas cepas, que posteriormente serán tratadas, en su caso, genéticamente para conseguir una multiplicación más rápida y para que sean las predominantes en el proceso de fermentación, es decir, que se desarrollen en cantidad y fuerza para que prevalezcan frente a otras levaduras que puedan aparecer y que además consigan la total fermentación de los azúcares, para obtener un vino con carácter y muy buen alcohol que le dará longevidad, aromas y sabores, que no sólo nos recuerden el fruto sino también la tierra y el ambiente donde se han cultivado las viñas, resolviendo un problema existente actualmente y que es que con levaduras salvajes o indígenas no se había conseguido, hasta ahora, la fermentación con un alto grado de alcohol.

Realización preferente

A.- Descripción de la metodología usada

a). El método se inició en 1.989. Se ha partido de la premisa de realizar un tipo de agricultura totalmente natural, comenzando para ello por la selección de viñas autóctonas, en este caso de Bobal, Tempranillo y Garnacha.

En el cultivo de estas viñas, no se emplea ningún abono químico ni orgánico, a excepción del compost que se consigue con las hierbas del terreno donde están plantadas las vides. El objeto de lo anterior es conseguir unas viñas resistentes por sí mismas y que sean capaces de buscarse los alimentos en el propio terreno, por lo que desarrollarán unas raíces profundas y fuertes. Esto hace que adquiera la uva sabores y aromas que nos recuerden al terreno donde se cultivan.

En cuanto a la irrigación, no se realiza ningún riego a pesar de que la pluviosidad en la zona es inferior a 500 l/m², ya que se trata de un clima continental y seco, (entre 300 a 500 mm de pluviosidad). Esto logrará que también las levaduras presentes en la piel de las uvas se hayan adaptado a esta climatología.

b) En el año 1.990 se recogió la uva más tarde, pues aguantaban las uvas perfectamente debido principalmente a la forma de cultivo.

Estas viñas se han ido extendiendo por el terreno, terreno que tiene orientación sur y se encuentra en un microclima, ya que a ambos lados del mismo existen dos pequeños bosques.

c) Las viñas empezaron a producir uvas diferentes en sabores y aromas a los 6, 7 años y van mejorando cada año la calidad de su producción.

d) En los años 1.996 a 1.998, se hace más vino con las uvas recolectadas tardíamente, que es como se realiza normalmente la cosecha, (aunque últimamente se está adelantando), logrando un alto grado alcohólico entre 14 a 16° en volumen de alcohol, de una forma totalmente natural con las levaduras salvajes que aparecen en el mosto, es decir, superando en mucho toda la creencia sobre las levaduras salvajes acerca de su dificultad para vivir y desarrollarse con esos grados de alcohol. Aunque no se aclimatan a más graduación de alcohol, en el año 1.998 cambian los aromas. ¿Se debe a las levaduras?. Sabemos que las levaduras son seres vivos muy sensibles y parece que se están aclimatando a altas graduaciones de alcohol. Así hasta llegar al año 2.002 en que se coge la primera cosecha comercial y se decide realizar, también y como siempre, una vendimia tardía en época de nieblas y después de las lluvias del otoño.

Normalmente cuando llueve en septiembre las uvas engordan. Sin embargo, con las lluvias del otoño engrasa la piel de las uvas, las uvas no engordan y es cuando aparecen las levaduras que intervendrán posteriormente en el proceso de fermentación posterior del azúcar.

ES 2 358 402 A1

e) En el año 2.002 se producen 15,5° de alcohol, igual que en el 2.003, se continúa de la misma forma y en el año 2.004 se obtiene una cantidad de alcohol entre 16,5 a 18,68% en volumen.

La obtención del vino se realiza elaborando un pie de cuba con uva estrujada, en depósitos de capacidad inferior a 5.000 litros, sobre el 20-25% de dicho volumen, para que se reproduzca la levadura, siendo esta la salvaje o indígena. Tarda en fermentar entre 15 a 20 días alcanzando del 3,5 a 6% de alcohol en volumen. A partir de este pie, se va añadiendo del 15 al 20% del volumen del contenedor cada 7 a 15 días, realizando una fermentación en escalera y aportando de esta manera oxígeno y alimento a las levaduras que aumentarán la graduación alcohólica, hasta conseguir fermentar todo el azúcar y alcanzar un grado alcohólico entre el 16 al 19% en volumen de alcohol.

Se observa que las levaduras permanecen vivas aunque les falte alimento (azúcar); quedan como invernando y cuando se les aporta azúcar, reinician la fermentación.

De esta forma se consigue obtener un vino con cuerpo, muy buen alcohol, con lo que se asegura su calidad a lo largo del tiempo, y con muy buenos aromas que nos recuerdan al ambiente y al terreno, sabores que recuerdan el fruto donde proceden, consiguiéndose un bouquet característico y debido a la longevidad de las viñas, (viñedos viejos con mas de 70 años), una mayor calidad en los caldos fermentados.

B.- Resultados obtenidos

Se ha estudiado en laboratorio estas levaduras causantes de esta fermentación, por lo que se extrajeron muestras representativas del vino producido.

Las muestras recogidas fueron:

- Muestra del poso de una barrica que contenía un porcentaje de etanol de 17.7% en volumen de alcohol.
- Muestra del poso de otra barrica cuyo contenido en alcohol era 18.2% en volumen de alcohol.
- Botella de vino de la misma cosecha que el vino que estaba en barrica.

Todas las muestras y la barrica pertenecían a la cosecha de 2004. Toda esa cosecha estaba todavía en barricas excepto una barrica que se embotelló y de ahí que tuviese botellas de esa cosecha. La fecha del embotellado de esa botella fue: 6-11-06.

1- Se sembraron en placas de medio YPD las muestras anteriores, una en cada placa y solamente crecieron las cepas correspondientes a las muestras de vino que estaban etiquetados como de 18.2% en volumen de alcohol, como se ve en la figura 1 donde se observan los tres tipos.

En esta placa se observan tres tipos distintos de colonias, que a partir de ahora las llamaremos: levadura blanca, levadura amarilla y levadura de crecimiento lento.

2- Posteriormente se volvió a sembrar la muestra de 17.7% en volumen de alcohol en medio YPD y en medio SD para comprobar si realmente no crecía nada, y sí se obtuvo un crecimiento. Además este crecimiento fue muy similar al observado en la placa de 18,2% en volumen de alcohol. Todos los procesos siguientes se llevaron a cabo a partir de las levaduras obtenidas de la placa de 18.2% en volumen de alcohol.

3- Se tomó una muestra de cada tipo de levadura y se sembraron en una nueva placa YPD para que así crecieran en mayor cantidad y poder diferenciarlas mejor, tal como puede observarse en la figura 2. Se ha señalado con una flecha cada una de las levaduras en esta figura 2, así con el número 1 se ha indicado la *Levadura Blanca*, con el número 2 la *Levadura de Crecimiento Lento* y con el número 3 la *Levadura amarilla*.

4- Una vez las levaduras estuvieron perfectamente definidas y diferenciadas se pasó a comprobar su capacidad de crecimiento.

Para ello se cogió la misma cantidad de cada tipo de levadura y se sembraron en una nueva placa YPD y se comprobó que la levadura que habíamos llamado de crecimiento lento, efectivamente le costaba crecer más que a las otras dos.

Ya sabemos que tenemos tres tipos de levaduras, el siguiente paso fue hacer glicerizados con los tres tipos de levaduras cada una por triplicado. Unos días después de estar el glicerizado en el congelador se procedió a comprobar si todos los glicerizados crecían en medio YPD y los resultados fueron satisfactorios, solamente se tuvo un problema y fue, que en la comprobación del glicerizado de la cepa de crecimiento lento apareció un hongo. Para comprobar si ese hongo procedía del glicerizado o era una contaminación ambiental repetimos la comprobación de los tres glicerizados de la cepa de crecimiento lento y en los resultados de la recomprobación no se obtuvo ningún hongo, por lo que deducimos que el hongo procedía de una contaminación ambiental y que los glicerizados estaban bien hechos.

ES 2 358 402 A1

5- Se realizó una nueva visita a la bodega para recoger nuevas muestras, estas nuevas muestras fueron tomadas del tanque de fermentación de la cosecha de 2008.

- Se tomó una muestra del líquido de la parte inferior del tanque.
- Se tomó otra muestra del poso del tanque de fermentación.

Estas dos muestras fueron sembradas en dos placas de un medio rico de crecimiento de levaduras, YPD y se dejaron crecer. Nos encontramos con la aparición de unos hongos filamentosos, indicados, en la figura 3 y mejor en la figura 4, con una flecha, que sospechamos podría tratarse de la levadura de crecimiento lento que en el proceso de fermentación se encuentra en forma de estos hongos filamentosos, para posteriormente evolucionar a la forma de levadura que hemos obtenido en barricas. En las placas también encontramos abundante levadura blanca y alguna pequeña muestra de levadura amarilla.

6- A continuación procedimos a sembrar estas mismas levaduras (los tres tipos glicerinados) en medios con distintos niveles de etanol para ver su capacidad para desarrollarse. Las levaduras sembradas procedían de las placas de comprobación de los glicerinados.

Se prepararon dos tipos de medio uno con glucosa (1%) y otro sin glucosa. Después de fracasar en algunos intentos de preparación de medio YPD con etanol (debido a que concentraciones elevadas de etanol fluidifican en exceso el medio YPD dimos con un método fiable y en estas placas se sembraron las levaduras, obteniendo los siguientes resultados, que se pueden observar en las figuras 5.1 y 5.2.

Discusión

Como se puede observar la *levadura blanca* crece sin problemas en todas las concentraciones de etanol y en grandes cantidades tanto en medio con glucosa como en medio sin glucosa.

La *levadura amarilla* presenta una morfología distinta dependiendo de si el medio contiene glucosa o no. En medios con glucosa crece en forma de grandes colonias mientras que en medios sin glucosa crece en forma de colonias más pequeñas pero en mucho mayor número. En ambos casos se produce una reducción en la cantidad de levadura al aumentar el porcentaje de etanol.

Levadura de crecimiento lento: Al igual que la levadura amarilla la levadura de crecimiento lento crece de forma distinta dependiendo de si el medio lleva glucosa o no. En este caso el comportamiento es el opuesto a la levadura amarilla, así las colonias de medio sin glucosa presentan un mayor tamaño que las de medio con glucosa aunque están en menor número. En cuanto al crecimiento en distintos niveles de etanol vemos como a niveles altos de etanol les cuesta más crecer.

En todos los tipos de levaduras se intentó sembrar la misma cantidad en todas las placas, pero eso resultó dificultoso debido a las características de la levadura y del asa de siembra.

Una vez analizados los resultados anteriores, decidimos aumentar la concentración de etanol para ver cual era la concentración límite de etanol que resistía cada tipo de levadura.

Este nuevo ensayo entrañaba un problema y era que la cantidad de etanol a añadir era bastante alta y el medio podía tener problemas para solidificar por lo que decidimos aumentar la concentración de agar en el medio del 2% al 3%.

La cantidad de glucosa que se le puso a este medio fue del 1%.

Los resultados obtenidos fueron:

La *levadura blanca* creció para todas las concentraciones de etanol. La diferencia entre unas concentraciones y otras era la velocidad de crecimiento de la levadura. Para las concentraciones mayores, la velocidad de crecimiento es menor, (le costó más días crecer), pero como se puede ver la cantidad de levadura crecida es muy similar en todas las placas.

La *levadura amarilla* creció en todas las placas, pero su crecimiento fue muy pequeño, en algunas placas cuesta observar si ha crecido o no. Así en las placas que se observa un mayor crecimiento son las del 25 y 40% de etanol.

La *levadura de crecimiento lento* creció en un gran número de colonias para una concentración del 25% y para mayores concentraciones de etanol no creció.

A la vista de estos resultados se llegó a la conclusión de que la levadura de crecimiento lento no resiste condiciones en las que la concentración de etanol es superior al 25%, mientras que la levadura blanca resiste concentraciones de etanol muy elevadas y a la *levadura amarilla* le cuesta mucho crecer en todas las concentraciones de etanol, aunque crece en cantidades muy pequeñas.

ES 2 358 402 A1

Posteriormente se realizaron ensayos con niveles todavía más altos de etanol para ver el límite que resisten las levaduras blancas.

Los niveles de etanol en estas placas fueron: 40%, 45%, 50%, 60%. Los resultados obtenidos fueron:

La *levadura blanca* crece en todas las placas en gran cantidad aunque en la placa del 60% de etanol se aprecia una marcada disminución de la cantidad de levadura. Parece que a este nivel la levadura ya se ve afectada por la toxicidad del etanol.

La levadura de crecimiento lento no crece en ninguna de estas placas.

La *levadura amarilla* si presenta indicios de crecimiento en algunas de estas placas pero parece ser que es debido a lo que se llama crecimiento residual la gran cantidad de levadura sembrada que permanece en la estría de siembra. Cuando se coge *levadura amarilla* con el asa de siembra, debido a su textura, se coge gran cantidad de levadura, ésta es la que se ve en estas placas no es que haya crecido. Estos resultados pueden observarse en la figura 6.

El análisis de la muestra de la botella de vino. Antes de abrir la botella de vino se la puso un tiempo de forma que el poso que pudiese contener estuviese en el tapón (boca abajo).

Abrimos la botella y sembramos dos placas distintas, en una sembramos el líquido y en la otra sembramos el sólido del poso que contenía el tapón obteniendo los siguientes resultados se observan en la figura 7 la siembra del líquido y la figura 8 la del poso del tapón.

Dejamos crecer siete días más a 28°C y obtuvimos lo que aparece en la figura 9 (siembra del líquido) y figura 10 (siembra del poso).

En esta última placa de líquido se puede ver una colonia amarilla que parece ser una contaminación. Las levaduras corresponderían a las otras colonias, como se observa en la figura 10.

El siguiente paso fue analizar los distintos tipos de levaduras al microscopio, obteniendo los resultados que pueden observarse en las figuras 11 y 12 correspondientes a la levadura que denominamos blanca, y observando en la figura 12 un gran número de células reproduciéndose.

La figura 13 corresponde a la que se ha denominado como levadura de crecimiento lento.

Cuando se sembró mosto en fermentación se obtuvieron unas hifas que la figura 14 muestra el resultado de su observación al microscopio.

La figura 15 es una de las anteriores hifas entera, observándose perfectamente la cabeza de dicha hifa y que la figura 16 es una ampliación de dicha cabeza, que como se puede observar esta formada por pequeñas células, estas células se observan mejor en la figura 17.

Estas células tienen un aspecto muy parecido a las observadas en la levadura de crecimiento lento. El tamaño de célula es mayor y también una membrana celular más gruesa en este caso.

Una vez descrita suficientemente la invención, así como una realización preferente de la misma, sólo debe añadirse que es posible realizar modificaciones en su constitución y materiales empleados sin apartarse del alcance de la misma, definido en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

5 1. Método de obtención de levaduras para fermentación con alto grado de alcohol **caracterizado** por seleccionar
unas variedades de viñas naturales autóctonas, tener un pie natural, sin injerto alguno, abonar dichas viñas únicamente
con el compost obtenido de las propias hierbas del terreno, recolectar las uvas después de las lluvias del otoño, para
obtener levaduras salvajes autóctonas y por fermentar la totalidad de los azúcares contenidos en las uvas mediante la
formación de un pie de cuba con uva estrujada, en depósitos de capacidad inferior a 5.000 litros, sobre el 20-25% de
dicho volumen, reproducción de las levaduras salvajes autóctonas obtenidas, alcanzando del 3,5 a 6% de alcohol en
10 volumen, rellenos posteriores cada 7 a 15 días, fermentación con las mismas levaduras en escalera hasta conseguir
fermentar todo el azúcar, obtención de un grado alcohólico final entre 16 a 19% en volumen de alcohol.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

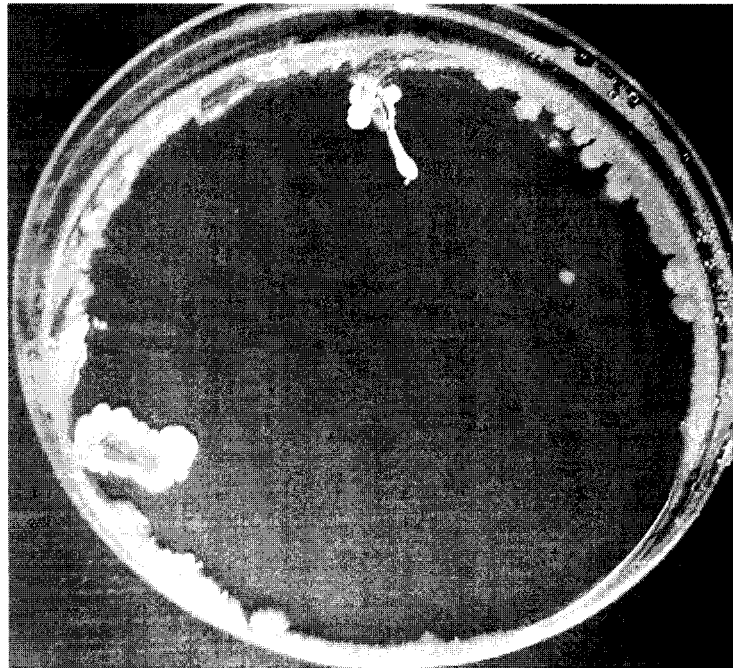


Figura 1

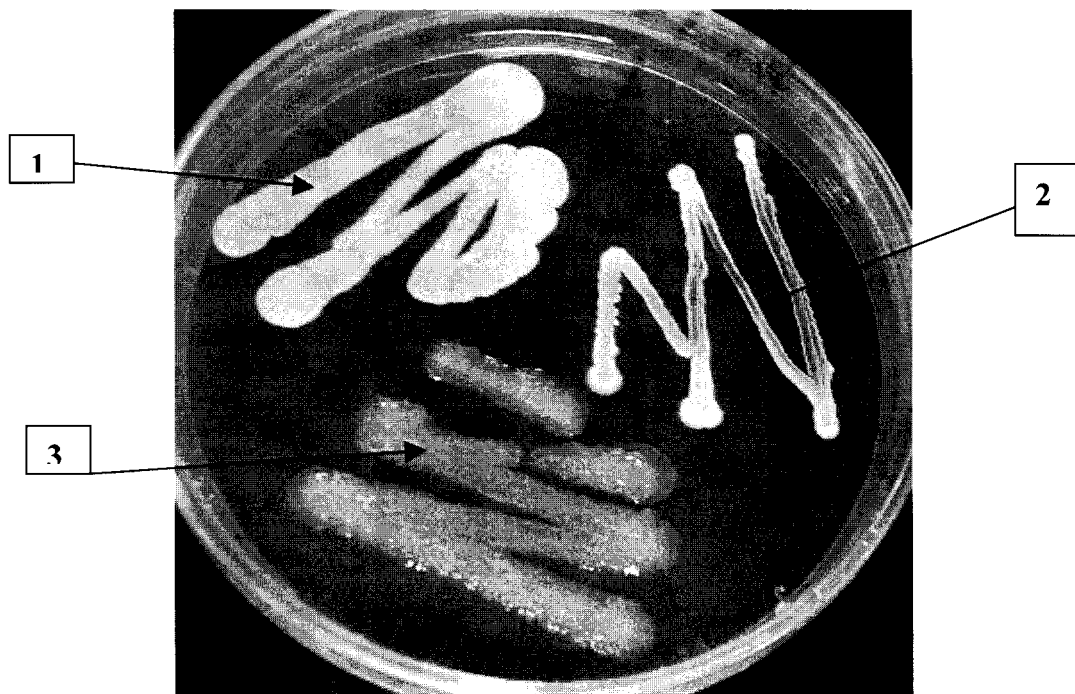


Figura 2



Figura 3



Figura 4

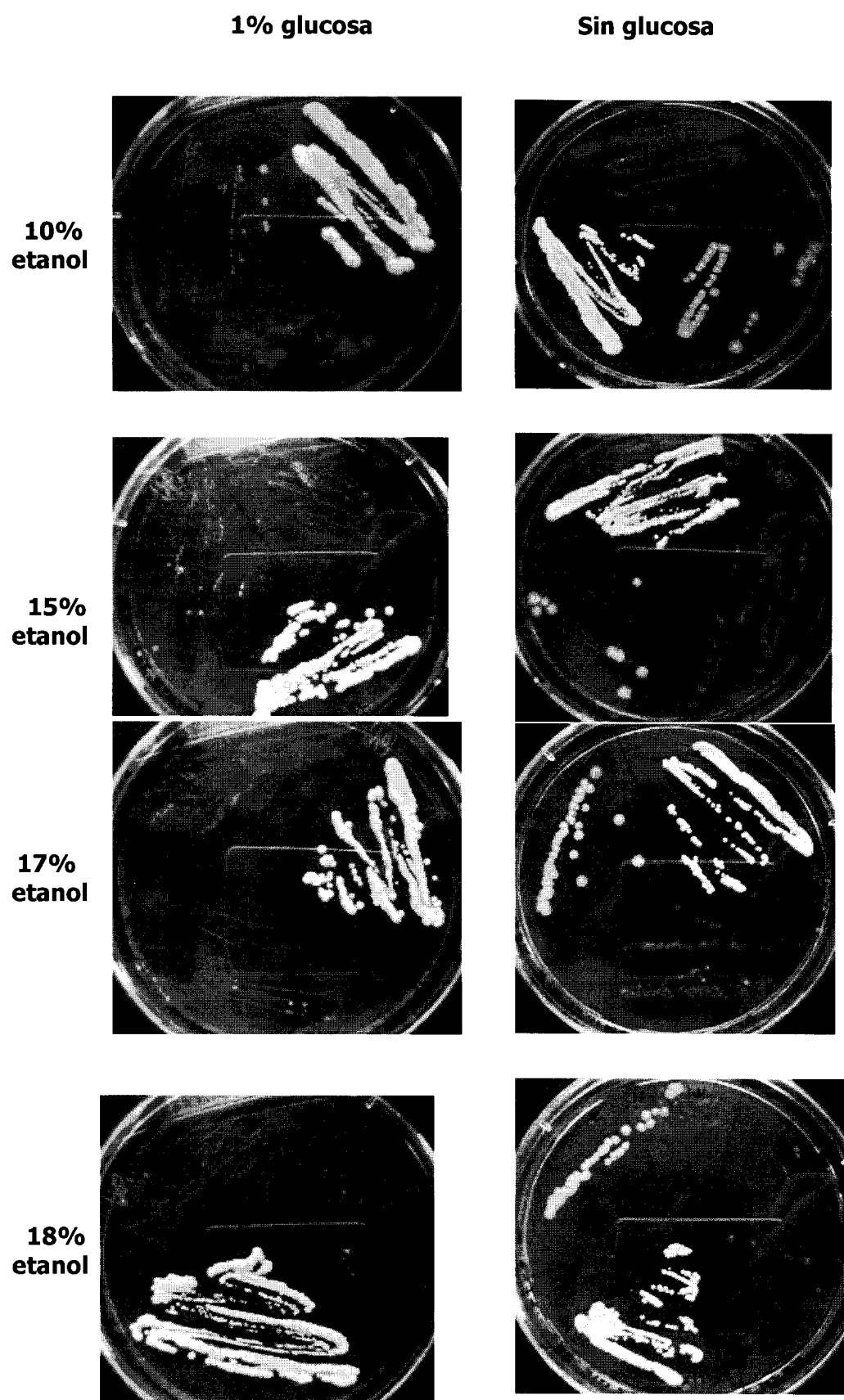


Figura 5.1

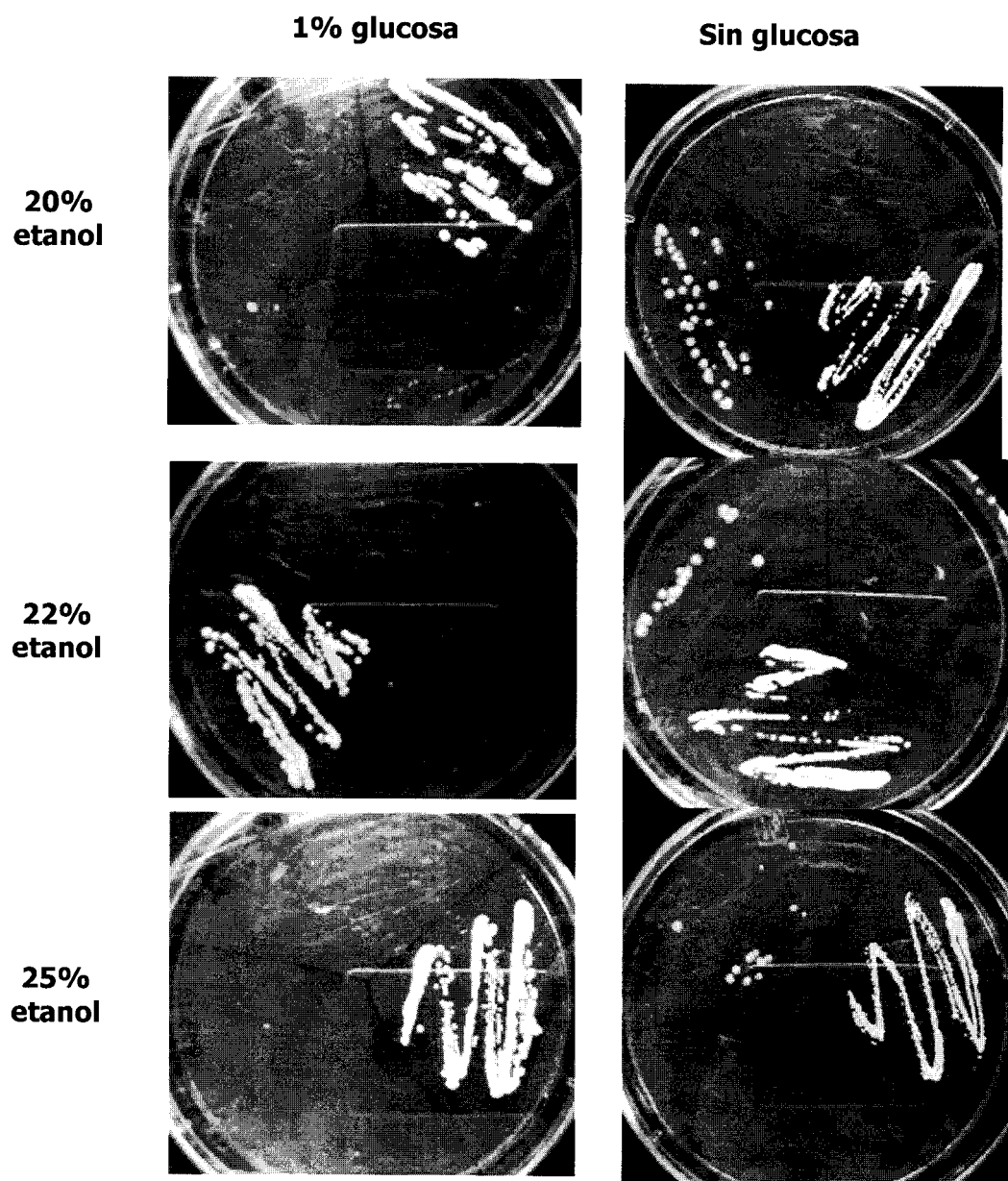


Figura 5.2

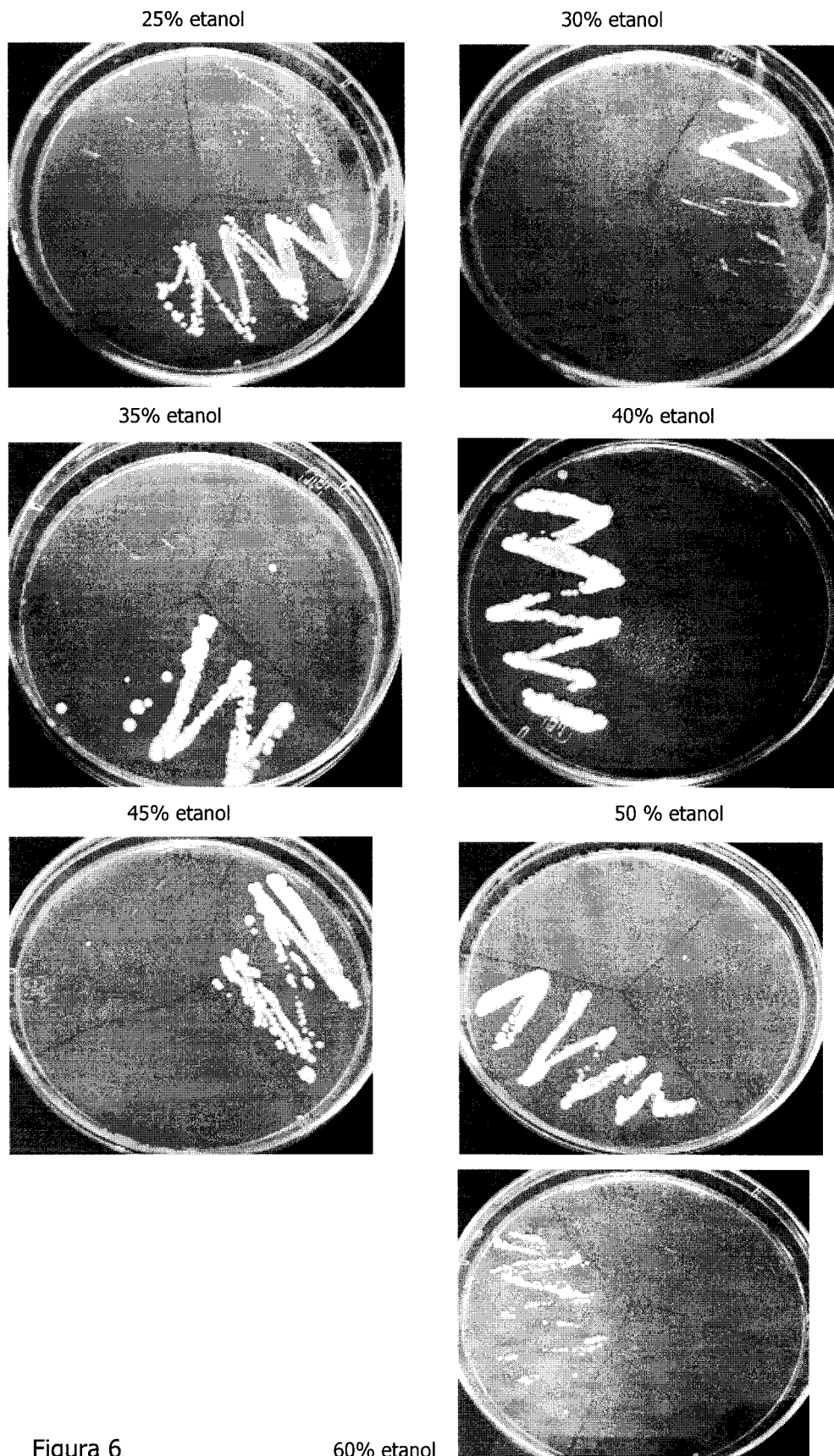


Figura 6

60% etanol

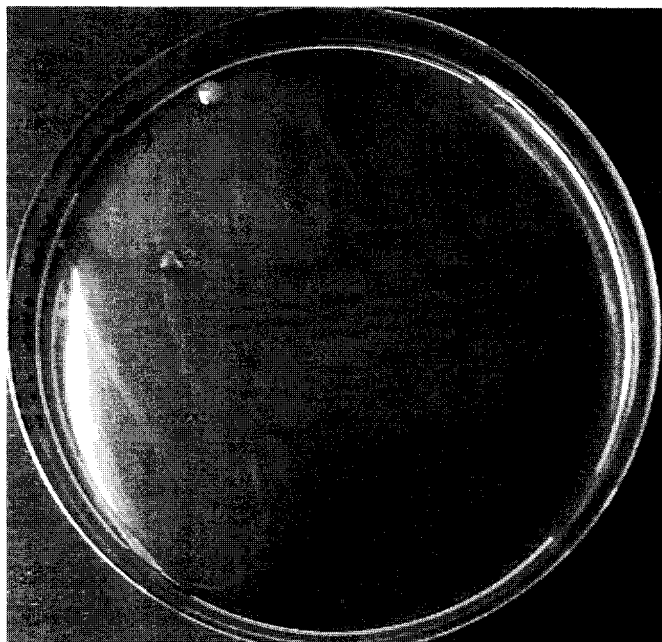


Figura 7

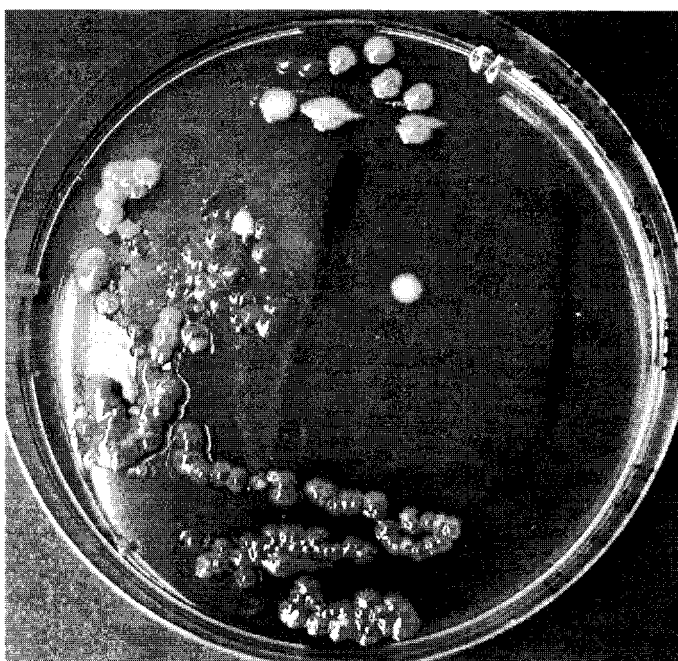


Figura 8

ES 2 358 402 A1

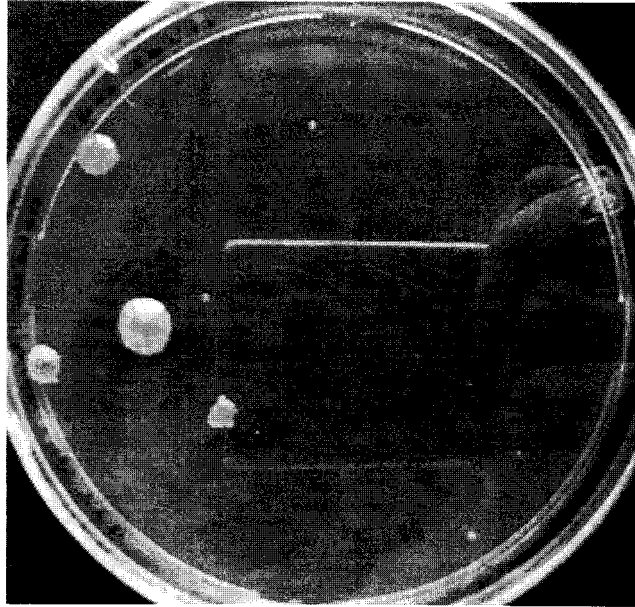


Figura 9

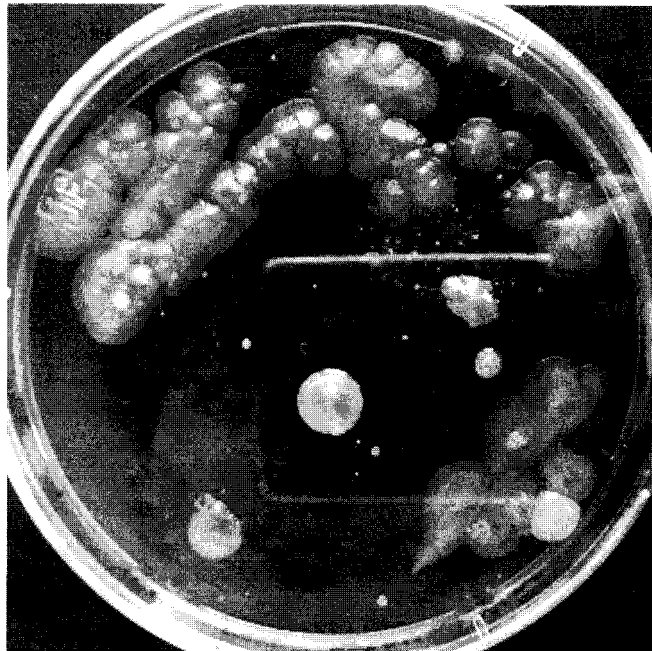


Figura 10

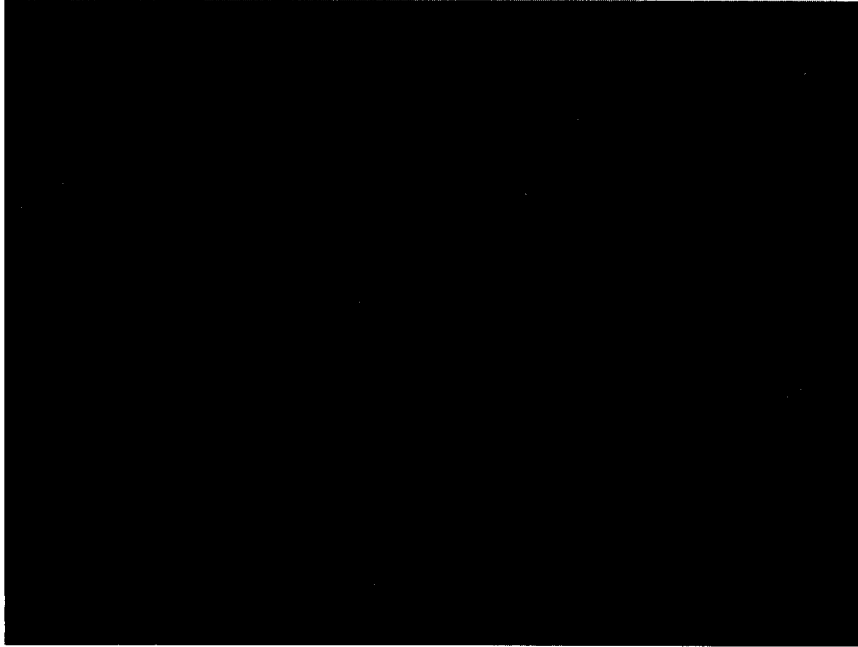


Figura 11

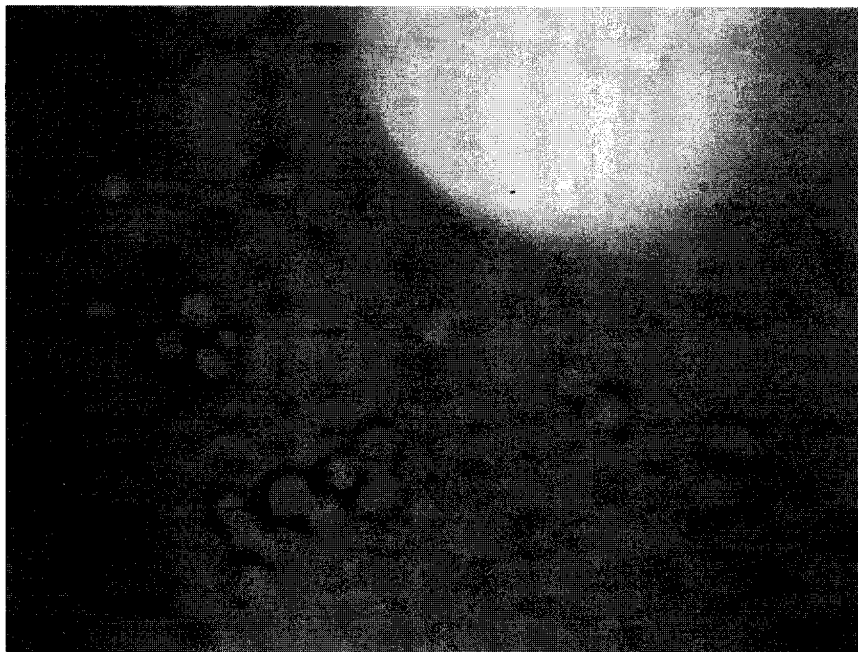


Figura 12

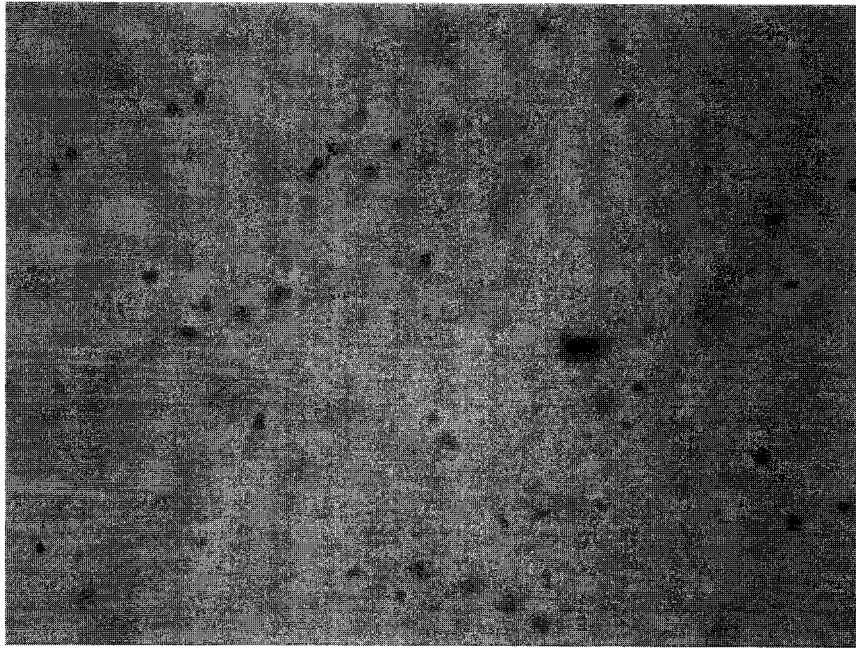


Figura 13

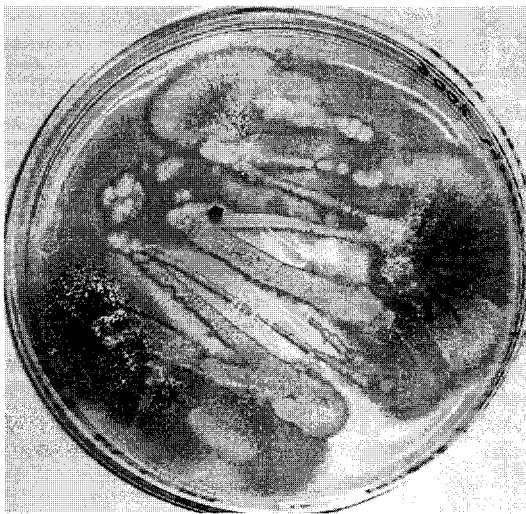


Figura 14

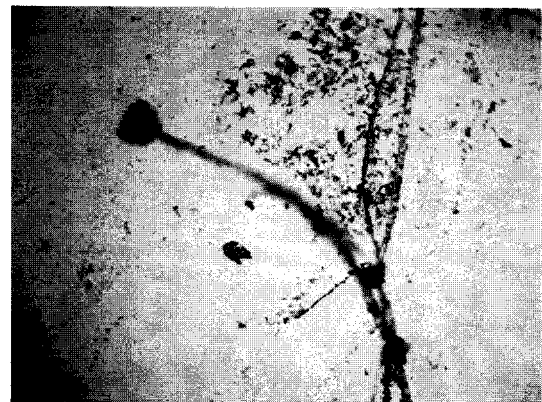


Figura 15

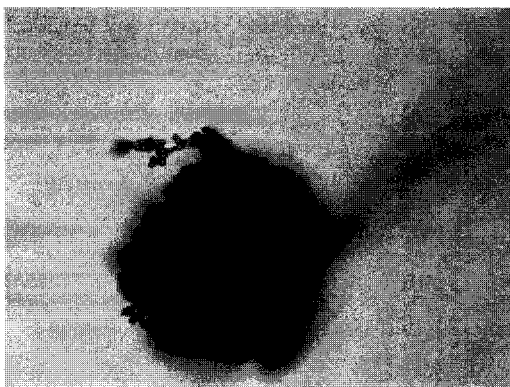


Figura 16



Figura 17



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901997

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Escuela de Agricultura. Sur de Mendoza, Tierra de Buenos Vinos: Enología. [online] 18.02.2003. [Recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.oni.escuelas.edu.ar/olimpi99/tierradebuenosvinos/vinoelab.htm >	1
A	GARCÍA MUÑOZ-SECA MJ: " CARACTERIZACIONES MOLECULARES EN CEPAS LEVADURIFORMES", Federación Española de Asociaciones de Enólogos, -Artículos Técnicos- (Resumen) [online], Artículo científico publicado originalmente en la revista "Enólogos" nº 39 (enero-febrero 2006). [Recuperado el 29.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.enologo.com/tecnicos/eno39/eno39_2.html >	1
A	FR 2844275 A1 (DESPAGNE JEAN LOUIS) 12.03.2004, todo el documento.	1
A	FR 2751322 A1 (VIGNOLLES JEAN) 23.01.1998, todo el documento, en particular, página 11, líneas 21-28.	1
A	Productos del Moncayo. Vino Ecológico. [online] primer párrafo. 17.10.2005. [Recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.productosdelmoncayo.com/vino-ecologico.php >	1
A	EP 1482029 A1 (INST MADRILENO DE INVESTIGACIO) 01.12.2004, todo el documento.	1
A	JP 3285670 A (BODYSONIC KK) 16.12.1991, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW199205, N° DE ACCESO1992-038431.	1
A	RU 2186846 C2 (GUP G et al.) 10.08.2002, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW200303, N° DE ACCESO 2003-037549.	1
A	FR 2630455 A1 (TAX ADMINISTRATION AGENCY MINI et al.) 27.10.1989, todo el documento.	1
A	WO 2009046485 A1 (AUSTRALIAN WINE RES INSTLTD et al.) 16.04.2009, todo el documento.	1
A	FR 2687544 A1 (BIREMONT GERALD) 27.08.1993, todo el documento.	1

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
18.04.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901997

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DI MARO E et al.: "Yeasts Dynamics During Spontaneous Wine Fermentation of the Catalanesca Grape". Int. J. Food Microbiol. (2007), vol. 117, pp.: 201-210, todo el documento.	1

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
18.04.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
2/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01G17/02 (2006.01)**C12G1/022** (2006.01)**C12N1/16** (2006.01)**C12G3/02** (2006.01)

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

A01G, C12G, C12N

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: 18.04.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1
Reivindicaciones

SI
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	Escuela de Agricultura. Sur de Mendoza, Tierra de Buenos Vinos: Enología. [online] 18.02.2003. [Recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.oni.escuelas.edu.ar/olimpi99/tierradebuenosvinos/vinoelab.htm >	
D02	GARCÍA MUÑOZ-SECA MJ: " CARACTERIZACIONES MOLECULARES EN CEPAS LEVADURIFORMES", Federación Española de Asociaciones de Enólogos, -Artículos Técnicos- (Resumen) [online], Artículo científico publicado originalmente en la revista "Enólogos" nº 39 (enero-febrero 2006). [Recuperado el 29.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.enologo.com/tecnicos/eno39/eno39_2.html >	
D03	FR 2844275 A1 (DESPAGNE JEAN LOUIS) 12.03.2004, todo el documento.	
D04	FR 2751322 A1 (VIGNOLLES JEAN) 23.01.1998, todo el documento, en particular, página 11, líneas 21-28.	
D05	Productos del Moncayo. Vino Ecológico. [online] primer párrafo. 17.10.2005. [Recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de Internet: < http://www.productosdelmoncayo.com/vino-ecologico.php >	
D06	EP 1482029 A1 (INST MADRILENO DE INVESTIGACIO) 01.12.2004, todo el documento.	
D07	JP 3285670 A (BODYSONIC KK) 16.12.1991, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW199205, Nº DE ACCESO1992-038431.	
D08	RU 2186846 C2 (GUP G et al.) 10.08.2002, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 28.03.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW200303, Nº DE ACCESO 2003-037549.	
D09	FR 2630455 A1 (TAX ADMINISTRATION AGENCY MINI et al.) 27.10.1989, todo el documento.	
D10	WO 2009046485 A1 (AUSTRALIAN WINE RES INST LTD et al.) 16.04.2009, todo el documento.	
D11	FR 2687544 A1 (BIREMONT GERALD) 27.08.1993, todo el documento.	
D12	DI MARO E et al.: "Yeasts Dynamics During Spontaneous Wine Fermentation of the Catalanesca Grape". Int. J. Food Microbiol. (2007), vol. 117, pp.: 201-210, todo el documento.	

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 solicitud reivindica un método para la obtención de levaduras vinificantes autóctonas.

D01 y D02 se refieren a procedimientos generales de fabricación de vino en los que se no se añaden levaduras externas al proceso. Los documentos D3-D12 hacen referencia a procedimientos de elaboración de vino, a aislamiento de cepas autóctonas de levadura y a la utilización de dichas levaduras en la fabricación de vino u otros productos. Sin embargo, no se ha considerado que estos documentos sean relevantes para el contenido de la reivindicación, al afectar tan sólo a alguna parte de la misma, pero no a su conjunto.

Por todo lo anterior, se considera que la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986, y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.