

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 474**

21 Número de solicitud: 201500195

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.03.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.12.2015

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.07.2016

Fecha de concesión:

21.04.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.04.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Sección contratos y patentes C/ Donoso Cortés
65 - 1ª planta
28015 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SANTOS DE LA SEN, Antonio;
MARQUINA DÍAZ, Domingo;
BELDA AGUILAR, Ignacio;
NAVASCUÉS LÓPEZ-CORDÓN, Eva;
ALONSO CONDE, Rafael Alejandro y
RUIZ RUIZ, Javier**

54 Título: **Medio de cultivo selectivo para levaduras con actividad β -Liasa, métodos de elaboración y uso**

57 Resumen:

Medio de cultivo selectivo para levaduras con actividad β -lasis, métodos de elaboración y uso.

La presente invención se refiere a un medio de cultivo para seleccionar y aislar levaduras capaces de incrementar la producción de aromas típicos en las fermentaciones vínicas en base a su actividad β -lasis. El medio de cultivo de la invención incluye, como única fuente de nitrógeno, un compuesto de cisteína-S-conjugado. Las levaduras que tienen actividad β -lasis liberan NH_3 a partir de dicho compuesto de cisteína-S-conjugado y, de esta manera, obtienen nitrógeno para crecer.

La invención también incluye un método para elaborar el medio de cultivo de la invención así como dos métodos para utilizar el medio de cultivo:

- en forma sólida para la selección y aislamiento de levaduras con actividad β -lasis,
- en forma líquida para la cuantificación de la actividad β -lasis de levaduras.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 553 474 B2

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo selectivo para levaduras con actividad β -liasa, métodos de elaboración y uso.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se encuadra en el sector enológico, dentro del sector agroalimentario; más concretamente, se refiere al aislamiento de levaduras con óptimas propiedades para la revelación de aromas tiólicos en la fermentación de vinos.

10

Estado de la técnica

Los beneficios de utilizar levaduras comerciales para la obtención de vinos de calidad (fermentaciones seguras y calidad sensorial controlada) han sido claramente demostrados, siendo necesarias estas levaduras para la trazabilidad y la regularidad de los procesos de vinificación. Durante el proceso de vinificación, diversas rutas bioquímicas del metabolismo de las levaduras funcionan para la formación y desarrollo de aromas característicos en el vino. Sin embargo, a pesar de que la microflora de levaduras presente en el viñedo y en la bodega ofrece una importante diversidad, es el género *Saccharomyces* el que monopoliza casi exclusivamente todas las fermentaciones alcohólicas.

El efecto de distintas especies de levadura como inóculo en las fermentaciones vínicas sobre el perfil sensorial de los vinos ha sido subestimado al no ser bien conocidos dichos efectos. En los últimos años, los conocimientos científicos sobre las levaduras se han desarrollado considerablemente, poniendo de manifiesto la existencia de numerosas oportunidades para su utilización en bodega (Jolly, N.P. *et al.* (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14: 215-237). Las actividades metabólicas y enzimáticas de las levaduras han demostrado ser muy interesantes para mejorar muchos aspectos analíticos del vino y también para intensificar y mejorar sus propiedades sensoriales. La utilización de diferentes especies y cepas de levaduras ha sido muchas veces empírica, es decir, basada tan solo en si resultaban favorables o desfavorables para la producción de vino, sin un conocimiento profundo previo de las capacidades enzimáticas y metabólicas de las levaduras que asegure la utilidad, estabilidad y fiabilidad de las fermentaciones. Por estas razones existe un interés bien fundamentado en encontrar una vía para la rápida detección y caracterización de

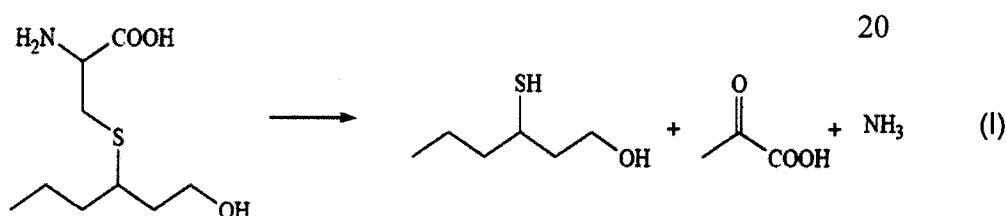
las actividades enzimáticas, ligadas a ciertas especies de levaduras, que presenten incidencia sobre el vino obtenido para mejorar su perfil sensorial.

- 5 Los aromas varietales son aquellos resultantes de la propia uva y, por tanto, dependen de la variedad de uva, el suelo y el clima. Las levaduras tienen la capacidad de poner de manifiesto, o revelar, algunas familias de dichos aromas a partir de los precursores conjugados sin olor presentes en la uva, utilizando para ello sus capacidades enzimáticas.
- 10 Los trabajos que han conducido al conocimiento de la existencia de precursores de aroma en la uva fueron realizados en primer lugar en las variedades moscatel, donde se describió la existencia de un componente varietal no volátil capaz de contribuir al aroma final del vino a través de su liberación por acción de las levaduras.
- 15 Aunque en algunos casos no se conoce la acción exacta de la levadura, la calidad de los vinos obtenidos de un mismo mosto con diferentes cepas de levadura (siendo idénticos todos los otros parámetros de vinificación) puede ser muy distinta. En consecuencia, la elección de la cepa de levadura (y el conocimiento de su potencial de revelación de aromas) es muy importante.
- 20 Se puede concluir que buena parte del aroma varietal procedente de la uva se encuentra en forma de precursores sin olor ligados a otros componentes de la uva; y que la levadura, gracias a su potencial enzimático, puede actuar sobre estos precursores para liberar la parte volátil de la molécula que enriquecerá la parte
- 25 aromática del vino. Es lo que se conoce como revelación de aromas. Este potencial enzimático varía de una cepa de levadura a otra, lo que significa que, en función de la cepa de levadura utilizada, el potencial aromático varietal del mosto será revelado en mayor o menor medida.
- 30 Existen una serie de aromas varietales ligados a precursores S-conjugados a cisteína que se encuentran en las uvas y mostos. Estos, como consecuencia de la actividad β -liasa de las levaduras, pueden producir aromas deseables en el vino. Tres tioles varietales son los que muestran incidencia en los vinos blancos: 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), 3-mercaptohexanol (3MH) y su derivado acetilado 3-
- 35 mercaptohexil acetato (3MHA). 4MMP y 3MH son compuestos que se encuentran en la uva en forma de precursores conjugados unidos a cisteína (Cys, del inglés *Cysteine*) (Cys-4MMP y Cys-3MH) y son liberados durante la fermentación alcohólica

mediante la actividad β -liasa que presentan las levaduras. Existen variaciones importantes en su liberación dependiendo de la cepa de levadura, de tal forma que es muy ventajoso seleccionar y emplear aquellas levaduras con elevada expresión de actividad β -liasa para obtener la máxima expresión del potencial aromático tiólico.

5

Los aromas tiólicos revelados se encuentran en la uva en forma de precursores no aromáticos y son liberados durante la fermentación alcohólica mediante la actividad β -liasa que presentan las levaduras (Roncoroni M. *et al.* (2011) The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology* 28: 926-935; Swiegers *et al.* (2007). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*. 24: 561-574; Swiegers JH, Pretorius IS. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 954-960). La actividad β -liasa actúa rompiendo los enlaces entre carbono y azufre (-C-S-).
 15 Así, sobre un sustrato natural S-conjugado a cisteína (3-mercaptohexanol-L-cisteína; Cys-3MH, por ejemplo) la actividad β -liasa da lugar a un aroma tiólico (3-mercaptohexanol; 3MH) presente en los vinos, además de ácido pirúvico y amoníaco. En la reacción (I), se representa esta reacción.



25

En la bibliografía científica existen métodos complejos de laboratorio para la detección de la presencia de aromas tiólicos liberados por acción de la enzima β -liasa, como el descrito por Howell *et al.* (Howell *et al.* (2004) Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine
 30 strains. *FEMS Microbiology Letters*. Nov 15; 240:125-129) o el descrito por Roncoroni (Roncoroni M. *et al.* (2011) The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology* 28: 926-935). Estos métodos consisten en detectar en un tubo hermético (mediante micro-extracción en fase sólida y análisis por cromatografía de
 35 gases acoplada a espectrometría de masas) la presencia de los aromas tiólicos liberados durante la fermentación. Estos métodos, si bien permiten conocer la liberación de aromas tiólicos (4MMP, 3MH y 3MHA) en base a la actividad β -liasa que

actúa sobre los precursores naturales presentes en la uva, no permiten realizar una determinación práctica y rápidamente procesable. La variabilidad de la presencia de los precursores en las variedades de uva, el procedimiento de extracción y purificación, la cuantificación y su preparación para la determinación de un ensayo
5 rápido y repetitivo son procedimientos extremadamente complicados, difíciles de llevar a cabo en un análisis rutinario en la industria enológica.

Sin embargo, los expertos coinciden en que la capacidad de las cepas de levadura para liberar tioles volátiles presenta una gran diversidad y en que la selección de
10 cepas de levaduras es extremadamente importante para modular la concentración de tioles volátiles en el vino.

Descripción detallada de la invención

Medio de cultivo selectivo para levaduras con actividad β -liasa, métodos de
15 elaboración y uso.

La presente invención se refiere a un medio de cultivo selectivo para el aislamiento y selección de levaduras con elevada capacidad de escindir precursores conjugados a cisteína liberando aromas tiólicos en fermentación alcohólica de mosto o uva en base
20 a su actividad enzimática β -liasa.

Las levaduras que presentan actividad β -liasa son capaces de crecer en el medio diseñado, formando colonias, y en base a ese crecimiento, el medio al que se refiere la invención permite la selección de las mismas. Este medio de cultivo permite
25 seleccionar rápidamente, las levaduras con actividad β -liasa y, por tanto, las levaduras seleccionadas ejercen una mayor liberación de aromas varietales tiólicos durante la fermentación alcohólica, un valor añadido en las levaduras que se utilizan en enología.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un medio de cultivo que comprende una base nutritiva para levaduras que aporta la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de las levaduras pero no contiene fuentes de nitrógeno, un compuesto de cisteína-S-conjugado que actúa como sustrato para la enzima β -liasa, un cofactor para la enzima β -liasa, un agente inhibidor del crecimiento bacteriano y, para medios
35 sólidos, un agente solidificante.

Como compuesto de cisteína-S-conjugado se utilizan preferentemente compuestos sintéticos y, entre ellos, es de elección la S-metil-L-cisteína que es hidrolizada por enzimas del grupo de las β -liasas de la levadura, liberando los productos de la reacción, entre los que se encuentra el amoníaco. El amoníaco, tras su liberación, es
 5 usado como única fuente de nitrógeno por las levaduras con actividad β -liasa y, por tanto, éstas pueden crecer mientras que aquellas levaduras que no tienen actividad β -liasa no son capaces de crecer. Los compuestos sintéticos de cisteína-S-conjugado son compuestos no odorantes cuya estructura es análoga a la de los sustratos naturales de dicha actividad β -liasa presentes en la uva y el mosto (Cys-3MH y Cys-
 10 4MMP), presentando idéntico tipo de enlace carbono-azufre (C-S) que es hidrolizado por la enzima β -liasa.

El compuesto sintético de cisteína-S-conjugado, preferentemente se trata de S-metil-L-cisteína, se añade en el medio de cultivo a una concentración final de 0,05 a 2 g/l,
 15 preferentemente 0,1 g/l.

El cofactor para la enzima β -liasa, preferentemente el piridoxal-5'-fosfato, se utiliza a una concentración final de 0,005 a 0,015 g/l, preferentemente 0,01 g/l.

20 El inhibidor de crecimiento bacteriano se añade en concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente contaminantes. Se utiliza preferentemente cloranfenicol y, preferentemente, a una concentración final de 50 mg/l.

25 Por otro lado, el pH del medio de cultivo se ajusta entre pH 3.0 y pH 4.0, preferentemente a 3,5 para simular las condiciones de fermentación vínica. Se trata, por lo tanto, de un medio de cultivo doblemente selectivo: permite seleccionar levaduras con actividad β -liasa que, además, son capaces de crecer y mantener esa actividad en condiciones de acidez semejantes a las de las fermentaciones vínicas.

30 Cuando se desea solidificar el medio, se añade preferentemente agar-agar a una concentración final de entre 15 y 20 g/l.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar el medio de cultivo
 35 de la invención, que comprende los siguientes pasos:

a) disolver en agua desionizada y ajustar con HCl a un pH comprendido entre pH 3.0 y 4.0, preferentemente de 3,5 los siguientes componentes:

- base nutritiva para levaduras con aporte de carbono pero no de nitrógeno, en concentración final de 5 a 20 g/l,
 - compuesto de cisteína-S-conjugado en concentración final de 0,05 a 2 g/l,
 - cofactor para la enzima β -liasa en concentración final de 0,005 a 0,015 g/l,
- 5 b) esterilizar por filtración, con filtros de 0,22-0,45 μ m, cada una de las disoluciones del paso a);
- c) mezclar, en condiciones asépticas, todos los componentes del paso b).

Preferentemente, como base nutritiva se utiliza la conocida como "Yeast Carbon Base". Así mismo, el compuesto de cisteína-S-conjugado es preferentemente sintético y, entre ellos, el preferido es S-metil-L-cisteína. Como cofactor para la enzima β -liasa se utiliza preferentemente el piridoxal-5'-fosfato. Además, puede añadirse un inhibidor del crecimiento bacteriano en concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente contaminantes; preferentemente,

10 se utiliza cloranfenicol y se utiliza a una concentración final de 50 mg/l.

- Para elaborar el medio de cultivo de la invención en forma sólida se añaden los siguientes pasos al método descrito más arriba:
- d) esterilizar en autoclave el agente solidificante (agar-agar) en agua desionizada a
- 20 una concentración final entre 15 y 20 g/l;
- e) atemperar el agente solidificante disuelto en agua y esterilizado hasta que alcance una temperatura de 50-55°C;
- f) añadir en condiciones asépticas las disoluciones esterilizadas del paso b)
- g) disponer el medio de cultivo del paso f) en placas de Petri, en condiciones
- 25 asépticas, y dejar enfriar hasta que solidifique.

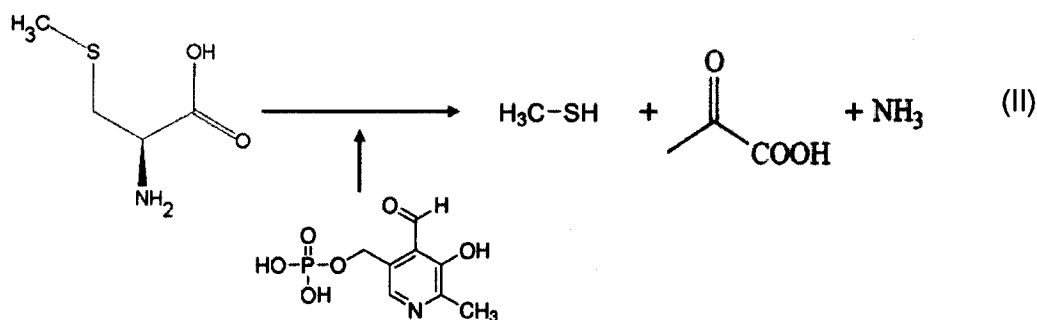
La conservación de las placas Petri con el medio de cultivo se realiza a 4°C.

El medio de cultivo sólido, una vez preparado, se utiliza poniéndolo en contacto con una muestra del producto del que se quieren seleccionar las levaduras con elevada capacidad de producir aromas tiólicos (vino, mosto, uva u otro alimento). Previamente, de la muestra se eliminan los nutrientes por filtración o centrifugación y lavado. La muestra se extiende sobre la superficie del medio de cultivo sólido y se incuba en estufa de cultivo a la temperatura adecuada de crecimiento de las

30 levaduras (20-30°C) y por un tiempo de 48-72 horas para permitir la aparición de colonias.

La detección de las levaduras se realiza por observación directa de las placas Petri de cultivo. Las levaduras con actividad β -liasa darán lugar a colonias mientras que otras levaduras sin actividad β -liasa presentes en la muestra no se desarrollarán, permitiendo la detección diferencial, y posteriormente, el aislamiento de las colonias de las levaduras con actividad β -liasa.

Las levaduras con actividad β -liasa son capaces de desarrollarse gracias a que son capaces de utilizar el amoníaco (NH_3) proveniente de la hidrólisis del compuesto de cisteína-S-conjugado, y que es la única fuente de nitrógeno de la que disponen las levaduras de la muestra, como ocurre en el caso de utilizar la S-metil-L-cisteína. En la reacción (II), se representa esta reacción: la β -liasa, en presencia de piridoxal-5'-fosfato como cofactor, metaboliza la S-metil-L-cisteína dando lugar a metanotiol, ácido pirúvico y amoníaco.



Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para utilizar el medio de cultivo de la invención en la selección y aislamiento de levaduras con actividad β -liasa que comprende:

- a) preparar una o varias muestras de vino, mosto, uva u otro alimento por filtrado o por centrifugación y posterior lavado;
- b) extender cada muestra sobre la superficie del medio de cultivo sólido de la invención;
- c) incubar el medio de cultivo sembrado a 20-30°C durante 48-72 horas;
- d) seleccionar y aislar las colonias desarrolladas.

El medio de cultivo de la invención, en su forma líquida, también puede utilizarse para detectar y cuantificar la actividad β -liasa de las levaduras mediante un procedimiento que incluye el crecimiento de la levadura de interés en dicho medio líquido, seguido de la detección del producto volátil de la reacción de la actividad β -liasa mediante cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC-MS; de las siglas en inglés *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Este método aporta un valor añadido al

medio de cultivo descrito en lo que respecta a su capacidad para cuantificar la actividad β -liasa. El uso del medio de cultivo líquido acoplado a la detección por GC-MS ofrece datos precisos sobre la eficacia de la actividad β -liasa de diferentes levaduras.

5

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para determinar cuantitativamente la actividad β -liasa de las levaduras que incluye:

- a) inocular la levadura de interés en el medio de cultivo de la invención en estado líquido;
- 10 b) incubar el medio de cultivo del paso a) a 20-30°C durante 24-48 horas;
- c) detectar por GC-MS los tioles volátiles producto de la reacción de la β -liasa.

El medio de cultivo líquido incluye, preferentemente, el compuesto sintético de cisteína-S-conjugado denominado S-metil-L-cisteína de manera que, por GC-MS, se
15 detecta el derivado tiólico producto de su hidrólisis, el metanotiol, consecuencia de la actividad β -liasa.

La utilización de medios de cultivo generales para el aislamiento de mohos y levaduras implica la posterior caracterización de los aislamientos realizados para
20 determinar su actividad β -liasa, hecho que, además, en la actualidad se realiza de forma empírica, una vez elaborado el vino, y sin posibilidad de anticipar si la levadura será óptima o no para revelar los aromas tiólicos del vino antes de la fermentación. Por tanto, dotar de un medio de cultivo que permita el aislamiento de levaduras con elevada actividad β -liasa permite conocer si una levadura posee o no la capacidad de
25 revelar los aromas tiólicos de forma eficaz y reducir el tiempo necesario para determinarlo, aumentando la información rutinaria que determina si una levadura es adecuada o no para su utilización enológica en lo que a liberación de aromas tiólicos se refiere.

30 Se trata de un procedimiento sencillo, fácil de ser reproducido por cualquier laboratorio de fabricación de medios de cultivo microbiológicos y, una vez fabricado, el medio es de aplicación directa para cualquier empresa o laboratorio relacionados con la industria enológica interesados en aislar levaduras con un marcado carácter para la producción de aromas varietales tiólicos o en determinar cuantitativamente
35 dicho carácter. Las levaduras seleccionadas se aplicarán en fermentaciones industriales para la producción de vinos con mejores características aromáticas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Actividad β -liasa de dos levaduras (A y B) aisladas de mosto. Se han inoculado por separado dos levaduras en el medio líquido de la invención y se han comparado con un control sin inocular (D) y con una levadura sin actividad β -liasa (C) como control negativo. La primera (A), una cepa de *Torulaspora delbrueckii* de la que empíricamente se conocía su actividad β -liasa, que se usó como control positivo. La segunda levadura (B) fue una cepa de *Kluyveromyces marxianus* aislada a partir de mosto de uva utilizando el medio sólido descrito en la presente invención y que presenta una actividad β -liasa un 18% superior a la de la levadura A. La figura muestra la actividad β -liasa determinada mediante la detección del ion 49 correspondiente al metanotiol (CH_4S ; producto de la reacción) por GC-MS. Se aprecia que las levaduras A y B, que crecen en el medio de la presente invención, presentan una mayor actividad β -liasa detectada como una mayor producción de metanotiol. El control no inoculado (D) y el control negativo (C) muestran una liberación residual de metanotiol debida a descomposición espontánea de la S-metil-L-cisteína.

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Preparación de medio de cultivo sólido.

Para preparar 1000 ml de medio de cultivo sólido con S-metil-L-cisteína, en primer lugar se disolvieron, en 100 ml de agua desionizada, los siguientes compuestos:

- Yeast Carbon Base (Difco): 12 g,
- S-metil-L-cisteína (Sigma-Aldrich): 1 g,
- Piridoxal-5'-fosfato (Sigma-Aldrich): 0,1 g,

y se ajustó el pH a 3,5 con HCl, esterilizándose posteriormente por filtración, con filtros de 0,22 μm .

A continuación, se prepararon 50 mg de cloranfenicol en 2 ml de etanol 70%. Por otro lado, se disolvieron 20 g de agar-agar en 900 ml de agua desionizada, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dejó atemperar a 50°C en un baño de agua.

Se mezclaron, en condiciones asépticas, todos los componentes del medio ya preparados y se procedió a distribuir el medio en placas Petri, también en condiciones asépticas, dejándolo enfriar para su solidificación. Posteriormente, se conservó a 4°C hasta su utilización.

5

Ejemplo 2. *Aislamiento y selección de levaduras con actividad β -liasa.*

Se llevó a cabo el aislamiento de levaduras, a partir de mostos recién obtenidos de uvas de la variedad verdejo, usando el medio preparado según se describe en el ejemplo 1. Se filtraron 0,1 ml de mosto con un filtro de 0,22 μ m para retirar todo el
10 mosto y sus nutrientes y el material retenido en el filtro se lavó tres veces haciendo pasar a través del filtro un volumen de 100 ml de agua desionizada estéril. El filtro se depositó en la superficie del medio de cultivo preparado como se indica en el ejemplo 1 y se incubó a 20°C hasta el desarrollo de colonias de levaduras. Las colonias de levaduras crecidas en 72 horas fueron aisladas.

15

Ejemplo 3. *Preparación de medio de cultivo líquido.*

Se procedió como en el ejemplo 1 pero sin añadir agar-agar. El medio de cultivo se distribuyó en viales especiales para GC-MS de 20 ml de capacidad, a razón de 10 ml por tubo.

20

Ejemplo 4. *Determinación de la capacidad de las levaduras para producir metanotiol en el medio de cultivo.*

Para demostrar la validez del método de selección, se seleccionaron 3 cepas de levaduras según su capacidad para desarrollarse en medio de cultivo de la invención.
25 La primera (A), una cepa de *Torulaspora delbrueckii* de la que empíricamente se conocía su actividad β -liasa, se usó como control positivo. La segunda (B) fue una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, aislada a partir de mosto de uva según el ejemplo 2. La tercera (C), una cepa de *Aureobasidium pullulans* incapaz de crecer en el medio de cultivo descrito en la presente invención debido a su nula actividad β -liasa, que se
30 usó como control negativo. Los resultados se compararon con el resultado obtenido en el medio descrito en el ejemplo 3 sin inocular (D). Los cuatro ensayos (A, B, C y D) se analizaron para determinar la actividad β -liasa usando el medio de cultivo obtenido según se describe en el ejemplo 3 y un análisis utilizando la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) de los productos de la reacción
35 generados (metanotiol) durante el cultivo (Figura 1).

Se preparó un inóculo en el medio líquido, en viales especiales para GC-MS de 20 ml (a razón de 10 ml por tubo) con cada una de las levaduras seleccionadas. Dichos inóculos se utilizaron para sembrar los tubos de rosca, con igual medio de cultivo al descrito en el ejemplo 3, hasta alcanzar una turbidez de 0,1 medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 20°C en agitación; tiempo tras el cual se procedió a determinar el contenido en metanotiol presente en el gas de cabeza por espectrometría de masas. El ensayo se realizó por triplicado mostrándose la desviación estándar con las correspondientes barras de error. Los resultados de actividad β -liasa se expresaron porcentualmente (Figura 1), en relación con el valor más elevado de actividad registrado.

El equipo utilizado para la cuantificación del metanotiol fue un espectrómetro de masas de trampa de iones modelo Saturno 2200 acoplado a un cromatógrafo de gases CP-3800, ambos de la casa comercial Varian. La columna capilar utilizada fue Phenomenex ZB-5MS (30m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m *film thickness*). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 ml/min. El espectrómetro de masas operó en modo *full-scan* en un intervalo de masas entre 30-400 uma (unidades de masa atómica). El programa de temperatura que se utilizó fue: inicialmente a 30°C durante 2 minutos, después subió progresivamente hasta 40°C a razón de 2°C/minuto, a continuación subió a 100°C a razón de 15°C/minuto y finalmente subió a 200°C a razón de 25°C/minuto y se mantuvo 5 minutos a esa temperatura. El tiempo total del análisis fueron 20 minutos. La temperatura del inyector de tipo 1079 fue de 260°C y el volumen inyectado de muestra (gas de cabeza) fue de 200 μ L en modo *headspace*. El ion determinado en espectrometría de masas para detectar el metanotiol fue el ion 49. La determinación se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos (Figura 1) muestran que las levaduras (A y B) producen una cantidad de metanotiol entre 40 y 50 veces superior, respectivamente, a la producida en el medio sin inocular (D) y por la levadura (C) incapaz de crecer en el medio de cultivo desarrollado según el ejemplo 2, en los que la detección de una pequeña cantidad de metanotiol se debe a una tasa residual de descomposición espontánea de la S-metil-L-cisteína. Esto demuestra que las levaduras que se aislaron en el medio descrito en la presente invención según el ejemplo 2, presentaron una elevada actividad β -liasa y también se demuestra la utilidad del medio de cultivo en su forma líquida para la cuantificación de la actividad β -liasa mediante la detección de metanotiol según el método descrito de análisis por GC-MS.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de levaduras con actividad β -
5 liasa que comprende:
 - una base nutritiva para levaduras sin aporte de nitrógeno,
 - S-metil-L-cisteína,
 - piridoxal-5'-fosfato,en el que la base nutritiva es "Yeast Carbon Base" (YCB) y la S-metil-L-
10 cisteína es el único aporte de nitrógeno.
2. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 1 cuyo pH tiene un valor de entre 3,0 y 4,0.
- 15 3. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que la concentración final del medio YCB es de 5 a 20 g/l.
4. Medio de cultivo selectivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que incluye un agente inhibidor del crecimiento bacteriano.
- 20 5. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 4 en el que el agente inhibidor del crecimiento bacteriano es cloranfenicol.
6. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 5 en el que el
25 cloranfenicol está a una concentración final de 50 mg/l.
7. Medio de cultivo selectivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la concentración final del compuesto de S-metil-L-cisteína es de 0,05 a 2 g/l.
- 30 8. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 7 en el que la S-metil-L-cisteína está a una concentración final de 0,1 g/l.
9. Medio de cultivo selectivo según cualquiera de las reivindicaciones
35 anteriores en el que el piridoxal-5'-fosfato está a una concentración final de 0,005 a 0,015 g/l.

10. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 9 en el que el piridoxal-5'-fosfato está a una concentración final de 0,01 g/l.
11. Medio de cultivo selectivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye un agente solidificante.
12. Medio de cultivo selectivo según la reivindicación 11 en el que el agente solidificante es agar-agar a una concentración final de 15 a 20g/l.
13. Método para elaborar un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de levaduras con actividad β -liasa que comprende los siguientes pasos:
- a) disolver en agua desionizada y por separado los siguientes componentes:
- base nutritiva para levaduras sin aporte de nitrógeno "Yeast carbon base",
 - S-metil-L-cisteína,
 - piridoxal-5'-fosfato,
- b) esterilizar por filtración, con filtros de 0,22-0,45 μ m, cada una de las disoluciones del paso a);
- c) mezclar, en condiciones asépticas, todos los componentes del paso b).
14. Método según la reivindicación 13 en el que, en el paso a), además, se ajusta el pH de cada disolución a un valor de entre 3,0 y 4,0 con HCl.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en el que se incluyen los siguientes pasos:
- d) esterilizar en autoclave un agente solidificante disuelto en agua desionizada;
- e) atemperar el agente solidificante del paso d) hasta que alcance 50-55°C;
- f) mezclar, en condiciones asépticas, el agente solidificante del paso e) con la mezcla del paso c);
- g) distribuir el medio de cultivo del paso f) en placas de Petri, en condiciones asépticas, y dejar enfriar hasta que solidifique.
16. Método según la reivindicación 15 en el que el agente solidificante que se añade es agar-agar a una concentración final de 15 a 20g/l.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-16 en el que se añade un agente inhibidor del crecimiento bacteriano a la mezcla del paso c).
18. Método según la reivindicación 17 en el que el inhibidor del crecimiento bacteriano es cloranfenicol.
19. Método según la reivindicación 18 en el que el cloranfenicol se añade a una concentración final de 50 mg/l.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-19 en el que la base nutritiva para levaduras "Yeast carbon base" se añade a concentración final de 5 a 20 g/l.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-20 en el que la S-metil-L-cisteína se añade a concentración final de 0,05 a 2 g/l.
22. Método según la reivindicación 21 en el que la S-metil-L-cisteína se añade a una concentración final de 0,1 g/l.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-22 en el que el piridoxal-5'-fosfato se añade a una concentración final de 0,005 a 0,015 g/l.
24. Método según la reivindicación 23 en el que el piridoxal-5'-fosfato se añade a una concentración final de 0,01 g/l.
25. Método de selección y aislamiento de levaduras actividad β -liasa que comprende:
 - a) preparar una o varias muestras por filtrado o por centrifugación y lavado;
 - b) extender la/s muestra/s sobre la superficie del medio de cultivo sólido definido en las reivindicaciones 11-12;
 - c) incubar a 20-30°C durante 48-72 horas;
 - d) seleccionar y aislar las colonias crecidas sobre el medio de cultivo.
26. Método para determinar cuantitativamente la actividad β -liasa de levaduras que incluye:
 - a) inocular una levadura en un medio de cultivo líquido según se define en las reivindicaciones 1-10;

- b) incubar a 20-30°C durante 24-48 horas;
- c) detectar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) el derivado tiólico volátil de la reacción de la β -liasa.

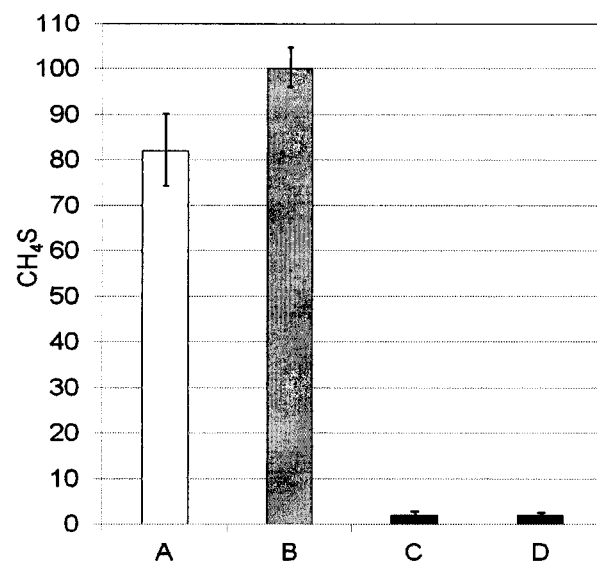


Fig. 1



- ②① N.º solicitud: 201500195
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Difco ^{1M} Yeast Carbon Base. Cat. No. 239110. Recuperado de Internet [26.11.2015], < http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/YeastCarbonBase_239210.pdf > todo el documento.	1-30
X	COOPER, A.J.L. et al. "Cysteine S-conjugate β -lyases". AMINO ACIDS. Febrero 2006, Vol. 30, N° 1, páginas 1-15, todo el documento.	1-30
X	HOWELL, K.S. et al. "Genetic determinants of volatile-thiol release by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during wine fermentation". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Septiembre 2005, Vol. 71, N° 9, páginas 5420-5426, todo el documento.	1-30
X	HOLT, S. et al. "Engineering <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an <i>S. cerevisiae</i> gene, STR3, for improvement of wine aroma". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Junio 2011, Vol. 77, N° 11, páginas 3626-3632, todo el documento.	1-30
X	TOMINAGA, T. et al. "Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from <i>Vitis vinifera</i> L. Cv. Sauvignon Blanc". J. AGRIC. FOOD. CHEM. Marzo 1998. Vol. 46, N° 3, páginas 1044-1048, todo el documento.	30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.11.2015

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/16 (2006.01)**C12N9/88** (2006.01)**G01N33/68** (2006.01)

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

C12N, G01N

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-30	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-30	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.

Consideraciones:

La invención consiste en un medio de cultivo específico para la selección de levaduras productoras de β -liasas activas sobre S-conjugados de cisteína. El medio de cultivo está formado por una base nutritiva sin aporte de nitrógeno, un compuesto S-conjugado de cisteína y un cofactor para la enzima β -liasa.

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	Difco™ Yeast Carbon Base. Cat. No. 239110. Recuperado de Internet [26.11.2015], < http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/YeastCarbonBase_239210.pdf >	
D02	COOPER, A.J.L. et al. "Cysteine S-conjugate β -lyases". AMINO ACIDS. Febrero 2006, Vol. 30, Nº 1, páginas 1-15.	
D03	HOWELL, K.S. et al. "Genetic determinants of volatile-thiol release by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during wine fermentation". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Septiembre 2005, Vol. 71, Nº 9, páginas 5420-5426.	
D04	HOLT, S. et al. "Engineering <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an <i>S. cerevisiae</i> gene, STR3, for improvement of wine aroma". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Junio 2011, Vol. 77, Nº 11, páginas 3626-3632.	
D05	TOMINAGA, T. et al. "Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from <i>Vitis vinifera</i> L. Cv. Sauvignon Blanc". J. AGRIC. FOOD. CHEM. Marzo 1998. Vol. 46, Nº 3, páginas 1044-1048.	

El documento D01, es la información sobre la composición y propiedades del medio "Yeast Carbon Base" de la casa Difco™ incluida en su página web.

El documento D02, es una revisión sobre las enzimas S-conjugados de cisteína β -liasas.

El documento D03, identifica los determinantes genéticos de la β -liasa de *Saccharomyces cerevisiae*, implicados en la formación del tiol volátil 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) durante la fermentación del vino.

El documento D04, describe la purificación de una enzima β -liasa de *Saccharomyces cerevisiae* implicada en la producción de los tioles aromáticos 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) y 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), la sobreexpresión del gen que la codifica y el interés de la sobreexpresión para aumentar el aroma del vino.

El documento D05, describe la aplicación de la espectroscopía de masas para analizar tioles volátiles relacionados con el aroma de los vinos

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

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-29

La invención está relacionada con un medio de cultivo específico para seleccionar cepas de levaduras productoras de β -liasas de S-conjugados de cisteína. Las reivindicaciones 1-29, definen el medio de cultivo de acuerdo a sus componentes de una manera muy general. El medio está integrado por: a) una base nutritiva para levaduras sin aporte de nitrógeno, b) un compuesto de cisteína-S-conjugado y c) un cofactor para la enzima β -liasa. De acuerdo a la redacción de las reivindicaciones se hacen las siguientes consideraciones.

1) El medio está integrado por una base nutritiva para levaduras, sin aporte de nitrógeno. Esta base nutritiva es una composición de la que no se aportan ni los componentes ni las proporciones en las que los cuales se encuentran en la misma. Estos datos tampoco se incluyen en la descripción. La base nutritiva no tiene características técnicas por lo que las reivindicaciones 1-29, no tienen características técnicas y soporte en la descripción.

2) En los ejemplos presentados en la descripción, se utiliza como base nutritiva para levaduras sin aporte de nitrógeno, el producto comercial "Yeast Carbon Base" de la casa DIFCO™ (ver D01) que está protegida por derechos de marca registrada. Un producto registrado, no puede formar parte de una composición que se pretende patentar.

Las reivindicaciones 1-29, no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Art. 6 y 8 de la LP.

Reivindicación 30

La aplicación de la espectroscopía de masas para cuantificar los tioles volátiles producidos durante la fermentación del vino, está ampliamente descrita en el estado de la técnica y un ejemplo es el documento D05. La reivindicación 30, no cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Art. 6 y 8 de la LP.