

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/050641 A1

(43) Fecha de publicación internacional
11 de abril de 2013 (11.04.2013)

WIPO | PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A23L 1/015 (2006.01) C12H 1/00 (2006.01)
A23L 2/84 (2006.01) C12R 1/80 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070694

(22) Fecha de presentación internacional:

5 de octubre de 2012 (05.10.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201131620 7 de octubre de 2011 (07.10.2011) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **MORENO ARRIBAS, María Victoria**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **CUEVA SÁNCHEZ, Carolina**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **BARTOLOMÉ SUALDEA, Begoña**; Instituto de Investigación en Ciencias de la

Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **GARCÍA RUIZ, Almudena**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **GONZÁLEZ ROMPINELLI, Eva María**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **MARTÍN ÁLVAREZ, Pedro Jesús**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **SALAZAR TORRES, Óscar**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **VICENTE PÉREZ, María Francisca**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **BILLS, Gerald**; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **UNGRÍA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

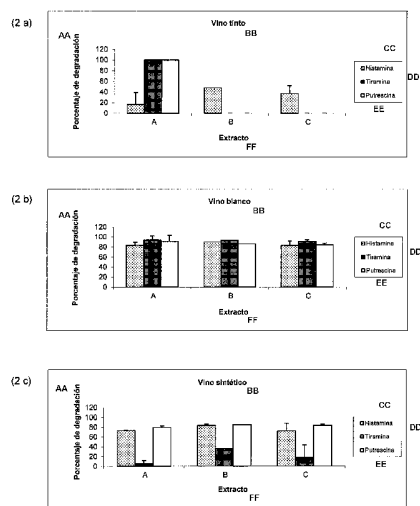
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ENZYME EXTRACTS FROM VINE FUNGI THAT DEGRADE BIOGENIC AMINES IN WINES

(54) Título : ENZIMÁTICOS DE HONGOS DE LA VID QUE DEGRADAN AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

FIGURA. 2



AA percentage degradation
BB extract
CC red wine
DD histamine
EE tyramine
FF putrescine

(57) Abstract: The present invention proposes new sources of raw materials for isolating fungi with amino oxidase enzyme activity. Specifically, the fungi described in the present invention originate from vines and other natural ecological niches closely linked to that addressed in the application, which are not customarily exploited for such purposes. These are thus new raw materials of low cost and simple, viable production processes. The present invention also relates to the production of enzyme extracts originating from preisolated fungi containing enzymes with the ability to degrade biogenic amines (i.e. histamine, tyramine and putrescine) without the need for the presence of molecular oxygen in the environment. Therefore, the enzyme extracts of fungal origin described in this invention could be used after the process of preparing fermented products that naturally exhibit high concentrations of biogenic amines, with a view to reducing the concentration thereof prior to market launch.

(57) Resumen: En la presente invención se proponen nuevas fuentes de materias primas para el aislamiento de los hongos con actividad enzimática amino oxidasa. En concreto los hongos que se describen en la presente invención proceden de viñedos y otros nichos ecológicos naturales e íntimamente relacionados con el que se persigue en la aplicación, y no explotados usualmente para tales fines. Se trata por tanto de nuevas materias primas de bajo coste y procesos de producción sencillos y rentables.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2013/050641 A1



GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

La presente invención también tiene como objetivo obtener extractos enzimáticos procedentes de hongos previamente aislados y que contienen enzimas con capacidad de degradar aminas biógenas (i.e. histamina, tiramina y putrescina) sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio. Por tanto, los extractos enzimáticos de origen fúngico descritos en esta invención se podrían aplicar tras el proceso de elaboración de productos fermentados que de forma natural presentan elevadas concentraciones de aminas biógenas, con la intención de reducir la concentración de las mismas antes de salir al mercado.

ENZIMÁTICOS DE HONGOS DE LA VID QUE DEGRADAN AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

La presente invención concierne a extractos enzimáticos de origen fúngico que
5 eliminan aminas biógenas (histamina, tiramina y putrescina) para su aplicación en la industria de la alimentación, en la agricultura y en la biotecnología.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que están presentes de forma natural en alimentos y bebidas fermentadas, especialmente queso, algunos productos cárnicos, cerveza y vino, entre otros. De forma general se admite que, la presencia de aminas biógenas en estos alimentos, está relacionada con los procesos de fermentación, y
15 fundamentalmente se debe a la acción de bacterias lácticas con actividad aminoácido descarboxilasa. El contenido total de aminas biógenas en el vino varía desde trazas a valores de hasta 130 mg/L (Soufleros et al., 1998). Las aminas biógenas mayoritarias en vinos son la histamina, tiramina y putrescina (Bauza et al, 1995; Silla Santos, 1996; Marcobal et al, 2006), que se producen
20 principalmente a partir de la descarboxilación microbiana de los correspondientes aminoácidos precursores, histidina, tirosina y ornitina, respectivamente.

El consumo de alimentos y bebidas con cantidades elevadas de aminas biógenas, como histamina y tiramina, se considera un riesgo potencial por sus efectos
25 tóxicos para la salud, que pueden ser más graves en los consumidores sensibles, ya que éstos presentan una reducción de las enzimas mono (MAO) y diamino (DAO) oxidasas que, de forma natural, se encuentran en el intestino humano y constituyen la principal vía de detoxificación de las aminas biógenas que ingerimos en la dieta (Ancín-Azpilicueta et al., 2008; Moreno-Arribas et al., 2009).
30 El etanol y la presencia de otras aminas en el alimento (como putrescina) pueden potenciar los efectos adversos de las aminas en el organismo humano. Por otro lado, la presencia de histamina supone una amenaza potencial para el sector enológico en las transacciones comerciales a determinados países, que imponen límites máximos de la concentración de histamina que admiten en los vinos.

Por todo lo expuesto, existe un gran interés en controlar la producción de aminas biógenas en los vinos y otros productos alimentarios. Sin embargo, en la actualidad, los únicos procedimientos disponibles para evitar la presencia en vinos de elevadas concentraciones de aminas, se basan en estrategias de prevención
5 que ponen el énfasis en controlar los principales factores que intervienen en la génesis de estos compuestos durante la vinificación (es decir, cepas de bacterias lácticas con actividad descarboxilasa, concentración de aminoácidos precursores, pH del vino y otros factores con incidencia directa en los anteriores), con el objetivo final de evitar su formación. Sin embargo, en la práctica estos
10 procedimientos suponen inconvenientes en bodega, y en algunos casos el llevarlos a cabo puede comprometer la composición química y calidad organoléptica del producto final, por lo que los elaboradores no siempre están dispuestos a asumirlos. Por tanto, en la práctica el problema de la formación de aminas biógenas en los vinos no está resuelto. De ahí, el interés en desarrollar
15 nuevos procedimientos eficaces para eliminar las aminas biógenas de los alimentos ya fermentados, incluido el vino.

En la actualidad, en el mercado no existen productos de origen fúngico a utilizar en el control de aminas biógenas en el vino. EP0132674A2 describe un
20 procedimiento para reducir la presencia de aminas biógenas en productos alimentarios basado en la puesta en contacto del alimento en cuestión con enzimas amino oxidasas de origen fúngico (*Aspergillus niger*) en presencia de oxígeno molecular.

25 El procedimiento desarrollado en EP0132674A2 fue aplicado con éxito para reducir la concentración de aminas biógenas de extractos de levaduras autolisadas. Sin embargo su aplicación a la producción de alimentos, específicamente durante la elaboración y maduración del queso, y en bebidas fermentadas como vino y cerveza, está restringida por la presencia de oxígeno en
30 el medio, es decir, que para el caso concreto de los vinos, el procedimiento descrito en EP0132674A2 únicamente podría ser útil en las fases previas a los procesos de fermentación, momento en el cual todavía no es relevante la presencia o no de aminas biógenas. De hecho, el vino como producto no figura entre los ejemplos que se incluyen en EP0132674A2.

La alta capacidad de secreción enzimática y de productos de alto valor añadido de hongos filamentosos ha sido ampliamente explotada comercialmente. Un ejemplo claro son una gran parte de los antibióticos disponibles en el comercio. La eliminación enzimática de aminas biógenas puede ser una forma segura y económica para eliminar estos compuestos problemáticos en los vinos y otros alimentos fermentados.

Se han descrito varios tipos de hongos filamentosos que producen actividades enzimáticas amino oxidasa utilizando las aminas como única fuente de carbono para su crecimiento (Yamada et al, 1965; Yamada et al, 1966; Adachi et al, 1970; Yamada et al, 1972; Isobe et al, 1982). El procedimiento de obtención de las enzimas amino oxidasas a partir de hongos filamentosos se ha descrito previamente (Yamada et al, 1965). En hongos filamentosos, se han purificado y caracterizado dos tipos de enzimas amino oxidasas (Frébort et al, 1996; Frébort et al, 1997). Además, el genoma de *Aspergillus niger* contiene seis genes que codifican para enzimas amino oxidasas. La expresión heteróloga de uno de esos genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha abordado recientemente (Kolaříková et al., 2009)

Las enzimas amino oxidasas presentes en distintos microorganismos como hongos y algunas bacterias lácticas, permiten, mediante una reacción oxidativa, degradar aminas biógenas para generar un aldehído, peróxido de hidrógeno y amonio. Esta reacción enzimática se favorece en presencia de oxígeno y humedad. Dependiendo del sustrato de partida, es decir de la amina biógena, se clasifican en diamino oxidasas (si se trata de histamina y putrescina) y monoamino oxidas (si el sustrato de partida es la tiramina).

Hasta el momento, no existe información sobre la distribución de estas enzimas en especies de hongos procedentes de la vid, ni tampoco sobre el potencial de los hongos de la vid para degradar las aminas biógenas en vinos y otros alimentos.

En los hongos, la mayoría de las enzimas amino oxidasas han sido estudiados en los extractos crudos cuando son inducidas por diferentes aminas, principalmente n-butilamina, espermina, metilamina y agmatina (Isobe et al., 1982; Frébort et al.,

1997a).

Por tanto, actualmente existe la necesidad de identificar nuevas fuentes de materias primas para el aislamiento de los hongos con esta capacidad enzimática amino oxidasa, con el objetivo de desarrollar un procedimiento de obtención de extractos enzimáticos de origen fúngico que aplicados a productos fermentados sean capaces de reducir la concentración de las aminas biógenas sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, mostrando su utilidad como agentes detoxificantes al final del proceso de elaboración de dichos productos y antes de salir al mercado.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se proponen nuevas fuentes de materias primas para el aislamiento de los hongos con actividad enzimática amino oxidasa. En concreto los hongos que se describen en la presente invención proceden de viñedos y otros nichos ecológicos naturales e íntimamente relacionados con el que se persigue en la aplicación, y no explotados usualmente para tales fines. Se trata por tanto de nuevas materias primas de bajo coste y procesos de producción sencillos y rentables.

La presente invención también tiene como objetivo obtener extractos enzimáticos procedentes de hongos previamente aislados y que contienen enzimas con capacidad de degradar aminas biógenas (es decir, la histamina, la tiramina y la putrescina) sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio. Por tanto, los extractos enzimáticos de origen fúngico descritos en esta invención se podrían aplicar tras el proceso de elaboración de productos fermentados que de forma natural presentan elevadas concentraciones de aminas biógenas, con la intención de reducir la concentración de las mismas antes de salir al mercado.

30

Otros objetos de la presente invención son el uso del citado extracto fúngico como agente detoxificante de aminas biógenas en la industria alimentaria, así como para el control de la concentración aminas biógenas en el vino.

Cepa *Penicillium* sp. CIAL-274,760 (CECT 20782)

La siguiente cepa ha sido depositada el 14 de septiembre de 2011, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por M. Victoria Moreno-Arribas, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CIAL), (CSIC-UAM) Calle Nicolás Cabrera nº 9, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid (España).

- 10 El depósito de la cepa depositada cuya referencia es ***Penicillium* sp. CIAL-274,760**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 20782** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un método o proceso para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado, que comprende poner en contacto dicho producto fermentado con un extracto
20 enzimático de origen fúngico sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio.

En una realización particular, el producto fermentado es un alimento o bebida en cuya fermentación intervienen bacterias lácticas con actividad aminoácido
25 descarboxilasa, las cuales son responsables de la presencia natural de aminas biógenas en estos productos. De manera representativa y no limitante, dichos productos fermentados se pueden seleccionar de entre el siguiente grupo: queso, algunos productos cárnicos y encurtidos, cerveza, mosto, sidra y vino. En una realización preferente, el producto fermentado es el vino.

30

En una realización particular, el extracto enzimático de origen fúngico tal y como se entiende en la presente invención, contiene enzimas amino oxidasas con capacidad de degradar al menos una amina biógena.

En la presente invención el término: “amina biógena” se refiere a un compuesto nitrogenado de bajo peso molecular que está presente de forma natural en algunos productos fermentados. De manera representativa y no limitante, dichas aminas biógenas se pueden seleccionar de entre el siguiente grupo: histamina, 5 tiramina y putrescina y una combinación de las mismas.

En otra realización particular de la presente invención, el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado de un nicho ecológico natural e íntimamente relacionado con el que se persigue en la aplicación, y no 10 explotados usualmente para tal fin. Preferentemente, el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado de un ecosistema vínico.

En la presente invención el término “ecosistema vínico” o “ecosistema de la vid”, se refiere al entorno de los viñedos, de donde se aíslan hongos procedentes de 15 plantas de vid y del suelo.

En una realización más particular, el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado perteneciente a un género de hongo seleccionado de entre el siguiente grupo: *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, 20 *Penicillium* spp., *Phoma* spp., y *Ulocladium chartarum*. Preferentemente, el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado perteneciente al género *Penicillium* spp. Aún más preferentemente, el extracto enzimático de origen fúngico procede de la cepa *Penicillium* sp. CIAL-274,760, depositada el 14 de septiembre de 2011, en la Colección Española de Cultivos 25 Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 20782.

En otra realización particular de la presente invención, el método o proceso para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado anteriormente descrito, se caracteriza porque el porcentaje de 30 reducción de la concentración de al menos una amina biógena puede ser superior al 60%.

En otra realización particular de la presente invención, el método o proceso para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto

fermentado anteriormente descrito, se caracteriza porque incluye estabilizantes o conservantes conocidos por un experto en la materia para mejorar la eficiencia de la reacción.

5 La presente invención también hace referencia a un método para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado, caracterizado por poner en contacto dicho producto fermentado con un extracto enzimático de origen fúngico, sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, tal y como se ha definido anteriormente, donde la
10 capacidad del extracto enzimático de eliminar las aminas biógenas presentes en los productos fermentados determinan su uso como agentes detoxificantes en la industria alimentaria.

La presente invención también hace referencia a un método para reducir la
15 concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado, caracterizado por poner en contacto dicho producto fermentado con un extracto enzimático de origen fúngico, sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, tal y como se ha definido anteriormente, donde la capacidad del extracto enzimático de eliminar las aminas biógenas presentes en
20 los productos fermentados determinan su uso para mejorar la calidad organoléptica del vino ya fermentado.

Otro objeto de la presente invención, es el procedimiento o método de obtención de un extracto enzimático de origen fúngico para reducir la concentración de al
25 menos una amina biógena en un producto fermentado sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

- i. aislar al menos un hongo, preferentemente de un ecosistema vínico,
- ii. incubar el hongo aislado en i) en un medio de cultivo que contiene al
30 menos una amina biógena como principal fuente de nitrógeno,
- iii. inducir la actividad enzimática del hongo implicada en la degradación de la amina biógena citada en ii),
- iv. separar el micelio del hongo, preferentemente mediante filtración, y
- v. extraer del micelio el citado extracto enzimático.

En una realización más particular, el procedimiento o método de obtención definido anteriormente se caracteriza porque el paso i) es aislar al menos un hongo perteneciente a un género de hongo seleccionado de entre el siguiente
5 grupo: *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium* spp., *Phoma* spp., y *Ulocladium chartarum*. Más preferentemente, el hongo pertenece al género *Penicillium* spp. Aún más preferentemente, el paso i) es aislar al menos la cepa *Penicillium* sp. CIAL-274,760, depositada el 14 de septiembre de 2011, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 20782.

10

En otra realización particular de la presente invención se hace referencia al método para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado definido anteriormente, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico es obtenido mediante el método de obtención
15 definido anteriormente por las etapas i-v.

En otra realización particular de la presente invención se hace referencia a un extracto enzimático de origen fúngico para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado sin la necesidad de la presencia
20 de oxígeno molecular en el medio, caracterizado porque se obtiene mediante el método de obtención definido anteriormente por las etapas i-v.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
25 componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Análisis 'neighbour-joining' de los hongos aislados de ecosistemas de la vid procedentes de cuatro regiones geográficas (Villamanrique del Tajo,

Escuela de la Vid, Tortuero y Membrilla) de España. Las cepas de referencia seleccionadas se alinearon con los hongos aislados de viñedos. Los valores estadísticos se indican en las ramas. Las distancias horizontales son proporcionales a las distancias de las secuencias.

5

FIGURA 2. Degradación de histamina, tiramina y putrescina en un vino tinto (2 a), blanco (2 b) y sintético (2 c) tras 18 h de incubación con los extractos enzimáticos fúngicos A, B y C. Las determinaciones se hicieron mediante RP-HPLC.

10 BIBLIOGRAFÍA

Adachi, O., Yamada, H., 1970. Amine oxidases of microorganisms. Part VIII. Purification and properties of amine oxidase from *Fusarium culmorum*. *Research Institute Food Science*. Kyoto University 31, 10-18.

15

Ancín-Azpilicueta, C., González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., 2008. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 257-275.

20 Bauza, T., Blaise, A., Teissedre, P.L., Cabanis, J.C., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Daumas, F., 1995. Les amines biogènes du vin: Métabolisme et toxicité. *Bulletin de L'ÓIV* 68, 42-67.

Bills, G.F., Christensen, M., Powell, M., Thorn, G., 2004. Saprobic soil fungi. In: 25 Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M. (Eds.), *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. pp. 271-302.

EP0132674A2: Amine removal, Hobson John Charles; Anderson, Deborah Anne 30 Goergina, Application number 84107990.8, fecha de publicación 13-2-85

Frébort, I., Matsushita, K., Adachi, O., 1997. The fungus *Gibberella fujikuroi* produces a copper/topaquinone-containing amine oxidase when induced by *n*-butylamine. *Biochemistry & Molecular Biology International* 41, 11-23.

- Isobe, K., Tani, Y., Yamada, H., 1982. Crystallization and characterization of agmatine oxidase from *Penicillium chrysogenum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1353-1359.
- 5
- Kolaříková, K., Galuszka, P., Sedlářová, I., Šebela, M., Frébort, I., 2009. Functional expression of amine oxidase from *Aspergillus niger* (AO-I) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology Reports* 36, 13-20.
- 10 Marcobal, A., Polo, M.C., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., 2005. Biogenic amine content of red Spanish wines: Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International* 38, 387-394.
- 15 Marcobal, Á., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V., 2006. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69, 397-404.
- Moreno-Arribas, M.V., Smit, A.Y., Toit, M., 2010. Biogenic amines and the
20 winemaking process. In: Reynolds, A.G. (Ed.), *Understanding and Managing Wine Quality and Safety*. Woodhead Publishing Limited (Eds.) pp 494-522
- Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 213-231.
- 25
- Soufleros, E., Barrios, M.L., Bertrand, A., 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 266-278.
- 30 Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4768.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.

5

Yamada, H., Adachi, O., Ogata, K., 1965. Amine oxidases of microorganisms. Part I. Formation of amine oxidase by fungi. *Agricultural Biology and Chemistry* 29, 117-123.

10 Yamada, H., Kumagai, H., Uwajima, T., Ogata, K., 1966. Trimethylamine metabolism. Part I. Monomethylamine oxidase. *Research Institute Food Science. Kyoto University* 27, 1-14.

Yamada, H., Suzuki, H., Ogura, Y., 1972. Amine Oxidases from Microorganisms:
15 Stoichiometry of the Reaction Catalyses by Amine Oxidase of *Aspergillus niger*. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 5, 189-201.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

10 EJEMPLO 1. Aislamiento e identificación molecular de hongos de la vid con capacidad de degradar aminas biógenas

1.1. Obtención de las materias primas y aislamiento de los hongos

15 Uno de los objetivos de esta invención fue aislar una colección amplia de hongos representativos de los hongos del ecosistema de la vid. En total, se aislaron 224 cepas de hongos procedentes de plantas de vid y 66 de muestras procedentes del suelo (Tabla 1).

20 **Tabla 1.** Distribución de los hongos aislados de cuatro ecosistemas de viñedos españoles

Localización	Número		Número de aislados		Hongos aislados por		Número de géneros		Hongos sin identificar	
	Plantas	Suelos	Plantas	Suelos	Plantas	Suelo	Plantas	Suelos	Plantas	Suelos
Villamanrique del Tajo (Madrid)	4	-	30	-	7,5	-	12	-	3	-
Escuela de la Vid (Madrid)	5	-	97	-	19,4	-	17	-	17	-
Membrilla (Ciudad Real)	9	2	70	31	7,77	15,5	11	13	14	6
Tortuero (Guadalajara)	6	1	27	35	4,5	35	4	12	11	13
Total	24	3	224	66	-	-	44	25	45	19

El muestreo de plantas de viñedos se llevó a cabo durante la primavera del 2008 en cuatro zonas de España, dos en la provincia de Madrid (Villamanrique del Tajo

y Escuela de la Vid), uno en la provincia de Guadalajara (Tortuero) y por último, uno en la provincia de Ciudad Real (Membrilla). Para aislar los hongos de la parte aérea de la vid, se cortaron, con la ayuda de un bisturí, pequeñas virutas de la corteza, xilema y yemas de las plantas recogidas. Las virutas se desinfectaron 5 mediante lavados consecutivos, durante 30 s en etanol 70%, hipoclorito sódico (5%), etanol 70% y agua estéril en el caso de la corteza, mientras que para las yemas se utilizó etanol 70% y agua estéril. Las virutas de xilema no requieren desinfección al tratarse de una muestra limpia. Tras el lavado, las virutas se transfirieron con unas pinzas a placas de 48 pocillos que contenían medio YMC 10 (10 g de extracto de malta, 2 g extracto de levadura, 20 g de agar bacteriológico, 4 mg de ciclosporina A, 50 mg de sulfato de estreptomicina, 50 mg de terramicina, y 1 litro de agua destilada. Se prepararon 6 placas por cada muestra. Las placas se incubaron a 22°C y 70% de humedad relativa durante 2 semanas.

15 Para aislar los hongos del suelo, las muestras se tamizaron, lavaron y filtraron utilizando un sistema de filtración de partículas acoplado a una bomba de vacío, descrito anteriormente por Bills y col. (2004). Las partículas que quedaron retenidas en el filtro con menor tamaño de poro se transfirieron a un tubo falcon donde se lavaron 7-8 veces con agua destilada. Tras el lavado las partículas de 20 suelo se transfirieron a una placa Petri que contenía carboximetilcelulosa sódica (CMC) al 0.05%, y que se empleó para hacer 3 diluciones de las partículas de suelo lavadas. Después, alícuotas de 10 µl de cada dilución se pipetearon en placas de 48 pocillos con medio YMC. Se prepararon 9 placas por cada muestra (3 placas/dilución). Las placas se incubaron a 22°C y 70% de humedad relativa 25 durante 2 semanas.

1.2. Obtención de los cultivos puros de hongos

Para la obtención de cultivos puros, los hongos que crecieron en las placas de 30 YMC se reaislaron, con la ayuda de una lupa Leica MZ APO, en placas de Agar Extracto de Levadura Malta (10 g de extracto de malta, 2 g de extracto de levadura, 20 g de agar bacteriológico y 1 litro de agua destilada), que se incubaron a 22°C y 70% de humedad relativa durante 2 semanas.

Una vez obtenidos los cultivos puros de hongos, se procedió a la preparación de inóculos. Para ello, a partir de las placas con cultivos puros, con un transfer estéril se cortaron de 3 a 4 discos de micelio, los cuales se introdujeron en tubos con 8 ml de medio SMYA (10 g de neopeptona, 40 g de maltosa, 10 g de extracto de levadura, 4 g de agar bacteriológico y 1 litro de agua destilada) y 2 cubreobjetos. Los tubos se incubaron con una inclinación de 75° en cabinas Kühner a 22°C durante 4 días, en agitación (200 rpm).

Los inóculos obtenidos se utilizaron para la caracterización molecular de los hongos, experimentos de degradación de aminas biógenas y ensayos de actividad antimicrobiana.

1.3. Identificación molecular de hongos

Para la extracción del ADN genómico se utilizó un kit de purificación de ADN para bacterias Gram positivas (Master Pure™ Gram Positive DNA Purification Kit Epicentre Biotechnologies), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante con algunas modificaciones: (a) se disminuyó el volumen añadido de isopropanol a 300 µl, (b) se lavó el pellet de ADN con 200 µl de etanol 70% seguido de un proceso de desecación a 45°C durante 15 minutos (Speed Vac ADN 120), y (c) se resuspendió el ADN en 100 µl de agua milli-Q.

El ADN extraído se utilizó para amplificar la región espaciadora intergénica ribosomal ITS (fragmento ITS1-5.8S-ITS2), empleando los cebadores universales ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Los productos de PCR se purificaron usando el protocolo de purificación Illustra GFX 96 PCR y se secuenciaron en el secuenciador automático ABI Prism Dye terminator cycle sequencing kit. Las secuencias se alinearon usando la aplicación Clustal W (Thompson y col., 1994). De manera paralela, las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias depositadas en el banco de datos GenBank usando la aplicación BLAST.

Se generó un árbol filogenético por método del “neighbour joining”(NJ) a partir de la matriz de distancias genéticas (Figura 1), al que se incorporó la secuencia de cepas de hongos de referencia. El árbol se dividió en dos ramas principales (Figura 1, las ramas A y B). Sobre la primera, con un fuerte agrupamiento (98%) se sitúan secuencias de referencia pertenecientes a los Órdenes *Xylariales* y

Sordariales (Clase Sordariomycetes) (Tabla 2).

La otra rama principal (Figura 1, b) que incluye a la mayoría de los aislados (81% del muestreo), se dividió en dos sub-ramas (Figura 1, c ramas y d) con un apoyo 5 razonable. La rama c incluye los aislamientos de hongos pertenecientes a los Órdenes *Hypocreales*, *Microascales*, *Calosphaeriales* y *Phyllachorales* (Clase *Sordariomycetes*) (Tabla 2); mientras que la rama d parece corresponder con los Órdenes *Capnodiales*, *Botryosphaeriales*, *Dothideales* y *Pleosporales* (Clase *Dothideomycetes*), *Eurotiales* *Onygenales* (Clase *Eurotiomycetes*), *Xylariales* 10 (Clase *Sordariomycetes*), y, por último, *Agaricales* (Clase *Agaromycetes*) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los hongos aislados en función de su grupo taxonómico

Filo	Clase	Orden	Familia	Especies	
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Botryosphaeriales</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Botryosphaeria</i> spp, <i>Dothiorella</i> spp, <i>Microdiplodia</i> spp	
			<i>Capnodiales</i>	<i>Davidiellaceae</i>	<i>Cladosporium</i> spp, <i>Davidiella</i> spp
				Sin asignar	<i>Rachicladosporium</i> spp
			<i>Dothideales</i>	<i>Dothideaceae</i>	<i>Coniozyma</i> spp
				<i>Dothioraceae</i>	<i>Aureobasidium</i> spp
			<i>Pleosporales</i>	<i>Didymellaceae</i>	<i>Didymella</i> spp
				<i>Leptosphaeriaceae</i>	<i>Epicoccum</i> spp, <i>Leptosphaeria</i> spp
				<i>Massarinaceae</i>	<i>Saccharicola</i> spp
				<i>Montagnulaceae</i>	<i>Paraconiothyrium</i> spp
				<i>Phaeosphaeriaceae</i>	<i>Phaeosphaeria</i> spp, <i>Stagonospora</i> spp
		<i>Pleosporaceae</i>		<i>Alternaria</i> spp, <i>Ulocladium</i> spp, <i>Embellisia</i> spp, <i>Pleospora</i> spp, <i>Lewia</i> spp, <i>Pyrenochaeta</i> spp, <i>Didymella</i> spp, <i>Dendryphion</i> spp	
		<i>Sporormiaceae</i>		<i>Sporormia</i> spp	
		Sin asignar	<i>Phoma</i> spp, <i>Camarosporium</i> spp, <i>Coniothyrium</i> spp		
		<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Chaetothyriales</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	<i>Exophiala</i> spp
			<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Penicillium</i> spp
			<i>Onygenales</i>	Sin asignar	<i>Geomyces</i> spp
		<i>Sordariomycetes</i>	<i>Calosphaeriales</i>	<i>Calosphaeriaceae</i>	<i>Phaeoacremonium</i> spp, <i>Togninia</i> spp
				<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Paecilomyces</i> spp, <i>Metarrhizium</i> spp
				<i>Hypocreaceae</i>	<i>Acremonium</i> spp, <i>Hypocrea</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp
				<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Myrothecium</i> spp
			<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i> spp, <i>Nectria</i> spp, <i>Gibberella</i> spp	
			Sin asignar	<i>Acremonium</i> spp, <i>Acrostalagmus</i> spp, <i>Stachybotrys</i> spp	
	<i>Microascales</i>		<i>Microascaceae</i>	<i>Wardomyces</i> spp, <i>Scedosporium</i> spp	
			Sin asignar	<i>Microdochium</i> spp	
	<i>Phyllachorales</i>		Sin asignar	<i>Verticillium</i> spp	
	<i>Sordariales</i>		<i>Chaetomiaceae</i>	<i>Chaetomium</i> spp, <i>Thielavia</i> spp	

		<i>Xylariales</i>	<i>Amphisphaeriaceae</i>	<i>Discostroma</i> spp, <i>Pestalotiopsis</i> spp, <i>Truncatella</i> spp
	Sin asignar	Sin asignar	Sin asignar	<i>Tetracladium</i> spp, <i>Scolecobasidium</i> spp, <i>Helminthosporium</i> spp
<i>Basidiomycota</i>	<i>Coelomyces</i>			Especies de Coelomycete
	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Psathyrellaceae</i>	<i>Coprinellus</i> spp
Hongos sin identificar				

Los análisis filogenéticos se confirmaron empleando el modelo de sustitución nucleotídica de máxima parsimonia, implementado en el programa PAUP, a partir del alineamiento múltiple, y realizando una búsqueda heurística con 1000 réplicas mediante el algoritmo TBR (tree bisection recollection). El soporte de los nodos se evaluó mediante "bootstrap" como una medida de confianza estadística. Una agrupación del 95% de las réplicas fue considerada estadísticamente significativa.

Las comparaciones de las secuencias de nucleótidos de los hongos aislados con las secuencias disponibles en GenBank permitieron identificar la mayoría de los hongos aislados, al menos a nivel de género. La mayoría de los hongos aislados pertenecieron a los géneros *Phoma* spp, *Alternaria* spp y *Fusarium* spp. Estos géneros representaron el 22,8% de todos los aislamientos.

15

1.4. Screening de hongos capaces de degradar aminas biógenas y obtención de extractos fúngicos

Para profundizar en el estudio de las actividades enzimáticas de interés, implicadas en la eliminación de aminas biógenas, en la presente invención, se seleccionaron 44 cepas representativas de los principales géneros de hongos de los ecosistemas de la vid, previamente aislados de la planta y suelo de la vid. Las cepas de hongos fueron estudiadas para comprobar su capacidad de degradar aminas biógenas después de haber sido inducida la actividad enzimática amino oxidasa por las aminas biógenas que se detectan más frecuentemente en los vinos (histamina, tiramina y putrescina). Para ello, los hongos seleccionados se inocularon en un medio de cultivo que contenía estas aminas como única fuente de nitrógeno (Tabla 3). Se utilizó un medio de cultivo básico, el Yeast Carbon Base (YCB, Sigma), al que se añadió 0,05 g/L de histamina, tiramina o putrescina como única fuente de nitrógeno. El medio de cultivo se esterilizó por filtración

(Millipore Express™ Plus, 0.22 µm) y después se distribuyó, con la ayuda de un Termo Multidrop Combi (Termo Scientific), en placas de 24 pocillos a razón de 4 ml/pocillo. A continuación se transfirió aproximadamente 0,5 cm de de cada inóculo de hongo a su pocillo correspondiente, a excepción de los pocillos 5 utilizados como control. Las placas se incubaron en agitación a 22°C en cabinas Kühner durante 10 días. Los ensayos se hicieron por duplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, se separó el micelio del hongo del medio de cultivo mediante filtración (Syringe Filters with Luer tip; Agilent Technologies). Para comprobar si los hongos habían degradado las aminas se tomó 1 ml del medio 10 filtrado y se analizó mediante RP-HPLC.

Tabla 3. Screening de los hongos aislados de ecosistemas de la vid con capacidad de de degradar aminas biógenas

Número de aislado	Identificación	Degradación de histamina (%)	Degradación de tiramina (%)	Degradación de putrescina (%)
F-274,861	<i>Acremonium</i> spp	42,05	96,9	98,94
F-274,707	<i>Alternaria</i> spp	99,66	100	100
F-274,722	<i>Alternaria</i> spp	99,83	100	100
F-274,736	<i>Alternaria</i> spp	99,88	100	100
F-274,737	<i>Alternaria</i> spp	99,89	100	100
F-274,767	<i>Alternaria</i> spp	100	100	100
F-274,720	<i>Ascochyta</i> spp	99,67	100	100
F-274,787	<i>Cladosporium</i> spp	80,6	100	99,61
F-274,684	Coelomycete	99,42	100	100
F-274,776	Coelomycete	75,94	100	100
F-274,726	<i>Dendryphion penicillatum</i>	0	99,91	22,8
F-274,659	<i>Discostroma</i> spp	88,86	99,98	100
F-274,735	<i>Discostroma</i> spp	73,12	100	100
F-274,673	<i>Embellisia</i> spp	99,52	100	100
F-274,906	<i>Embellisia</i> spp	100	20,08	99,68
F-274,672	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,69	100	100
F-274,667	<i>Fusarium</i> spp	2,07	100	100
F-274,763	<i>Fusarium</i> spp	19,62	100	100
F-274,683	<i>Leptosphaeria</i> spp	35,5	100	100
F-274,696	<i>Leptosphaeria</i> spp	99,55	100	100
F-274,897	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0	100	100
F-274,760	<i>Penicillium</i> spp	100	99,91	99,69
F-274,895	<i>Pestalotiopsis</i> spp	100	100	99,84
F-274,692	<i>Phoma</i> spp	99,64	99,91	99,95
F-274,733	<i>Phoma</i> spp	52,14	99,99	100
F-274,741	<i>Phoma</i> spp	99,46	100	99,5
F-274,757	<i>Phoma</i> spp	100	99,86	99,84
F-274,885	<i>Phoma</i> spp	93,79	100	99,82
F-274,896	<i>Phoma</i> spp	100	100	100
F-274,903	<i>Phoma</i> spp	68,06	100	100
F-274,904	<i>Scolecobasidium</i> spp	99,74	64,84	100
F-274,893	<i>Ulocladium chartarum</i>	99,84	100	100
F-274,899	<i>Ulocladium chartarum</i>	100	100	100
F-274,670	Ascomycete sin identificar	79,12	100	100
F-274,674	Hongo sin identificar	99,65	100	100
F-274,731	Hongo sin identificar	0	99,98	48,97

F-274,755	Hongo sin identificar	92,6	0	100
F-274,888	Hongo sin identificar	100	100	99,77
F-274,901	Hongo sin identificar	100	100	100
F-274,687	Hongo sin identificar (n.s)	5,61	100	88,96
F-274,724	Hongo sin identificar (n.s)	37,3	37,93	100
F-274,743	Pleosporales sin identificar	99,72	100	99,55
F-274,881	Pleosporales sin identificar	51,12	100	99,73
F-274,900	Pleosporales sin identificar	100	100	100

n.s: Secuencia no disponible

De las 44 cepas estudiadas, 31 cepas mostraron capacidad de degradar las 3 aminas, 8 cepas degradaron 2 aminas y 5 cepas degradaron sólo una amina. En esta encuesta, se fijó arbitrariamente el valor del 60% de degradación como el nivel mínimo para considerar que los hongos eran capaces de degradar aminas biógenas. Es decir, las actividades enzimáticas de degradación de aminas biógenas fueron significativas para muchos de los hongos estudiados, independiente de la amina incorporada al medio de cultivo (Tabla 4), lo que sugiere que las especies de hongos de la vid tienen capacidad para degradar las aminas de manera similar.

EJEMPLO 2. Degradación de aminas biógenas

2.1 Degradación de aminas biógenas por hongos seleccionados

5 Los hongos que mostraron mayor capacidad de degradación de las aminas biógenas, histamina, tiramina y putrescina (*Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium* spp., *Phoma* spp., y *Ulocladium chartarum*) (Tabla 3) se seleccionaron para llevar a cabo un nuevo ensayo, en el que además se incluyeron dos microorganismos GRAS (Generally Regarded As Safe), *Aspergillus oryzae* CECT

10 2094 y *Penicillium roqueforti* CECT 2905, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Tabla 4).. La metodología y análisis empleados fueron los descritos en anteriormente, pero además, se incluyó la medición del pH a tiempo inicial y tras la incubación.

15 **Tabla 4.** Degradación de histamina, tiramina y putrescina (valores expresados como un porcentaje con respecto a los valores iniciales) en el medio YCB con 0,05 g/L histamina, tiramina o putrescina, después de 10 días de incubación a 22°C con los hongos aislados de la vid.

Número de aislado	Origen	Nombre	Degradación de histamina (%)	pH final	Degradación de tiramina (%)	pH final	Degradación de putrescina (%)	pH final
F-274,707	Corteza de vid	<i>Alternaria</i> spp	100	4.5	100	4.5	100	4.5
F-274,672	Xilema de vid	<i>Epicoccum nigrum</i>	36.45	4.5	100	4.5	100	4.5
F-274,760	Corteza de vid	<i>Penicillium</i> spp	100	4	100	4	100	4
F-274,692	Xilema de vid	<i>Phoma</i> spp	100	4.5	100	4.5	100	4.5
F-274,893	Suelo de vid	<i>Ulocladium chartarum</i>	100	5	100	5	ND	5
	CECT 2094	<i>Aspergillus oryzae</i>	3.77	4	100	4	100	4
	CECT 2905	<i>Penicillium roqueforti</i>	100	4.5	100	4.5	100	4.5

ND: No determinado

20

Cuando el ensayo se repitió con una nueva incubación empleando mayores volúmenes de muestra, todas los hongos mantuvieron su capacidad para degradar las aminas biógenas, con excepción de *E. nigrum*, para el cual el porcentaje de degradación de la histamina se redujo de 99.69% (Tabla 4) a

25 36.45% (Tabla 4), y *Ulocladium chartarum*, para el que no se detectó la degradación de putrescina (Tabla 4).

Respecto a los dos hongos GRAS, ambos fueron capaces de degradar la tiramina y putrescina, sin embargo, la histamina sólo fue degradada por *P. roqueforti* (Tabla 4). Los valores medios de pH en los medios de cultivo se mantuvieron estables para cada cepa. Estos son los primeros datos sobre la degradación de 5 aminas biógenas, y en particular histamina, por hongos GRAS, lo que les convierte en fuentes muy atractivas para su aplicación en productos de consumo humano.

2.2. Degradación de aminas biógenas en vinos

10

Para este ensayo se emplearon dos vinos comerciales, uno tinto y otro blanco, y un vino sintético. El vino tinto presentaba una concentración total de aminas biógenas de 43,97 mg/L (19,33 mg/L de histamina, 2,08 mg/L de tiramina y 22,56 mg/L de putrescina). El vino blanco fue dopado con 0,05 g/L de cada una de las 15 aminas (histamina, tiramina y putrescina). El vino sintético se preparó mezclando etanol al 12% (v/v) (VWR, Leuven, Bélgica) y 4 g/L de ácido tartárico (Panreac, Barcelona, España); tras ajustar el pH a 4 con NaOH (Panreac, Barcelona, España) se añadieron las aminas biógenas (histamina, tiramina y putrescina, 0,05 g/l).

20

El hongo seleccionado para este ensayo fue *Penicillium* spp (F-274,760, aislado de la vid) debido a su elevado potencial para degradar aminas biógenas (en torno al 100% de degradación) en los dos experimentos de incubación en medios de cultivo (Tablas 3 y 4).

25

Para obtener los extractos crudos del hongo se procedió de la siguiente manera: a matraces con 25 ml de medio YCB y 0,05 g/l de histamina (extracto A), tiramina (extracto B) o putrescina (extracto C) como única fuente de nitrógeno, se añadió 0,5 cm de inóculo de *Penicillium* spp. Para cada amina se utilizó un matraz 30 como control que contenía sólo el medio de cultivo con la amina. Tras la inoculación, los matraces se incubaron en agitación (200 rpm), a 22°C y 80% de humedad relativa durante una semana. Transcurrido el tiempo de incubación los caldos de cultivo se filtraron usando filtros de 0.22 µm (Millipore Express™ Plus),

obteniéndose así lo que denominamos extractos crudos del hongo. El experimento se realizó por duplicado.

Para confirmar que el extracto enzimático mantenía su capacidad de degradación de aminas, se tomó una alícuota (1ml) de cada extracto para su análisis por RP-HPLC mediante el método propuesto por una Marcobal et al., (2005), basado en una derivatización precolumna de las aminas con ortoftaldialdehído (OPA) en presencia de mercaptoetanol, para formar un complejo detectable por fluorescencia.

10

Posteriormente, los extractos A, B y C fueron utilizados para los ensayos enzimáticos en vino (Figura 2). Se añadió 0,5 ml de extracto fúngico (o agua estéril en el caso del control) a 1 ml de vino tinto, blanco o sintético, y se incubó a 35°C durante 18 h; transcurrido este tiempo, la reacción se paró mediante la adición de 1,5 ml de HCl 1M. Las muestras se filtraron antes de su análisis por RP-HPLC. La degradación de aminas presentes en los vinos se expresó como porcentaje con respecto de la concentración del vino control (Figura 2).

Cuando se añadieron a los vinos, los tres extractos disminuyeron el contenido de aminas biógenas. Los extractos enzimáticos procedentes de los medios de cultivo inducidos por el crecimiento del hongo en presencia de histamina (extracto A) mostraron la mayor capacidad para promover la degradación de aminas biógenas en los dos vinos comerciales, blanco y tinto, y en el vino sintético. En conjunto, la histamina fue significativamente degradada en el vino tinto tratado con los extractos A, B y C (hasta 20, 40 y 38% de degradación de histamina, respectivamente), aunque se obtuvieron mejores resultados en el vino blanco (hasta un 80-90% de degradación, Figura 2).

EP0132674A2 propone el uso de extracto enzimático procedente de *A. niger* en los alimentos fermentados como quesos, cervezas, mostos y extractos de levadura, pero no se presentan los datos concretos de su utilidad en condiciones reales de producción de alimentos.

En base a los resultados obtenidos tanto en medios de cultivo como en vinos, la presente invención se refiere a extractos enzimáticos procedentes de *Penicillium*

spp., previamente aislado de la vid, cuyas actividades enzimáticas mantienen su capacidad de degradación de aminas biógenas (i.e. histamina, tiramina y putrescina) a valores de pH de entre 3,5 hasta 5,0, es decir a valores de pH más bajos (y más cercanos a los de cualquier producto fermentado) que los pH 5 óptimos de las amino oxidasas de *A. niger* descritos en EP0132674A2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado, caracterizado por poner en contacto dicho producto
5 fermentado con un extracto enzimático de origen fúngico, sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque el producto fermentado es un alimento o bebida en cuya fermentación intervienen bacterias
10 lácticas con actividad aminoácido descarboxilasa.
3. El método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el producto fermentado se selecciona de entre el siguiente grupo: queso, productos cárnicos y encurtidos, cerveza, mosto, sidra y vino.
15
4. El método según las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico es capaz de degradar al menos una amina biógena.
5. El método según las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque la amina
20 biógena se selecciona de entre el siguiente grupo: histamina, tiramina, putrescina y una combinación de las mismas.
6. El método según las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado de un
25 ecosistema vínico.
7. El método según las reivindicaciones 1 - 6, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado perteneciente a un género del siguiente grupo: *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium*
30 spp., *Phoma* spp., y *Ulocladium chartarum*.
8. El método según las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico procede de al menos un hongo aislado perteneciente al género *Penicillium* spp.

9. El método según las reivindicaciones 1 - 8, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico procede de la cepa *Penicillium sp. CIAL-274,760*, depositada el 14 de septiembre de 2011, en la Colección Española de Cultivos
5 Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 20782.

10. El método según las reivindicaciones 1 - 9, caracterizado porque el porcentaje de reducción de la concentración de al menos una amina biógena es superior al 60%.

10

11. El método según las reivindicaciones 1 - 10, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico se usa como agente detoxificante en la industria alimentaria.

15 12. El método según las reivindicaciones 1 - 11, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico se usa para mejorar la calidad organoléptica del vino.

13. Un método de obtención de un extracto enzimático de origen fúngico para
20 reducir la concentración de al menos una amina biógena en un producto fermentado sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

- i. aislar al menos un hongo,
- ii. incubar el hongo aislado en i) en un medio de cultivo que contiene al
25 menos una amina biógena como principal fuente de nitrógeno,
- iii. inducir la actividad enzimática del hongo implicada en la degradación de la amina biógena citada en ii),
- iv. separar el micelio del hongo, y
- v. extraer del micelio el citado extracto enzimático.

30

14. El método de obtención según la reivindicación 13, caracterizado porque el paso i) es aislar al menos un hongo de un ecosistema vínico.

15. El método de obtención según las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado porque el paso i) es aislar al menos un hongo perteneciente a un género seleccionado de entre el siguiente grupo: *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium* spp., *Phoma* spp., y *Ulocladium chartarum*.
- 5
16. El método de obtención según las reivindicaciones 13 - 15, caracterizado porque el paso i) es aislar al menos un hongo perteneciente al género *Penicillium* spp.
- 10 17. El método de obtención según las reivindicaciones 13 - 16, caracterizado porque el paso i) es aislar al menos la cepa *Penicillium* sp. CIAL-274,760, depositada el 14 de septiembre de 2011, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 20782.
- 15 18. El método según las reivindicaciones 1 - 12, caracterizado porque el extracto enzimático de origen fúngico es obtenido mediante el método de obtención definido en las reivindicaciones 13 - 17.
19. Un extracto enzimático de origen fúngico para reducir la concentración de
20 al menos una amina biógena en un producto fermentado sin la necesidad de la presencia de oxígeno molecular en el medio, caracterizado porque se obtiene mediante el método de obtención definido en las reivindicaciones 13 - 17.

FIGURA. 1

A

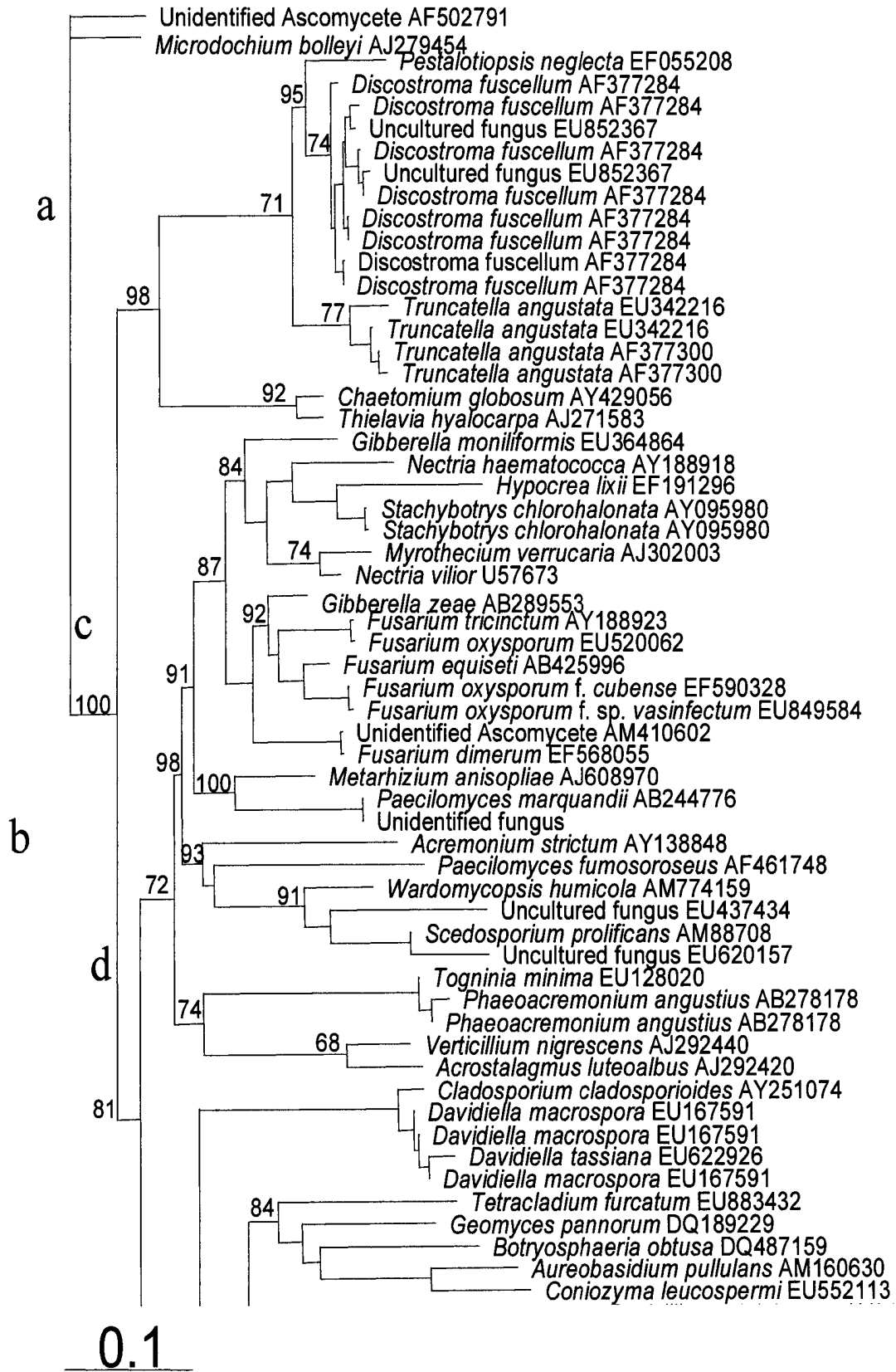
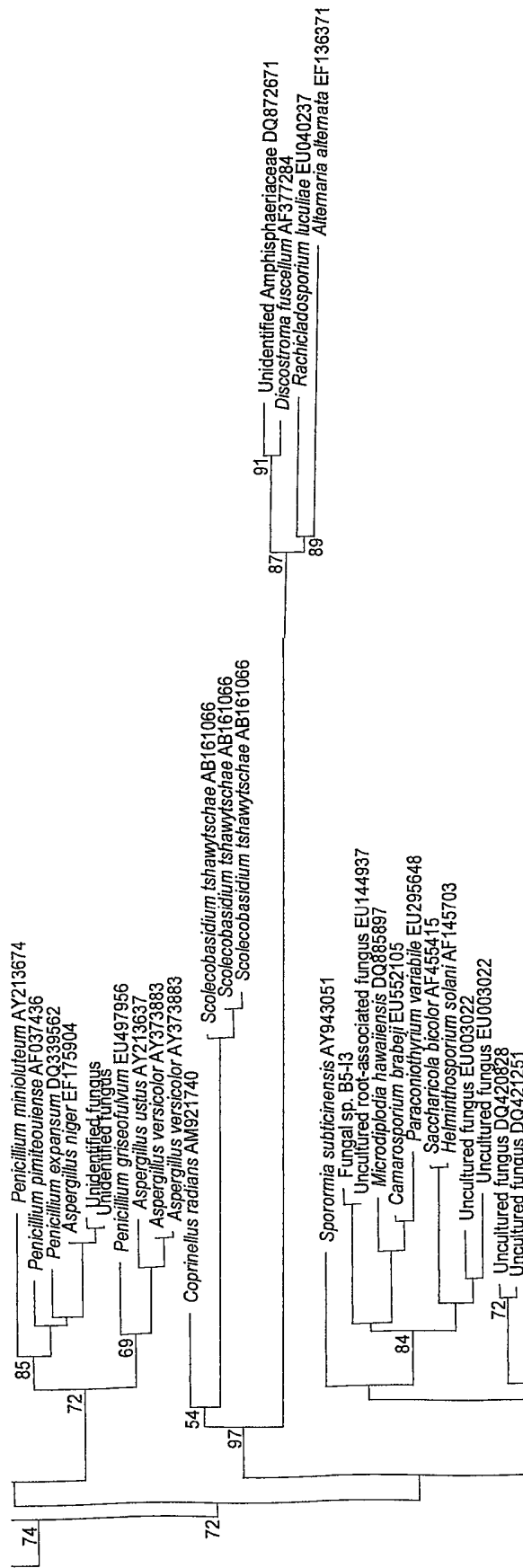


FIGURA. 1

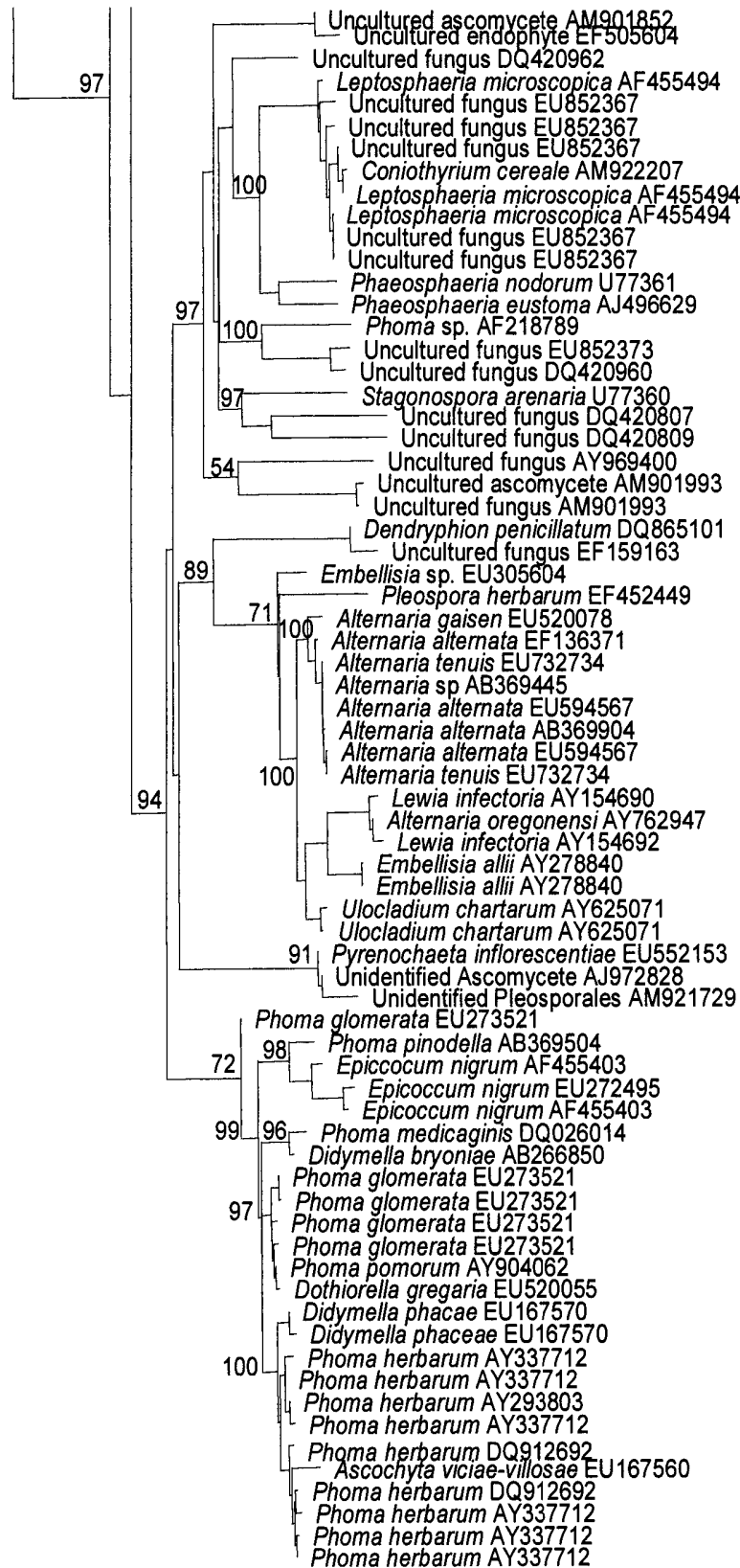
B



0.1

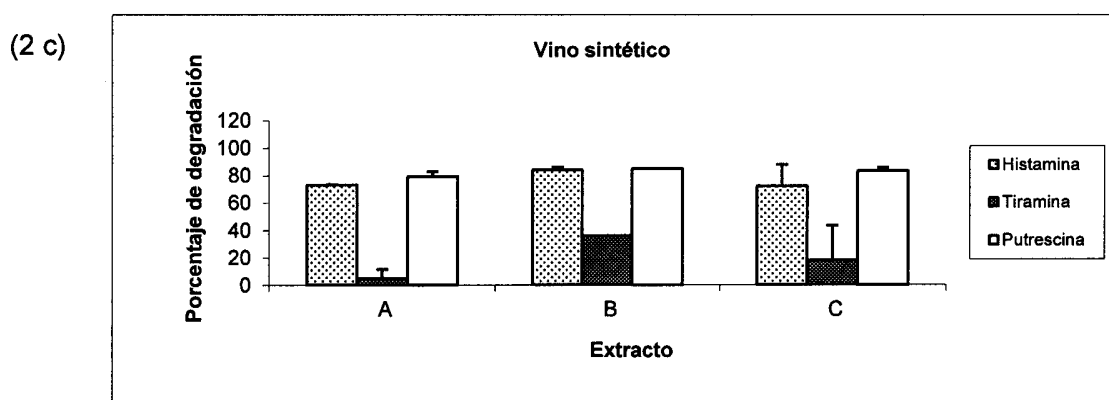
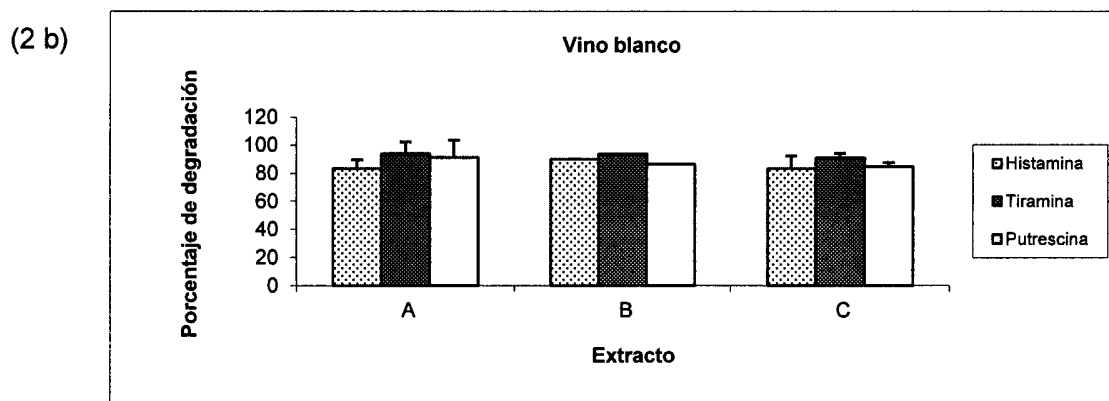
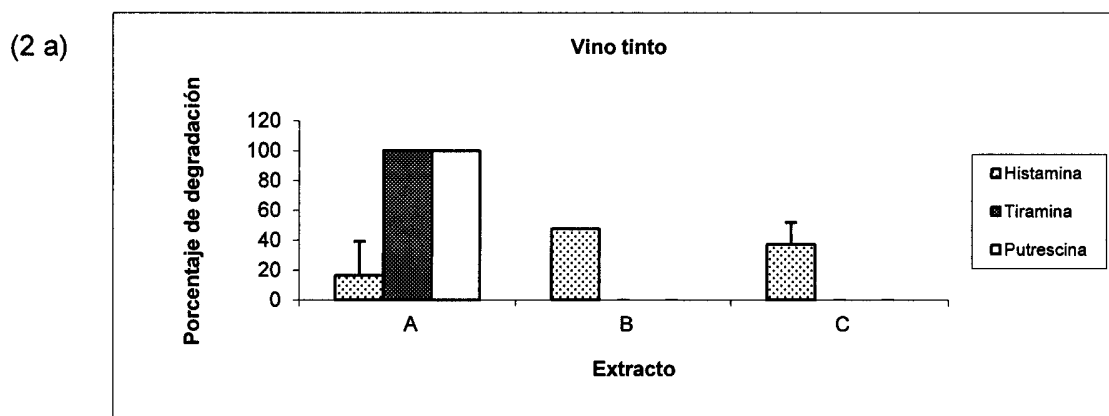
FIGURA. 1

C



0.1

FIGURA. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L, C12H, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, wpi, embase, biosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Punakivi K. et al. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. Talanta. 15.01.2006. Vol. 68, N ^o . 3, pages 1040-1045. ISSN 0039-9140ES483819 A1 (UNDERBERG EMIL) 01.09.1980.	19
Y		1-6, 10-12
Y	EP 0170880 A1 (UNDERBERG EMIL) 12.02.1986,	1-6, 10-12
A	EP 0132674 A2 (BOVRIL LTD) 13.02.1985,	1-19
A	ES 483819 A1 (UNDERBERG EMIL) 01.09.1980,	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
12/12/2012

Date of mailing of the international search report
(17/01/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Manso Tomico

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070694

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2.

Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 13 lacks the necessary clarity and conciseness, in that it generalises the species of fungus to such an extent that it is not possible to carry out a meaningful search with respect to the totality of the claimed subject matter, and for this reason the search has been carried out insofar as it relates to the species disclosed in claims 7-9.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070694

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP0170880 AB	12.02.1986	EP19850108206 US4725540 A AT60796 T	03.07.1985 16.02.1988 15.02.1991

EP0132674 AB	13.02.1985	DK352984 A AU3080784 A EP19840107990 JP60043346 A ZA8405540 A ES8609466 A AU574694 B AT59135 T	21.01.1985 24.01.1985 07.07.1984 07.03.1985 29.05.1985 16.12.1986 14.07.1988 15.01.1991

ES483819 A	01.09.1980	PT70133 A LU81643 A BE878568 A SE7907244 A SE7907244 L DK368479 A NL7906522 A AU5028179 A DE2933041 AC JP55039798 A FR2434582 AB GB2031948 AB DD150426 A AR225293 A NZ191395 A CA1135110 A AU526269 B YU215779 A AT374089 B ATA554279 A CH641644 A HU183030 B MX6665 E IT1122949 B SE448932 BC	01.09.1979 07.12.1979 31.12.1979 05.03.1980 05.03.1980 05.03.1980 06.03.1980 13.03.1980 13.03.1980 19.03.1980 28.03.1980 30.04.1980 02.09.1981 15.03.1982 23.03.1982 09.11.1982 23.12.1982 28.02.1983 12.03.1984 15.08.1983 15.03.1984 28.04.1984 07.10.1985 30.04.1986 30.03.1987

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070694

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/015 (2006.01)

A23L2/84 (2006.01)

C12H1/00 (2006.01)

C12R1/80 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070694

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A23L, C12H, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, wpi, embase, biosis

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	Punakivi K. et al. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. Talanta. 15.01.2006. Vol. 68, Nº. 3, páginas 1040-1045. ISSN 0039-9140ES483819 A1 (UNDERBERG EMIL) 01.09.1980.	19
Y		1-6, 10-12
Y	EP 0170880 A1 (UNDERBERG EMIL) 12.02.1986,	1-6, 10-12
A	EP 0132674 A2 (BOVRIL LTD) 13.02.1985,	1-19
A	ES 483819 A1 (UNDERBERG EMIL) 01.09.1980,	1-19

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
12/12/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
17-ENERO-2013 (17/01/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico

Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070694

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

- Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
- Las reivindicaciones n°s: **13 parcialmente**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

La reivindicación 13 carece de la necesaria claridad y concisión como para llevar a cabo una búsqueda significativa sobre la totalidad de la materia reivindicada al generalizar las especies de hongos, de tal manera que la búsqueda se ha llevado a cabo en la medida que se refiera a las especies divulgadas en las reivindicaciones 7-9.

- Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

- Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
- Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
- Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
- Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070694

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP0170880 AB	12.02.1986	EP19850108206	03.07.1985
		US4725540 A	16.02.1988
		AT60796 T	15.02.1991

EP0132674 AB	13.02.1985	DK352984 A	21.01.1985
		AU3080784 A	24.01.1985
		EP19840107990	07.07.1984
		JP60043346 A	07.03.1985
		ZA8405540 A	29.05.1985
		ES8609466 A	16.12.1986
		AU574694 B	14.07.1988
		AT59135 T	15.01.1991

ES483819 A	01.09.1980	PT70133 A	01.09.1979
		LU81643 A	07.12.1979
		BE878568 A	31.12.1979
		SE7907244 A	05.03.1980
		SE7907244 L	05.03.1980
		DK368479 A	05.03.1980
		NL7906522 A	06.03.1980
		AU5028179 A	13.03.1980
		DE2933041 AC	13.03.1980
		JP55039798 A	19.03.1980
		FR2434582 AB	28.03.1980
		GB2031948 AB	30.04.1980
		DD150426 A	02.09.1981
		AR225293 A	15.03.1982
		NZ191395 A	23.03.1982
		CA1135110 A	09.11.1982
		AU526269 B	23.12.1982
		YU215779 A	28.02.1983
		AT374089 B	12.03.1984
		ATA554279 A	15.08.1983
CH641644 A	15.03.1984		
HU183030 B	28.04.1984		
MX6665 E	07.10.1985		
IT1122949 B	30.04.1986		
SE448932 BC	30.03.1987		

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A23L1/015 (2006.01)

A23L2/84 (2006.01)

C12H1/00 (2006.01)

C12R1/80 (2006.01)