

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 665**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2014 PCT/IB2014/060323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14155369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2014 E 14739228 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2978856**

54 Título: **Medio cromogénico selectivo**

30 Prioridad:

29.03.2013 HU P1300186

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.07.2017

73 Titular/es:

SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM (50.0%)

Dugonics tér 13

6720 Szeged, HU y

SOLVO BIOTECHNOLÓGIAI ZRT. (50.0%)

72 Inventor/es:

VÁGVÖLGYI, CSABA;

PFEIFFER, ILONA y

MÁRKY-ZAY, JÁNOS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 665 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medio cromogénico selectivo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a medios cromogénicos adecuados para el crecimiento y la detección selectivos de una o más especies de levaduras seleccionadas.

Preferiblemente, la invención se refiere a métodos adecuados para la detección de especies de levaduras de *Brettanomyces/Dekkera* y *Zygosaccharomyces* y para la determinación del recuento de células de dichas levaduras. La invención se refiere además al uso de dicho método en los procesos de la industria enológica y/o alimentaria y a los medios y kits necesarios para llevar a cabo el examen.

10 **Antecedentes de la invención**

La invención es adecuada para la detección de las especies de levaduras descritas en la presente memoria teóricamente a partir de cualquier tipo de muestra, preferiblemente a partir de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos o una materia prima de alimentos.

15 La detección y separación selectivas de especies de levaduras que tienen un papel en la producción de cerveza y vino que en muchos casos se ven perjudicadas por las especies de levaduras naturales tiene una importancia especial.

20 Loureiro V y Malfeito-Ferreira M. [Spoilage yeasts in the wine industry. Int J Food Microbiol. 2003; 86(1-2):23-50.] proporcionan un resumen detallado sobre los problemas microbiológicos provocados por levaduras que están presentes en el vino. Los autores de la publicación hablan sobre los métodos que se conocen en la actualidad para la detección de levaduras que provocan el deterioro de alimentos, y analizan los factores que ayudan a la colonización por levaduras en las uvas y el vino.

La depreciación del vino que se origina por razones microbiológicas provoca pérdidas graves en todo el mundo, y afecta aún más gravemente al vino de categorías de primera calidad, que madura en un barril de madera.

25 Como este problema tiene una enorme importancia económica, los procedimientos que reconocen la presencia y la multiplicación de microorganismos dañinos con el tiempo son extremadamente importantes. Con la ayuda de estos, se puede prevenir la infestación, o se puede realizar de manera selectiva una intervención para disminuir el grado de deterioro.

La mayoría de los microorganismos que tienen un papel en la creación del vino entran en el proceso desde las uvas o desde el equipo de producción del vino.

30 La composición de las especies y el número de células de la microflora cambian dependiendo de las circunstancias, el número de bacterias es infinitesimal, y las levaduras predominan. Entre las levaduras, aparte de la cepa cultivada (noble) de *Saccharomyces* hay presentes muchas levaduras naturales, que predominan en el medio de fermentación durante mucho tiempo. Entre las levaduras naturales, los géneros de *Brettanomyces/Dekkera* y *Zygosaccharomyces* toleran relativamente bien un nivel alto de concentración de alcohol y son resistentes a los procedimientos habituales de producción de vino, y por lo tanto si proliferan durante la maduración del vino pueden provocar su deterioro.

35 Los géneros de *Zygosaccharomyces*, especialmente *Zygosaccharomyces bailii*, pueden generar una fermentación secundaria indeseable y la formación de un aroma desfavorable en los vinos con un contenido de azúcar residual, pero al mismo tiempo tienen un papel muy importante en el comienzo de la fermentación de mosto con alto contenido de azúcar y en la fermentación de mosto con una proporción inadecuada glucosa:fructosa

40 Hay un carácter fenólico adverso (el llamado "carácter brett") que está provocado por el subproducto del metabolismo de las especies de *Brettanomyces* (principalmente la *B. bruxellensis*), en particular durante la producción de vino tinto, y como consecuencia existe una disminución significativa de la calidad y el precio. Estos componentes indeseables de aroma se describieron mediante evaluaciones sensoriales como "desinfectante", "carácter brett", "cuero", "perro mojado" "rancio", "caballo sudado" "estiércol", "urinario" y "carácter animal". Los compuestos que surgen por la influencia de *Brettanomyces*, en pequeñas cantidades, pueden contribuir a la complejidad del vino (animalidad leve), sin embargo, por encima de cierto número de células, la presencia de *Brettanomyces* es indeseable. Su proliferación en una etapa temprana de la maduración se puede prevenir con un tratamiento con monóxido de carbono, al que estas levaduras son relativamente sensibles. Aunque la sulfuración por sí misma puede influir en el olor del vino de una manera desventajosa y puede inhibir el desarrollo, y por tanto el tratamiento tiene que ser selectivo. La condición de la intervención selectiva es la identificación temprana de la presencia de *Brettanomyces* en el vino en maduración, cuando el número de estos microorganismos y la concentración de sus productos del metabolismo todavía son bajos.

Para esto, se pueden usar varios métodos analíticos (ELISA, métodos de biología molecular, citometría de flujo, cultivo, métodos de cromatografía), pero la mayoría de ellos requieren un equipo y conocimientos especiales, y

además consumen mucho tiempo y son caros, porque en el medio hay un gran número de otros microorganismos que hacen que la demostrabilidad sea muy difícil.

5 Por ejemplo, Cocolin y colaboradores [Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in Spoiled Wines. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(3): 1347-1355.] crearon un ensayo mediante PRC-RFLP para la identificación de *Brettanomyces bruxellensis* y *Brettanomyces anomalus*. La clave de su método es que se obtienen diferentes patrones para las dos especies, cuando un fragmento de ADN que se amplifica durante la reacción de PCR se digiere con enzimas de restricción. El método es muy sensible, y es adecuado para detectar y separar dos especies de *Brettanomyces*, sin embargo, se requiere un equipamiento de laboratorio especial y es relativamente costoso.

10 Phister y Mills [Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003; 69(12):7430-7434.] usaron el método de RT-PCR para la identificación de *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* en el vino. El método es muy sensible (es capaz de hacer una detección a una concentración de 1 célula/ml) y selectivo, pero es aún más caro que la PCR tradicional, los costes de equipamiento también son altos y su uso requiere un personal adecuadamente cualificado.

15 Stender y colaboradores [Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:938-941 (2001)] detectaron *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* a partir de vino, Connell y colaboradores [Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 2002; 53(4): 322-24] detectaron cepas de *Brettanomyces* a partir del aire de bodegas con el método de hibridación *in situ* quimioluminiscente (con la aplicación de una sonda de ácido peptidonucleico). El método es muy sensible, pero se basa en el cultivo, y por lo tanto consume tiempo y requiere trabajadores cualificados, y además el coste de las pruebas es significativo.

25 Mitrakul y colaboradores [Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiol.* 1999 16 3-14.] usaron el método RAPD-PCR para la identificación de cepas de *Brettanomyces/Dekkera*. Este método es adecuado para la identificación de especies y cepas, pero su condición es tener un instrumento especial (PCR). Los autores lo usaron en combinación con otros métodos de identificación, que se basan en el cultivo y las pruebas fisiológicas, y por lo tanto el ensayo también requirió tiempo.

30 Ibeas y colaboradores [Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by a Nested PCR Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(3) 998-1003] identificaron cepas de *Brettanomyces/Dekkera* en jerez con PCR "anidada". Este método es muy sensible, no requiere cultivar las cepas, y por lo tanto da un resultado rápido y fiable en 10 horas. Aunque requiere un equipamiento especial, y los restos de jerez en la muestra bloquean la reacción, y así se puede obtener un resultado falso.

35 La identificación mediante Oeno Yeast Kit (Partec) es un método de detección de fluorescencia, basado en citometría de flujo, que detecta las células de levadura metabólicamente activas. De manera similar a otros procedimientos citométricos, este método no es específico de especies de *Brettanomyces/Dekkera*, por lo tanto solamente se puede usar en muestras de vino que están en la fase de maduración, cuando no es probable la presencia de otras levaduras. El ensayo es caro y necesita instrumentos especiales.

40 En resumen, la ventaja de los métodos moleculares es la selectividad y la rapidez, la ventaja de los métodos instrumentales es la precisión y la rapidez. Su desventaja es que requieren instrumentos especiales y caros, la reacción es bastante costosa y la implementación y la evaluación requieren un personal cualificado. La desventaja común de los procedimientos de biología molecular es que si identifican una o dos especies, otras especies que pueden desencadenar el deterioro del vino y los alimentos permanecen ocultas.

45 La solución a este problema es usar un medio que sea selectivo para las especies de *Brettanomyces/Dekkera* y/o *Zygosaccharomyces*. El beneficio significativo de este medio es que su uso no requiere un equipamiento especial, ni un microbiólogo, ni cualificaciones analíticas, y el examen se puede llevar a cabo y evaluarlo en una bodega por parte de un enólogo. Una desventaja de esta técnica es que la selectividad del medio es limitada, y por tanto podrían aparecer otros microorganismos, p.ej. colonias de levaduras naturales (resultado falso positivo).

50 Renouf V. y Lonvaud-Funel A. [Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Res.* 2007; 162(2): 154-67.] crearon un medio selectivo y con él, las especies de *Dekkera/Brettanomyces* se pueden enriquecer, y así se puede hacer sensible el procedimiento de identificación.

55 Barata A. y colaboradores [Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, 2008 104(4) 1182-1191.] incrementaron el contenido de alcohol y usó cicloheximida solamente como fuente de carbono, lo que aseguró que su medio es selectivo para las especies de *Dekkera/Brettanomyces*.

Schuller D. y colaboradores C. [A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *J Food Prot.* 2000 63(11):1570-5.] crearon un medio que sirve para el cultivo selectivo de

Zygosaccharomyces bailii. Con el ajuste adecuado de la concentración de ácido fórmico y de glucosa se hizo el medio tan selectivo que solamente *Z. bailii* provocó un desplazamiento del pH en dirección alcalina, que dio como resultado un cambio de color del medio.

5 El objetivo de Hocking AD. [Media for preservative resistant yeasts: a collaborative study. Int J Food Microbiol. 1996 29(2-3):167-75] fue crear un medio que fuera más adecuado para la identificación de una levadura que es resistente a los conservantes en los alimentos. Según la publicación, los autores examinaron 5 medios, de los cuales 3 fueron selectivos. Dos de 3 se hicieron selectivos mediante la adición de ácido acético, mientras el tercer medio fue un medio ZBM (*Zygosaccharomyces bailii*), que contuvo tinte azul tripán. Al comparar la eficacia de los medios, el medio ZBM pareció ser adecuadamente selectivo para *Z. bailii*, sin embargo, fue menos adecuado para el recuento debido a su efecto de inhibición del crecimiento.

Mediante la aplicación de los métodos mencionados anteriormente, los medios se pueden hacer selectivos para las levaduras en crecimiento. Una tarea adicional es identificar la especie de levaduras determinadas, que en caso de la levadura natural se realiza a menudo mediante una muestra de olor, mediante la adición de un compuesto al medio, p.ej., ácido p-cumárico, que la levadura transforma en un compuesto con un olor característico.

15 Couto J. A. y colaboradores [A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. Lett Appl Microbiol. 2005 41(6):505-10.] presenta en su publicación un método sencillo y fiable para identificar las levaduras de *Brettanomyces/Dekkera*. La base de su método es la utilización de un medio selectivo, que contiene glucosa, cicloheximida, cloranfenicol y ácido p-cumárico. La presencia de levaduras se evalúa mediante la turbidez y el olor.

20 Rodrigues N, y colaboradores [Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. J Appl Microbiol. 2001 90(4):588-99.] también desarrollaron un medio selectivo para la identificación de especies de *Dekkera/Brettanomyces* en un medio asociado a la producción de vino. Aseguraron la selectividad del medio añadiendo etanol y cicloheximida. Demostraron la identificación de cepas productoras de ácido añadiendo verde de bromocresol. La adición de ácido p-cumárico aseguró la identificación de cepas de *Dekkera/Brettanomyces* basada en muestras de olor.

30 Durante el método aplicado por Lebrun Labs (kit Easy Blue Brettanomyces Test), el medio selectivo que bloquea el crecimiento de la mayoría de levaduras se decolora por efecto de los ácidos producidos por los microbios (cambio del pH). Además, las colonias *Dekkera/Brettanomyces* producen un compuesto volátil de olor característico a partir del ácido p-cumárico del medio, cuya percepción ocurre al olerlo, por lo que requiere experiencia y/o una muestra de olor comparativa. Aunque este método no requiere una cualificación o instrumentos especiales, tiene sus desventajas: el medio no es absolutamente selectivo, lo que puede conducir a resultados positivos falsos.

35 Durante el uso complementario de ácido p-cumárico, el metabolito que desarrolla [4-etilfenol (4-EP), 4-etilguayacol (4-EG), ácido isovalérico] tiene un olor que es típico de las levaduras de *Brettanomyces/Dekkera*, cuya identificación requiere experiencia y/o una muestra de olor. Tomar una muestra de olor implica abrir la placa Petri una y otra vez, lo que se convierte en una fuente potencial de infección por sí misma.

Por lo tanto, según el conocimiento técnico, hubo propuestas de soluciones, en las que se identificaron las especies mencionadas de levadura natural en un medio cromogénico, basándose en una reacción que fue acompañada de decoloración.

40 Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. ["Spoilage yeasts in the wine industry." Int J Food Microbiol. 2003 86(1-2):23-50.] tienen un resumen detallado en profundidad en el que discuten las colonias de levaduras en uvas y en vinos, y también mencionan las técnicas de identificación industriales. Presentan los componentes que se deben hallar en los medios generales que son para la identificación de levaduras, y con respecto a estos mencionan los indicadores que se usan en estos medios: verde de bromocresol y azul de bromofenol.

45 En la publicación internacional nº WO0073494 (A1) Leao Cecilia y colaboradores describen medios que son elegibles para la identificación de especies de *Zygosaccharomyces*, tales como *Zygosaccharomyces Bailii* y *Zygosaccharomyces bisporus*, de vino y otros alimentos. El medio está constituido por un medio mineral general, que se complementa con vitaminas y oligoelementos, glucosa y ácido fórmico como fuentes de carbono, un indicador ácido-base y opcionalmente con antibióticos. En este caso, el indicador es generalmente verde de bromocresol.

50 En el medio selectivo azul, distribuido por Millipore, se experimenta la decoloración alrededor de las colonias de *Brettanomyces*, debido al ácido que producen.

55 La solución (inventores: Loureiro Virgilio Borges y colaboradores. "Culture medium for detection of *Dekkera* and *Brettanomyces*") que se describió en la solicitud de patente, publicada con el número EP1185686(A1) (que corresponde a la publicación internacional nº WO2000073495A1), se refiere a un método y al uso de un medio general para la identificación de levaduras *Dekkera* y *Brettanomyces*, y la determinación de sus recuentos de células. Según el método, se añade lo siguiente al medio: nutrientes; fuente de energía no fermentable, principalmente etanol; ácido p-cumárico; indicador ácido-base, principalmente verde de bromocresol; cicloheximida

para bloquear el crecimiento de levaduras y antibióticos para bloquear el crecimiento de bacterias, cloranfenicol u oxitetraciclina. El medio muestra una decoloración distintiva como efecto de las colonias cultivadas (nobles) de cepas de *Dekkera* y *Brettanomyces*. El grado de cambios por decoloración depende del patrón de crecimiento como efecto de la disminución del pH. Además, durante el cultivo se desarrolla un aroma fenólico característico tras unos pocos días de incubación, que es fácil de identificar. La invención se puede aplicar también en la industria alimentaria.

En la publicación N° ES2268970(A1) Velázquez P. E. et al ("Yeasts detection culture medium comprises glucose mixed with buffer microorganism and bacterial growth inhibitors and e.g. a nitrogen source") se ha enseñado un medio adecuado para la detección de levaduras, en el que el medio comprende glucosa como fuente de carbono, un tampón de carbonato cálcico, agentes activos capaces de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos y bacterias, fuentes de nitrógeno y un indicador de pH que realmente es rojo neutro. El medio es capaz de detectar *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en alimentos y bebidas. La identificación se basa en el olor a ácido acético del medio y en la aparición de líneas transparentes alrededor de las colonias de levaduras de *Dekkera/Brettanomyces* presentes en el medio.

La solicitud de patente japonesa JP56106588 describe un método para la producción de un medio de cultivo biológico que contiene pectina metoxilada y que se forma mezclando lactosa (5 g), eosina Y (0,5 g), azul de metileno (0,065 g), pectina de baja metoxilación (25 g) y agua desionizada (1 l) en presencia de agar-agar. La mezcla resultante se esteriliza, se ajusta su pH a 7,1 con fosfato sódico, y en una placa Petri se vierte un gel de la mezcla resultante. El medio de cultivo se usa para cultivar levaduras, bacterias, microorganismos y hongos. Los inventores no tienen conocimiento sobre si el medio es adecuado para la detección de especies de levaduras, en particular colonias de levaduras de *Dekkera/Brettanomyces*, basándose en el cambio de color.

En un resumen de Marki-Zay y colaboradores [Development and Evaluation of Methods for the Detection of *Brettanomyces* in Wine. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyulése - Abstraktfüzet, Helikon Szálló. 2010, 58-59] se comparó un medio y ensayo selectivos para la detección cuantitativa de *Brettanomyces/Dekkera* con los análisis comerciales.

Los métodos mencionados anteriormente, que se basan en el cultivo, se pueden llevar a cabo con una experiencia previa mínima y son baratos. En el caso de los presentes métodos, la identificación se basa principalmente en el cambio de color del indicador, por ejemplo, los ácidos orgánicos producidos por *Brettanomyces* provocan la acidificación del pH del medio y, por tanto, el cambio de color del indicador. La selectividad de los métodos normalmente fue limitada, y por tanto no pudieron distinguir ciertas levaduras naturales de otras. El objetivo de la invención se dirige a desarrollar un medio y un método de cultivo selectivo que sea más fiable y más fácilmente estimable que los anteriores, y mediante cuya aplicación las colonias de levaduras específicas se puedan identificar visualmente y distinguirlas de manera inequívoca, y separarlas de otros microorganismos capaces de crecer en el medio, y que sean relativamente menos problemáticos con respecto a la enología.

35 Descripción breve de la invención

La invención se basa en el hallazgo de que los diferentes metabolitos de levaduras provocan cambios diferenciados de color de ciertas cepas, es decir, diferentes grupos de levaduras provocan diferentes reacciones de color en el medio de la invención y por tanto son detectables selectivamente.

La invención se define en su sentido más amplio mediante las reivindicaciones adjuntas.

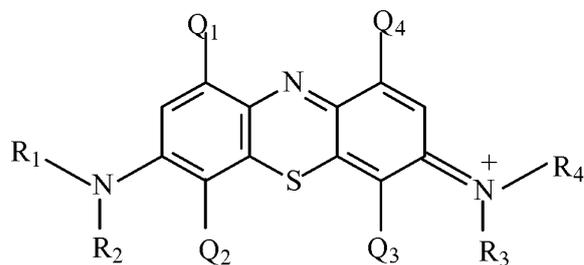
40 La invención se refiere a un medio selectivo cromogénico adecuado para la detección y el crecimiento de una o más levadura(s) a partir de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una levadura del género *Zygosaccharomyces*, y/o una levadura del género *Lachancea*, y dicho medio comprende

- un nutriente adecuado para la alimentación y/o el crecimiento de dicha una o más especies de levaduras a detectar,
- 45 - un agente capaz de inhibir el crecimiento de especies de *Saccharomyces*, preferiblemente a una concentración capaz de inhibir dicho crecimiento, y
- una tinción cromogénica, en la que la tinción cromogénica es la combinación de los siguientes colorantes, y dicha combinación es cromática con luz visible:
 - 50 - múltiple(s) tipo(s) de bis-3,7 diaminofenotiazinas sustituidas y/o sin sustituir que comprenden una mezcla de azul de metileno y Azure B, y
 - uno o múltiple(s) tipo(s) de fluoresceína(s) sustituida(s)

en el que la fluoresceína sustituida se selecciona del grupo que consiste en eosina Y, eosina B y cualquier mezcla de las mismas.

También se describe que el colorante de bis-3,7 diaminofenotiazina de fórmula I en el medio puede tener la

estructura química



I.

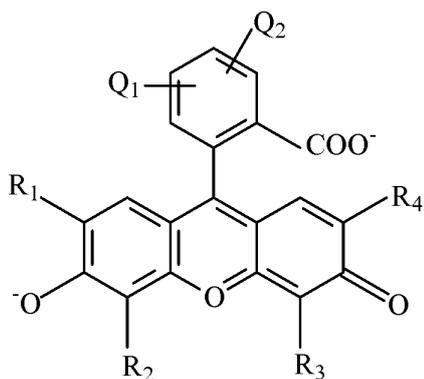
en la que

R1, R2, R3 y R4 son independientemente H, metilo o etilo, preferiblemente H o metilo,

- 5 Q1, Q2, Q3 y Q4 son independientemente H, alquilo C1-4, halógeno, pseudohalógeno, -NO o -NO₂, preferiblemente H, metilo o etilo, lo más preferiblemente H,

o la sal soluble de la misma, y

que la estructura química del colorante de fluoresceína sustituida de fórmula II puede ser



II.

- 10 en la que

R1, R2, R3 y R4 son independientemente halógeno, pseudohalógeno, -NO o -NO₂,

Q1 y Q2 son H, alquilo C1-4, alcoxi C1-4, halógeno, pseudohalógeno, -NO o -NO₂, heterociclo de 5 o 6 miembros, o Q1 y Q2 forman juntos un heterociclo de 5 o 6 miembros, en cuyo caso Q1 y Q2 están situados en átomos de C adyacentes,

- 15 o la sal soluble de la misma.

Preferiblemente, la fluoresceína sustituida es Eosina Y.

- 20 La tinción cromogénica comprende al menos dos tipos de bis-3,7 diaminofenotiazinas que tienen diferentes grados de metilación, es decir, una mezcla de azul de metileno y Azure B. En una realización preferida, las bis-3,7 diaminofenotiazinas de dos grados diferentes de metilación tienen cantidades molares que son como máximo un 50% o 30%, preferiblemente como máximo un 20% o 10% diferentes respecto del componente que está presente en la cantidad más pequeña. Lo más preferiblemente, la tinción cromogénica es una mezcla de azul de metileno y Azure B en una proporción básicamente 1:1 y de Eosina Y (Azure II-eosinato).

- 25 Lo más preferiblemente, la tinción cromogénica es una mezcla de la bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir y la fluoresceína sustituida, preferiblemente en una proporción de 1,5:1 a 1:1. Muy preferiblemente, la bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir es una mezcla de azul de metileno y Azure B en una proporción básicamente de 1:1. Más preferiblemente, la tinción cromogénica en el medio selectivo y cromogénico es Azure II-eosinato.

- 30 En una realización preferida, las cantidades molares del al menos un tipo de colorante de bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir y del al menos un tipo de colorante de fluoresceína sustituida son como máximo un 50% o 30%, preferiblemente un 20% o 10% diferentes respecto de la cantidad del componente que está presente en la cantidad más pequeña.

Como se describe en la presente memoria, también se puede usar azul de metileno y los intermedios desmetilados del mismo o la mezcla de los mismos en la tinción, seleccionados de:

una sal de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-io, preferiblemente acetato o cloruro (azul de metileno),

una sal de N-metil-N',N'-dimetilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure B),

5 una sal de N',N'-dimetilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure A: CAS 531 533),

una sal de N-metilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure C),

una sal de fenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente cloruro o acetato (tionina).

La tinción comprende una mezcla de Azure B y azul de metileno.

10 También se describe un medio cromogénico y preferiblemente selectivo adecuado para el crecimiento y la detección selectiva de una o más levadura(s) seleccionada(s) de:

- una especie de levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*,

- una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces*,

- una especie de levadura del género *Lachancea*,

preferiblemente al menos una especie de levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*,

15 y que comprende

- un nutriente adecuado para la nutrición y/o el crecimiento de levaduras que incluyen al menos o preferiblemente una o más especies de levaduras a detectar,

- un agente capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente de otras levaduras, más preferiblemente de una especie de *Saccharomyces*, preferiblemente a una concentración capaz de inhibir dicho crecimiento, y

20 - una tinción cromogénica, en la que la tinción cromogénica es la combinación de los siguientes colorantes, y dicha combinación es cromática con luz visible:

- uno o más tipos, preferiblemente al menos dos tipos, preferiblemente dos tipos de bis-3,7 diaminofenotiazinas sustituidas y/o sin sustituir seleccionadas de:

25 una sal de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-io, preferiblemente acetato o cloruro (azul de metileno),

una sal de N-metil-N',N'-dimetilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure B),

una sal de N',N'-dimetilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure A),

una sal de N-metilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure C),

una sal de fenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente cloruro o acetato (tionina), y

30 - uno o más tipos de fluoresceínas sustituidas seleccionadas de: colorantes de eosina, preferiblemente Eosina B y Eosina Y.

En una realización preferida, el medio selectivo y cromogénico comprende un agente gelificante y se formula como:

polvo sólido, medio de cultivo gelificado y preferiblemente el medio está en una forma preparada previamente, lista para el uso, preferiblemente en forma sólida y/o de gel, lo más preferiblemente vertida previamente en placas.

35 Lo más preferiblemente, el agente que inhibe el crecimiento de las especies de *Saccharomyces* es un agente quimioterápico o un antibiótico, preferiblemente cicloheximida.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del medio cromogénico de la invención para la detección o determinación cualitativa o cuantitativa de una o más levadura(s) a partir de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos, y/o una materia prima de alimentos, preferentemente un producto agrícola, y la levadura se selecciona de: una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una levadura del género *Zygosaccharomyces* y/o una levadura del género *Lachancea*.

40

En una realización preferida, se detecta una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, y dicha levadura se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, y *Brettanomyces nanus*.

En una realización preferida, se detecta una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces*, en la que dicha levadura es preferiblemente *Zygosaccharomyces bailii*.

En una realización preferida, se detecta una especie de levadura del género *Lachancea*, en la que dicha levadura es preferiblemente *Lachancea fermentatii*.

- 5 En la presente memoria se describe el uso del siguiente medio cromogénico y selectivo para la detección o determinación cualitativa o cuantitativa de una o más levadura(s) de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos, y/o una materia prima de alimentos, en el que el producto alimenticio es preferiblemente un producto alimenticio preparado mediante fermentación, en particular vino, y dicha levadura se selecciona de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una levadura del género *Zygosaccharomyces* y/o una levadura del género *Lachancea*, preferiblemente al menos una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*,

10 en el que el medio que es cromogénico y selectivo es adecuado para el crecimiento y la detección selectiva de dicha o dichas levadura(s),

y dicho medio contiene

- 15 - un nutriente adecuado para la nutrición y/o el crecimiento de levaduras que incluyen al menos o preferiblemente una o más especies de levaduras a detectar,
- un agente capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente de otras levaduras, más preferiblemente de una especie de *Saccharomyces*, preferiblemente a una concentración capaz de inhibir dicho crecimiento, y
- 20 - una tinción cromogénica, en la que la tinción cromogénica es la combinación de los siguientes colorantes, y dicha combinación es cromática con luz visible:
- al menos dos tipos, preferiblemente dos tipos de bis-3,7 diaminofenotiazinas sustituidas y/o sin sustituir seleccionadas de:
- una sal de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-io, preferiblemente acetato o cloruro (azul de metileno),
- 25 una sal de N-metil-N',N'-dimetilfenotiazin-5-io-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure B),
- y
- uno o más tipo(s) de fluoresceínas sustituidas seleccionadas de: Eosina B y Eosina Y y cualquier mezcla de las mismas.

En el uso según la invención

- 30 - preferiblemente, cuando la colonia es rosa y/o intensamente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una especie de levadura o múltiples especies de levaduras de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*,
- preferiblemente, cuando la colonia es azul y opcionalmente ligeramente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces*, preferiblemente *Zygosaccharomyces bailii*,
- 35 - preferiblemente, cuando la colonia es azul verdosa con un borde rosa y/o es ligeramente fluorescente con luz UV con el borde intensamente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Lachancea*, preferiblemente *Lachancea fermentatii*.

- 40 Preferiblemente, el producto alimenticio preparado mediante fermentación según la invención es preferiblemente vino o cerveza, en particular preferiblemente vino tinto.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la detección o determinación cualitativa o cuantitativa de una o más levadura(s) seleccionada(s) del grupo a continuación, de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos, y/o una materia prima de alimentos, y el método comprende las etapas siguientes:

- 45 - proporcionar el medio de la invención, en particular un medio seleccionado de los medios definidos anteriormente,
- obtener una muestra de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos y/o una materia prima de alimentos, en el que el producto alimenticio es preferiblemente un producto alimenticio preparado mediante fermentación, en particular vino,

- preparar la muestra para añadirla al medio, opcionalmente filtrar y/o concentrar y/o enriquecer la muestra en microorganismos,
- colocar en placas la muestra o una parte adecuada de la misma en el medio,
- 5 - incubar el medio en condiciones adecuadas para el cultivo de las especies de levaduras hasta obtener colonias,
- detectar las especies de levaduras mediante la decoloración de dichas colonias.

Preferiblemente, dicha levadura es una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*.

Preferiblemente, dicha levadura es una levadura o especies de levaduras del género *Zygosaccharomyces*.

Preferiblemente, dicha levadura es una levadura o especies de levaduras del género *Lachancea*.

- 10 Preferiblemente, cuando la colonia es rosa e intensamente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una levadura o múltiples especies de levaduras de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*.

Preferiblemente, cuando la colonia es azul y opcionalmente ligeramente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces*, preferiblemente *Zygosaccharomyces bailii*.

- 15 Preferiblemente, cuando la colonia es azul verdosa con un borde rosa y/o es ligeramente fluorescente con luz UV con el borde intensamente fluorescente con luz UV, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Lachancea*, preferiblemente *Lachancea fermentatii*.

Según una realización preferida, el número de las colonias se proporciona respecto de la cantidad de la muestra original, preferiblemente el volumen o el peso de la misma, y por lo tanto el método es cuantitativo.

- 20 Lo más preferiblemente, las colonias y preferiblemente el número de las colonias se determinan con luz UV, basándose en la fluorescencia.

En una realización preferida, el producto alimenticio es un producto alimenticio preparado mediante fermentación, preferiblemente

- cerveza o vino, preferiblemente vino tinto,
- 25 - el intermedio de procesamiento de alimentos es malta, mosto, malta o mosto en fermentación, y/o
- la materia prima de alimento es uva.

Según una realización preferida, el medio de cultivo adecuado para el cultivo de dicha levadura se proporciona en una forma preparada previamente, lista para el uso, preferiblemente en forma sólida o de gel, lo más preferiblemente vertida previamente en placas.

- 30 Según un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit de reactivos para el uso en el método de la invención, que contiene el medio de la invención y medios para preparar un medio de cultivo en gel del mismo.

Definiciones

- 35 De acuerdo con la clasificación taxonómica del género *Brettanomyces*/*Dekkera*, primero se identificaron las formas anamorfas (que se reproducen de manera asexual), y tales formas se clasificaron posteriormente en el género *Brettanomyces*. Más tarde, también se observó la presencia de formas con reproducción sexual en ciertas especies, que se clasificaron en el género *Dekkera*. Las siguientes especies se identificaron como especies anamorfas: *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, y *Brettanomyces nanus*, aunque se estableció un carácter teleomorfo con respecto a dos especies: *Dekkera bruxellensis* y *Dekkera anomala*. Sin embargo, más tarde, se verificó mediante ensayos de ADN que estas dos son idénticas a *Brettanomyces bruxellensis* y *Brettanomyces anomalus*, que realmente representan sus variaciones teleomorfas. Por lo tanto, en la descripción se usa la expresión aceptada profesionalmente "Brettanomyces/Dekkera", que incluye en general cualquier levadura que se identifique o se clasifique taxonómicamente como miembro de este género.

- 45 El género *Brettanomyces*/*Dekkera* incluye las especies *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. clausenii*, *B. custersianus*, *B. lambicus*, *B. naardenensis* y *B. nanus*.

Las "levaduras" constituyen un grupo de hongos que son especies eucariotas que tiene un núcleo, en general unicelulares, aunque en ciertas condiciones algunas especies son capaces de formar pseudomicelios o micelios auténticos. Se reproducen por medio de gemación o por medio de fisión. Aunque en un sentido amplio, estas especies no constituyen una única categoría filogenética, se pueden clasificar en general en dos filos (divisiones), los

Ascomycetos y los Basidiomicetos.

Preferiblemente, una o más levaduras que se pueden detectar según la invención pertenecen a las levaduras del filo *Ascomycota*, más preferiblemente del subfilo *Saccharomycotina*, más preferiblemente de la clase *Saccharomycetes*, muy preferiblemente de la familia *Saccharomycetaceae*.

- 5 El término "levadura" se refiere a una levadura, tipo de levadura o categoría de levadura definida de una manera específica, preferiblemente, una levadura que pertenece a una unidad taxonómica definida, en particular preferiblemente a un género o especie definido.

10 En la descripción, el término "especie de levadura" significa cualquier levadura que se sabe que tiene un efecto beneficioso expresamente sobre el proceso de fermentación concreto, y que está caracterizada de manera adecuada. Preferiblemente, la levadura noble es una cepa establecida de una especie de levadura concreta. Las expresiones "especie de levadura perjudicial" o "levadura perjudicial" significan cualquier levadura cuya presencia o cuya presencia por encima de una cantidad o concentración concreta tiene un efecto perjudicial sobre la producción de un producto concreto preparado mediante fermentación.

15 "Producto preparado mediante fermentación" significa cualquier producto, preferiblemente los productos alimentarios, para cuya preparación es necesario el efecto de la levadura, preferiblemente la conversión de carbohidratos en alcohol y dióxido de carbono por parte de la levadura. Preferiblemente, el producto preparado mediante fermentación contiene alcohol, es decir, es una bebida alcohólica, preferiblemente cerveza o vino, muy preferiblemente vino, más preferiblemente vino tinto.

20 La palabra "contiene" no es exclusiva en su significado, y permite la adición o implicación de otras propiedades o etapas procedimentales al contenido de las propiedades o etapas procedimentales ya enumeradas.

25 En el contexto de la descripción, la palabra "contiene" se puede limitar a las expresiones "contiene básicamente" y/o "de hecho, contiene", que se deberían interpretar como "contiene" propiedades prescritas o etapas procedimentales prescritas o componentes que se especifican en alguna lista, p.ej. dentro del alcance de la reivindicación de la patente, pero además de éstas, también está permitida la presencia de otras propiedades, etapas procedimentales, o componentes que no afectan fundamentalmente a ningún otro objetivo descrito en la invención.

La palabra "uno" usada en algunas de las definiciones de la descripción, y cuando el contexto así lo permite el artículo "un", que expresa el singular se puede considerar que contiene el significado del plural a menos que sea necesario de otra manera por el contexto, a menos que, por ejemplo, el uso de "uno" se refiera de manera inequívoca a "uno" como dígito.

30 Descripción de las figuras

Figura 1: Identificación de levaduras naturales junto con levaduras de producción de vino (nobles) en un medio selectivo

Los patrones asignados a los números en secuencia son los siguientes:

- 35 1: *Dekkera bruxellensis* CBS 73; 2: *Pichia membranifaciens var. membranifaciens* CBS 191; 3: *Zygosaccharomyces bailii var. bailii* CBS 4688; 4: *Zygosaccharomyces bailii var. bailii* CBS 4689; 5: *Zygosaccharomyces mellis* CBS 684; 6: *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 441; 7: *Lachancea fermentati* CBS 707; 8: *Issatchekia orientalis* CBS 6799; 9: *Brettanomyces custersianus* CBS 4805; 10: *Saccharomyces cerevisiae* T-158C; 11: *Saccharomyces cerevisiae* S6; 12: *Schizosaccharomyces pombe*

Figura 2: colonias de *Brettanomyces* de un medio vinoso, sobre un medio selectivo, coloreado

40 Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores descubrieron inesperadamente durante la creación de la invención que si se añade azure-II-eosinato a un medio selectivo - que es adecuado para hacer crecer levaduras, pero bloquea el crecimiento de *Saccharomyces* - en el medio que se obtiene se pueden identificar especies de *Brettanomyces* entre las colonias que aparecen, con la ayuda de azure-II-eosinato.

45 De manera bastante sorprendente, los presentes inventores observaron lo siguiente:

1. En este medio, las colonias de *Brettanomyces* tienen un color rosa, y son visibles a simple vista.
2. Las colonias rosas son fluorescentes con luz ultravioleta, lo que confirma la separación de las especies.

50 Con la ayuda de este método, las colonias de *Brettanomyces/Dekkera* se pueden distinguir fácilmente de otras levaduras naturales, que son capaces de crecer en un medio selectivo, mirándolas. La identificación que se basa en la visibilidad, no solamente hace que el proceso de identificación sea mucho más sencillo, sino que además no requiere experiencia y muestras de olor, además, hace que el análisis del olor de las muestras sea innecesario, lo

que conlleva la posibilidad de extender la infección. La razón por la que es más específico para las especies de *Brettanomyces/Dekkera* que otros métodos es que es capaz de identificar otras especies de levaduras que no son levaduras de producción de vino (nobles), lo cual (solamente) provoca un problema en caso de los vinos dulces con un residuo mayor de azúcar.

- 5 También se han llevado a cabo los experimentos mediante el uso de diferentes colorantes de azure y eosina. Los colores de todas las tinciones cambiaron con el incremento del pH. Sin embargo, estas tinciones no proporcionaron la reacción de color previamente experimentada, y no fueron adecuadas para distinguir las especies de *Brettanomyces/Dekkera* de otras levaduras examinadas.

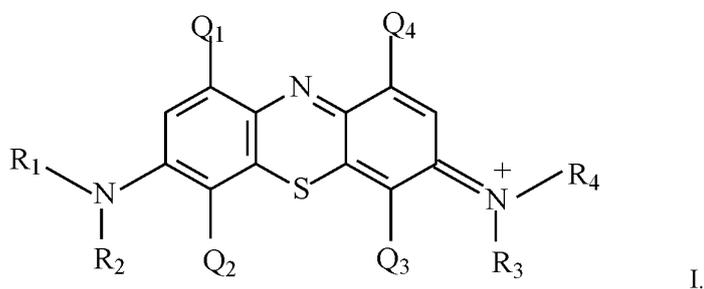
- 10 Según la invención, para obtener los resultados deseados, se necesitan bis-3,7-diamino-fenotiazinas sustituidas o sin sustituir junto con los derivados sustituidos de fluoresceína.

- 15 Hubo una tinción de medio que se conocía antes con los mismos componentes, eosina y azul de metileno, pero no se usó para identificar la contaminación con levaduras. Por ejemplo, la publicación del Reino Unido n° GB1248197 [ABBOTT LAB (US), "Diagnostic method and apparatus for the detection of bacteria"] describe un medio de agar con eosina-azul de metileno que contiene lactosa, sin embargo, la identificación de las levaduras en la referencia no se basa en el medio de eosina-azul de metileno. Hasta donde se puede entender, previamente se usó azure-II-eosina para otros fines, principalmente para teñir muestras de tejido.

- 20 Según el documento de la descripción japonesa n° JP56106588A se usó eosina-Y ($0,5 \text{ g}, 7,23 \times 10^{-4} \text{ mol}$) y azul de metileno ($0,065 \text{ g}, 2,03 \times 10^{-4} \text{ mol}$) en un medio solamente, sin embargo, el documento no proporciona ninguna información sobre la decoloración diferente del medio y/o las colonias como resultado del crecimiento de diferentes tipos de levaduras.

La tinción cromogénica descrita en la presente memoria es, por lo tanto, la combinación de al menos un tipo de tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir y al menos un tipo de tinción de fluoresceína sustituida. Preferiblemente, la combinación de la tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir de fórmula I siguiente y la tinción de fluoresceína sustituida de fórmula II siguiente.

- 25 La estructura química de la tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina de fórmula I es



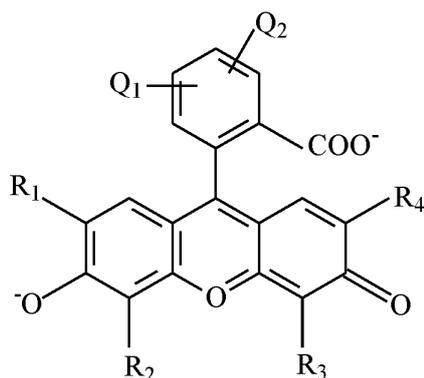
en la que

R1, R2, R3 y R4 son independientemente H, metilo o etilo, preferiblemente H o metilo,

- 30 Q1, Q2, Q3 y Q4 son independientemente H, alquilo C1-4, halógeno, pseudohalógeno, -NO o -NO₂, preferiblemente H, metilo o etilo, preferiblemente H o metilo, lo más preferiblemente H.

Preferiblemente, la tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina de fórmula I está presente en una forma catiónica, tal como una sal formada con un anión. El anión es preferiblemente un ión haluro, lo más preferiblemente ión cloruro. Según una variación, el anión se forma mediante la tinción fluorescente sustituida de fórmula II.

La estructura química de la tinción fluorescente sustituida de fórmula II es



II.

en la que R1, R2, R3 y R4 son independientemente halógeno, pseudohalógeno, -NO o -NO₂,

Q1 y Q2 son H, alquilo C1-4, alcoxi C1-4, halógeno, pseudohalógeno, -NO o NO₂, heterociclo de 5 o 6 miembros, Q1 y Q2 forman juntos un heterociclo de 5 o 6 miembros, en cuyo caso Q1 y Q2 están situados en átomos de C adyacentes.

Preferiblemente, R1 y R4 son halógeno, más preferiblemente Br o -NO₂.

Preferiblemente, R2 y R3 son halógeno, más preferiblemente Br.

Preferiblemente, Q1' es H, metilo o halógeno y Q2 es H.

Preferiblemente, la tinción de fluoresceína sustituida de fórmula II se usa en una forma aniónica, preferiblemente en forma de una sal formada con un catión. Preferiblemente, el catión es ión sodio, ión potasio o ión amonio. Según una variación adicionalmente preferida, el catión se forma mediante la tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina de fórmula I.

Preferiblemente, el medio cromogénico comprende al menos un tipo de tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir y al menos un tipo de tinción de fluoresceína sustituida en cantidades molares básicamente idénticas, es decir, la cantidad del al menos un tipo de tinción de bis-3,7 diaminofenotiazina sustituida o sin sustituir y la cantidad del al menos un tipo de tinción de fluoresceína sustituida en el medio de cultivo son como máximo un 50% o 30%, preferiblemente como máximo un 20% o 10% diferentes respecto del componente que está presente en una cantidad más pequeña, es decir, la proporción de las cantidades molares es de 1,5:1 a 1:1 o de 1,3:1 a 1:1, preferiblemente de 1,2:1 a 1:1 o de 1,1:1 a 1:1, lo más preferiblemente la proporción de las cantidades molares es 1:1 o viceversa.

Lo más preferiblemente, el medio de cultivo contiene múltiples tipos de tinciones de bis-3,7 aminofenotiazina sustituida o sin sustituir, en cuya fórmula general I R1, R2, R3 y R4 son H, metilo o etilo, de forma que los sustituyentes R1, R2, R3 y R4 son diferentes en las diferentes tinciones (R1, R2, R3 y R4 pueden no ser idénticos). Lo más preferiblemente, R1, R2, R3 y R4 son H o metilo y las tinciones de componentes de bis-3,7 diaminofenotiazina son diferentes en los grados de metilación.

Por lo tanto y preferiblemente, también se puede usar azul de metileno y los intermedios desmetilados del mismo o la mezcla de los mismos en la tinción, seleccionados de

una sal de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-ilo, preferiblemente acetato o cloruro (azul de metileno),

una sal de N-metil-N',N'-dimetilfenotiazin-5-ilo-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure B),

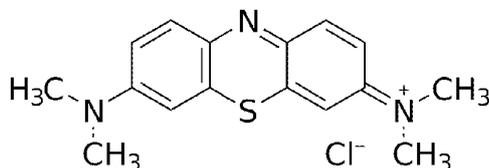
una sal de N',N'-dimetilfenotiazin-5-ilo-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure A: CAS 531 533)

una sal de N-metilfenotiazin-5-ilo-3,7-diamina, preferiblemente acetato o cloruro (Azure C),

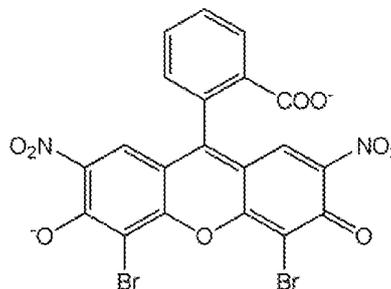
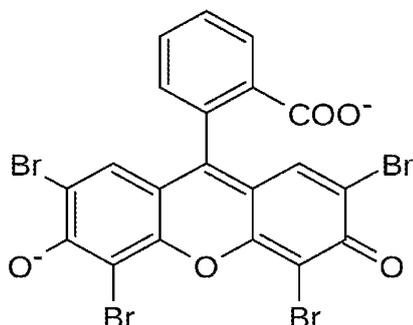
una sal de fenotiazin-5-ilo-3,7-diamina, preferiblemente cloruro o acetato (tionina).

La mezcla de Azure B y azul de metileno está presente en la tinción.

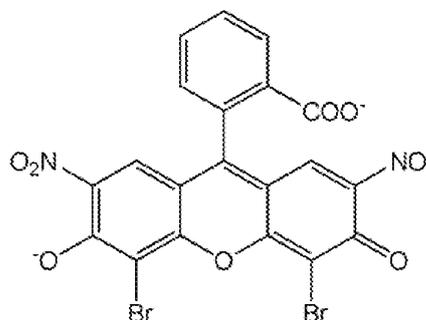
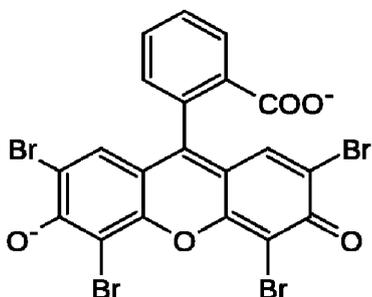
Fórmula química de azul de metileno:



De forma similar, las fluoresceínas sustituidas pueden ser de uno o más tipos. Se usa una tinción de eosina o una mezcla de tinciones de eosina, que comprende Eosina B o Eosina Y.



La tinción de eosina es Eosina B o Eosina Y, cuyas fórmulas son respectivamente



5

Lo más preferiblemente, la tinción usada según la invención es Azure II-eosinato. El Azure II-eosinato (CAS 53092-85-6) es una mezcla de azul de metileno y Azure B en la proporción 1:1 y de eosina Y. El Azure II-eosinato está disponible de diversos fabricantes (tales como Fluka, Sinopharm, CN y Nile Chemicals, IN).

10 Como se describe en la presente memoria, se pueden usar variantes sustituidas adicionales o sales de las tinciones de la invención, con tal de que sean cromáticas y el color cambie en presencia de levaduras.

Con respecto a los medios de crecimiento, se puede usar cualquier medio de crecimiento que sea adecuado para cultivar levaduras y que contenga al menos un agente que inhiba el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces*, p.ej. los medios de crecimiento descritos en los antecedentes de la invención.

15 Basándose en lo anterior, la invención se refiere a un método para el cultivo selectivo de levaduras de *Brettanomyces/Dekkera* y para la tinción diferencial de sus colonias, en el que se prepara un medio de crecimiento adecuado para cultivar células de levadura, que se hace selectivo mediante la adición de un agente quimioterápico adecuado o antibiótico que inhibe el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces*, y mediante la adición de la tinción cromogénica de la invención.

20 El medio de cultivo puede ser de una composición variada. Teóricamente, cualquier medio de crecimiento adecuado para cultivar levaduras es adecuado y conocido para una persona experta en la técnica. El medio de crecimiento contiene preferiblemente ingredientes seleccionados del grupo siguiente: carbohidrato, p.ej. glucosa; extracto o hidrolizado que contiene aminoácidos o péptidos, tal como peptona, extracto de levadura, "base de nitrógeno para levaduras" o "base de carbono para levaduras"; agente gelificante, p.ej. agar; y opcionalmente sal. Muy preferiblemente, el medio de crecimiento comprende glucosa, base de nitrógeno para levaduras y agar.

25 Además, el medio de crecimiento también contiene sustancias que inhiben la reproducción de microbios que tienen un papel en la fermentación normal o sana de productos alimenticios. Con tal de que el producto alimenticio en el que se lleva a cabo el método de detección sea un producto alimenticio preparado mediante fermentación, la sustancia que inhibe el crecimiento previene de manera viable el crecimiento de microorganismos que realizan la fermentación natural del producto alimenticio, p.ej. bloquea el crecimiento de levaduras nobles. Es evidente para una persona experta en la técnica que el inhibidor del crecimiento se debería aplicar al menos a una concentración que ya sea suficiente para bloquear el crecimiento de tales microorganismos. Al mismo tiempo, la concentración de inhibidor puede tener un umbral superior para que no se inhiba el crecimiento de las levaduras, cuya presencia se desea ensayar. Preferiblemente, el producto alimenticio es un producto alimenticio fermentado mediante una especie de *Saccharomyces*, tal como cerveza, vino u otro producto o intermedio que contiene levaduras, y el agente que inhibe el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces* es un agente quimioterápico o antibiótico adecuado, p.ej. cicloheximida aplicada a una concentración, p.ej. de 0,5-50 µg/ml, preferiblemente 1-20 µg/ml, en particular

35

preferiblemente 2-10 µg/ml, muy preferiblemente alrededor de 5 µg/ml, y de ese modo se incrementa o se hace selectiva la selectividad del medio de crecimiento.

La muestra puede ser cualquier muestra usada en la producción de tal producto alimenticio, p.ej. una muestra tomada de dispositivos usados en el proceso o una muestra extraída del líquido usado para limpiar los dispositivos.

5 El medio de cultivo preparado se coloca en una forma adecuada para la aplicación de la muestra. Según una cierta variación, se prepara un gel y se vierte en una placa, p.ej., una placa Petri. De manera alternativa, se puede aplicar cualquier otro medio de cultivo sólido (p.ej., en forma de gel) en el que la muestra se pueda colocar en placas y se pueda separar la progenie (p.ej. colonias) de una única célula.

10 Además de placas Petri, se puede usar preferiblemente cualquier otro recipiente de cultivo que tenga una gran superficie, en el que la muestra se pueda extender sobre la superficie del medio formado en él, y se pueda cerrar (p.ej., que tenga una tapa) y en el que se puedan detectar las colonias de microorganismos y visualizarlas de manera viable. Es preferible que el recipiente de cultivo esté hecho de vidrio o plástico, más preferiblemente plástico, y preferiblemente que tenga una tapa transparente.

15 También se pueden usar placas de Kolle o matraces de Roux, ya que también tienen grandes superficies, pero la muestra se debería introducir en la placa a través de una pequeña abertura, y también presenta dificultades conseguir una colocación uniforme en las placas. Después, la abertura se debería cerrar de una manera que permita una cierta ventilación, pero que la muestra no se contamine.

Por lo tanto, se pueden usar placas de cultivo con tapa esterilizables, en las que las muestras a ensayar se puedan colocar sobre una gran superficie.

20 De las muestras (p.ej., agua usada para lavar barriles u otras superficies), o de sus diluciones adecuadas, se coloca en placas una cantidad predeterminada sobre la superficie de los medios de cultivo, después se incuban a 10-37 °C, preferiblemente a 20-30 °C, en particular preferiblemente a temperatura ambiente durante alrededor de 5-20 días, preferiblemente durante 8-16 días, y muy preferiblemente durante 10-14 días. Es evidente para una persona experta en la técnica que el tiempo de incubación es necesariamente más largo a temperaturas inferiores.

25 En el medio de cultivo preparado según la invención, las levaduras de *Saccharomyces* dejan de crecer, y el color de las colonias de *Brettanomyces/Dekkera* se hace rosa y se pueden distinguir de los microorganismos que no son perjudiciales o solamente ligeramente perjudiciales para el vino. Los resultados se evalúan visualmente. En el caso de la aplicación de la muestra, el resultado se puede hacer cuantitativo proporcionando el número de células de levadura cultivables por 1 ml.

30 La sensibilidad de la detección de las levaduras de *Brettanomyces/Dekkera* se puede incrementar filtrando una cantidad mayor de vino a través de membranas con un tamaño de poro de 0,45 µm o 0,22 µm, y después colocando la membrana sobre la superficie del medio de cultivo. En este caso se debería asegurar que no haya burbujas de aire entre la membrana y la superficie de agar.

35 Además, la invención se refiere a medios de cultivo para llevar a cabo el método anterior, en los que el medio está en una forma en polvo o una forma lista para el uso, y también a los kits que los contienen y a otros componentes necesarios para llevar a cabo el examen (p.ej. dispositivos de aplicación de muestras), y también las instrucciones para el usuario. Preferiblemente, el kit de reactivos de la invención comprende el medio de cultivo necesario para llevar a cabo el método de la invención en la forma y cantidad pesada previamente para cada ensayo, y en una forma vertida por adelantado en placas Petri de plástico.

40 El método desarrollado es barato y no requiere una instrumentación especial, y es sencillo de llevar a cabo por cualquier persona. El procedimiento no requiere condiciones estériles de laboratorio, y solamente se debe prestar un poco de atención para asegurar que se coloca la muestra correcta sobre la superficie del medio de cultivo. El medio de cultivo contiene componentes fácilmente disponibles. Además de los componentes usados para el crecimiento, el medio contiene antibióticos que inhiben el crecimiento de levaduras, p.ej. - otros medios de cultivo similares al selectivo para *Brettanomyces* - también cicloheximida. Este antibiótico se usa para la identificación de especies diferentes en diagnósticos de levaduras. A la concentración usada por los inventores, previene el crecimiento de la mayoría de levaduras que desempeñan un papel en la producción de vino (p.ej. *Saccharomyces*), mientras esta concentración todavía es tolerada por la especie que provoca la degradación del vino.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitación, mediante los ejemplos siguientes.

50 Ejemplos

En los ejemplos siguientes, a menos que se indique de otra manera, se aplicaron las siguientes concentraciones y composiciones. La composición de medio que fue adecuada para el crecimiento de células de levadura fue la siguiente: 1% de glucosa, 0,67% de "base de nitrógeno para levaduras", 2% de agar, que se hizo selectivo mediante el uso de 5 µg/ml de cicloheximida como antibiótico para bloquear el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces*. Se usó Azure-II-eosinato a una concentración de 30 µg/ml.

55

Ejemplo 1: Identificación de especies de *Brettanomyces/Dekkera* a partir de mosto

Se hace una secuencia de dilución a escala 10 en 5 etapas a partir de agua destilada obtenida a partir de mosto. De cada dilución, se extienden 50 µl sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en las placas Petri. Se hacen las extensiones en tres medidas hechas en paralelo. Se incuban las placas Petri entre 20-25 °C durante 10-14 días. Las colonias rosas que aparecen sobre la superficie del medio tras finalizar el tiempo de incubación implican una infección por *Brettanomyces/Dekkera*. Se eligen las placas en las que se puede identificar fácilmente el número de colonias. Si se multiplica el número de colonias por veinte, más el valor de la dilución, se consigue el recuento de las placas de *Brettanomyces/Dekkera* del mosto aplicado a 1 ml.

También se puede examinar una placa positiva con luz UV. La fluorescencia de las colonias confirma los resultados obtenidos.

Ejemplo 2: Identificación de especies de *Brettanomyces/Dekkera* a partir de vino embotellado

Se agita el vino antes de tomar una muestra, después se filtran 500 ml a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µm. Se coloca el filtro de membrana sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en la placa Petri, de manera que se ajusta de manera adecuada (no debería haber burbujas de aire entre ellos). Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días.

Ejemplo 3: Identificación de especies de *Brettanomyces/Dekkera* a partir de vino tinto almacenado en barriles

Se centrifugan 50 ml del vino tinto de un barril (3000 rpm, 10 min, Hereus Multifuge 3S). Se suspende el sedimento en 1 ml de agua destilada. De la suspensión, se extienden 100 µm sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en la placa Petri. Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días.

Ejemplo 4: Identificación de especies de *Brettanomyces/Dekkera* a partir de barriles

Después de lavar los barriles, se filtran 500 ml del agua de lavado a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µm. Se coloca el filtro de membrana sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en la placa Petri, de manera que se ajusta de manera adecuada (no debería haber burbujas de aire entre ellos). Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días.

Ejemplo 5: Identificación de especies de *Brettanomyces/Dekkera* a partir de uvas

Se agitan suavemente las uvas que están empapadas en agua destilada durante una hora a temperatura ambiente. Mientras tanto, las células de las uvas se lavan en agua. Tras esto, se vierte el agua de las uvas y se filtra a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µm. Se coloca el filtro de membrana sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en la placa Petri, de manera que se ajusta de manera adecuada (no debería haber burbujas de aire entre ellos). Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días.

Ejemplo 6: Identificación de *Zygosaccharomyces bailii* a partir de vinos dulces embotellados

Se filtran 500 ml de vino dulce embotellado a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µm. Se coloca el filtro de membrana sobre la superficie del medio cromogénico selectivo en la placa Petri, de forma que se ajusta de manera adecuada (no debería haber burbujas de aire entre ellos). Las placas Petri se incuban a 30 °C durante 10-14 días. Las colonias azules que aparecen muestran un resultado positivo.

Ejemplo 7: Identificación del nivel de infectividad de cepas colectivas de *Brettanomyces/Dekkera*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Lachancea fermentatii*

Se suspende 1 asa de siembra del cultivo en 5 ml de agua destilada. Desde la suspensión, se extiende sobre la superficie del medio de diferenciación con el asa de siembra. Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días. Las colonias de *Zygosaccharomyces bailii* que parecen azules, las de *Brettanomyces/Dekkera* rosas, y las de *Lachancea fermentatii* azules verdosas con el borde rosa indican una infección.

Ejemplo 8: Recuperación de un cultivo puro de cepas de *Brettanomyces/Dekkera* en una colección de cultivos

Se suspende 1 asa de siembra del cultivo infectado en 5 ml de agua destilada. Con el asa, se siembra sobre el medio de diferenciación desde la suspensión. Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10-14 días. Se hace una suspensión de las colonias rosas que aparecen (1 asa/5 ml de agua destilada estéril), y desde la suspensión se extiende sobre el medio de diferenciación con un asa de siembra. Las placas Petri se incuban a 20-25 °C durante 10 días. Si no se observan otras colonias aparte de las rosas, se puede confirmar la pureza del cultivo.

Ejemplo 9: Ensayos de otras tinciones con azure y eosina (ejemplo de referencia)

Se llevó a cabo el experimento según el ejemplo X, también con las siguientes tinciones:

Tinción

Azure A (cloruro de Azure A)

Azure B

Azure II

Eosina B

5 Eosina Y

El color de las tinciones aplicadas cambia en cada caso con el incremento del pH. Las tinciones no fueron adecuadas para separar claramente entre sí las especies de *Brettanomyces/Dekkera* de las otras levaduras examinadas.

Ejemplo 10: Ensayos de los medios

10 Se llevó a cabo el experimento según el ejemplo X, con los medios siguientes:

YPD (1% de glucosa, 1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 2% de agar)

YNB (1% de glucosa, 0,67% de base de nitrógeno para levaduras, 2% de agar)

YCB (0,5% de sulfato amónico, 1,17% de base de carbono para levaduras, 2% de agar)

Se experimentó la decoloración rosa/azul más contrastada en medio YNB en el caso de azure II-eosina.

15 **Aplicabilidad industrial**

El proceso y los medios especificados por la invención se pueden aplicar de manera ventajosa en primer lugar para monitorizar los recuentos de células de *Brettanomyces/Dekkera*, identificar o descartar su proliferación, así como para detectar para fines higiénicos las levaduras de *Brettanomyces/Dekkera* responsables del deterioro de vinos y provisiones en el caso de los utensilios usados para el almacenamiento con los que pueden entrar en contacto directamente. El uso del medio hace posible la identificación temprana del crecimiento de levaduras de *Brettanomyces/Dekkera* - que puede desencadenar el deterioro de alimentos y vino - así como la verificación del efecto de los tratamientos que se dirigen a evitar su deterioro. El método puede identificar otros microorganismos, tales como especies de levaduras que pertenecen al género *Zygosaccharomyces* y al género *Lachancea*.

25 Una ventaja de este método es que hace posible identificar fácilmente las colonias de *Brettanomyces/Dekkera* observándolas, además, se pueden distinguir colonias de especies de levaduras que pertenecen al género *Zygosaccharomyces* y *Lachancea* de las colonias de otras especies y de levaduras naturales que son capaces de crecer en un medio selectivo. La identificación que se basa en la visibilidad, no solamente hace que el proceso de identificación sea mucho más sencillo, sino que además no requiere experiencia y muestras de olor, además, hace que el análisis del olor de las muestras sea innecesario, lo que conlleva la posibilidad de extender la infección. La razón por la que es más específico para las especies de *Brettanomyces/Dekkera* que otros métodos es que es capaz de identificar otras especies de levaduras que no son levaduras de producción de vino (nobles), lo cual provoca un problema en caso de los vinos dulces con un residuo mayor de azúcar.

35 El método que se ha desarrollado es barato, no requiere instrumentos especiales, y cualquiera puede llevarlo a cabo. No son necesarias las circunstancias de un laboratorio estéril, y solamente requiere una atención mínima para colocar la muestra correcta sobre la superficie del medio. El medio contiene componentes fácilmente accesibles.

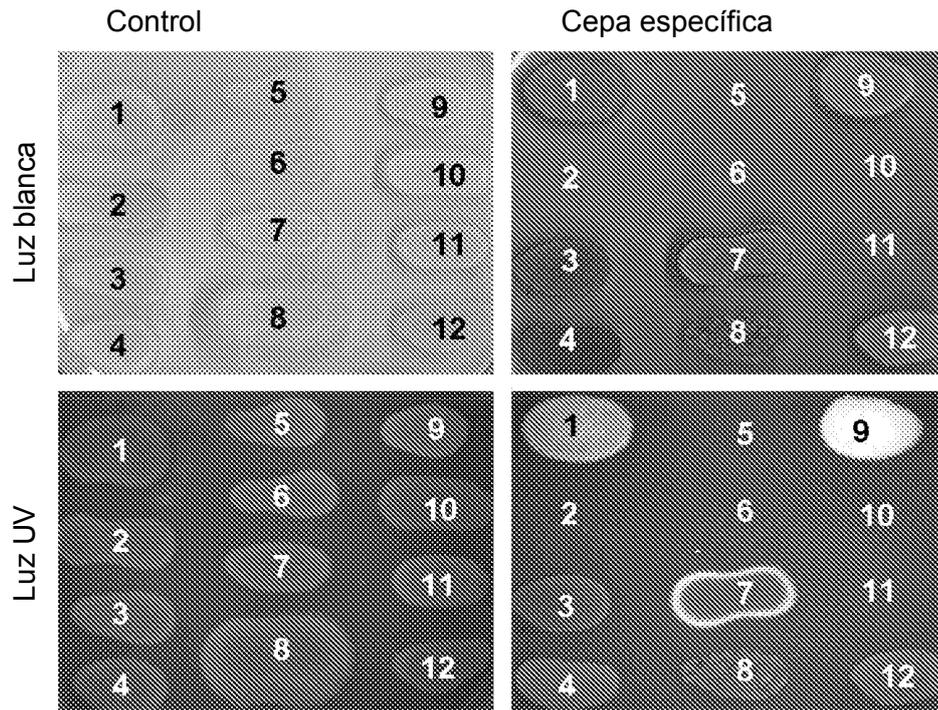
Referencias:

- 5 Barata A., Seborro F., Belloch C., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V.: Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, Volumen 104, Edición 4, páginas 1182-1191
- Couto JA, Barbosa A, Hogg T.: A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Lett Appl Microbiol*. 2005;41(6):505-10.
- Documento EP1185686(A1) Loureiro Virgilio Borges; Goncalves Maria Da Graca Alves; Rodrigues Nuno Miguel Sousa Fa. Culture medium for detection of *Dekkera* and *Brettanomyces*.
- 10 Documento ES 2268970 (A1) Velázquez Pérez Encarna; López Rodrigues Da Silva Luis; Trujillo Toledo Martha Estela [Es]; Mateos González Pedro Francisco; Martínez Molina Eustoquio. Yeasts detection culture medium comprises glucose mixed with buffer microorganism and bacterial growth inhibitors and e.g. a nitrogen source.
- Documento GB1248197 - ABBOTT LAB [US], "Diagnostic method and apparatus for the detection of bacteria".
- 15 Hocking AD.: Media for preservative resistant yeasts: a collaborative study. *Int J Food Microbiol*. 1996;29(2-3):167-75.
- José I. Ibeas, Ignacio Lozano, Francisco Perdigonés, y Juan Jiménez: Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by a Nested PCR Method. *Appl. Environ. Microbiol*. Mar. 1996, pág. 998-1003 Vol. 62, Nº 3
- Laurie Connell, Henrik Stender, y Charles G. Edwards: Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am. J. Enol. Vitic*. 2002; 53(4): 322-24.
- 20 Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol*. 2003;86(1-2):23-50.
- Luca Cocolin, Kalliopi Rantsiou, Lucilla Iacumin, Roberto Zironi, y Giuseppe Comi: Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(3): 1347-1355.
- 25 Mitrakul, C. M., T. Henick-Kling, y C. M. Egli: Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiol*. 1999;16:3-14.
- Renouf V, Lonvaud-Funel A.: Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Res*. 2007;162(2):154-67.
- Rodrigues N, Gonçalves G, Pereira-da-Silva S, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J Appl Microbiol*. 2001;90(4):588-99.
- 30 Schuller D, Côte-Real M, Leão C.: A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *J Food Prot*. 2000;63(11):1570-5.
- Stender, H., C. Kurtzman, J.J. Hyldig-Nielsen, D. Sorensen, A.J. Broomer, K. Oliveira, H. Perry-O'Keefe, A. Sage, B. Young, y J. Coull: Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol*. 67:938-941 (2001).
- 35 Trevor G. Phister y David A. Mills: Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(12):7430-7434.
- Documento WO0073494 (A1) Leao Cecilia; Corte-Real Manuela; Schuller Dorit

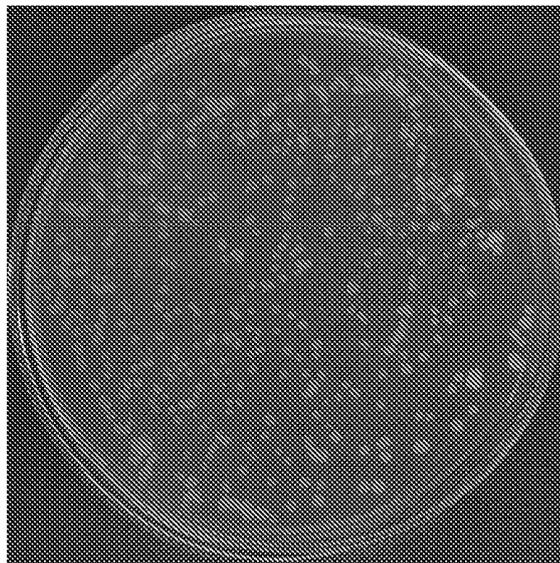
REIVINDICACIONES

1. Un medio cromogénico adecuado para el crecimiento selectivo y la detección de una o más levadura(s) de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una levadura del género *Zygosaccharomyces*, y/o una levadura del género *Lachancea*, y dicho medio comprende
- 5 - al menos un nutriente adecuado para la alimentación y/o el crecimiento de dicha una o más levadura(s) a detectar,
- un agente capaz de inhibir el crecimiento de especies de *Saccharomyces*, y
- una tinción cromogénica, en la que la tinción cromogénica es la combinación de los siguientes colorantes, y dicha combinación es cromática con luz visible:
- 10 - múltiple(s) tipo(s) de bis-3,7 diaminofenotiazinas sustituidas y/o sin sustituir que comprenden una mezcla de azul de metileno y Azure B, y
- uno o múltiple(s) tipo(s) de fluoresceína(s) sustituida(s)
- en el que la fluoresceína sustituida se selecciona del grupo que consiste en eosina Y, eosina B y cualquier mezcla de las mismas.
- 15 2. El medio selectivo y cromogénico según la reivindicación 1, en el que dicha tinción cromogénica comprende la mezcla de azul de metileno y Azure B, y de Eosina Y.
3. El medio selectivo y cromogénico según la reivindicación 2 en el que dicha tinción cromogénica es Azure II-eosinato.
- 20 4. El medio selectivo y cromogénico según la reivindicación 1, en el que dicha tinción cromogénica es una mezcla de
- las bis-3,7 diaminofenotiazinas que consisten en una mezcla de azul de metileno y Azure B y
- el o los múltiples tipo(s) de fluoresceína(s) sustituida(s)
- en la proporción de 1,5:1 a 1:1.
5. El medio selectivo y cromogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende un agente gelificante y que se formula como una de las formas siguientes:
- 25 polvo sólido, medio de cultivo gelificado,
- en el que preferiblemente
- el medio está en una forma preparada previamente, lista para el uso.
- 30 6. El uso del medio selectivo y cromogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la detección o determinación de una o más levadura(s) de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una levadura del género *Zygosaccharomyces*, y/o una levadura del género *Lachancea* a partir de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos, y/o una materia prima de alimentos, preferiblemente a partir de un producto agrícola.
- 35 7. El uso de la reivindicación 6, en el que la levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera* se selecciona de *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, y *Brettanomyces nanus*,
- y/o la especie de levadura del género *Zygosaccharomyces* es *Zygosaccharomyces bailii*,
- y/o la especie de levadura del género *Lachancea* es *Lachancea fermentatii*.
- 40 8. El uso de la reivindicación 6 o 7, en el que el producto alimenticio se prepara mediante fermentación, y dicho producto alimenticio es preferiblemente vino o cerveza, en particular preferiblemente vino tinto.
9. Un método para la detección o la determinación de una o más especies de levaduras seleccionadas del grupo siguiente: levaduras de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, levaduras del género *Zygosaccharomyces*, y levaduras del género *Lachancea*, a partir de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos y/o una materia prima de alimentos, y dicho método comprende las etapas de
- 45 - proporcionar el medio de cualquiera de las reivindicaciones 1-4,

- obtener una muestra de un producto alimenticio, un intermedio del procesamiento de alimentos y/o una materia prima de alimentos,
 - preparar la muestra para añadirla al medio, opcionalmente filtrar y/o concentrar y/o enriquecer la muestra en microorganismos,
- 5
- colocar en placas la muestra o una parte adecuada de la misma en el medio,
 - incubar el medio en condiciones adecuadas para el cultivo de dichas especies de levaduras hasta obtener colonias,
 - detectar dichas especies de levaduras mediante la decoloración de dichas colonias.
- 10
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha levadura se selecciona de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces* y una especie de levadura del género *Lachancea*, y
- cuando la colonia es rosa, se considera que es la detección de una levadura de los géneros *Brettanomyces* y/o *Dekkera*, y/o
- 15
- cuando la colonia es azul, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Zygosaccharomyces*, y/o
 - cuando la colonia es azul verdosa con un borde rosa, se considera que es la detección de una especie de levadura del género *Lachancea*.
- 20
11. El método según la reivindicación 9 o 10, en el que se determina el número de colonias detectadas respecto de la cantidad de la muestra original, preferiblemente el volumen o el peso de la misma, de forma que el método es cuantitativo.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que se determinan las colonias y preferiblemente el número de colonias a luz UV, mediante fluorescencia.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el producto alimenticio se prepara mediante fermentación, preferiblemente
- 25
- cerveza o vino, preferiblemente vino tinto,
 - el intermedio de procesamiento de alimentos es malta, mosto, malta o mosto en fermentación, y/o
 - la materia prima de alimento es uva.
- 30
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el medio de cultivo adecuado para el cultivo de dicha levadura se proporciona en una forma preparada previamente, lista para el uso, preferiblemente en forma sólida o de gel, lo más preferiblemente vertida en placas.
15. Un kit para el uso en el método según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, que contiene el medio según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y medios para preparar un medio de cultivo en gel del mismo.



1. FIGURA: Identificación de levaduras naturales al lado de levaduras de producción de vino en medio selectivo



2. FIGURA: Colonias de *Brettanomyces* de medio vinoso, en un medio selectivo teñido