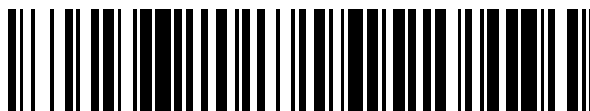


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 220**

51 Int. Cl.:

G01N 33/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011** **E 11151003 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015** **EP 2476745**

54 Título: **Sistema de placa de cultivo y procedimiento para la detección mejorada de microorganismos contaminantes de productos alimenticios**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2015

73 Titular/es:

BIOSILTA OY (100.0%)
University of Oulu P.O. Box 4300
90014 Oulu, FI

72 Inventor/es:

VASALA, ANTTI

74 Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

ES 2 541 220 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

Sistema de placa de cultivo y procedimiento para la detección mejorada de microorganismos contaminantes de productos alimenticios

[0001] La presente invención se refiere al enriquecimiento y detección de microorganismos contaminantes de productos alimenticios, especialmente bebidas y refrescos. Es particularmente adecuado para la detección de bacterias que deterioran la cerveza. La presente invención proporciona un sistema novedoso que a) mejora la recuperación de los microbios de descomposición, b) proporciona la detección más rápida y aparición más temprana de colonias en las placas, y c) proporciona tamaños de colonia mayores que hacen una detección más fácil.

[0002] Puesto que las bacterias pueden propagarse en y contaminar los productos alimenticios después de que el producto haya pasado el control de calidad normal al final del proceso de producción y esté ya empaquetado, embotellado o enlatado, el deterioro por microorganismos (en su mayoría anaerobios) puede causar pérdidas económicas significativas. El material sospechoso debe ser retirado del mercado hasta que pueda confirmarse su naturaleza sin deteriorar. En el peor de los casos los costos de recogida de los alimentos en mal estado de las tiendas de alimentos pueden ser significativos. Además, la expedición de productos de mala calidad a los clientes puede fácilmente tener desventajas para la reputación del fabricante y la marca. Tan sólo una bacteria en un recipiente de alimentos o botella puede causar el deterioro del producto. Por lo tanto la presencia de incluso un bajo número de células bacterianas en un envase debe ser detectada. Esto se aplica particularmente a bebidas tales como cerveza. En general, la cerveza es un ambiente hostil para microbios diferentes de las levaduras debido a la presencia de compuestos antibacterianos de lúpulo y el etanol, condiciones anaerobias y un pH relativamente bajo. Sin embargo, algunos microorganismos pueden aún proliferar en la cerveza y deteriorar el producto al causar turbidez, acidez o producción de un olor desagradable (por ejemplo, a sulfuro de hidrógeno).

[0003] Los deterioradores de cerveza se identifican principalmente mediante procedimientos basados en la incubación en medios de cultivo. El medio de incubación puede ser líquido o sólido (por ejemplo placas de agar). De acuerdo con una valoración realizada por Sartorius AG (Goettingen, Alemania) los cultivos nutrientes líquidos son generalmente mejores que los medios de cultivo sólidos, porque la invasión microbiana es inmediatamente visible por signo de fermentación. Especialmente organismos deteriorantes leves son más capaces de recuperarse y proliferar en cultivos líquidos que en placas de cultivo sólidos. Sin embargo, la detección microbiana exacta en cultivos líquidos lleva un tiempo considerablemente más largo (típicamente de 5 a 10 días) en comparación con cultivos en placa donde los resultados pueden ser a menudo obtenidos después de 2 a 3 días. Para el control microbiológico, se han aplicado también muchas técnicas biotecnológicas avanzadas, tales como el inmunoensayo y la cadena de reactiva de polimerasa (PCR). Sin embargo, incluso para estos "métodos rápidos", pueden ser necesarios varios días de cultivo para alcanzar una cantidad de bacterias suficiente para una señal apreciable. No obstante, los procedimientos de placa de cultivo han mantenido su importante papel en el sistema de control de calidad microbiana en la industria de la producción alimenticia y fábricas de cerveza por las siguientes razones: 1) son fáciles y baratos de usar, 2) es posible cuantificar los microbios contaminantes, 3) puede ser detectados de manera simultánea varios microbios contaminantes, 4) es sencilla una mayor caracterización e identificación del microbio contaminante, ya que pueden obtenerse directamente "aislamientos puros" de la placa en forma de colonias bacterianas. En cervceras se toman típicamente muestras a partir de tanques de fermentación, tanques de almacenamiento, superficies y tanques de sobre-presión. Muchos de estos emplazamientos son anaerobios, pero también puede existir una fuente de la contaminación en las superficies aeróbicas. Algunas especies estrictamente anaerobias también pueden sobrevivir en un ambiente que contiene oxígeno si están protegidas por bio-película o aisladas del oxígeno (por ejemplo, presentes en gotitas de líquido). En consecuencia, las superficies en ambientes aeróbicos pueden servir como fuentes de contaminación de microbios anaeróbicos. Muchos de los contaminantes (anaeróbicos) son de crecimiento bastante lento. En los sistemas normales de control de calidad en fábricas de cerveza se detectan con tecnología de placas. Puesto que incluso una sola célula bacteriana puede causar contaminación del producto, las muestras se concentran a menudo en grandes volúmenes por filtración. En la práctica, las muestras de cerveza se filtran a través de un filtro de membrana que retiene los microorganismos presentes en la muestra. La membrana se retira entonces del filtro y se transfieren a una placa de cultivo. Sólo en muy pocos lugares existe la posibilidad de realizar el tratamiento de la muestra en condiciones completamente anaerobias. Si, sin embargo, las condiciones no son anaeróbicas, las bacterias de descomposición son sometidas a un estrés oxidativo severo que puede matarlas o dañarlas. Esto significa que, o bien no forman colonias en placas o su revitalización lleva más tiempo. Una célula dañada cuando se expone repentinamente a condiciones ricas en nutrientes puede morir.

[0004] Los organismos anaerobios no toleran el oxígeno porque utilizan rutas metabólicas construidas alrededor de enzimas que reaccionan con oxidantes. Ellos también pierden los componentes clave presentes en organismos aeróbicos que puede desintoxicar el oxígeno: especialmente complejos de enzima de oxidasa y catalasa. Por lo tanto, con estos organismos es importante asegurar que el tiempo en que están expuestos a oxígeno perjudicial se reduce al mínimo. También su actividad metabólica durante la exposición al oxígeno debe mantenerse mínima. Desafortunadamente, el muestreo normal y la configuración del cultivo de placa se producen en condiciones que contienen oxígeno, y la generación de condiciones anaeróbicas en frascos anaerobios puede tardar varias horas. También debe observarse que incluso después de la eliminación del oxígeno del medio ambiente, la activación rápida de las células dañadas debido al entorno alto en nutrientes (especialmente alto contenido de azúcar de las placas de cultivo) puede favorecer dañarlos o matarlos. Estos problemas son generalmente difíciles de superar porque a fin de

facilitar el crecimiento rápido y la detección temprana (aparición de colonias), el medio de cultivo debe proporcionar una alta cantidad de nutrientes.

[0005] Organismos sensibles al oxígeno son típicamente cultivados en incubadoras anaerobias, cámaras anaerobias o bolsas anaerobias. Estos productos están disponibles en varios fabricantes tales como Oxoid, BD y Merck. Los productos químicos en tales sistemas anaeróbicos generan típicamente gas hidrógeno que reacciona rápidamente con el oxígeno generando agua. El hidrógeno se puede derivar, por ejemplo, de la reacción entre el borohidruro de sodio y agua. La reacción, por ejemplo, entre el ácido cítrico y bicarbonato de sodio puede generar tanto CO₂ como hidrógeno. Se han lanzado diferentes variantes de tales sistemas, pero ninguno de ellos puede proporcionar condiciones anaeróbicas de manera inmediata. Se encuentran disponibles desde hace varios años sistemas que proporcionan condiciones completamente anaerobias para el tratamiento de muestras y cultivos, pero que se han aplicados tan sólo en algunas fábricas de cerveza. Por ejemplo, el Sistema de Atmósfera Controlada Modular (MACS) de Oxoid puede garantizar un ambiente óptimo para organismos anaerobios. En casos óptimos todos los pasos (muestreo, tratamiento de la muestra tal como filtración, placas) se van a realizar en condiciones anaeróbicas. Tales dispositivos raramente se encuentran disponibles para unidades de análisis de calidad estándar en la industria alimentaria.

[0006] Incluso los microbios que, en principio, prefieren condiciones oxigénicas pueden sufrir estrés oxidativo cuando se exponen concentraciones de glucosa repentinamente cambiantes. Altas concentraciones de glucosa pueden inducir vías metabólicas (fermentativas) que resultan en la producción de compuestos inhibidores del crecimiento tales como el etanol, ácido acético y ácido láctico.

[0007] De manera típica, las bacterias deteriorantes de los alimentos se cultivan en placas de medio que contienen un digesto enzimático de proteínas, extracto de carne, sales (como citrato de amonio, sulfato o cloruro de magnesio, fosfatos como sales de potasio o de sodio) y una concentración bastante alta de azúcares (típicamente 20 g/L de glucosa). Si se pretende el cultivo de bacterias deteriorantes de la cerveza normalmente se incluye cerveza en estas composiciones de medio ya que la presencia de cerveza y sus compuestos de lúpulo pueden prevenir el crecimiento de organismos que no pueden proliferar en la cerveza. En algunos medios de cultivo pueden aplicarse otros azúcares diferentes a glucosa (por ejemplo, fructosa) u otras fuentes de carbono (tales como lactatos). Muchos de estos medios de cultivo también contienen etilo (como sales de potasio o de sodio) y fosfatos, que sirven como componentes tampón. Los medios de cultivo utilizados generalmente para bacterias de descomposición de cerveza de ácido láctico incluyen caldo de *Lactobacilli* MRS complementado con el 25% de cerveza, Raka Ray y medio-NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien [medio de detección de bacterias de descomposición cerveza])

[0008] En general, para facilitar la detección temprana de contaminantes, los sistemas de placa de cultivo generalmente tratan de maximizar crecimiento y tamaño de la colonia. Por lo tanto se aplican normalmente altas cantidades de glucosa u otros azúcares. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente la activación rápida del metabolismo puede causar más daños o incluso la muerte de las células por estrés. Por lo tanto, se desarrolló un sistema de liberación lenta de glucosa para alimentar gradualmente una razonablemente alta cantidad de glucosa a las bacterias. A este respecto han surgido recientemente algunos productos aplicables a cultivos líquidos agitados simples, por ejemplo el sistema *feed-bead* (Jeude et al, *Biotechnol Bioeng* 95 (3): 433-445, 2006) y el sistema de suministro de glucosa enzimática de BioSilta Oy (Panula-Perälä et al., *Microb. Hecho Cell.* 7: 31, 2008). Taskila et al. (*J. Inst. Brew.* 116 (2), 151-156, 2010) han mostrado recientemente que una liberación lenta de glucosa puede proporcionar enriquecimiento rápido de *Lactobacillus backi* y *Pediococcus damnosus* en cultivos líquidos. Este sistema se basa en la liberación enzimática de la glucosa a partir de almidón liberado a partir de una capa de almidón-agar a un medio líquido. En la práctica, los organismos de descomposición de cerveza crecían en medio líquido basado en MRS que se estableció en la parte superior de un gel de almidón-agar. Sin embargo, hasta ahora ninguno de estos sistemas de liberación lenta se ha adaptado a cultivos de placa.

[0009] A pesar de que en muchos sistemas anaeróbicos la acumulación de CO₂ puede acidificar el ambiente de cultivo (y, además, muchos microorganismos producen metabolitos ácidos), se ha prestado relativamente poca atención a la optimización pH de cultivos en placa. Por lo general, el pH de medios de placa se ajusta a niveles que han sido optimizados para cultivos líquidos. Esto tiene desventajas, ya que a diferencia de en medios líquidos, los metabolitos ácidos mencionados en las placas no pueden dispersarse libremente, sino que se acumulan dentro de un área restringida alrededor de la colonia microbiana debido a las limitadas posibilidades de difusión. La acumulación de estos metabolitos puede restringir el crecimiento de bacterias y limitar el tamaño de la colonia. Además, se sabe que los ácidos grasos de cadena corta que se producen, tales como el ácido acético, ácido propiónico o ácido láctico, en altas dosis son antibacterianos. Su efecto inhibidor puede ser, sin embargo, disminuido mediante conversión en sus sales. Para el cultivo de bacterias de ácido láctico en cultivos líquidos, es utilizado a veces CaCO₃ para neutralizar los ácidos dañinos y por lo tanto aumentar rendimiento de células. El CaCO₃ a veces también se incluye en medios sólidos, por ejemplo en placas de cultivo de levadura. Pero hasta ahora se ha prestado muy poca atención al desarrollo de placas de CaCO₃ con una calidad constante y pH deseado. La mezcla directa de una suspensión de CaCO₃ con nutrientes agar deviene en la sedimentación rápida del CaCO₃ en el fondo de las placas. Por lo tanto, la concentración eficaz de CaCO₃ en la parte superior de la placa puede ser bastante baja. En el método desarrollado por Wade et al. (*J. Bacteriol.* 51 (6): 787-788, 1946) se añadió CaCO₃ mediante una pipeta en cada placa de cultivo que después se enfría rápidamente para minimizar la sedimentación de CaCO₃ en la parte inferior de la placa. Este sistema se mejoró aún más por Shank y Silliker (*J. Bacteriol.* 73 (5): 625-626, 1956) mediante la introducción de CaCO₃ en una forma coloidal (mezcla fundida de carragenano ("musgo irlandés"), agar y CaCO₃) que podría ser distribuido en la placa de manera más uniforme. En esta publicación de Shank et al. (1956), el CaCO₃ se utiliza principalmente para retardar la tasa de difusión de ácidos, permitiendo así la detección mejorada de colonias que producen ácido mediante tintes indicadores de pH, tales como el azul de cresol-cromo. En ninguno de estos sistemas, la propiedad elevadora de pH del CaCO₃ se consideró para

establecer un determinado pH para las placas. El CaCO_3 es en sí ligeramente alcalino y eleva el nivel pH de las placas de medio. Puesto que el CaCO_3 se descompone fácilmente en condiciones ácidas durante el tratamiento térmico, el nivel de pH de la suspensión de CaCO_3 no puede ajustarse directamente.

[0010] Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de placas de cultivo y un procedimiento para el enriquecimiento rápido y detección de microorganismos contaminantes de productos alimenticios, especialmente de bebidas y refrescos. Estas placas de cultivo evitan las desventajas anteriormente descritas de los sistemas de cultivo de placa conocidos y serán adecuados para crecimiento y detección rápida y fiable de microorganismos contaminantes de alimentos de forma rápida y fiable.

[0011] Este objeto se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones 1 y 10. Las realizaciones preferidas son el objeto asunto de las reivindicaciones dependientes.

[0012] En particular, la presente invención proporciona un sistema de placa de cultivo para la detección de microorganismos contaminantes de productos alimenticios seleccionados del grupo consistente en *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Enterobacterias*, *Bacillus* o *Campylobacter*, que comprende como entidades separadas:

(a) una placa de cultivo con un pH de 5,7 a 7,0 que contiene una base de nutrientes, 5-40 g/l de di-, oligo- o polisacárido, 5-30 g/l de CaCO_3 en forma coloidal y un agente gelificante;

(b) una solución madre de una enzima en una dilución que contiene de 10 a 100 unidades/ml, en la que la enzima digiere un di-, oligo- o polisacárido en la glucosa.

[0013] >

[0014] De acuerdo con la presente invención, un "producto alimenticio" es cualquier producto nutriente absorbido por humanos o animales para fines de nutrición. Puede ser un sólido, líquido o jalea. En una realización preferida particular, es una bebida, tal como cerveza o un refresco.

[0015] Según la presente invención, los "microorganismos a detectar" son aquellos sometidos a estrés cuando se expone al oxígeno. Estos microorganismos son preferiblemente bacterias, en particular, aerobios, anaerobios estrictos o facultativos o microaerófilos. Los grupos más destacados de los organismos de descomposición de cerveza son lactobacilos (por ejemplo, *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. Backi*), *pediococos* (*P. damnosus*, *P. pentosaceus*), *Pectinatus* (por ejemplo, *P. frisingensis*, *P. cerevisiophilus*) y *Megasphaera*. Entre los microorganismos de intoxicación alimentaria más importantes, las enterobacterias (como *Salmonella*) y bacilli son facultativos mientras que las campilobacterias son microaerófilas y siendo los clostridios anaerobios estrictos. Aunque los organismos facultativos, tales como *Salmonella*, se cultivan sobre todo en condiciones aeróbicas ya que crecen mucho más rápido con oxígeno, la liberación de nutrientes lenta como se proporciona con el sistema de la presente invención puede ayudar a las células dañadas a sobrevivir al estrés oxidativo.

[0016] La placa de cultivo puede basarse en cualquier composición de medio nutriente apropiada como base nutriente. Estos medios y sus ingredientes están disponibles comercialmente o aplicarse como se describe en la bibliografía y de manera bien conocida por los expertos en la técnica. Estos medios de cultivo son conocidos ya sea como medio complejo que se compone de, al menos en parte, materias primas menos exactamente definidas, tales como extractos (por ejemplo, extracto de levadura, extracto de carne) o hidrolizados (por ejemplo, peptona, ácidos de casamino), o como medios definidos que son mezclas de productos químicos con composición conocida.

[0017] Estos medios pueden contener elementos inorgánicos, sales minerales (por ejemplo, calcio, potasio, sodio, magnesio, manganeso, sulfato, bicarbonato, cloruro) y/o fuente(s) de amoníaco (amoníaco, nitrato, aminoácidos). Además pueden contener opcionalmente vitaminas (por ejemplo, ácido ascórbico, riboflavina, ácido fólico, tiamina, vitamina A), aminoácidos (por ejemplo, L-cisteína, glicina), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, IGF, TGF), antibióticos (estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol), citoquinas, proteínas de suero (por ejemplo, BSA, HSA), agentes tensioactivos iónicos o no iónicos (por ejemplo, polisorbato, TweenR80) y / o nucleósidos (por ejemplo ribonucleósidos, desoxiribonucleósidos). Si se pretende la detección de bacterias de descomposición de cerveza el medio debe contener una cantidad adecuada (por ejemplo del 20 al 30%, preferiblemente el 25%) de cerveza.

[0018] Medios estándar adecuados para el crecimiento de microorganismos son, por ejemplo caldo extracto de peptona-levadura, caldo de *Staphylococcus*, medios PPLO, caldo de sal de manitol, caldo de Luria-Bertani, DMEM, RPMI, BME, medios de Fischer o caldo de soja triptico. Preferiblemente, se utiliza la composición de medio de lactobacilo MRS (Mann-Rogosa-Sharpe).

[0019] Como fuente de carbono complejo los medios de placa contienen al menos un di-, oligo- o polisacárido que sirve como un precursor o materia prima para producción de glucosa enzimática. Se usan preferiblemente almidón o derivados de almidón en una cantidad de 5 a 40 g/l, más preferiblemente de 10 a 20 g/l. Se prefiere particularmente usar almidón de patata en una cantidad de 10 a 20 g/l. Para facilitar la liberación lenta deseada de una fuente de carbono como sustrato de crecimiento limitativo, la composición del medio de placa debe contener, en todo caso, sólo una pequeña cantidad (preferiblemente menos de 1 g/l) de un monosacárido, por ejemplo, glucosa. Sin embargo, resulta más preferido que el medio de placa no contenga monosacárido alguno, en particular glucosa, como fuente de carbono.

[0020] Además, el medio de placa contienen un agente gelificante. Ejemplos de agentes gelificantes son agar, agarosa, alginato, carragenanos, celulosa y sus combinaciones. Una combinación preferida particular es agar y carragenina.

[0021] Un ingrediente adicional del medio de placa es el CaCO_3 coloidal en una cantidad de 5 a 30 g por litro, preferiblemente 30 g por litro.

[0022] El pH del medio de placa puede ajustarse desde 5,7 a 7,0 con un ácido adecuado (por ejemplo, HCl). Valores de pH inferiores a 5,7, producirían degradación parcial del agar durante el tratamiento térmico y por lo tanto deben ser evitados. Para placas listas para utilizar el pH es preferiblemente > 6, y más comprendido preferiblemente entre 6,2 y 6,8.

[0023] Un sistema preferido particular comprende un medio nutriente que contiene almidón solidificado con agar y conteniendo CaCO_3 que se añade en una forma coloidal (es decir, como una mezcla de carragenano y CaCO_3) que puede ser distribuido uniformemente en el medio. En este sentido, se ha encontrado ventajoso ajustar el nivel de pH deseado mencionado anteriormente antes de la emisión de las placas mediante la adición de HCl al 15-30% aproximadamente, preferentemente de HCl aproximadamente al 20%, después de combinar el medio de cultivo (por ejemplo MRS/almidón/agar) con una suspensión de CaCO_3 /carragenano.

[0024] El segundo componente del nuevo sistema de placa de cultivo es una solución madre de una encima de digestión de di-, oligo- o polisacárido. Se prefiere una solución madre de glucoamilasa, preferiblemente diluida conteniendo de 10 a 100 unidades/ml, más preferiblemente alrededor de 20 unidades/ml. La "1 unidad" se define como una cantidad necesaria para dividir un micromol de maltosa por minuto a 30° C para pH 4,8. Según la presente invención, una pequeña gota de la enzima de división polisacárido (preferiblemente glucoamilasa) se añade a la superficie de la placa de cultivo antes de aplicar la muestra sobre la placa bacteriana. Preferiblemente 1 unidad de enzima se entrega en una gota de 50 ml. Este enfoque proporciona un sistema de expedición lenta de sustrato enzimático que puede suministrar gradualmente una fuente de carbono (por ejemplo glucosa) para las bacterias en crecimiento.

[0025] La muestra bacteriana se puede aplicar sobre la placa por varios métodos. Las bacterias pueden ser recogidas de un gran volumen por filtración, después de que la membrana con bacterias se coloca sobre la gota de enzima. De manera alternativa, se pueden recoger muestras de las superficies mediante una torunda de algodón húmedo, que se utiliza para propagar las bacterias sobre la placa y simultáneamente difundir la gota de enzima. Después de aplicar la muestra contaminante, la placa de cultivo se transfiere a la incubadora aeróbica (cámara, tarro, bolsa) y se cultiva a la temperatura adecuada (por lo general de 27 a 30° C) hasta que en la placa aparecen las colonias.

[0026] Dentro del conocimiento general de un experto en el arte, está cómo preparar placas de cultivo para la detección de microorganismos. En este sentido se hace referencia a los manuales de laboratorio generales tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" por J. Sambrook y D. Russell. En una realización preferida de la presente invención, las placas se preparan de la siguiente manera:

(A) Se prepara CaCO_3 coloidal calentando carragenina y CaCO_3 anhidro (por ejemplo, en un horno de microondas) en una cantidad adecuada de agua. Después de fundirse la carragenina, la mezcla se mantiene durante al menos 1 hora a aproximadamente 80° C y se mezcla con un agitador magnético. Posteriormente, la mezcla se esteriliza (por ejemplo, por tratamiento en autoclave durante 15 min a 121° C). La mezcla se mantiene > 80° C hasta mezclarse con la base de medio (B)

(B) la base de medio (B) es un medio de cultivo adecuado para el microorganismo a detectar. Una persona experta en la arte sabe que microorganismo crece mejor en qué medio. Para la detección de los lactobacilos y pediococos puede utilizarse caldo de lactobacillus MRS (Man-Rogosa-Sharpe) modificado. En una realización preferida, se prepara disolviendo los siguientes componentes en una cantidad adecuada de agua: proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, TweenR80 (polisorbato 80), citrato de amonio, acetato de sodio, sulfato de magnesio*6H₂O, fosfato dipotásico. También pueden ser adicionalmente añadidos productos químicos (por ejemplo, L-cisteína o MnSO₄) conocidos para promover la supervivencia de las bacterias anaerobias. Si se pretende la detección de bacterias de descomposición de cerveza, el medio debe contener una cantidad adecuada (por ejemplo, el 25%) de cerveza. El pH de la base de medio puede ajustarse de 5,7 a 7,0 con un ácido adecuado (por ejemplo, HCl). Valores de pH inferiores a 5,7 causarían degradación parcial del agar durante el tratamiento térmico y por lo tanto deben ser evitados. Después se añade una cantidad adecuada de almidón y agar. A continuación, el medio se esteriliza (por ejemplo, en autoclave durante 15 min. a 121° C) y se mantiene a aproximadamente 80° C hasta emitir el gel. En este punto, una cantidad adecuada de un ácido mineral (por ejemplo HCl) puede añadirse para establecer un pH deseado para las placas (ejemplo 3, tabla 1) Para preparar la composición final, (A) y (B) se combinan mezclándolas, en particular en una proporción de 1 parte (A) en 4 partes (B). A continuación, la composición final se vierte en placas de Petri y se solidifica.

(C) Antes de proporcionar la muestra microorganismo sobre las placas, una solución de enzima de división almidón se aplica en la superficie de las placas. Después de aplicar la muestra, la placa de cultivo se transfiere a una incubadora y se cultiva a la temperatura apropiada (típicamente de 27 a 30° C) hasta que las colonias aparecen en la placa.

[0027] La invención utiliza el sistema de suministro lento de sustrato enzimático que puede suministrar gradualmente una fuente de carbono (por ejemplo glucosa) para las bacterias en crecimiento. Se prefiere la entrega gradual de glucosa ya que la activación temprana y rápida del metabolismo de los organismos sensibles a oxígeno (anaeróbico o microaerófilico) puede dar lugar a lesiones letales en sus condiciones de cultivo cuando aún queda un poco de oxígeno. La entrega gradual de glucosa también es beneficiosa para las bacterias que toleran oxígeno porque los cambios rápidos en la concentración de glucosa pueden inducir estrés oxidativo (disminuir la viabilidad) y/o llevar a acumulación de metabolitos que inhiben el crecimiento. Este problema es particularmente importante, ya que los organismos contaminantes pueden ya tener una viabilidad reducida, debido a las condiciones estresantes de crecimiento y la tensión causada por el tratamiento de muestra. Además, la invención aplica un sistema mejorado para la neutralización de los metabolitos inhibidores de crecimiento.

[0028] El nuevo sistema de placa de cultivo proporciona una más rápida aparición de colonias, una mejor tasa de supervivencia y proporciona mayor tamaño de colonia mediante algunos o todos de los siguientes mecanismos: 1) la activación de metabolismo más lenta debido a la lenta liberación de la glucosa, 2) la acumulación reducida de metabolitos dañinos, 3) la neutralización de ácidos grasos de cadena corta tales como ácido acético, ácido láctico y ácido propiónico debido a una alta concentración efectiva de CaCO_3 , 4) la presencia de CaCO_3 puede proporcionar

mayor cantidad eficiente de CO₂ (y por lo tanto reduce la concentración de O₂), 5) se obtiene un mantenimiento mejorado del nivel de pH, mediante tamponado con CaCO₃ coloidal.

[0029] Se ha descubierto en la presente invención que, para una detección rápida y fácil de contaminantes se prefieren placas de cultivo frente a cultivos líquidos. Las ventajas adicionales de cultivos en placa son 1) microbios formadores de colonias pueden ser evaluados rápidamente con respecto al tamaño, opacidad o visibilidad, y morfología, y puede ser microscópicamente identificado 2) varias especies de contaminantes diferentes pueden detectarse y aislarse en una sola placa. A diferencia de muchos procedimientos moleculares modernos los procedimientos de cultivo de placa no requieren amplios conocimientos o dispositivos caros.

[0030] La invención se describe con más detalle en relación a las figuras adjuntas:

- Figura 1: Utilización de las placas de cultivo para la determinación de bacterias de descomposición concentradas de cerveza. Las bacterias se concentran a partir de una muestra de cerveza sobre una membrana de nitrocelulosa. Antes de colocar la membrana en el cultivo, se añade una gota de enzima glucoamilasa.

[0031] La invención se describe adicionalmente respecto de los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1: Preparación y uso de placas enriquecidas

[0032] Este ejemplo muestra cómo se mejoró un medio MRS suplementado con cerveza con la tecnología de la presente invención. Se añadió CaCO₃ coloidal (denominado en lo sucesivo como (A)) a un medio de cultivo (en lo sucesivo (B)). En este ejemplo se prepararon un total de 1000 ml, combinando 200 ml de (A) como solución caliente con 800 ml de (B).

Preparación de las placas

[0033] (A) Se preparó CaCO₃ coloidal, calentando 4,5 g de carragenano y 30 g CaCO₃ anhidro en un horno de microondas en 200 ml de agua. Después de haberse derretido la carragenina, la mezcla se mantuvo, al menos, 1 hora en un baño de agua caliente (alrededor de 80 °C) y se mezcló con un agitador magnético. Posteriormente, la mezcla se esterilizó por tratamiento en autoclave durante 15 min a 121 °C. La mezcla se mantuvo > 80 °C, hasta mezclarlo con (B). Si se solidifica podría ser fundido en horno de microondas antes de combinarlo con (B) caliente.

(B) base de medio (B) es un concentrado reducido a 1,25 de un medio de cultivo seleccionado. En este ejemplo se utilizó caldo de lactobacillus MRS (Man-Rogosa-Sharpe) modificado. Se preparó disolviendo los siguientes componentes resultantes en un volumen final de 800 ml: proteosa peptona (10 g), extracto de carne (10 g), extracto de levadura (5 g), glucosa (1 g), TweenR80 (Polisorbato 80) (1 g), citrato de amonio (2 g), acetato de sodio (5 g), sulfato de magnesio*6H₂O (0,1 g), fosfato dipotásico (2 g), 250 ml de cerveza y 550 ml de agua. El pH del medio se ajustó a 5,7 con HCl al 37%. Después de eso se añadieron 20 g de almidón de patata soluble y 15 g de agar. El medio se trató 15 minutos en autoclave a 121 °C y se mantuvo a 80 °C hasta emitir gel. Para preparar la composición final, se combinaron mediante mezcla 200 ml de (A) y 800 ml de (B). Cada alícuota de 20 ml de la composición final se vertió en placas de Petri. Si las placas estaban destinadas a ser utilizados para muestras posiblemente contenían células de levadura, que se complementaron con la cicloheximida de antibióticos (dosificación preferida es 1 ml/litro). Sin ningún ajuste de pH adicional, el nivel de pH de las placas sería típicamente 6,9 ± 0,1 debido a la naturaleza de elevación de pH del CaCO₃. Para obtener placas que tienen pH de 6,2, se añadió 3 ml de HCl al 18,5% a la base de medio (B) antes de combinarse al CaCO₃ coloidal (A).

El uso de las placas para el cultivo

[0034] En este ejemplo almidón soluble inmovilizado en gel de agar funciona como principal fuente de glucosa para las bacterias. El almidón no se puede utilizar directamente como fuente de carbono por la mayoría de las bacterias de descomposición de cerveza. Sin embargo, puede utilizarse como proveedor de glucosa. Por lo tanto 1 unidad, es decir, una gota (aproximadamente 50 ml), de una solución madre de enzima glucoamilasa (15 unidades / ml), se añade a la placa. La glucoamilasa penetra en la matriz del gel donde se libera gradualmente la glucosa a partir del almidón. Las bacterias que contiene la muestra o bien pueden limpiarse directamente sobre la placa o las bacterias pueden ser concentradas primero en una filtro de membrana (véase la figura 1) que se coloca sobre la gota de enzima.

[0035] El ejemplo 1 muestra cómo el sistema de neutralización basado CaCO₃ y el sistema de suministro de glucosa a base de enzima se puede aplicar a composiciones de medio que son adecuadas para el cultivo de bacterias de descomposición de cerveza, especialmente lactobacilos y pediococos.

Ejemplo 2:

Optimización de la dosis de enzima necesaria para proporcionar una cantidad suficiente de glucosa

[0036] Los tamaños de las colonias bacterianas son más o menos dependientes de la cantidad de azúcar en el medio de las placas. Se encontró que generalmente 20 g/L de glucosa (una cantidad que está presente en muchos medios de cultivo) proporcionan el mayor tamaño de la colonia. Por lo tanto, en la presente invención se deseaba obtener esta cantidad de glucosa, no desde el principio pero si dentro de 1 a 2 días de cultivo. La determinación de la cantidad de glucoamilasa necesaria para este fin se llevó a cabo mediante el uso de placas de agar MRS (placas Petri con 85 mm de diámetro) suplementado con 20 g/L de almidón pero no CaCO₃ coloidal. Cantidades de enzimas de 0,2 - 0,5 - 1 - 5-

10 - 20 unidades se extendieron sobre un área de $\sim 17 \text{ cm}^2$. La cantidad adecuada de enzima se define como una cantidad que proporciona zonas claras (es decir, áreas con almidón degradado) en 24 horas.

[0037] Se encontró que una concentración de 1 unidad proporcionada dentro de una gota de 50 ml es una cantidad suficiente de enzima para la tecnología actual. Con una dosis de enzima superior el almidón se degradó mucho antes (en pocas horas), con un menor dosis de enzima, la cantidad de glucosa liberada a partir de almidón se estimó que era insuficiente para colonias de gran tamaño. Por lo tanto, la disponibilidad de glucosa se considera que es dependiente de la dosis de enzima. Este resultado proporciona la posibilidad de ajustar el sistema de placa para alcanzar diferentes tasas de liberación de glucosa.

Ejemplo 3

Aplicación de CaCO_3 en la composición de medio de placa y ajuste del deseado nivel de pH en las placas

[0038] El procedimiento método desarrollado por Shank y Silliker (J. Bacteriol (1956) Vol 73: 625-626) halló proporcionar placas conteniendo CaCO_3 con estructura consistente. En ese procedimiento se preparó una suspensión a partir de carragenina derretida ("musgo irlandés") y CaCO_3 se combinó con una composición de medio conteniendo agar caliente antes de emisión de placa. En la presente invención, este sistema se modificó adicionalmente para aplicar concentraciones de CaCO_3 y carragenina 1,5 veces superiores. La suspensión de CaCO_3 /carragenano elevó el nivel de pH cuando se combina con la composición del medio de cultivo (MRS/almidón/agar /cerveza). Por lo tanto, fueron probados procedimientos para ajustar el nivel de pH de las placas.

[0039] El nivel de pH de la suspensión de CaCO_3 /carragenano no se podía ajustar directamente puesto que la adición de HCl inducía una rápida descomposición del CaCO_3 en CO_2 . El procedimiento alternativo, fijando el pH de MRS/almidón/agar a un nivel bajo (incluso por debajo de pH 4) y luego combinar con el CaCO_3 no tuvo éxito, aunque el nivel de pH deseado (pH 6) se pudo alcanzar. La calidad de los geles resultantes llegó a ser muy pobre ya que la estructura de los componentes gelificantes (agar y carragenina) es destruida durante el tratamiento en autoclave bajo condiciones ácidas (es decir, a un pH mucho menor que 6).

[0040] El siguiente sistema para ajuste del pH ha sido desarrollado por los presentes inventores. El nivel de pH deseado de aproximadamente pH 6,0 a 6,8 se ajustó mediante la adición del 18,5% de HCl después de combinar el medio de cultivo (MRS /almidón/agar) con la suspensión de CaCO_3 /carragenano. La correspondencia entre la cantidad de ácido añadido y el pH resultante en las placas se muestran en la tabla 1. El nivel de pH de las placas fue comprobado permitiendo cubrir la superficie de la placa con 5 ml de agua con agitación ocasional y la posterior medición del pH de la fase acuosa. Los lotes de placa para pH 6,2 y 6,8 también se ensayaron para determinar las propiedades a largo plazo. Se encontró que estas placas mantenían bien sus propiedades de pH durante varios días. Esto indica que la estructura de gel de estas placas puede estabilizar el CaCO_3 bastante bien y disminuir las reacciones (por ejemplo, liberación de CO_2) entre el medio ligeramente ácido y CaCO_3 .

Tabla 1. La correspondencia entre el volumen del HCl al 18,5% y el nivel de pH en las placas. Antes de la adición de la mezcla de CaCO_3 /carragenano (proporcionando 5g CaCO_3 y 0,9 g de carragenina a la composición final), el pH del medio se había ajustado a 5,7

ml añadidos de HCl al 18,5 %	pH después de 1 hora	pH después de 4 horas
6 ml	6,03	6,13
3 ml	6,27	6,29
1,5 ml	6,53	6,54
0,75 ml	6,60	6,65

Ejemplo 4:

[0041] En los ejemplos 4 y 5, se utilizaron las siguientes cepas obtenidas de la colección de cultivo VTT: *Pediococcus damnosus* E-97848, *Lactobacillus brevis* E-89347, y *Lactobacillus Backi* E-052886.

Determinación de tamaños de colonia

[0042] Durante los cultivos realizados, las placas de la presente invención proporcionan tamaños de colonia, mayores que las placas de control con la misma cantidad de glucosa disponible (20 g/L), pero sin contener nada de CaCO_3 . Este fenómeno obviamente se atribuyó a las propiedades de neutralización de ácidos de la placa. Debido a la presencia de CaCO_3 coloidal las placas no usadas están bastante turbias. Sin embargo, durante el proceso de cultivo grandes colonias bacterianas estaban a menudo rodeadas de zonas claras, lo que indica que los ácidos producidos (ácido láctico) han reaccionado con el carbonato de calcio generando sales de Ca (Por ejemplo, lactato de Ca) que tienen una mejor solubilidad en comparación con CaCO_3 . Esta suposición pudo ser confirmada aplicando manualmente el ácido láctico en las placas que generaron también áreas claras en la placa. En la presente innovación se ha mostrado que el sistema inventivo puede mejorar el crecimiento de bacterias de descomposición de alimentos mediante la neutralización de manera eficaz de los ácidos producidos por las bacterias. Las bacterias ácido lácticas pueden ser sensibles a una disminución del pH causada por la acumulación de ácido láctico producido por ellas. El CaCO_3 sólido se ha utilizado con éxito para mantener sus actividades fermentativas y crecimiento en medios de cultivo líquido (Hong et al. 1996 " Growth

of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics". J. Microbiol. Biotechnol. 6 (2): 128-131).

Tabla 2. Comparación tamaño de colonia entre MRS/placas cerveza y placas del Ejemplo 1. Los mismos componentes de medio (MRS-medio y cerveza) se utilizaron en ambas composiciones de medio. Antes de introducir en placas las bacterias se estresaron durante 40 h en cerveza.

Organismo/Placa	Diámetro colonias				
	Días después de poner en placa				
	2	3	4	5	6
Pediococcus damnosus					
MRS/cerveza agar	-	0,5-1 mm	0,5-1 mm		
Enc/Almidón/CaCO ₃	0,5 mm	0,5-3 mm	0,5-3 mm		
Lactobacillus backi					
MRS/Cerveza agar	-	-	-	-	0,1 mm
Enc/Almidón/CaCO ₃	-	-	0,2 mm	0,5 mm	0,7-1,5 mm
Lactobacillus brevis					
MRS/cerveza agar	-	0,2 mm	0,2 mm	0,5 mm	
Enc./almidón/CaCO ₃		0,2 mm	0,5 mm	1 mm	

Ejemplo 5:

Detección más rápida de *Pediococcus* y *Lactobacillus* en placas

[0043] Se prepararon cultivos puros de tres especies de bacteria de ácido láctico, *Pediococcus* y *Lactobacillus damnosus backi* y *Lactobacillus brevis*. Estas bacterias se cultivaron primero en caldo de *Lactobacillus* MRS (Merck) a 30° C, se recogieron por centrifugación (3500 rpm durante 3 horas) y luego se expusieron a cerveza (lager, 4,5% de contenido de EtOH) durante 40 horas (30° C). Se distribuyeron cantidades determinadas de bacterias (400 o 2000 células bacterianas estimadas a partir de la turbidez del cultivo) en 25 ml de solución salina (0,9% NaCl), y las bacterias se recogieron por filtración al vacío sobre membranas de nitrocelulosa. La membrana se colocó sobre una placa de acuerdo con el ejemplo 1 después de la adición de una gota de glucoamilasa (15 U/ml). Como control, se utilizó medio de placa agar MRS/cerveza (que contienen la cantidad normal (20 g/L) de glucosa). Como se muestra en la tabla 3, para los cultivos de *Pediococcus*, surgieron primeras colonias después de 3 o 4 días, pero la capacidad de supervivencia en las placas de la presente invención fue mucho mayor en comparación con las placas de control (medio MRS normal complementado con cerveza). Con reactivos "Anaerocult" (Merck AG, Darmstadt, Alemania), *pediococos* rechazaron crecer en esas placas de control. Esto sugiere que también la generación de CO₂ en cantidades suficientes puede ser importante para la supervivencia de algunas bacterias microaerófilas. La presente innovación sin embargo parece proporcionar buenos resultados para sistemas Anaerocult A y Anaerocult C. En cultivos de *Lactobacillus backi*, aparecieron las colonias después de 4 y 6 días, respectivamente. Con todas las bacterias probadas, la supervivencia fue muy mejorada utilizando los nuevos productos de placa.

Tabla 3. Se observaron las cepas probadas y el número de días antes aparecer las primeras colonias, usando Anaerocult A. Los organismos de descomposición de cerveza se estresaron durante 40 horas en cerveza (lager de 4,5%) a 30° C introducir en placas, y recogido sobre membrana de NC (0,25 µm de tamaño de poro) que se colocó sobre la placa. Las placas se cultivan en una cámara anaeróbica con reactivos Anaerocult A (para *P. damnosus* también con Anaerocult C reactivos).

Cepa	Enc/Almidón/CaCO ₃		Control de MRS/cerveza	
	Visibilidad colonias	% supervivencia	Visibilidad colonias	% supervivencia
<i>Lactobacillus brevis</i>	Día 3	7-12 %	Día 3/4	3-7 %
<i>Lactobacillus backi</i>	Día 4	1,3 - 2,5 %	Día 6	0,4 - 1,25 %
<i>Pediococcus damnosus</i>	Día 3 o 4	1,5 %	No detectadas	0 %
Utilizando Anaerocult C				
<i>Pediococcus damnosus</i>	Día 3	0,5 - 1,5 %	Día 3	0,1 - 0,25 %

[0044] Se utilizó Anaerocult A (Merck) para el cultivo de microorganismos estrictamente anaerobios. De acuerdo con los estudios de Imhof y Heinzer 1996 ("Continuous monitoring of oxygen concentrations in several systems for cultivation of

anaerobic bacteria J. Microbiol Clínica 34 (7): 1646-1648) que proporciona < 0,5% de concentraciones de oxígeno dentro de 60 a 93 minutos.

[0045] Se utilizó Anaerocult C (Merck) para la incubación específica de microorganismos microaerófilos y capneicos (que necesitan CO₂). Las concentraciones de gas producidas son CO₂ 8-10%, O₂ de 5-6%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema de placas de cultivo para la detección de microorganismos contaminantes en productos alimenticios seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, enterobacterias, *Bacillus* o *Campylobacter*, que comprende como entidades separadas:
 10 (a) una placa de cultivo con un pH de 5,7 a 7,0 que contiene una base de nutrientes, 5 a 40 g/l de di-, oligo- o polisacárido, 5 a 30 g/l de CaCO_3 en forma coloidal y un agente gelificante; y
 (b) una solución madre de una enzima en una dilución conteniendo de 10 a 100 unidades/ml, en donde la enzima digiere un di-, oligo- o polisacárido en glucosa.
- 15 2. Sistema de placa de cultivo de la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio es una bebida.
3. Sistema de placa de cultivo de la reivindicación 2, en la que la bebida es cerveza.
4. Sistema de placa de cultivo de la reivindicación 3, en el que la placa de cultivo (a) contiene adicionalmente cerveza.
- 20 5. Sistema de placa de cultivo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente gelificante es agar y/o carragenina.
6. Sistema de placa de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polisacárido es almidón o un derivado de almidón.
- 25 7. Sistema de placa de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima del componente (b) es la glucoamilasa.
8. Sistema de placa de cultivo según la reivindicación 7, en el que la concentración de la glucoamilasa en la solución madre es 20 U/ml.
- 30 9. Sistema de placa de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio nutriente es un caldo de *Lactobacillus* Man-Rogosa-Sharpe (MRS).
- 35 10. Procedimiento para la detección en productos alimenticios de microorganismos contaminantes seleccionados de entre el grupo que comprende *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, enterobacterias, *Bacillus* o *Campylobacter*, que comprende las siguientes etapas:
 (A) preparar una solución coloidal de CaCO_3 estéril con una concentración de 5 a 30 g/l de CaCO_3 ;
 (B) la preparación de un medio nutriente estéril que contiene nutrientes, 5 a 40 g/l de di-, oligo- o polisacárido y al menos un agente de gelificación en el que el pH del medio nutriente se ajusta dentro del intervalo de 5,0 a 7,0;
 (C) mezclar (A) y (B),
 40 (D) ajustar el pH de 5,7 a 7,0,
 (E) verter la composición resultante en placas de Petri,
 (F) añadir una solución de enzima de división de di-, oligo- o polisacárido de una solución madre que contiene 10 a 100 unidades/ml de dicha enzima sobre la superficie del gel nutriente de la placa,
 45 (G) la aplicación de una muestra de microorganismo y transferir la placa de cultivo a una incubadora e incubar la placa a una temperatura apropiada hasta que en la placa aparezcan las colonias.
11. Procedimiento de la reivindicación 10, en el que la solución coloidal de CaCO_3 contiene carragenina.
12. Procedimiento de la reivindicación 10 en el que el polisacárido es almidón o un derivado de almidón.
- 50 13. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la enzima es glucoamilasa.

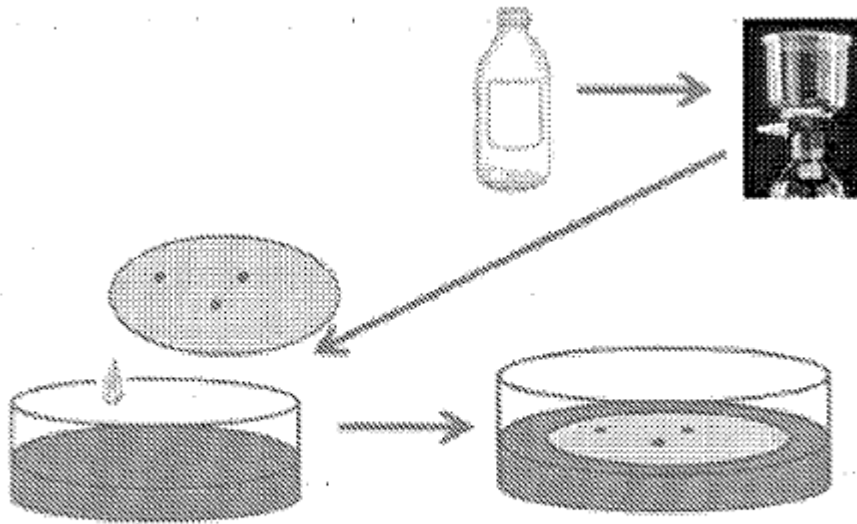


Fig. 1

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- JEUDE et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, vol. 95 (3), 433-445 [0008]
- PANULA-PERÄLÄ et al. *Microb. Cell Fact.*, 2008, vol. 7, 31 [0008]
- TASKILA et al. *J. Inst. Brew.*, 2010, vol. 116 (2), 151-156 [0008]
- WADE et al. *J. Bacteriol.*, 1946, vol. 51 (6), 787-788 [0009]
- SHANK ; SILLIKER. *J. Bacteriol.*, 1956, vol. 73, 625-626 [0009] [0038]
- J. SAMBROOK ; D. RUSSELL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [0026]
- HONG et al. Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, vol. 6 (2), 128-131 [0042]
- IMHOF; HEINZER. Continuous monitoring of oxygen concentrations in several systems for cultivation of anaerobic bacteria. *J. Clinical Microbiol.*, 1996, vol. 34 (7), 1646-1648 [0044]