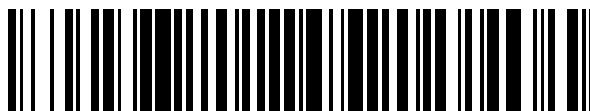


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 832**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12741348 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2739721**

54 Título: **Medio nutriente**

30 Prioridad:

01.08.2011 EP 11176196

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

14.12.2015

73 Titular/es:

DÖHLER GMBH (100.0%)

Riedstrasse 7-9

64295 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

LÖGTENBÖRGER, HEINZ-JÜRGEN y

FIEBIG, KAY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 832 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 nutriente

La invención se refiere a un medio nutriente y a su uso.

5 En la preparación de una gran parte de ante todo artículos de consumo de primera necesidad, tales como por ejemplo alimentos, por ejemplo en forma de bebidas sin alcohol o cervezas debe prestarse atención a una libertad o la existencia de un número máximo definido como tolerable de los correspondientes productos de o en microorganismos vivos con capacidad de metabolización tales como mohos, levaduras, lactobacterias o acetobacterias. Se conocen desde hace tiempo sistemas de detección microbiológicos para este fin.

10 Los medios nutrientes típicos usados para fines analíticos son medios nutrientes gelificados, sólidos a base por ejemplo de agar, sobre los que pueden crecer microorganismos en forma de colonias.

15 Un procedimiento generalizado se basa en el modelo de utilidad alemán 93 19 470.6, en el que se describe un medio nutriente que se prepara por el usuario a partir de partes constituyentes individuales secas o una correspondiente premezcla en polvo, se ajusta a un valor de pH de por ejemplo 4,3 a 4,4 y a continuación se pasteuriza. Durante la producción del artículo que va a someterse a estudio se toman muestras del proceso de producción y se rellenan con el medio nutriente. El crecimiento de microorganismos puede observarse entonces en caso de existencia en una muestra en un espacio de tiempo de aproximadamente 1 a 2 días en una caja de luz a una temperatura de aproximadamente 28 °C. Si una muestra se enturbia, ésta está cargada de microorganismos. El grado de enturbiamiento proporciona al mismo tiempo un punto de referencia sobre la magnitud de la carga de la muestra con microorganismos.

20 Es desventajosa, en el procedimiento conocido, la preparación que relativamente requiere mucho esfuerzo y tiempo del medio nutriente por parte del usuario. Esto exige experiencia por parte del usuario en la manipulación con medios nutrientes microbiológicos y un correspondiente equipamiento del laboratorio con agitadores magnéticos, matraces de Erlenmeyer, medidores de pH con compensación de la temperatura, balanzas de precisión, una disposición de pasteurización etc.

25 Mediante un incumplimiento de las condiciones o contaminación durante la preparación podría obtenerse el correspondiente medio nutriente en calidad no óptima, lo que podría conducir a dificultades en el uso tales como por ejemplo resultados falsos positivos.

Era objetivo de la presente invención superar al menos algunos de los inconvenientes del estado de la técnica.

Se consigue el objetivo mediante un medio nutriente líquido que contiene

- 30
- de 10 a 20 partes en peso de extracto de levadura
 - de 15 a 30 partes en peso de peptona
 - de 35 a 75 partes en peso de monosacáridos y disacáridos
 - hasta 3 partes en peso de sustancias minerales
 - de 0,02 a 1 partes en peso de agente formador de gel estable, que es estable de modo que el producto soporte
- 35 un proceso en autoclave o un proceso de UHT habitual en la industria así como
- agua, sometiéndose a un proceso en autoclave o calentándose a temperaturas ultra-altas el medio nutriente.

Se usa agua preferentemente en una cantidad entre 100 y 2000, más preferentemente de 1000 a 2000 partes en peso. Preferentemente se encuentra la concentración del agente formador de gel estable en $\leq 0,5$ % en peso, preferentemente $\leq 0,1$ % en peso, aún más preferentemente $\leq 0,05$ % en peso.

40 A diferencia de los medios nutrientes del estado de la técnica puede prepararse el producto ya por parte del fabricante y puede suministrarse en forma "ready-to-use", lista para su uso, a los clientes.

Sorprendentemente, el producto con la composición de acuerdo con la invención es estable durante un espacio de tiempo de más seis meses en almacenamiento a temperatura ambiente, cuando se sometió a un proceso en autoclave o como alternativa se calentó a temperaturas ultra-altas.

45 El medio nutriente de acuerdo con la invención contiene de manera habitual nutrientes para microorganismos mediante mezclado de extracto de levadura, peptona, monosacáridos y disacáridos y sustancias minerales.

50 De acuerdo con la invención, el medio nutriente contiene uno o varios agentes formadores de gel estables que están contenidos en una cantidad que conduce a una consistencia fluida del medio nutriente. El agente formador de gel debe ser estable de modo que el producto soporte un proceso en autoclave, es decir un calentamiento hasta una temperatura de 121 °C durante un tiempo de permanencia de como mínimo 5 minutos o un proceso de UHT habitual en la industria.

Los medios nutrientes fluidos habituales contienen por ejemplo carragenano. Éste no soporta en las condiciones dadas sin embargo ningún proceso en autoclave y por tanto no es ningún agente formador de gel estable en el

sentido de la invención descrita. Preferentemente se usa como agente formador de gel goma gellan, sin embargo pueden usarse también otras sustancias poliméricas naturales, semisintéticas o sintéticas con propiedades de formación de gel análogas a la goma gellan.

5 Las propiedades de formación de gel análogas a la goma gellan significa que las sustancias pueden conseguir una estabilización y fijación de partículas o materiales particulados descritos en la disolución, sin producir un aumento significativo de la viscosidad. Un agente formador de gel estable es en particular aquél que con su uso en las cantidades mencionadas tras un proceso en autoclave con un tiempo de permanencia de 5 min a 121 °C forma aún sistema cuya viscosidad se encuentra por encima de la del mismo sistema sin adición del agente formador de gel, sin embargo asciende a menos de 100 mPa·s a 20 °C.

10 Preferentemente se encuentra la viscosidad del sistema en al menos 2 mPa·s.

La goma gellan puede obtenerse por ejemplo con la denominación Gelrite de Merck und Co. USA. La goma gellan se usa en el estado de la técnica de modo que se usa en presencia de iones divalentes y forma geles sólidos. Los medios nutrientes de acuerdo con la invención son, a diferencia de esto, líquidos.

15 Los agentes formadores de gel no estables, tales como por ejemplo carragenano, se modifican en el proceso en autoclave de modo que pierden sus propiedades de formación de gel.

Si bien éstos pueden pasteurizarse eventualmente, sin embargo esto no es suficiente para una capacidad de almacenamiento a largo plazo de los correspondientes medios nutrientes, sino que significa que los medios nutrientes deben usarse a corto plazo.

20 En los intervalos de cantidades mencionados resultan líquidos que presentan preferentemente una viscosidad < 100, preferentemente < 10 mPa·s a 20 °C. A diferencia de caldos de cultivos habituales, que o bien son consistentes o no garantizan como caldo ninguna fijación ni una unión de una colonia de microorganismos, los medios nutrientes de acuerdo con la invención pueden fluir y proporcionan una fijación (ninguna sedimentación) y la unión de una colonia en crecimiento (por consiguiente puede distinguirse bien por el ojo humano). Los nutrientes pueden difundirse libremente, sin que se vean impedidos mediante una matriz.

25 Mediante la composición de acuerdo con la invención pueden almacenarse los medios nutrientes tras un proceso en autoclave o como alternativa un calentamiento a temperaturas ultra-altas durante un espacio de tiempo largo. En un almacenamiento oscuro que ha de preferirse a de 4 °C a 8 °C en un recipiente cerrado se modifican las propiedades del producto durante un espacio de tiempo de 12 meses.

30 Mientras que sea posible suministrar el medio nutriente como botella de depósito a los usuarios, se prefiere especialmente que el medio nutriente se envase en porciones, por ejemplo en recipientes con paredes transparentes, que puedan cerrarse herméticamente. Son especialmente adecuados por ejemplo los recipientes con tapa de rosca. Por parte del usuario tan sólo debe abrirse el recipiente con tapa de rosca, debe añadirse la muestra y debe cerrarse de nuevo el recipiente con tapa de rosca.

35 Para su uso se mezcla el medio nutriente con una muestra y se conserva en una incubadora, por ejemplo a de 25 °C a 37 °C. Los microorganismos pueden crecer en el medio nutriente, lo que se muestra en un enturbiamiento del medio en el caso mínimo localmente limitado. La intensidad del enturbiamiento puede ser al mismo tiempo una medida de la carga de germen de la muestra. De esta manera puede diferenciarse de manera sencilla una gran número de muestras "a primera vista" en muestras cargadas y no cargadas.

40 El uso del medio nutriente es adecuado ante todo en áreas en las que se da importancia al control del estado microbiológico de productos que consumen los seres vivos o se administran a éstos en todas las formas de administración concebibles, por ejemplo en el área de la fabricación de bebidas y alimentos, de la fabricación de piensos, de la cosmética o de la industria farmacéutica. Además es adecuado el medio nutriente en forma adaptada según las circunstancias para el área del diagnóstico clínico.

45 Básicamente pueden obtenerse los microorganismos de los medios nutrientes de manera sencilla mediante pipeteado y pueden caracterizarse en más detalle, por ejemplo por medio de PCR o procedimientos similares.

La invención se explica en más detalle los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo comparativo 1

Un medio nutriente se preparó con los siguientes ingredientes en la masa seca:

50 70 % de monosacáridos y disacáridos
2 % de sustancias minerales
14 % de extracto de levadura
15,1 % de peptona
0,9 % de carragenano.

Se prepararon 5 partes de esta masa seca con 95 partes de agua y el medio de detección resultante se mezcló con una suspensión de levadura muy diluida tras el ajuste del valor de pH hasta pH = 4,3 y la pasteurización a 80 °C durante 5 minutos.

- 5 La incubación del recipiente con tapa de rosca a 25 °C proporciona tras 1 a 3 días un resultado interpretable a simple vista, concretamente el crecimiento de colonias de células de levadura que pueden distinguirse como enturbiamientos discretos en forma de puntos y que flotan libremente en el medio de detección.

Ejemplo comparativo 2

Se procedió como en el ejemplo 1, sin embargo diferenciándose de éste no se pasteurizó el medio nutriente listo para su uso, sino que se sometió en autoclave a 121 °C durante 5 minutos.

- 10 Tras la inoculación con células de levadura se produce tras de 1 a 3 días la formación de un sedimento que se genera mediante los microorganismos. Una interpretación sencilla y de valor informativo del resultado microbiológico no es posible en este caso y tampoco sin manipulación del recipiente con tapa de rosca.

Ejemplo 1

- 15 Un medio nutriente que se diferencia de los ejemplo comparativos 1 y 2 con respecto al agente formador de gel usado se preparó con los siguientes ingredientes en la masa seca:

- 20 70 % de monosacáridos y disacáridos
2 % de sustancias minerales
14 % de extracto de levadura
15,1 % de peptona
0,9 % de goma gellan.

Se prepararon 5 partes de esta masa seca con 95 partes de agua y el medio de detección resultante se mezcló con una suspensión de levadura muy diluida tras el ajuste del valor de pH hasta pH = 4,3 y el proceso en autoclave a 121 °C durante cinco minutos.

- 25 La incubación del recipiente con tapa de rosca a 25 °C proporciona tras 1 a 2 días un resultado interpretable a simple vista, concretamente el crecimiento de colonias de células de levadura que pueden distinguirse como enturbiamientos discretos en forma de puntos y que flotan libremente en el medio de detección.

REIVINDICACIONES

1. Medio nutriente líquido que contiene
 - de 10 a 20 partes en peso de extracto de levadura
 - de 15 a 30 partes en peso de peptona
 - de 35 a 75 partes en peso de monosacáridos y disacáridos
 - hasta 3 partes en peso de sustancias minerales
 - de 0,02 a 1 partes en peso de agente formador de gel estable, que es tan estable que el producto soporta un proceso en autoclave o un proceso de UHT habitual en la industria así como
 - agua, sometándose el medio nutriente a un proceso en autoclave o calentándose a temperaturas ultra-altas.
2. Medio nutriente según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los monosacáridos y disacáridos se seleccionan de maltosa, dextrosa, sacarosa y fructosa.
3. Medio nutriente según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** están contenidas adicionalmente de 1 a 10 partes de ácido láctico o sus sales (lactatos) en cantidades molares equivalentes.
4. Medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gel de medio nutriente puede conservarse a de 4 a 8 °C al menos durante 365 días.
5. Medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el agente formador de gel estable es goma gellan.
6. Medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que a 20 °C la viscosidad asciende a de 2 a 100 mPa·s.
7. Medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el contenido en agentes formadores de gel estables asciende a $\leq 0,5$ % en peso.
8. Medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el contenido en agentes formadores de gel estables asciende a $\leq 0,1$ % en peso.
9. Uso de un medio nutriente según una de las reivindicaciones 1 a 8 para el cribado microbiológico en la industria alimentaria, tal como por ejemplo en la industria de bebidas en la preparación de bebidas sin alcohol y sus materias primas, en la industria de alimentos para animales, en la industria cosmética y la industria farmacéutica así como en el área del diagnóstico.
10. Uso de un medio nutriente según la reivindicación 9 para el cribado microbiológico en el área de la producción de cerveza.