

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 293**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/30</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/18</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/22</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2013 PCT/EP2013/062132**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186253**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2013 E 13727948 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2861715**

54 Título: **Catalasa en medios de cultivo**

30 Prioridad:

**13.06.2012 EP 12171798**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2019**

73 Titular/es:

**EUCODIS BIOSCIENCE GMBH (100.0%)  
Viehmarktgasse 2a/2OG Campus Vienna  
Biocenter II  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**BESENMATTER, WERNER;  
NIEBISCH, AXEL;  
MODREGGER, JAN y  
HUNDLE, BHUPINDER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 702 293 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

Catalasa en medios de cultivo

**Antecedentes de la invención**

5 El peróxido de hidrógeno se utiliza como un potente desinfectante para una amplia gama de microorganismos, pero no necesariamente elimina todos los microorganismos durante el tiempo de aplicación. Para comprobar si los microorganismos sobrevivieron al tratamiento con peróxido de hidrógeno, se aplican medios de cultivo adecuados. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno remanente inhibe el crecimiento de los microorganismos, lo que conduce a resultados negativos falsos y a una falsa sensación de seguridad. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno debe ser neutralizado o degradado en los medios de cultivo. Con este fin, se han sugerido diferentes aditivos para los medios de cultivo como, p. ej., el piruvato o la catalasa.

10 El piruvato reacciona con el peróxido de hidrógeno a acetato, dióxido de carbono y agua. Una desventaja del piruvato y otros aditivos químicos en comparación con la degradación catalítica es que los aditivos químicos se agotan por la reacción de neutralización con peróxido de hidrógeno. Otra desventaja del piruvato es que los microorganismos pueden metabolizarlo. McDonald, et al (Applied and Environmental Microbiology, 1983, pp 360-365) probaron la adición de piruvato al agar violeta rojo bilis, que es selectivo para coliformes y demostraron que el piruvato conduce a resultados positivos falsos.

15 Las catalasas catalizan la degradación del peróxido de hidrógeno a los productos inocuos agua y oxígeno. Las catalasas, especialmente la catalasa más larga conocida procedente del hígado bovino, se han probado en medios de cultivo, específicamente en placas de agar, con éxito limitado. Calabrese y Bissonnette (Canadian Journal of Microbiology, 1990 pp 544-550) combinaron catalasa de hígado bovino, 1500 U/placa y piruvato sódico 5 g/l en medios de cultivo con agar para aumentar la recuperación de bacterias estresadas por la acción de agua ácida. Ohresser et al (PDA J Pharm Sci Technol., 2004 pp 75-80) encontraron solo un 60% de recuperación con 8000 unidades internacionales de catalasa por placa y afirmaron que “altas concentraciones de enzimas en los medios no eran económicamente viables (en términos de costo por placa)”. Ohresser et al. y McDonald et al. informan la aplicación fallida de una catalasa en placas de agar. Estos y otros informes no especifican el microorganismo fuente de la catalasa y, por lo tanto, implican que la fuente de una catalasa no es importante o no hace una diferencia. Harmon y Kautter (Appl Environ Microbiol. 1976 Sep;32(3):409-16) describen que las catalasas de fuentes distintas del hígado de vacuno fueron efectivas para estimular el crecimiento de *C. perfringens* en diferentes medios. Las soluciones de catalasa se esparcieron en la superficie de las placas debido a la baja estabilidad térmica de la enzima.

20 GB 1 478 238 describe un proceso para proporcionar un medio de cultivo estéril en el que dicho medio de cultivo se somete a irradiación con 0,5-2,5 MRad y dicho medio de cultivo contiene uno o más radioprotectores. Se realizó la adición de enzimas como la catalasa para eliminar los efectos tóxicos debidos a la irradiación con rayos gamma.

25 Sin embargo, Switala y Loewen (Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002 pp 145-154) mostraron la diversidad de propiedades entre las catalasas, p. ej., se observó un amplio intervalo de sensibilidades a la inactivación térmica y un amplio intervalo de valores de  $K_m$ . Una catalasa con un valor bajo de  $K_m$  (la constante de Michaelis calculada) es deseable en una aplicación con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

**Compendio de la invención**

30 Sin preverlo anteriormente, los inventores han encontrado con sorpresa que una clase de catalasas es especialmente efectiva en aplicaciones en medios de cultivo. Esta clase comprende enzimas que se obtienen de catalasas fúngicas extracelulares. Originalmente, estas catalasas evolucionaron en la naturaleza para la secreción y función fuera de la célula fúngica. Esto hace que también sean útiles para aplicaciones industriales fuera de las células originales.

35 Para la aplicación exitosa en medios de cultivo, una catalasa debe ser estable durante la producción y almacenamiento de los medios de cultivo. Puede añadirse una catalasa durante la producción de un medio con agar cuando este se enfría a 50 °C antes de que el medio con agar se solidifique. Por lo tanto, es ventajoso si una catalasa utilizada según la invención es suficientemente estable a 50 °C. Sin embargo, una catalasa utilizada según la invención puede añadirse a un medio con agar a temperaturas por debajo de 50 °C, p. ej., mediante la adición de una catalasa sobre una placa de agar después de que el agar se ha solidificado, o mediante la adición de una catalasa a un medio de cultivo que no contiene agar. En ocasiones, los medios de cultivo son irradiados con rayos gamma para asegurar la esterilidad antes de ser utilizados. Por lo tanto, una catalasa utilizada según la invención también debe ser suficientemente estable durante la irradiación con rayos gamma. Por otra parte, una catalasa cuando se utiliza según la invención debe ser suficientemente estable en un medio de cultivo durante el almacenamiento, antes de que sea utilizado.

40 Durante el uso de una catalasa en placas de agar, el peróxido de hidrógeno se degrada a oxígeno, que se difunde. Especialmente si se añade peróxido de hidrógeno altamente concentrado, puede producirse oxígeno dentro del agar a velocidades tan rápidas que el oxígeno gaseoso causa pequeñas burbujas y grietas dentro del agar en menos de una hora. Un observador no entrenado puede confundir las burbujas y grietas formadas con colonias, que tienen un aspecto diferente y aparecen más tarde en la incubación durante una noche. Si bien Ohresser et al. observaron antes este fenómeno de burbujas y grietas, todavía no se ha informado ninguna solución. Sin preverlo anteriormente, los

inventores han descubierto con sorpresa que los aditivos químicos en combinación con una catalasa evitan la formación de grietas y burbujas de manera efectiva.

5 Un objeto de la presente invención es un medio esterilizado en forma opcional para la detección de microorganismos en ambientes que contienen hidrógeno, como superficies o aire, los cuales no sufren las desventajas indicadas anteriormente y que brindan mejores resultados.

Por consiguiente, como un primer aspecto la invención proporciona un medio neutralizador del peróxido de hidrógeno que comprende al menos 0,3 U/ml de una catalasa fúngica secretada, en donde dicha catalasa fúngica está comprendida en el medio.

10 Otro aspecto de la invención es un medio como el descrito anteriormente que comprende además hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.

Otro aspecto de la invención es un medio con agar neutralizador del peróxido de hidrógeno que comprende al menos 0,3 U/ml de una catalasa y que comprende además hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico para impedir la formación de grietas o burbujas en el medio con agar después de la adición de peróxido de hidrógeno.

15 Otro aspecto de la invención es un medio como el descrito anteriormente que comprende además hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.

Otro aspecto de la invención es un medio como el descrito anteriormente, en donde dicho medio es esterilizado, preferiblemente esterilizado mediante irradiación con rayos gamma.

20 Otro aspecto de la invención es un medio como el descrito anteriormente, en donde dicha catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.

Otro aspecto de la invención es el uso de una catalasa fúngica secretada para la neutralización del peróxido de hidrógeno en un medio para la detección de microorganismos.

Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, en donde la catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.

25 Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, en donde la catalasa exhibe una actividad de al menos 25%, preferiblemente de al menos 35%, más preferiblemente de al menos 50% después de la incubación a 50 °C durante 4 horas.

30 Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, en donde la catalasa exhibe una actividad de al menos 25%, preferiblemente de al menos 35%, más preferiblemente de al menos 50% después de la esterilización del medio mediante irradiación con rayos gamma con al menos 10 kGy, preferiblemente al menos 15 kGy, más preferiblemente al menos 20 kGy.

Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, en donde la catalasa exhibe una actividad de al menos 25%, preferiblemente de al menos 35%, más preferiblemente de al menos 50% después del almacenamiento en el medio durante al menos 6 meses.

35 Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, en donde la catalasa se utiliza en una concentración de aproximadamente 0,3 a 90 U/ml de medio.

Otro aspecto de la invención es el uso como el descrito anteriormente, que comprende hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico y opcionalmente hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.

40 Otro aspecto de la invención es un método para detectar microorganismos en un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o en una superficie que contiene peróxido de hidrógeno, dicho método que comprende poner en contacto dicho aerosol o superficie con un medio como el descrito anteriormente, y detectar el crecimiento de microorganismos en dicho medio.

Otro aspecto de la invención es un método como el descrito anteriormente que comprende los pasos de:

45 a. poner en contacto un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o una superficie que contiene peróxido de hidrógeno con un medio de cultivo que comprende la catalasa tal como se ha descrito anteriormente;

b. colocar el medio de cultivo en un ambiente que permita el desarrollo de colonias de microorganismos;

c. determinar si las colonias de microorganismos que puedan haberse desarrollado durante el paso (b) están presentes.

50 Otro aspecto de la invención es un método como el descrito anteriormente, en donde el aerosol que contiene peróxido

de hidrógeno comprende aire.

### Descripción detallada de la invención

En el contexto de esta invención el término "aerosol" se define como un gas que puede contener partículas sólidas y/o gotas líquidas y/o células biológicas y/o esporas y/o conidias y/o partículas de virus.

5 En el contexto de esta invención, el término "catalasa fúngica secretada" se define como una enzima obtenida de una catalasa que se originó a partir de un hongo que secretó dicha catalasa. La catalasa fúngica secretada puede aislarse de su hongo original, o puede producirse como una proteína secretada o como una proteína intracelular en un huésped de expresión, p. ej. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus oryzae*. Un gen que codifica una catalasa según la invención puede obtenerse de un gen fúngico natural o de un gen sintético con información de secuencia de un gen fúngico. Los ejemplos de hongos de los que puede originarse dicha catalasa fúngica secretada o su gen son *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*, *Magnaporthe oryzae*), *Scytalidium thermophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma atroviride*, *Colletotrichum graminicola*, *Nectria haematococca*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Fusarium oxysporum*, *Gibberella moniliformis*, *Cryphonectria parasitica*, *Claviceps purpurea*, *Oidiodendron maius*, *Phytophthora sojae*, *Pythium ultimum*, *Thielavia terrestris* (*Acremonium alabamense*), *Verticillium albo-atrum* o *Verticillium dahliae*.

15 El término "medio" se refiere a un medio de cultivo o nutritivo esterilizado diseñado para soportar el crecimiento de microorganismos. Los medios de cultivo más comunes para los microorganismos son caldos y placas con agar nutritivos. Los microorganismos pueden crecer en medios de cultivo líquidos y en la superficie de medios de cultivo sólidos.

20 Sorprendentemente, la acción neutralizadora del peróxido de hidrógeno de los medios según la invención puede ser potenciada mediante la adición de al menos 40 U/placa de una catalasa fúngica secretada; opcionalmente, se añaden piruvato sódico y/o tiosulfato sódico en pequeñas cantidades.

25 Los medios según la invención con la adición de una catalasa fúngica secretada y opcionalmente piruvato sódico y/o tiosulfato sódico son estables durante 6 meses, lo que facilita sustancialmente el almacenamiento y el envío y garantiza que el cliente tiene un período de uso potencial prolongado.

El tema de las definiciones siguientes está considerado en las realizaciones de la presente invención:

1. Un medio neutralizador del peróxido de hidrógeno que comprende al menos 0,3 U/ml de una catalasa fúngica secretada, en donde dicha catalasa fúngica está comprendida en el medio.
- 30 2. El medio según el punto 1 que comprende además hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico.
3. El medio según el punto 2, en donde dicho piruvato evita la formación de grietas o burbujas en el medio con agar después de la adición de peróxido de hidrógeno.
4. El medio según cualquiera de los puntos 1 o 3 que comprende además hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.
- 35 5. El medio según cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde dicho medio es esterilizado, preferiblemente irradiado con rayos gamma.
6. El medio según cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde dicha catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.
- 40 7. El uso de una catalasa fúngica secretada, para la neutralización del peróxido de hidrógeno en un medio para la detección de microorganismos, en donde dicha catalasa fúngica está comprendida en el medio.
8. El uso según el punto 7, en donde la catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.
9. El uso según cualquiera de los puntos 7 u 8, en donde la catalasa se utiliza en una concentración de aproximadamente 0,3 a 90 U/ml de medio.
- 45 10. El uso según cualquiera de los puntos 7 a 9, que comprende hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico y opcionalmente hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.
- 50 11. Un método para detectar microorganismos en un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o en una superficie que contiene peróxido de hidrógeno, dicho método comprende poner en contacto dicho aerosol o superficie con un medio según cualquiera de los puntos 1 a 6, y la detección del crecimiento de microorganismos en dicho medio.

12. El método según el punto 11, que comprende los pasos de:

a. poner en contacto un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o una superficie que contiene peróxido de hidrógeno con un medio de cultivo que comprenda la catalasa según cualquiera de los puntos 1 a 6;

b. colocar el medio de cultivo en un ambiente que permita el desarrollo de colonias de microorganismos;

5 c. determinar si las colonias de microorganismos que puedan haberse desarrollado durante el paso (b) están presentes.

13. El método según los puntos 11 o 12, en donde el aerosol que contiene peróxido de hidrógeno comprende aire.

**Ejemplo 1 Preparación de placas de agar**

Tabla 1 Componentes del medio de cultivo agar TSA-LT

Componente	g/l
Peptona de caseína	15,0
Peptona de soja	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Lecitina	0,7
Tween 80	5,0

10

TSA-LT significa Agar Tripticasa de Soja con Lecitina y Tween.

El medio de cultivo agar TSA-LT se preparó añadiendo a cada frasco de medio litro con tapón de rosca 16 g de agar CASO en polvo, que contiene los primeros componentes de la Tabla 1 premezclados, 0,28 g de lecitina, 2 g de Tween 80 y 400 ml de agua pura. Después de autoclavar a 121 °C durante 20 minutos, el medio se enfría a 50 °C en un baño de agua. Las soluciones de catalasa, u otras soluciones con aditivos, se añadieron con filtración estéril. Después de mezclar, se vertieron 30 ml de medio de cultivo en cada placa de Petri con un diámetro de 90 milímetros. Al día siguiente, las placas de agar se embalaron en láminas de plástico y algunas placas se irradiaron con rayos gamma con 20,5 kGy.

15

Las soluciones de catalasa se prepararon como se describe a continuación, se esterilizaron por filtración, se almacenaron a 4 °C y se midió su concentración como se describe en el Ejemplo 4.

20

La catalasa de *Magnaporthe* se preparó según lo descrito (y se denominó MagKatG2) por Zámocky et al. (Biochimie, 2012, pp 673-683) y el proceso de purificación se detuvo antes de la columna de hidroxiapatita.

La catalasa de *Scytalidium* se preparó a partir del producto comercial (Terminox Ultra 50L de Novozymes) mediante ultrafiltración con un MWCO (Límite de Peso Molecular) de 30.000 e intercambio de tampón a fosfato potásico 0,1 M con cloruro sódico 0,1 M a un pH de 7,0.

25

La catalasa de hígado bovino se preparó a partir del producto comercial (C9322 de Sigma) mediante disolución en fosfato potásico 0,1 M a un pH de 7,0.

**Ejemplo 2 Ensayo de difusión en agar**

Tabla 2 Componentes del medio de cultivo LB-T

Componente	g/l
Triptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro sódico	5,0
Tween 20	5,0

30

5 Se cultivó *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en medio de cultivo LB-T (ver Tabla 2) durante una noche a 37 °C. La suspensión de *Bacillus* se diluyó con medio de cultivo LB-a una DO600 (densidad óptica a 600 nm) de aproximadamente 0,1. Esta suspensión diluida de *Bacillus* (200 µl/placa) se esparció sobre placas de agar TSA-LT secas del Ejemplo 1. Se colocaron cuatro discos de papel sobre cada placa de agar. Los discos de papel tenían un diámetro de 6 mm y se prepararon con papel para transferencia en gel GB003 de Whatman utilizando una perforadora. Se pipetearon 10 µl de una solución acuosa que contenía peróxido de hidrógeno a una concentración de 2%, 5%, 8% y 10%, respectivamente, sobre los discos de papel de cada placa de agar. A continuación, las placas se incubaron durante una noche a 37 °C. Se midió el diámetro de la zona de inhibición, se restó el diámetro del disco de papel y el resultado se dividió por dos. De este modo, un valor informado en la siguiente tabla es la distancia desde el borde del disco de papel hasta el final de la zona de inhibición. Un valor de cero significa que no se ha observado ninguna inhibición. Cuanto mayor sea el valor, más potente será la inhibición no deseada.

Tabla 3 Inhibición en placas de agar

Aditivos	Concentración	mm (2%)	mm (5%)	mm (8%)	mm (10%)
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	300 U/placa	0	0	0	0,5
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	150 U/placa	0	0	0,5	1
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	80 U/placa	0	0,5	1,5	2,5
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	40 U/placa	0	2	3,5	4
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	20 U/placa	0	3,5	5	5,5
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	10 U/placa	1,5	5	6	7
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	300 U/placa	0	0	0	0,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	150 U/placa	0	0	0,5	1
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	80 U/placa	0	0,5	1,5	2
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	40 U/placa	0	1,5	2,5	3,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	20 U/placa	0	3	4	5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	10 U/placa	1	4,5	5,5	6,
Catalasa de hígado bovino	300 U/placa	0	2	4	4,5
Catalasa de hígado bovino	150 U/placa	0,5	4	5	6
Catalasa de hígado bovino	80 U/placa	1	5	6	7
Piruvato sódico	2,00 g/l	0	1	2	2,5
Tiosulfato sódico	0,05 g/l				
Sin aditivos		4,5	7	8	8,5

Tabla 4 Inhibición en placas de agar irradiadas con rayos gamma

Aditivos	Concentración	mm (2%)	mm (5%)	mm (8%)	mm (10%)
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	300 U/placa	0	0	0,5	0,5
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	150 U/placa	0	0,5	1	2
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	80 U/placa	0	1	2,5	3
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	40 U/placa	0	3	4,5	4,5

Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	20 U/placa	0,5	4,5	5,5	6
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	10 U/placa	1,5	5,5	7	7,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	300 U/placa	0	0	0,5	0,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	150 U/placa	0	0	0,5	1,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	80 U/placa	0	1	1,5	2,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	40 U/placa	0	2,5	3,5	4
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	20 U/placa	0,5	3,5	5	5,5
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	10 U/placa	1,5	5,5	7	7,5
Catalasa de hígado bovino	300 U/placa	1,5	5,5	6,5	7,5
Catalasa de hígado bovino	150 U/placa	2	6	7,5	8
Catalasa de hígado bovino	80 U/placa	3,5	7	8	8,5
Piruvato sódico	2,00 g/l	0	1	2	3
Tiosulfato sódico	0,05 g/l				
Sin aditivos		4,5	7,5	8,5	9

Debido a que se utilizó un medio de cultivo de 30 ml por placa, una concentración de 300 U/placa equivale a 10 U/ml, 40 U/placa equivale a 1,3 U/ml y 10 U/placa equivale a 0,3 U/ml.

### Ejemplo 3 Prueba de promoción del crecimiento

- 5 Se cultivó *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en medio de cultivo LB-T (ver Tabla 2) durante una noche a 37 °C. La suspensión de *Bacillus* se colocó en hielo y se diluyó a una DO600 de aproximadamente 0,1 con una solución de PBS que tiene un pH de 7,4 y contiene 8 g/l de cloruro sódico, 0,2 g/l de cloruro potásico, 0,2 g/l de fosfato monobásico de potasio y 0,918 g/l de fosfato ácido disódico. Esta suspensión diluida de *Bacillus* se diluyó 10.000 veces más con la solución de PBS y se mantuvo en hielo. Mientras tanto, se esparcieron 300 µl de una solución de peróxido de hidrógeno 1% sobre una placa seca que contenía 30 ml de medio de cultivo agar TSA-LT ml (ver Ejemplo 1). De este modo, se aplicó una concentración en el medio de cultivo de 100 ppm (partes por millón) de peróxido de hidrógeno. La placa se secó durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Luego, se esparcieron 200 µl de suspensión de *Bacillus* diluida 10.000 veces sobre la placa de agar. A continuación, las placas se incubaron durante una noche a 37 °C.

Tabla 5 Colonias en placas de agar

Aditivos	Concentración	UFC*
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	300 U/placa	189
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	150 U/placa	210
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	80 U/placa	169
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	40 U/placa	140
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	20 U/placa	8
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	10 U/placa	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	300 U/placa	163
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	150 U/placa	178
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	80 U/placa	162
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	40 U/placa	154

Catalasa de <i>Scytalidium</i>	20 U/placa	6
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	10 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	300 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	150 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	80 U/placa	0
Piruvato sódico	2,00 g/l	161
Tiosulfato sódico	0,05 g/l	
Sin aditivos		0
Sin aditivos y sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		164

\*UFC significa unidades formadoras de colonias.

Tabla 6 Colonias en agar irradiado con rayos gamma

Aditivos	Concentración	UFC
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	300 U/placa	205
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	150 U/placa	190
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	80 U/placa	171
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	40 U/placa	58
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	20 U/placa	1
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	10 U/placa	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	300 U/placa	161
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	150 U/placa	205
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	80 U/placa	109
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	40 U/placa	6
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	20 U/placa	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	10 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	300 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	150 U/placa	0
Catalasa de hígado bovino	80 U/placa	0
Piruvato sódico	2,00 g/l	229
Tiosulfato sódico	0,05 g/l	
Sin aditivos		0

5 Como se muestra en la Tabla 5, la catalasa de *Magnaporthe* y la catalasa de *Scytalidium* en concentraciones de 40 U/placa y en concentraciones más altas en medio no irradiado, conducen a una recuperación de mucho más del 50% de las unidades formadoras de colonias aplicadas.

Sin embargo, la catalasa de hígado bovino, incluso a la concentración más alta examinada de 300 U/placa, conduce a una recuperación del 0% de las unidades formadoras de colonias aplicadas.

10 Como se muestra en la Tabla 6, la catalasa de *Magnaporthe* y la catalasa de *Scytalidium* en concentraciones de 80 U/placa y en concentraciones más altas en medio irradiado con rayos gamma, conducen a una recuperación de más

del 50% de las unidades formadoras de colonias aplicadas. Después de la irradiación con rayos gamma, las placas de agar que contienen catalasa de *Magnaporthe* o catalasa de *Scytalidium* siguen siendo efectivas para degradar el peróxido de hidrógeno.

**Ejemplo 4 Medición de la actividad de la catalasa**

5 La definición de 1 unidad de catalasa (1 U) es la cantidad de enzima que descompone 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto a 25 °C a un pH de 7,0 y con una concentración inicial de peróxido de hidrógeno de 0,010 M (M significa molar, que es mol/l).

10 El pH de 7,0 se aseguró con un tampón de fosfato 0,1 M, que se preparó mezclando 61,5 ml de fosfato ácido dipotásico 1 M y 38,5 ml de fosfato monobásico potásico 1 M con 900 ml de agua pura. Se preparó una solución de peróxido de hidrógeno 0,01034 M mezclando 42,3 µl de solución de peróxido de hidrógeno 30% en peso, que tiene una densidad de 1,11 g/ml, con 40 ml de tampón de fosfato 0,1 M. La temperatura se llevó a 25 °C en un baño de agua, y se pipetearon 2,9 ml de esta solución en una cubeta de cuarzo. A continuación, se añadieron 100 µl de una solución de catalasa diluida, se mezcló y se inició rápidamente la medición cinética. La disminución de la absorción por minuto se midió con un fotómetro a 240 nm en el primer minuto en el intervalo lineal.

15 Antes de esta medición, las soluciones de catalasa se diluyeron con tampón de fosfato 0,1 M. Se prepararon diferentes diluciones, p. ej., con un factor de dilución de 20, 50 y 100. La dilución con el factor 20 se preparó mezclando 50 µl de solución de catalasa con 950 µl de tampón de fosfato 0,1 M. Para el siguiente cálculo se utilizó la dilución de catalasa que dio como resultado una disminución de la absorción de alrededor de 0,1 por minuto. La disminución de la absorción por minuto se multiplicó por el factor de dilución de la catalasa y se multiplicó por 688, lo que da la concentración en la solución de catalasa no diluida en U/ml. El factor 688 incluye el coeficiente de extinción (43,6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) de peróxido de hidrógeno a 240 nm y la dilución en la cubeta.

Figura 1: muestra la medición de la actividad de catalasa de *Magnaporthe*

**Ejemplo 5 Ensayo de formación de grietas**

25 Se esparcieron cantidades iguales de peróxido de hidrógeno, 100 µl de peróxido de hidrógeno 3% o 300 µl de peróxido de hidrógeno 1% sobre placas de agar secas, las cuales se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 sin radiación con rayos gamma. Luego, las placas se secaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). A continuación, se esparcieron sobre la placa de agar 200 µl de solución de PBS estéril, que se preparó como se describe en el Ejemplo 3. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C.

Tabla 7 Formación de grietas en las placas de agar y su prevención

Aditivos	Concentración	Grietas y burbujas 100 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	Grietas y burbujas 300 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1%
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	338 U/placa	muchas	0
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	75 U/placa	muchas	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	338 U/placa	muchas	pocas
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	75 U/placa	muchas	pocas
Catalasa de <i>Magnaporthe</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 2,00 g/l 0,05 g/l	0	0
Catalasa de <i>Magnaporthe</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 0,20 g/l 0,005 g/l	0	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 2,00 g/l 0,05 g/l	0	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	75 U/placa	0	0

piruvato sódico	0,20 g/l		
tiosulfato sódico	0,005 g/l		

La formación de grietas y burbujas se evitó por completo mediante la adición de piruvato, incluso a bajas concentraciones de piruvato.

5 Incluso si se hubiera aplicado la misma cantidad de peróxido de hidrógeno por placa, se habrían formado menos grietas con una solución más diluida de peróxido de hidrógeno. Además, se observó que las grietas aparecían predominantemente en la parte del agar plaqueado en donde el peróxido de hidrógeno se había aplicado primero antes de que se esparciera sobre toda la superficie del agar.

**Ejemplo 6 Prueba de promoción del crecimiento, otros ejemplos**

10 Como se describe en el Ejemplo 3, se realizaron pruebas de promoción del crecimiento con las placas de agar como se utilizaron en el Ejemplo 5.

Tabla 8 Colonias y grietas en el agar

Aditivos	Concentración	UFC	Grietas y burbujas
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	338 U/placa	137	1-2
Catalasa de <i>Magnaporthe</i>	75 U/placa	97	1-2
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	338 U/placa	83	3-4
Catalasa de <i>Scytalidium</i>	75 U/placa	68	3-4
Catalasa de <i>Magnaporthe</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 2,00 g/l 0,05 g/l	120	0
Catalasa de <i>Magnaporthe</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 0,20 g/l 0,005 g/l	108	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 2,00 g/l 0,05 g/l	114	0
Catalasa de <i>Scytalidium</i> piruvato sódico tiosulfato sódico	75 U/placa 0,20 g/l 0,005 g/l	99	0
piruvato sódico tiosulfato sódico	2,00 g/l 0,05 g/l	125	0
piruvato sódico tiosulfato sódico	0,20 g/l 0,005 g/l	0	0
sin aditivos		0	0
sin aditivos y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		83	0

La combinación de catalasas con bajas concentraciones de aditivos químicos es ventajosa en comparación con cada componente por separado.

Las catalasas sin aditivos químicos pueden provocar grietas o burbujas en las placas de agar con peróxido de hidrógeno.

Las concentraciones bajas de aditivos químicos sin catalasa, p. ej., 0,2 g/l de piruvato sódico y 0,005 g/l de tiosulfato sódico, no soportaron el crecimiento en placas de agar con peróxido de hidrógeno.

- 5 Sin embargo, la combinación de una catalasa con concentraciones bajas de aditivos químicos, p. ej., 75 U/placa de catalasa de *Magnaporthe* y 0,2 g/l de piruvato sódico y 0,005 g/l de tiosulfato sódico, soportó el crecimiento y evitó la formación de grietas y burbujas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio neutralizador de peróxido de hidrógeno que comprende al menos 0,3 U/ml de una catalasa fúngica secretada, en donde dicha catalasa fúngica está comprendida en el medio.
- 5 2. El medio según la reivindicación 1 que comprende además hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico.
3. El medio según la reivindicación 2, en donde dicho piruvato evita la formación de grietas o burbujas en el medio con agar después de la adición de peróxido de hidrógeno.
4. El medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, que comprende además hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.
- 10 5. El medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho medio es esterilizado, preferiblemente irradiado con rayos gamma.
6. El medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.
- 15 7. Uso de una catalasa fúngica secretada, para la neutralización de peróxido de hidrógeno en un medio para la detección de microorganismos, en donde dicha catalasa fúngica está comprendida en el medio.
8. El uso según la reivindicación 7, en donde la catalasa se obtiene de una especie de *Magnaporthe* o *Scytalidium*, preferiblemente de *Magnaporthe grisea* o de *Scytalidium thermophilum*.
9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la catalasa se utiliza en una concentración de aproximadamente 0,3 a 90 U/ml de medio.
- 20 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende hasta 4 g/l, preferiblemente hasta 2 g/l, más preferiblemente hasta 0,2 g/l de piruvato sódico y opcionalmente hasta 0,05 g/l, preferiblemente hasta 0,005 g/l de tiosulfato sódico.
- 25 11. Un método para detectar microorganismos en un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o en una superficie que contiene peróxido de hidrógeno, dicho método comprende poner en contacto dicho aerosol o superficie con un medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y la detección del crecimiento de microorganismos en dicho medio.
12. El método según la reivindicación 11, que comprende los pasos de:
- a. poner en contacto un aerosol que contiene peróxido de hidrógeno o una superficie que contiene peróxido de hidrógeno con un medio de cultivo que comprende la catalasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
- 30 b. colocar el medio de cultivo en un ambiente que permita el desarrollo de colonias de microorganismos;
- c. determinar si las colonias de microorganismos que puedan haberse desarrollado durante el paso (b) están presentes.
13. El método según la reivindicación 11 o 12, en donde el aerosol que contiene peróxido de hidrógeno comprende aire.

35

Fig. 1

