



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 195 771**

② Número de solicitud: 200200442

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/04**
// (C12Q 1/04
C12R 1:67)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **22.02.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2003**

Fecha de la concesión: **17.08.2004**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.10.2004

⑰ Titular/es: **Universidad de Santiago de Compostela
USC - Edificio Cactus - CITT - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Vázquez Belda, Beatriz Isabel;
Fente Sampayo, Cristina Asunción;
Jaimez Ordaz, Judith;
Rojas Durán, Ternura Rosa;
Franco Abuín, Carlos Manuel y
Cepeda Sáez, Alberto**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas.**

㉑ Resumen:

Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas.

Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas, suplementando los medios de cultivo habituales con Cavasol W7M-ciclodextrina y desoxicolato de sodio. La interacción con las aflatoxinas provoca la aparición al 2º ó 3er día de un halo beige muy nítido observable a simple vista con luz natural. El anillo beige observado se corresponde perfectamente con el anillo fluorescente que forman las aflatoxinas cuando se observan bajo luz UV (365 nm).

ES 2 195 771 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas.

En 1969 Whittaker agrupó a los seres vivos en cinco reinos: Monera, Protistas, Animal, Vegetal y Fungi. Dentro del reino Fungi o Mycota se incluyen diversidad de hongos. Como ejemplos más característicos de hongos tenemos las setas, levaduras y hongos microscópicos. El metabolismo secundario de los hongos microscópicos o mohos está muy desarrollado dando lugar a diversidad de sustancias tales como antibióticos, giberelinas, alcaloides y toxinas fúngicas.

De entre las toxinas fúngicas, o micotoxinas, se denominan aflatoxinas (Af) B₁, B₂, G₁ y G₂ las sustancias carcinogénicas producidas por hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, concretamente las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Las aflatoxinas se producen en determinadas condiciones de humedad y temperatura sobre gran variedad de sustratos alimentarios. Estas aflatoxinas presentan cierta fluorescencia natural debido a su estructura pentaheterocíclica oxigenada con alto grado de insaturación.

La metodología tradicional para conocer la capacidad aflatoxigénica de las cepas de estos hongos es lenta: implica la identificación de las cepas del género *Aspergillus* en las muestras, su aislamiento y cultivo en medios líquidos o sólidos durante 10 o más días, y la posterior extracción y análisis cromatográfico de las aflatoxinas utilizando detectores de fluorescencia.

Cuando el número de cepas a estudiar es muy alto es necesario un método más simplificado que la cromatografía. Se han desarrollado varios métodos para la detección fácil de cepas productoras de aflatoxinas, basándose en el diseño de medios de cultivo más o menos complejos, con componentes que incrementan la capacidad para producir estas micotoxinas y que, además, aumentan la débil fluorescencia natural que presentan las aflatoxinas. De esta forma se las detecta más fácilmente, ya que si se observan las placas con hongos bajo luz UV, las aflatoxinas se revelarán como anillos de fluorescencia rodeando sólo a las colonias que las produzcan. Así, se han usado para este propósito medios conteniendo azúcares, sales, extracto de cacahuetes, licor de maíz o extracto de coco (HARA, S.; FENNELL, D.I. y HESSELTINE, C.W. (1974). Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. Appl. Microbiol.: 1118-1123); (LIN, M.T. y DIANESE, J.C. (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathology, 66: 1466-1469). Pero hay que destacar que estos sistemas aún son lentos. Salvo en el caso de un método descrito por Lemke (LEMKE, P.A.; DAVIS, N.D.; IYER, S.K. Y CREECH, G.W. (1989). Direct visual detection of aflatoxin synthesis by microcolonies of *Aspergillus* Species. Appl. Environm. Microbiol., 55 (7): 1808-1810), en que se pueden detectar aflatoxinas al 5º día, en estos medios de cultivo específicos son necesarios por lo menos 10 días de incubación para finalmente poder llegar

al diagnóstico de la cepa en cuestión.

En la búsqueda de sustancias que ayudan a aumentar la débil fluorescencia de las aflatoxinas diversos autores realizaron estudios espectrofotométricos y cromatográficos que muestran cómo sustancias como las ciclodextrinas son capaces de interaccionar con las aflatoxinas y aumentar su fluorescencia natural (CEPEDA, A. *et al.* (1996). Post-column excitation of aflatoxins using cyclodextrins in liquid chromatography for food analysis. Journal of Chromatography A, 721 69-74). Las ciclodextrinas son moléculas de diferentes tamaños que contienen de 6 a 8 unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), y sus propiedades están descritas en la literatura científica. Los resultados de las investigaciones que ensayaron la α -, γ y varias del grupo β -ciclodextrina, mostraron que sobre todo la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina, denominada actualmente Cavasol W7M-ciclodextrina, presenta una cavidad idónea para la formación de complejos de inclusión con las aflatoxinas. Las aflatoxinas, al meterse dentro de las ciclodextrinas, se vuelven más rígidas, provocando un aumento muy importante de su fluorescencia, principalmente la de las aflatoxinas B₁ y G₁, que son las más tóxicas.

Esta capacidad de las ciclodextrinas para incrementar la fluorescencia de las aflatoxinas ha sido adaptada recientemente a la microbiología por los autores de la presente invención, desarrollando un medio de cultivo en que la adición de ciclodextrinas como componentes del medio permite la visualización bajo luz UV de la fluorescencia debida a las aflatoxinas producidas por cepas de *Aspergillus* spp. (JAIMEZ, J., *et al.* (2001) A new additive for culture media for rapid determination of aflatoxins producing *aspergilli* strains. Applied and Environmental Microbiology, 67 (10) 4858-4862). Utilizando este medio de cultivo se consigue realizar los recuentos fúngicos y simultáneamente detectar cepas aflatoxigénicas.

También es bien conocido por los investigadores el crecimiento expansivo de ciertas cepas de *Aspergillus* cuando crecen en los medios de cultivo habituales, lo que dificulta y a veces imposibilita su visualización cuando hay varias colonias en la misma placa. Para limitar el crecimiento expansivo de estos hongos ciertos autores han utilizado sustancias tales como el desoxicolato de sodio (Lemke, P.A. *et al.* 1989).

Proponemos la utilización de dos sustancias químicas: la Cavasol W7M-ciclodextrina [CAS RN: 343249-39-8] junto con el desoxicolato de sodio [CAS RN: 302-95-4]. Estos dos componentes se adicionan a los medios de cultivo que se utilizan habitualmente para la producción de micotoxinas y se observa un efecto no descrito anteriormente: al adicionar el desoxicolato de sodio aparece un halo de color beige sólo alrededor de las colonias de cepas aflatoxigénicas, permitiendo la detección visual directa y bajo luz natural y sin ningún tipo de aparato. Además utilizando conjuntamente los dos componentes, se posibilita la detección de las cepas aflatoxigénicas al 2º o 3º día de incubación.

Las ventajas que suponen la utilización de estas dos sustancias se resumen en:

1. No se necesitan sustancias químicas complejas para elaborar este nuevo medio de cultivo, es decir, se pueden utilizar como base los medios de cultivo tradicionales para facilitar la producción de micotoxinas, y además adicionar al medio ciclodextrinas del grupo beta, preferentemente la Cavasol W7M-ciclodextrina, y desoxicolato de sodio, ambas sustancias comerciales.

2. Aunque también se obtienen resultados con otras ciclodextrinas del grupo beta, el Cavasol W7M-ciclodextrina es la de preferencia, porque tiene mejor capacidad para formar complejos con las aflatoxinas y aumentar su fluorescencia natural, y así, alrededor de las cepas aflatoxigénicas bajo luz UV (365 nm) se observa claramente un anillo fluorescente.

3. El desoxicolato de sodio ejerce un gradual (dependiendo de su concentración) efecto inhibitorio sobre el crecimiento expansivo de las colonias de *Aspergillus* spp. Al tiempo que restringe el crecimiento también restringe la dispersión de aflatoxinas por el medio de cultivo, produciendo un efecto "concentrador" de estas micotoxinas alrededor de las colonias productoras. Al concentrarse las aflatoxinas se observa nítidamente, bajo luz UV, el anillo fluorescente que rodea las cepas aflatoxigénicas.

4. Al añadir desoxicolato de sodio a los medios de cultivo que contienen ciclodextrinas se observa, a simple vista y bajo luz natural, la aparición de un anillo beige sólo alrededor de las cepas de *Aspergillus* y coincidente con el anillo fluorescente observado bajo luz UV. Permite distinguir de forma fácil, confirmatoria, y sin ayuda de ningún aparato la presencia de cepas productoras de aflatoxinas.

5. Dada la capacidad del Cavasol W7M-ciclodextrina para la exaltación de la fluorescencia, no son necesarios más de 3 días, sólo en algunos casos 5 días, de incubación para lograr la visualización directa, bajo luz UV de 365 nm, del anillo de fluorescencia; pero al añadir conjuntamente el desoxicolato de sodio, se puede ver la fluorescencia ya a los 2 días, y coincide exactamente con la aparición del anillo beige.

Medio de cultivo

Se utilizará como base un medio de cultivo habitual en micología como es Agar Extracto de Levadura (YES). No todas las cepas productoras de micotoxinas lo son en el mismo grado ni en todos los medios de cultivo, por ello se utiliza el medio YES, cuya composición favorece y promueve una mayor producción de micotoxinas por parte de las cepas fúngicas.

Este medio será suplementado con Cavasol W7M-ciclodextrina en cantidades de 0,3% p/v (o superiores) (WACKER, Munich (Germany) u otra empresa suministradora) y con desoxicolato de sodio en cantidad de 0,6% p/v (o hasta 0,8% p/v máximo) (Fluka-Biochemika (Suiza) u otra empresa suministradora). La composición del medio de cultivo suplementado en las proporciones y condiciones que mejores resultados han proporcionado son:

Agar extracto de levadura (YES) suplementado

	* Extracto de levadura (comercial)	20,0 g
5	* Sacarosa	125,0 g
	* Agar	20,0 g
	* Cavasol W7M-ciclodextrina	3,0 g
	* Agua destilada	Hasta 1000,0 mL
10	* Desoxicolato de sodio	8,0 g

Preparación: Se disuelven todos los componentes (excepto el desoxicolato de sodio), en agua destilada y se enrasa hasta un litro. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, se enfría a 40-50°C y se añade asepticamente el desoxicolato de sodio, agitando bien para que se mezcle con el medio. Antes de emplacar se deja reposar el medio alrededor de 10 minutos en un baño de agua tibia para eliminar las burbujas formadas durante la agitación. A continuación se distribuye en placas Petri.

Diagnosis de la capacidad productora de aflatoxinas de cepas de *Aspergillus*

La presente invención propone la utilización de medios de cultivo habituales para la producción de micotoxinas, como el agar extracto de levadura (YES), suplementado con Cavasol W7M-ciclodextrina y desoxicolato de sodio para la detección de cepas productoras de aflatoxinas.

Se inoculan las cepas del género *Aspergillus* en placas con este medio de cultivo y se incuban a 28°C.

A diferencia de los métodos descritos por otros autores, que utilizan medios muy específicos y con algunos componentes difíciles de conseguir, el método que proponemos es sencillo y sobre todo muy rápido. Con sólo añadir la ciclodextrina del grupo beta y el desoxicolato de sodio a un medio corriente, por ejemplo YES, al cabo de dos a tres días ya se puede detectar a simple vista la presencia de cepas aflatoxigénicas.

La adición de desoxicolato de sodio restringe el crecimiento expansivo de las colonias y al mismo tiempo consigue que las aflatoxinas permanezcan concentradas. Estas aflatoxinas interaccionan con el Cavasol W7M-ciclodextrina y el desoxicolato de sodio provocando la aparición de un halo beige sólo alrededor de las cepas aflatoxigénicas, y en cambio el resto de las cepas permanecen inalteradas. Este halo beige visible a simple vista, sin ayuda de ningún aparato, se verá tanto más nítido cuanto mayor sea la producción y concentración de aflatoxinas.

Enfatizar que cuando se adiciona desoxicolato de sodio, pero no se adiciona el derivado de la beta-ciclodextrina, no aparece ningún anillo beige alrededor de las cepas aflatoxigénicas.

Finalmente, destacar que, debido a la adición de la Cavasol W7M-ciclodextrina, se puede confirmar que el halo beige coincide perfectamente con el halo de fluorescencia azulada que se observa al poner las placas bajo una lámpara de luz UV (365 nm). Por tanto se trata de un método que es confirmatorio en sí mismo.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas de hongos *Aspergillus*, **caracterizado** porque a los medios de cultivo habituales, como el agar extracto de levadura (YES), se adicionan ciclodextrinas del grupo beta, preferentemente la Cavasol W7M-ciclodextrina, y desoxicolato de sodio.

2. Medio de cultivo, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición al medio de cultivo

de ciclodextrinas del grupo beta, preferentemente la Cavasol W7M-ciclodextrina [CAS RN: 343249-39-8] en porcentajes del 0,3% p/v o superiores, junto con desoxicolato de sodio [CAS RN: 302-95-4] en porcentajes del 0,6% p/v (hasta 0,8% p/v máximo).

3. Medio de cultivo, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la aparición al 2° o 3^{er} día de un halo beige, visible a simple vista, alrededor de las cepas aflatoxigénicas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 195 771

② Nº de solicitud: 200200442

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.02.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/04 // (C12Q 1/04, C12R 1:67)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2162552 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 16.12.2001, todo el documento.	1-2
A	LEMKE, P.A. et al. "Direct visual detection of aflatoxin synthesis by minicolonies of Aspergillus species". Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55, 7. Páginas 1808-1810. ISSN 0099-2240. Todo el documento.	1-2
A	FENTE, C.A. et al. "New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing Aspergillus strains". Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67, 10. Páginas 4858-4862. Todo el documento.	1-2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.10.2003

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/1