

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 262**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/04</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/22</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/34</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)
<b>C12Q 1/6806</b>	(2008.01)
<b>D21C 5/00</b>	(2006.01)
<b>D21H 17/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/34</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2015 PCT/IB2015/058278**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071805**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2015 E 15857723 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3215632**

54 Título: **Método mejorado para la determinación de microorganismos**

30 Prioridad:

**07.11.2014 SE 1451333**

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

**10.12.2020**

73 Titular/es:

**STORA ENSO OYJ (100.0%)  
P.O. Box 309  
00101 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**PARTTI-PELLINEN, KIRSI;  
RÄSÄNEN, JARI;  
HÄRMÄLÄ, KIELO;  
KETTUNEN, ANU y  
RIIHINEN, KALLE-JUHANI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 798 262 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**

Método mejorado para la determinación de microorganismos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para la determinación del contenido de microorganismos en material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel.

10 Descripción de la técnica relacionada

El papel y el cartón son importantes materiales de embalaje utilizados en muchos campos de la industria. El papel o cartón de embalaje puede proporcionar protección física o química al objeto u objetos contenidos en ellos; también pueden por ejemplo, proporcionar información y mejorar el mercadeo y el control de porciones de los objetos. El papel y el cartón también tienen una larga historia en la industria alimentaria en una multitud de usos, incluido el embalaje. Como material de embalaje, el papel a menudo entra en contacto directo con los alimentos. Los contenedores de papel y cartón se utilizan para alimentos secos, líquidos y productos congelados. El envoltorio de papel se usa comúnmente también para comida rápida y dulces, embalajes de productos farmacéuticos, embalajes de cigarrillos, embalajes de lujo y productos gráficos de alta calidad. El embalaje protege el contenido contra la acción de factores peligrosos del medio ambiente, prolongando así la vida útil de los contenidos embalajes. El requisito de higiene para los productos de cartón de embalaje para el consumidor es extremadamente alto.

El papel y el cartón generalmente están compuestos principalmente de fibras de celulosa, carbonato de calcio, almidón y hemicelulosa. Todos estos son componentes naturales y pueden servir como medios de cultivo para microorganismos contaminantes. La circulación de agua que tiene un alto contenido en nutrientes y almidón es un origen común de infección microbiana.

Tradicionalmente, la pureza microbiana de una sustancia se ha evaluado utilizando métodos microbiológicos que requieren el cultivo de una muestra del material o superficie a analizar. La composición y las condiciones de cultivo (temperatura, tiempo, medio) tienen un impacto en la precisión del método. La muestra para el análisis cuantitativo debe diluirse de tal manera que se puedan contar colonias individuales formadas por células. Puede haber docenas o como máximo unos pocos cientos de células en la muestra estudiada. El recuento de colonias en muestras paralelas puede variar mucho y, en consecuencia, la reproducibilidad es mala. Por lo tanto, la precisión o fiabilidad es pobre. Además, los métodos microbianos suelen requerir mucho trabajo y mucho tiempo y, por lo tanto, no son óptimos para el seguimiento (monitoreo) de la pureza de los embalajes de papel y cartón.

Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar microorganismos en un proceso de fabricación de papel que incluye una lámina de papel se conocen, por ejemplo, a partir de los documentos US 8 613 837 y US2013189152.

Priha et al., (2004) describen la detección de bacterias del grupo *Bacillus cereus* del cartón y papel utilizando kits comerciales para aislamiento del ADN y PCR en tiempo real para análisis.

El documento WO 97147764 A1 describe un método de pretratamiento de una muestra biológica que contiene material de carbohidrato poniendo en contacto dicho material con enzimas celulasa, hemicelulasa, amilasa y/o pectinasa. El análisis se puede realizar mediante el cultivo de bacterias o la detección de antígenos.

Como los métodos actuales requieren mucho trabajo, requieren mucho tiempo y su precisión y sensibilidad no son satisfactorias, existe la necesidad de métodos mejorados para determinar la pureza microbiológica del material de papel y cartón.

50 Objetivos y resumen de la invención

Un objetivo de esta invención es proporcionar un método mejorado para la determinación de microorganismos contaminantes en material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel. La presente invención logra este objetivo como se describirá y reivindicará a continuación.

El primer aspecto de la invención es un método para la determinación del contenido de microorganismos en un material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel. Las características de dicho método se dan en la parte de caracterización de la reivindicación 1.

El segundo aspecto de la invención es el uso de celulosa en el pretratamiento de material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel antes de la determinación de microorganismos usando PCR cuantitativa.

El método permite un seguimiento simple y preciso de la pureza microbiológica del material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel y también de los materiales de papel y cartón resultantes, tales como materiales

de embalaje de consumo, especialmente materiales de embalaje de alimentos. De este modo, se mejora la higiene del material de embalaje, ya que las posibles contaminaciones se pueden detectar en una etapa temprana.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra una comparación del análisis de qPCR para bacterias en cartón inoculado suspendida en un tampón y sometida a una filtración por compresión y cultivo tradicional para la determinación de microorganismos.

10 La Figura 2 muestra una comparación del análisis por qPCR de bacterias en una cartón inoculado suspendida en un tampón y sometida a una filtración por centrifugación en bolsa y cultivo tradicional para la determinación de microorganismos.

15 Las Figuras 3a y 3b muestran una comparación entre el método de acuerdo con la presente invención y un método tradicional basado en el cultivo en la determinación de microorganismos en dos papeles o cartones diferentes.

La Figura 4 muestra una comparación del método para la determinación de microorganismos en cartón, en primer lugar usando qPCR sin pretratamiento enzimático, en segundo lugar de acuerdo con la presente invención y en tercer lugar usando un método tradicional de cultivo.

20 La Figura 5 muestra una comparación de la determinación de microorganismos usando cultivo tradicional, qPCR sin pretratamiento enzimático, filtración por compresión como pretratamiento, centrifugación en bolsa de filtración como pretratamiento y el método de acuerdo con la presente invención usando dos preparaciones de celulasa comerciales mixtas diferentes.

25 Descripción detallada de la invención

30 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la determinación basada en PCR de la pureza microbiológica del material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel puede mejorarse notablemente mediante el pretratamiento enzimático de la muestra. El pretratamiento enzimático permite la detección cuantitativa mediante PCR también cuando los niveles de microorganismos contaminantes son muy bajos.

De acuerdo con la invención, la determinación del contenido de microorganismos en un material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel comprende las etapas de:

- 35 (a) proporcionar una suspensión de una muestra del material que comprende celulosa; y  
 (b) tratar la suspensión de la etapa (a) con una o más preparaciones enzimáticas que tienen actividad de celulasa; y  
 (c) separar los microorganismos de la suspensión tratada con enzima de la etapa (b); y  
 (d) aislar ácidos nucleicos de los microorganismos separados de la etapa (c); y  
 40 (e) realizar un análisis de PCR en los ácidos nucleicos aislados de la etapa (d), en el que el resultado de la PCR indica el contenido de microorganismos de la muestra.

Como se conoce en la técnica, un resultado de PCR positivo indica la presencia de un cierto ácido nucleico y, por lo tanto, un cierto microorganismo, mientras que qPCR se usa para la determinación de los niveles de microorganismos.

45 A este respecto, debe entenderse que el "contenido de microorganismos" cubre tanto el contenido de microorganismos cualitativo (por ejemplo, identificar la cepa microbiana) como cuantitativo (por ejemplo, la cantidad de unidades formadoras de colonias de bacterias) de la muestra. La determinación del contenido cuantitativo y cualitativo de microorganismos en un material de muestra se puede hacer de forma independiente o en conjunto. El contenido cualitativo se puede medir usando cebadores específicos para ciertos géneros o especies. La presencia del producto de PCR indica la presencia del microorganismo y puede determinarse usando electroforesis en gel o preferiblemente usando analítica de equipo de qPCR. La determinación cuantitativa se realiza utilizando equipos de qPCR y controles conocidos, cuando sea necesario. Se pueden usar cebadores de amplio rango o cebadores específicos.

55 De acuerdo con esta invención, la frase "material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel" significa materiales que contienen celulosa en la industria de la pulpa y el papel, incluidas las materias primas, el material celulósico durante el proceso de fabricación y los productos finales. Ejemplos de tales materiales que comprenden celulosa (materiales celulósicos) son, sin limitarse a ellos, astillas de madera, pulpa mecánica y diversos papeles y cartones. La pulpa, diversos papeles y cartones son materiales preferidos. El cartón de consumo es particularmente preferido y el cartón de embalaje para alimentos y líquidos es el material más preferido que comprende  
 60 celulosa.

En este sentido, el término "cartón de consumo" incluye cartón de embalaje general, cartón de embalaje de alimentos y productos no alimenticios, cartón de embalaje para líquidos, cartón de embalaje para productos farmacéuticos, cartón para cigarrillos y cartón gráfico. La pureza microbiológica del papel o cartón a analizar puede ser de una sola capa o de múltiples capas, así como recubierto o no recubierto. El papel o cartón contiene fibras celulósicas y opcionalmente una cantidad variable de hemicelulosa y, opcionalmente, otros constituyentes y/o recubrimientos. El contenido o  
 65

recubrimiento de hemicelulosa puede tener un efecto sobre la composición óptima de la preparación enzimática. El material de papel y cartón preferido es el cartón de embalaje de consumo, especialmente el cartón de embalaje para líquidos y material alimentario.

5 La suspensión se puede tomar directamente de una fase acuosa del proceso de fabricación. Sin embargo, cuando la suspensión se deriva de un proceso o un producto acuoso, se debe asegurar que la solución sea adecuada para la actividad de preparación enzimática en las siguientes etapas. Si es necesario, se debe cambiar el tampón.

10 Una muestra del material potencialmente contaminado que comprende celulosa puede suspenderse en una solución, típicamente una solución tampón adecuada para la actividad de la preparación enzimática a utilizar. El material de papel o cartón se puede empalmar antes de la etapa de suspensión, por ejemplo, mediante el uso de tijeras. Por lo general, la etapa de suspensión del material de papel o cartón se mejora mediante molienda mecánica y/o por ejemplo, agitación tipo vórtice. Un ejemplo de un método preferido para suspender una muestra se puede encontrar en Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17<sup>a</sup> edición, publicaciones APHA. Las muestras derivadas de procesos de reducción a pulpa pueden someterse a un tratamiento enzimático sin molienda mecánica. Sin embargo, en algunos casos, el tampón de la suspensión debe cambiarse para satisfacer las necesidades de actividad enzimática en la siguiente etapa.

20 Después, una cantidad gravimétrica de una suspensión, preferiblemente homogeneizada, se pone en contacto con una preparación enzimática que contiene una o más actividades de celulasa y opcionalmente hemicelulasa. Típicamente, la preparación enzimática se agrega a la suspensión.

25 La suspensión se trata con enzimas celulolíticas para mejorar la separación de microorganismos y material fibroso. La preparación enzimática de acuerdo con esta invención contiene al menos una enzima que tiene actividad de celulasa. Opcionalmente, la preparación enzimática contiene además actividades de hemicelulasa. La preparación enzimática también puede ser una mezcla de enzimas que tienen actividades de celulasa y opcionalmente una o más actividades de hemicelulasa. La preparación enzimática que contiene varias actividades de celulasa se enriquece preferiblemente con una o más actividades de endoglucanasa. Las enzimas celulasa pueden ser endocelulasas tales como endoglucanasas (EC 3.2.1.4) o celobiohidrolasas exoactivas (EC 3.2.1.91), sin restringirse a ellas, y también pueden tener otras actividades celulolíticas y/o hemicelulolíticas o cualquier mezcla de ellas. Se prefieren las endoglucanasas. Las actividades de endoglucanasa de la familia cel5 son especialmente útiles. Las hemicelulasas pueden ser por ejemplo, xilanasas (EC 3.2.1.8) o mananasas o cualquier mezcla de las mismas. Un ejemplo de una mezcla de enzimas comercialmente disponible útil en la presente invención es Ecostone L900 (AB Enzymes, Finlandia), que es una mezcla de celulasa de *Trichoderma* enriquecida con cel5.

35 El tratamiento enzimático es suave para los microorganismos vivos y reduce la necesidad de una extensa molienda mecánica. Mejora la separación de microorganismos y fibras en los sustratos de papel o cartón, por lo que se mejora la sensibilidad y la precisión de la determinación.

40 Preferiblemente, la preparación enzimática se dosifica en un ligero exceso para asegurar la separación adecuada de microorganismos y fibras en el material que comprende celulosa. Las condiciones incluyen, por ejemplo, la pH, la temperatura y el tiempo de incubación para el tratamiento enzimático (definido como la etapa (b) anterior) deben ser adecuadas para la actividad de preparación enzimática. El tratamiento enzimático también muestra una mejor repetibilidad que los métodos mecánicos de maceración. Después del tratamiento enzimático, la suspensión permite la separación de los microorganismos del material que contiene celulosa utilizando, por ejemplo, centrifugación en bolsa de filtración.

50 La cantidad de impurezas microbiológicas contaminantes (la cantidad de microorganismos) en la pulpa derivada de un proceso de fabricación que funciona correctamente, o de papel o cartón obtenido usando un proceso de fabricación que funciona correctamente, es típicamente muy baja. Por lo tanto, es necesario separar los microorganismos de las fibras restantes. En principio, puede usarse cualquier método conocido para recuperar los microorganismos, pero la centrifugación en bolsa de filtración es la más preferida. Una bolsa de filtración para centrifugación recuperará los microorganismos vivos, pero las fibras residuales restantes se descargarán. Un experto en la materia puede seleccionar un tamaño de poro adecuado para la bolsa de filtro y puede ser por ejemplo, 50 micrómetros.

55 Posteriormente, las células separadas se pueden tratar con monoazida de propidio (PMA). La PMA penetra las membranas de las células muertas y reacciona con los ácidos nucleicos, lo que da como resultado un ADN que no puede amplificarse por PCR. Por lo tanto, solo se puede determinar el ADN de las células viables.

60 A continuación, se aíslan los ácidos nucleicos de los microorganismos separados. De nuevo, se puede usar cualquier método conocido. Un ejemplo de un protocolo adecuado se describe en Rinttilä et al.

65 Finalmente, el material de ácido nucleico aislado se conduce a un análisis de PCR, generalmente a PCR cuantitativa (qPCR). qPCR permite la determinación cuantitativa y cualitativa de microorganismos contaminantes. Un experto en la materia puede seleccionar cebadores de PCR adecuados para, por ejemplo, determinación de bacterias totales; por ejemplo, los cebadores para amplificar la región de ADN<sub>r</sub> 16S se pueden usar en la determinación del contenido

bacteriano total. También es posible usar cebadores específicos para ciertos géneros o especies de microorganismos (un análisis cualitativo, opcionalmente también con un resultado cuantitativo). Las muestras con una curva de amplificación que excede el ciclo de umbral antes de un control sin plantilla y una curva de fusión válida indican la presencia de microorganismos. El resultado de la PCR cuantitativa se calcula utilizando estándares con una cantidad/concentración conocida de microorganismos.

En comparación con los métodos de cultivo utilizados tradicionalmente, qPCR es notablemente más rápida y no requiere tanta mano de obra como el cultivo. El método de la invención también es muy sensible y permite la detección de pequeños cambios en la pureza microbiana del material. Por ejemplo, un material de embalaje de líquidos se considera microbiológicamente puro cuando el recuento total de bacterias por gramo de cartón de embalaje de líquido es inferior a 250 unidades formadoras de colonias (ufc/g) (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17ª edición, publicaciones APHA) Por lo tanto, la sensibilidad y el bajo límite de detección son esenciales para la facilidad de uso del método.

La precisión, la especificidad y la facilidad de uso mejoradas del método de determinación permiten un seguimiento continuo del material producido en el sitio de fabricación y un seguimiento fácil o pruebas aleatorias antes de usar el material de embalaje. Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención mejora la seguridad e higiene de los embalajes de consumo. Además, las impurezas microbiológicas en los procesos de fabricación son perjudiciales para el proceso y el producto resultante. La detección temprana de un posible aumento en el recuento microbiano hace que sea más fácil, por ejemplo, prevenir la formación de depósitos microbianos.

El método descrito en el presente documento es adecuado para la determinación de cualquier tipo de microorganismo. El método es especialmente adecuado para la determinación de bacterias, especialmente especies de *Bacillus* y especies dentro del grupo *Bacillus D*. También es posible determinar hongos y mohos contaminantes.

El uso de la enzima celulasa en el pretratamiento de un material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel antes de la determinación de microorganismos usando PCR cuantitativa también está dentro del alcance de esta invención. La enzima celulasa se puede usar sola o en combinación con otras enzimas celulósicas y/o con una o más enzimas hemicelulasas. Ambas preparaciones de celulasa mixtas y las llamadas preparaciones de celulasa completa que tienen varias actividades hidrolíticas, así como las celulosas que tienen solo una o dos actividades principales son utilizables dentro del alcance de esta invención. Como se conoce en la técnica, el tipo de celulosa depende del tipo de material fibroso. En el uso más preferido, el material de papel o cartón se trata previamente con enzima endoglucanasa antes de la determinación cuantitativa de microorganismos.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Debe entenderse que las realizaciones dadas en la descripción anterior y los ejemplos son solo para fines ilustrativos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Inoculación de cartón de embalaje

Una cepa bacteriana perteneciente al grupo *Bacillus D* se cultivó en TSB (caldo de soja tríplico) durante la noche a +37 °C. Para garantizar la viabilidad, las bacterias se recolectaron durante la fase de crecimiento exponencial. Desde el caldo de crecimiento primario, se transfirió un volumen de 5 mL a 500 mL de caldo fresco y se incubó a +37 °C durante 6 horas. Las células bacterianas se dividieron en tubos Falcon de 10 X 50 mL y se recolectaron por centrifugación. Los 10 sedimentos bacterianos se resuspendieron en un tampón de ácido cítrico estéril de 5 mL (0,05 M, pH 5,0) y se combinaron y se llevaron hasta 200 mL ("material bacteriana"). Se añadió el material bacteriano a una mezcla de cartón-tampón a 20 µL para inóculo bajo y 200 µL para inóculo medio-bajo.

Se inoculó un cartón de embalaje con dos niveles de cepas de *Bacillus* que pertenecen al grupo *Bacillus D* (bajo y medio-bajo). El cultivo se realizó de acuerdo con el protocolo estándar de la FDA (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17ª edición, publicaciones APHA). La dilución en serie de *Bacillus* cultivado como se explicó anteriormente se usó para inoculantes; alto nivel fue una dilución 1:10, y después de medio alto, medio bajo y bajo se diluyeron respectivamente, de modo que el inoculante de bajo nivel se diluyó 1:10.000.

#### Ejemplo 2: Tratamiento con monoazida de propidio.

Para el tratamiento con monoazida de propidio, se disolvió un sedimento que contenía células bacterianas con un vórtice manual a 1980 µL de NaCl al 0,9%. El líquido resultante se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadieron 20 µL de solución de reacción de PMA (monoazida de propidio). Los tubos se agitaron manualmente para mezclar las muestras y luego se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad sin agitación. Después de la incubación, los tubos se invirtieron para homogeneizar las muestras, se colocaron de lado sobre elementos fríos bajo una lámpara de 500 W y se iluminaron durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20.000 x g a + 4 °C durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5804 R) y se retiró el sobrenadante. Después de la centrifugación, el sedimento se secó en un desecador de vacío a +45 °C durante 20 minutos y se disolvió en 45 µL de tampón Tris-EDTA a +55 °C durante 1,5-2 horas.

Ejemplo 3: Extracción de ADN y qPCR

La extracción de ADN para células aisladas del material fibroso se realizó esencialmente como lo describen Rinttilä et al., (2004). En resumen, los reactivos de lisis se agregaron al tubo con perlas de vidrio y el batidor de cuentas FastPrep se usó tres veces a una velocidad de 6,5 m/s durante 1 minuto. Los tubos se incubaron a 65 °C durante 20 min, con agitación tipo vórtice con Thermomixer cada 2 minutos. Se añadieron 800 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:23:1), se mezclaron y se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 minutos. Se transfirieron 600 µL de fase líquida a un tubo nuevo y se extrajo con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se usaron 270 µL de isopropanol al 100% para precipitar el ADN y el líquido se eliminó después de una centrifugación de 20.000 x g a +4 °C durante 15 minutos. El sedimento se lavó dos veces con 1 mL (-20 °C) de etanol al 70% y se centrifugó con 20.000 x g a +4 °C durante 5 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento se secó en un desecador de vacío a + 45 °C durante 20 minutos y se disolvió en 45 µL de tampón Tris-EDTA a +55 °C durante 1,5-2 horas.

Las muestras de ADN se diluyeron 1:2, 1:4 y 1:8 para el análisis de qPCR. Cebadores de amplio rango como se describe en Nadkarni et al., 2002 se utilizaron durante 40 ciclos con una temperatura de hibridación de 60 °C. Los resultados de la muestra se calcularon de acuerdo con una curva estándar basada en estándares diluidos 10 veces.

Ejemplo 4: Filtración por compresión

El cartón de embalaje inoculado con dos niveles de cepas del grupo *Bacillus D*, bajo y medio bajo como se describe en el Ejemplo 1, se homogeneizó con un mezclador Waring en tampón y se presionó con filtración por compresión para separar la fase sólida y la líquida. El resultado de qPCR del filtrado obtenido de una filtración por compresión representó solo el 21 y el 11% del resultado del cultivo para el nivel de inoculación bajo y medio-bajo, respectivamente, véase la Figura 1. Un resultado mucho menor de la filtración por compresión que el resultado del cultivo indica que la filtración por compresión no es un método de separación adecuado para los microbios del cartón de embalaje.

Ejemplo 5: La centrifugación en bolsa de filtración es un método de separación inadecuado para microbios

El cartón de embalaje (10 g) se cortó en trozos pequeños con tijeras estériles, excluyendo los bordes de la muestra del cartón. Las piezas resultantes se mezclaron con 300 mL de tampón de ácido cítrico (0,05 M, pH 5) y se homogeneizaron en un mezclador Waring. Se transfirió una cantidad gravimétrica conocida de un cartón de embalaje remojado con agua y homogeneizado (35 ± 0,1 g) a un tubo Falcon de 50 mL que contenía una bolsa de filtro (bolsa de filtro F57 para estudios de fibra e *in vitro*, Ankom Technology) y se filtró por centrifugación. Idealmente, la matriz indisoluble quedaría atrapada en la bolsa del filtro mientras las bacterias se sedimentarían en el precipitado. Sin embargo, el resultado de qPCR representó el 27% del resultado del cultivo, lo que indica que la sola centrifugación en bolsa de filtración no es un método de separación adecuado para los microbios del cartón de embalaje suspendido en una solución. El resultado usando qPCR y el cultivo se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 6: Tratamiento enzimático

Se probaron cuatro preparaciones enzimáticas que contienen actividades celulolíticas (llamadas "celulasas enteras" o "celulasas mixtas") en relación con su capacidad para descomponer muestras de cartón suspendidas en un tampón. Las enzimas probadas fueron Ecostone L900 (AB Enzymes), Optimase<sup>MR</sup> CX40L, Optimase<sup>MR</sup> CX60L y Multifect (Genencor). Las actividades principales de acuerdo con los anuncios de los fabricantes y otra información disponible públicamente son las siguientes: Ecostone L900 es una preparación de celulasa de *Trichoderma* enriquecida con cel5. La preparación enzimática OPTIMASE<sup>MR</sup> CX 40L contiene celulasa y hemicelulasas como actividades enzimáticas principales. Optimase CX60L contiene múltiples actividades enzimáticas pero está estandarizada en función de su actividad en carboximetilcelulosa (CMC). La xilanasa es la actividad principal para Multifect.

Para garantizar que las actividades enzimáticas no limiten la descomposición del sustrato de cartón, se llevo a cabo la siguiente serie de configuraciones de prueba (véase la Tabla 1) en las que la relación del volumen de la enzima con respecto a la masa de la cartón varió desde 5 a 15 x 10<sup>-5</sup>. La eficiencia no cambió a pesar de que se proporcionó más enzima por cartón, lo que indica que ya el volumen más pequeño contenía tanta enzima que la actividad enzimática no limitó la descomposición del cartón.

Tabla 1.

Configuraciones de prueba	Cartón (g)	Tampón (mL)	Volumen de enzima (mL)
1	10	300	500
2	10	300	700
3	10	250	850
4	10	150	1500
5	15	150	2200
6	20	250	1700

(continuación)

Configuraciones de prueba	Cartón (g)	Tampón (mL)	Volumen de enzima (mL)
7	15	250	1300
8	10	250	800

Todas las enzimas se aplicaron como volumen máximo de modo que la actividad enzimática no limitaría la descomposición del sustrato de cartón. La temperatura de incubación, el pH y otras condiciones se ajustaron al intervalo óptimo para cada enzima de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. La capacidad de las enzimas para descomponer el sustrato de cartón se estimó visualmente y las dos enzimas con celulosa como actividad principal fueron superiores a las otras dos, lo que indica que las celulasas son preferibles a las hemicelulasas.

Ejemplo 7: Análisis de cartones de embalaje enriquecidos con qPCR

Se inocularon dos cartones de embalaje diferentes con cuatro niveles de cepas del grupo *Bacillus D* (bajo, medio bajo, medio alto y alto) como se describe en el Ejemplo 1. El cultivo se realizó de acuerdo con el protocolo estándar de la FDA (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17ª edición, publicaciones APHA). Para el análisis de qPCR, los cartones de embalaje (10 g) se cortaron en trozos pequeños con tijeras estériles, excluyendo los bordes de la muestra de cartón. Las piezas resultantes se mezclaron con 300 mL de tampón de ácido cítrico (0,05 M, pH 5) y se homogeneizaron en un mezclador Waring. Se transfirió una cantidad gravimétrica conocida de cartón de embalaje remojado con agua y homogeneizado ( $35 \pm 0,1$  g) a una botella de almacenamiento y se incubó en una incubadora con agitación a 40 °C con una enzima celulasa (AB Enzymes, Ecostone L900). La muestra se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL que contenía una bolsa de filtro y se filtró por centrifugación. La matriz indisoluble quedó atrapada en la bolsa de filtro mientras las bacterias sedimentadas quedaron en el precipitado. Las muestras para las cuales se midieron células viables se trataron con monoazida de propidio en la etapa de sedimentación antes de que se añadieran los reactivos de lisis. Los resultados de qPCR mostrados en las Figuras 3a y 3b mostraron una excelente linealidad y una baja desviación estándar entre las muestras replicadas. También estuvieron en línea con los resultados del cultivo, es decir, mostraron una buena recuperación y precisión (90 y 97%, respectivamente). El experimento se repitió varias veces usando varios cartones sin inoculación. Los resultados obtenidos usando el tratamiento enzimático y qPCR estuvieron en línea con los resultados de cultivo respectivos. Debido a un nivel muy bajo de microbios endógenos no se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas. No se muestran los datos.

Ejemplo 8: Comparación de la determinación por cultivo y qPCR con y sin pretratamiento con celulasa

El cultivo después de suspender la muestra de cartón mostró un nivel microbiano más alto que la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa cuando no se aplica un pretratamiento enzimático antes de la extracción de ADN y el análisis de qPCR. El pretratamiento con celulasa antes de la extracción de ADN y el análisis de qPCR, sin embargo, muestra una buena conformidad con el resultado del cultivo. La centrifugación en bolsa de filtración se usó para la separación de microbios antes de qPCR. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 9: Pretratamiento enzimático en comparación con otros pretratamientos

El cultivo de las muestras de cartón de embalaje se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo estándar de la FDA (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17ª edición, publicaciones APHA). La filtración por compresión se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 y la centrifugación en bolsa de filtración como se describe en el Ejemplo 5. El tratamiento con enzimas usando Ecostone L900 comercial se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7.

Las muestras pretratadas con celulasa mostraron un nivel respecto al cultivo (similar o ligeramente superior) mientras que otros pretratamientos (filtración por compresión y centrifugación en bolsa de filtración) y muestras sin pretratamiento mostraron un nivel inferior en comparación con el cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Referencias

Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques, y N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148:257-266.

Priha O., Hallamaa K., Saarela M. y Raaska L. Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real time PCR. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2004, volumen 3, no. 4

Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97(6):1166-1177.

Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17ª edición, publicaciones APHA. 2004.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para determinar el contenido de microorganismos en un material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una suspensión de una muestra del material que comprende celulosa; y
  - (b) tratar la suspensión con una o más preparaciones enzimáticas que tienen actividad de celulasa; y
  - (c) separar los microorganismos de la suspensión tratada con enzimas; y
  - (d) aislar ácidos nucleicos de los microorganismos separados; y
  - 10 (e) realizar un análisis de PCR en los ácidos nucleicos aislados,
- en el que el resultado de la PCR indica el contenido de microorganismos.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suspensión se proporciona suspendiendo una muestra en una solución.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la actividad de celulasa es una mezcla de actividades de celulasa.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la actividad de celulasa es al menos una actividad de endoglucanasa.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la preparación enzimática además contiene actividad o actividades de hemicelulasa.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los microorganismos se separan de la suspensión usando centrifugación en bolsa de filtro.
- 30 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material que comprende celulosa es un cartón de consumo, preferiblemente un cartón para la industria alimentaria.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo pertenece a las bacterias.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha bacteria representa una especie de *Bacillus*.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el microorganismo es un hongo o moho.
- 40 11. Uso de celulasa en el pretratamiento de un material que comprende celulosa en la industria de la pulpa y el papel antes de la determinación de microorganismos mediante PCR.
- 45 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el material de papel o cartón se trata previamente con enzima endoglucanasa antes de una determinación cuantitativa de microorganismos.

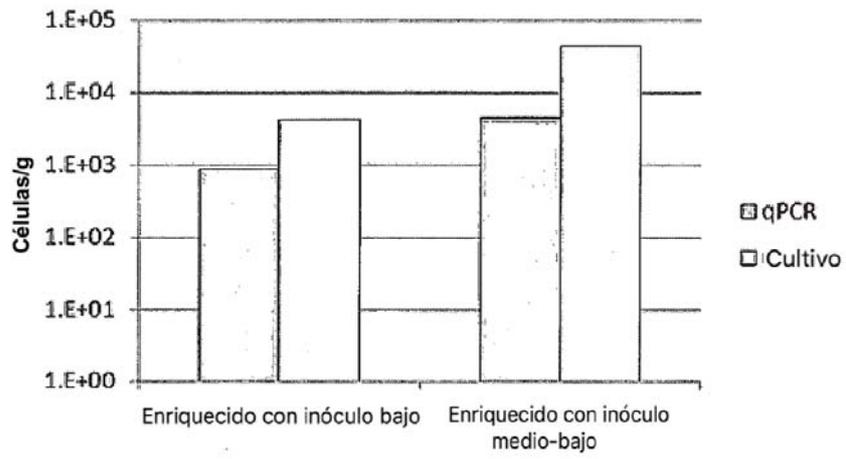


Fig. 1

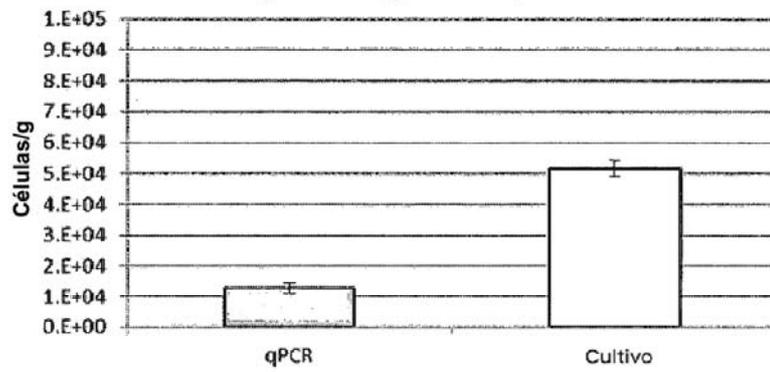


Fig. 2

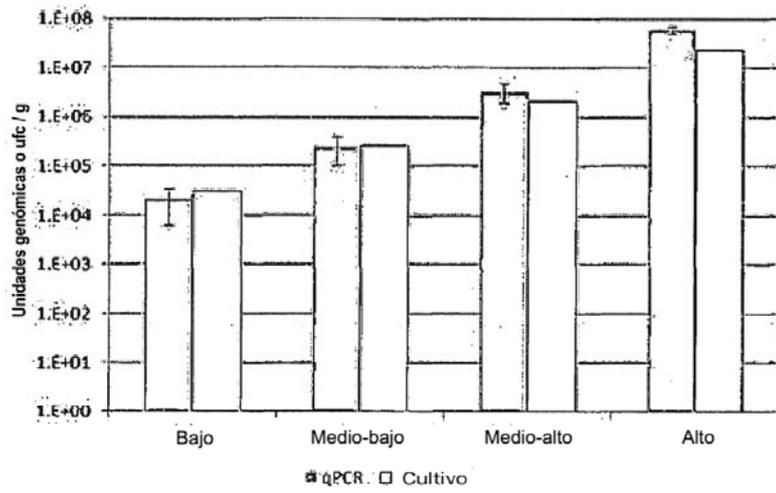


Fig. 3a

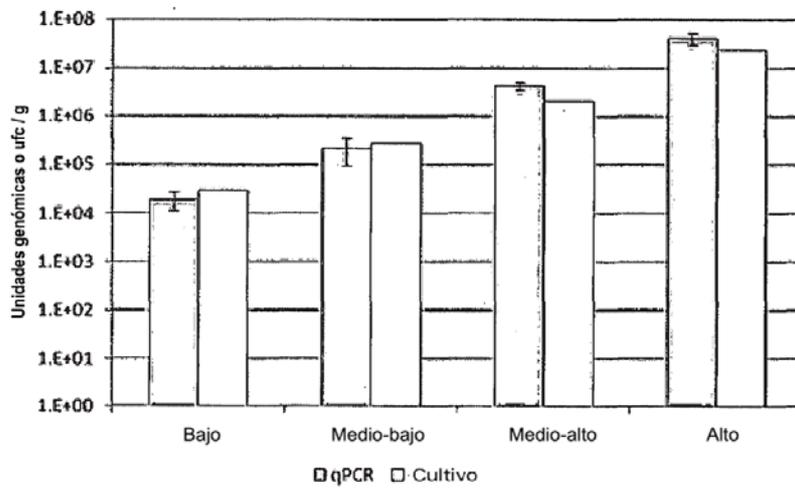
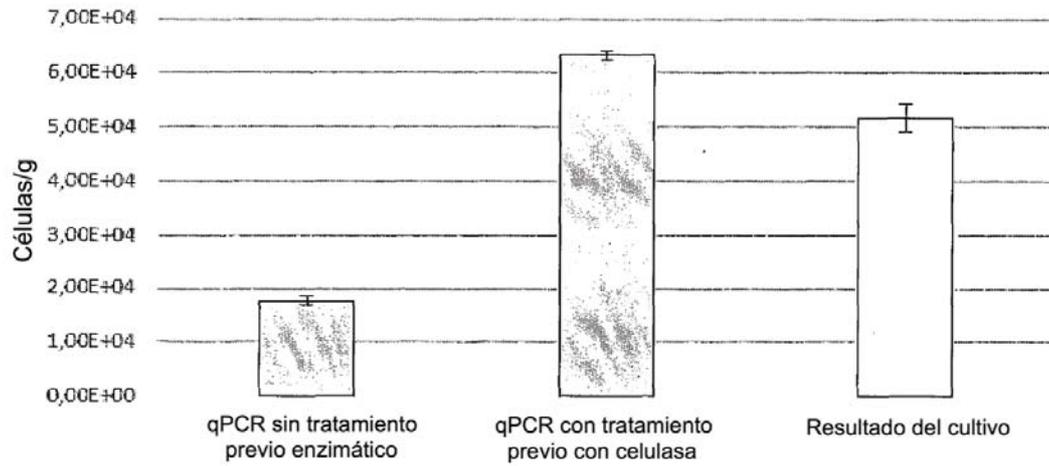
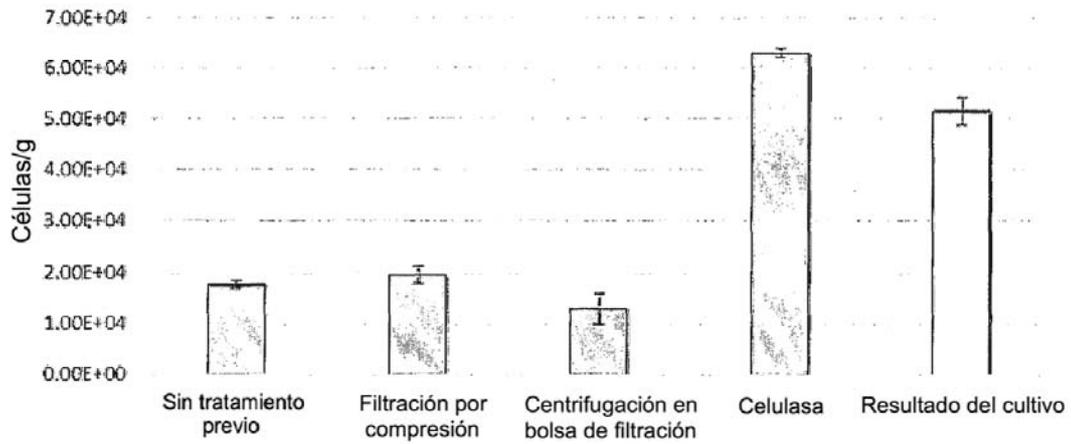


Fig. 3b



**Fig. 4**



**Fig. 5**