

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Februar 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/013078 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/82 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/008318
- (22) Internationales Anmeldedatum:
1. August 2005 (01.08.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 037 062.1 30. Juli 2004 (30.07.2004) DE
10 2005 003 457.8 25. Januar 2005 (25.01.2005) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): IFP PRIVATES INSTITUT FÜR PRODUKTQUALITÄT GMBH [DE/DE]; Teltowkanalstrasse 2, 12247 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARMBRUSTER,

Franz, Paul [DE/DE]; Immundiagnostik AG, Wiesenstrasse 4, 64625 Bensheim (DE). WEBER, Wolfgang [DE/DE]; IFP Privates Institut Produktqualität GmbH, Teltowkanalstrasse 2, 12247 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BENEDUM, Ulrich, Max; Haseltine Lake Partners, Rosenheimer Strasse 30, 81669 München (DE).

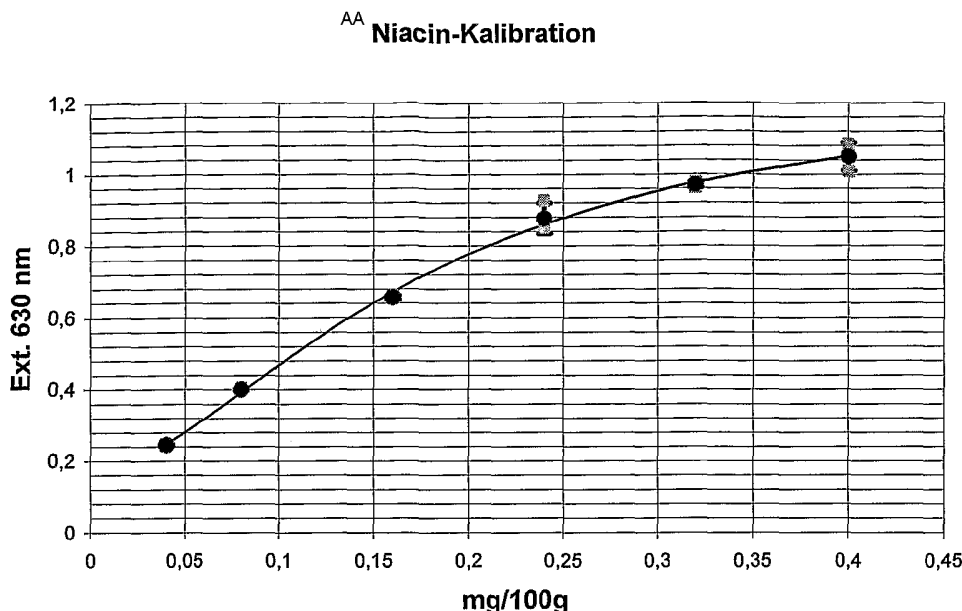
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR MICROBIOLOGICALLY IDENTIFYING VITAMINS IN SUBSTANCE MIXTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND TEILESATZ FÜR DIE MIKROBIOLOGISCHE BESTIMMUNG VON VITAMINEN IN STOFFGEMISCHEN



AA ... NIACIN CALIBRATION

(57) Abstract: The invention relates to a method for quantitatively identifying vitamins, amino acids or other life-essential substances in a substance mixture during which a predetermined number of vital cells of a suitable microorganism are constantly prepared in the culture vessel, i.e. in the cavities of a microtitration plate. The cells are shock-frozen in a freezing solution containing 200 to 500 mM trehalose/sucrose at -80 °C and are then freeze-dried. The freezing solution is preferably the test medium. The culture vessels are preferably the cavities of a microtitration plate.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/013078 A2



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Vitaminen, Aminosäuren oder anderen lebensnotwendigen Stoffen in einem Stoffgemisch, wobei in dem Kulturgefäß, den Kavitäten einer Mikrotiterplatte, jeweils eine vorbestimmte Zahl vitaler Zellen eines geeigneten Mikroorganismus dauerhaft vorbereitet wird. Die Zellen werden hierzu in einer Einfrierlösung, enthaltend 200 bis 500 mM Trehalose/Sucrose, bei -80°C schockgefroren und dann gefriergetrocknet. Die Einfrierlösung ist bevorzugt das Testmedium. Die Kulturgefäße sind bevorzugt die Kavitäten einer Mikrotiterplatte.

VERFAHREN UND TEILESATZ FÜR DIE MIKROBIOLOGISCHE BESTIMMUNG VON VITAMINEN IN STOFFGEMISCHEN

GEBIET DER ERFINDUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Teilesatz für die quantitative
5 Bestimmung von lebenswichtigen Substanzen in Stoffgemischen im Allgemeinen und
insbesondere in Nahrungs- und Futtermitteln, Kosmetika, Medikamenten, pharma-
zeutischen Erzeugnissen, Körperflüssigkeiten, medizinischen und sonstigen analytischen
Proben.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

10 Unter Vitaminen versteht man lebensnotwendige Substanzen, die der Organismus
über die Nahrung aufnehmen muss. Bei ausgewogener Ernährung ist der tägliche
Vitaminbedarf des Menschen völlig gedeckt. Bei Unter- oder Fehlernährung oder einer
Resorptionsstörung kann ein Vitaminmangel auftreten und zu Krankheiten führen wie
Skorbut, Beriberi, Nachtblindheit und sogar Tod. Nahrungersatzprodukte wie Sojamilch
15 für Säuglinge werden daher mit Vitaminen ergänzt. Es werden auch sonst
Nahrungsmitteln mit Vitaminen versetzt. Die biologische Aktivität der Vitaminen ist
strukturabhängig; sie wird in Gewichtseinheiten oder Internationalen Einheiten (IE oder
EU) angegeben. Der Vitamingehalt einer Probe lässt sich aber nur schwer und
zeitaufwendig bestimmen. Dies gilt besonders für die wasserlöslichen Vitamine und die
20 Spurenvitamine B₁₂, Folsäure und Biotin.

Den Vitamingehalt in einem Stoffgemisch kann man bestimmen (i) durch
chemisch-physikalische Verfahren, z.B. durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie
(HPLC). Diese sind für Spurenvitamine wie Vitamin B₁₂, Folsäure und Biotin zu wenig
empfindlich. (ii) Mit immunologischen Verfahren. Sie sind für viele Bestimmungen wegen
25 Matrixeffekten nicht präzise genug sind und müssen auf jede Probenmatrix adaptiert
werden. Dabei treten leicht Interferenzen mit anderen Matrixkomponenten auf, beson-
ders bei Säuglingsnahrung, Katzenfutter, Serum und Blut. (iii) Ferner kann man den
Vitamingehalt im Tierversuch bestimmen, was nicht praxisrelevant ist, und (iv) durch
mikrobiologische Verfahren. Hierbei wird ein Mikroorganismus, für den das zu bestim-
30 mende Vitamin unentbehrlich ist, in einer spezifisch defizienten Nährlösung, versetzt mit
Probe oder Vitaminstandard, gezüchtet und dessen Wachstum beziehungsweise
Stoffwechsel in Abständen gemessen, zum Beispiel titrimetrisch, gravimetrisch, turbidi-

metrisch oder nephelometrisch. Zum Hintergrund der mikrobiologischen Bestimmung seien weiterhin folgende Veröffentlichungen genannt: GORIN,G. et al, Appl. Microbiol., 1970, 20, 641-642; KELLEHER,BP et al., J. Clin. Pathol., 1991, 44(7), 592-595; BUI,M.H., J. Vitam. Nutr. Res., 1999, 69(5), 362-366; MOLOY,A.M. et al., Methods
5 Enzymol., 1997, 281, 43-53. Bei der mikrobiologischen Bestimmung muss man mehrere Verdünnungsreihen anlegen, so dass am Ende der Inkubationszeit ein Wachstums- oder Umsatzwert in den Messbereich der parallelen Standard-Konzentrationsreihe fällt. Für jeden Versuch ist eine nur für diesen Ansatz gültige Standardkurve anzufertigen. Zudem ist aus Sicherheits- und Genauigkeitsgründen jede Konzentrationsstufe der Standard-
10 und der Probenreihe mindestens dreifach anzusetzen. Der Vitamingehalt der Probe wird dann durch Vergleich mit den bekannten Vitamingehalten der parallelen Standardreihe ermittelt. Allgemein gültige Präzisionsangaben sind nicht möglich; der Variationskoeffizient sollte aber bei ungefähr 10 Prozent oder darunter liegen. Die Keim-
15 suspension für die Beimpfung der Standard- und Probenreihe ist nicht lagerfähig und muss für jeden Wachstumsversuch neu angezüchtet werden. Es besteht daher stets die Unsicherheit, ob die Impfsuspension richtig angezüchtet wurde beziehungsweise der Keim die gewünschte Sensitivität und Spezifität hat. Die mikrobiologische Bestimmung von Vitaminen ist sehr arbeits- und zeitaufwendig, und sie bedarf einer erheblichen Labororganisation. Nur wenige Labore im Lebensmittelbereich haben sich auf diese Art
20 der Analytik spezialisiert. Bei den Laborärzten in der Humandiagnostik wurde diese Methode wegen des großen Aufwands aufgegeben, obwohl bis heute keine gleichwertigen Verfahren zur Erfassung des biologisch aktiven Vitamingehalts zur Verfügung stehen. Die mikrobiologische Bestimmung ist aber nach wie vor das Referenzverfahren für alle anderen Verfahren.

25

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren und einen Teilesatz für die mikrobiologische Bestimmung von Vitaminen, Aminosäuren, insbesondere Lysin, Methionin oder Cystin, und anderen lebenswichtigen Substanzen wie Cholin oder Inositol
30 zur Verfügung zu stellen, welches die Nachteile des Stands der Technik nicht aufweist und prinzipiell automatenfähig ist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur quantitativen mikrobiologischen Bestimmung von einzelnen Vitaminen, Aminosäuren oder anderen lebensnotwendigen Stoffen in einem Stoffgemisch, bei dem in dem Kulturgefäß für die mikrobiologische Wachstums- und Stoffwechselbestimmung eine vorbestimmte Zahl vitaler Zellen eines geeigneten Mikroorganismus nach Zusatz von konservierenden Zuckern, Schockgefrieren und Gefriertrocknung trocken gelagert werden. Die Zellen werden hierzu in einer Einfrierlösung, enthaltend zudem 200 bis 500 mM Trehalose/Sucrose, bevorzugt 200 bis 250 mM Trehalose, schockgefroren und gefriergetrocknet werden. Die Einfrierlösung ist bevorzugt das Testmedium für die mikrobiologische Bestimmung. Die Zellen werden in dem Verfahren bei einer Temperatur zwischen -10 und -100°C , bevorzugt zwischen -18 und -80°C schockgefroren. Das erfindungsgemäße Testbesteck beziehungsweise Teilesatz umfasst derart haltbar gemachte Mikroorganismen in vorgegebener Zahl in ein oder mehreren Kulturgefäßen für die Wachstumsversuche bei der mikrobiologischen Bestimmungen. Die Kulturgefäße sind bevorzugt die Kavitäten einer Mikrotiterplatte.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass eine exakte Zahl von Zellen eines geeigneten Mikroorganismus in einem Untersuchungsgefäß in Gegenwart eines nicht-reduzierenden konservierenden Zuckers und eines assayspezifischen Nährmediums so konserviert werden, dass die Zellen für längere Zeiträume bei Raumtemperatur gelagert werden können und dass alle Zellen nach Zugabe der Flüssigkeit homogen weiterwachsen. Die Trocknung und Haltbarmachung erfolgt mit geringen Abwandlungen je nach Organismus durch eine Gefriertrocknung, wobei die Keime bei -80°C in einem kleinen Volumen, bevorzugt 0,5 bis 100 Mikroliter, besonders bevorzugt 1 bis 10 Mikroliter, schockgefroren und dann gefriergetrocknet werden. Der nicht-reduzierende konservierende Zucker ist bevorzugt Trehalose. Es können auch Saccharose (*Sucrose*) und Einfachzucker wie Dextrose zugesetzt werden, um Trocknungsschäden des Mikroorganismus zu begegnen. Die bevorzugt eingesetzten Konzentrationen sind 200 bis 500 mM Trehalose (mit oder ohne *Sucrose*), bevorzugt 200 bis 350 mM Trehalose/*Sucrose*, besonders bevorzugt 200 bis 250 mM Trehalose/*Sucrose*. Die Trehalosekonzentration sollte mindestens etwa 200 mM sein. Der Zusatz von zweiwertigen Ionen wie Ca^{2+} beim Trocknen verbessert den Wachstumsstart. Um zu Vermeiden, dass die Mikroorganismen bei der Gefriertrocknung und der Trockenlagerung ihren Stoffwechsel auf eine Mangelumgebung umstellen, werden sie bevorzugt im späteren Assaymedium, natürlich in Abwesenheit der Bestimmungssubstanz, schock-

gefroren und gefriergetrocknet. Hierdurch wird vermieden, dass während der Gefrier-
 trocknung und der Trockenlagerung Keime generiert werden, die ohne die Bestim-
 mungssubstanz, das Vitamin, wachsen können. Derartige Keime bilden sich ansonsten
 regelmäßig, führen zu einem hohen Messhintergrund und vereinzelt zu falschen Ergeb-
 nissen.

Der Teilesatz ergibt sich als Zwischenerzeugnis aus dem erfindungsgemäßen
 Verfahren. Der Untersuchungskit für die mikrobiologische Bestimmung von Vitaminen
 umfasst vorbereitete Reagenzien wie kalibrierte Standards und Nährlösungen für das
 Ansetzen der Wachstumskurven. Dem Fachmann ist bekannt, dass der Stoffwechsel von
 Mikroorganismen über Stoffwechselendprodukte wie Ethanol oder Milchsäure bestimmt
 werden kann. Der Untersuchungskit enthält dann Reagenzien für den Nachweis dieser
 Stoffwechselendprodukte, beispielsweise über eine geeignete Farbreaktion. Eleganter
 kann das Wachstum der Bakterien auch chemoluminimetrisch bestimmt werden über
 den ATP-Gehalt nach Aufschluss der Bakterienwand und durch Zusatz von Luciferin und
 Luciferase.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist prinzipiell für die mikrobiologische Gehaltsbe-
 stimmung aller Vitamine, Vitaminvorläufer, Vitaminabkömmlingen, Aminosäuren und
 sonstiger lebenswichtigen Substanzen geeignet. Insbesondere empfiehlt es sich für den
 Nachweis von Spurenvitaminen. Als Beispiele seien genannt:

20

Keim für den Nachweis

In Klammern sind die jeweils wichtigsten biologischen Vitamin-Wirkstoffe angegeben.

25	Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin, Hydroxycobalamin)	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> (<i>L. leichmanii</i>) ATCC 7830
	Folsäure (Folsäure, Pteroylglutaminsäure Folsäurekonjugate)	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469
	Biotin	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
30	Pantothensäure (Pantothensäure, Panthenol)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
	Niacin (Nicotinsäure, Nicotinsäureamid)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Vitamin B ₁	<i>Lactobacillus fermentus</i> ATCC 9338,

	(Thiamin, Thiaminpyrophosphat)	<i>Weisella (Lactobacillus) viridescens</i> ATCC 12706
	Vitamin B ₂ (Riboflavin, Riboflavinphosphat)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 <i>Lactobacillus helveticus</i>
5	Vitamin B ₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080 <i>Saccharomyces faecalis</i>
	Cholin	<i>Neurospora crassa</i> ATCC 9277
	Inositol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080
10	Lysin, Methionin, Cystin	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Vitaminbestimmung ist, dass neben der Arbeits- und Zeitersparnis auch alle biologisch gleichwirkenden Verbindungen bestimmt werden. Dies hat für die Bereiche Lebensmittel und Humandiagnostik viele Vorteile:

Lebensmittelbereich, am Beispiel Nicotinsäure und Nicotinsäureamid. Beide Formen sind gleichermaßen vitaminaktiv. Deklariert wird in der Regel nur Niacin, auch wenn beide Formen des Vitamins zugegen sind. Die mikrobiologische Bestimmung erfasst beide Verbindungen.

Humandiagnostik: Auch hier ist die mikrobiologische Analyse im Vorteil. Bis heute werden Serumanalysen falsch interpretiert, da die herkömmlichen Verfahren nur einzelne Formen eines Vitamins erfassen. Die mikrobiologische Analyse liefert den wahren biologisch aktiven Vitamingehalt.

Es ist überraschend, dass das erfindungsgemäße Verfahren reproduzierbare Wachstumskurven mit Standard und Probe ergibt. Zwar werden Mikroorganismen seit Jahrzehnten in Glycerin- und anderen Gefrierlösung oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Auch die Lyophilisierung und die Trocknung von Keimen und Sporen war bekannt. Der Stand der Technik lehrt zudem, prokaryotische Mikroorganismen oder Viren in Gegenwart von Trehalose und divalenten Kationen zu trocknen und aufzubewahren, z.B. in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, wenn eine geschlossene Kühlkette vermieden werden soll (siehe US-Patente 6 610 531; 5 149 653). Ziel dieser

Aufbewahrungsverfahren ist aber die prinzipielle Lebensfähigkeit der Keime und der Erhalt der genetischen und immunologischen Identität. Andererseits war auch bekannt, dass Mikroorganismen nach längerer Lagerung, zum Beispiel in einer Einfrierlösung, unterschiedlich lang brauchen, bis Stoffwechsel und Wachstum einsetzen. Werden die Mikroorganismen nach dem Einfrieren in eine Kulturlösung überführt, dann wird in der Regel der Keim, der sich als schnellstes regeneriert und als erstes zu wachsen beginnt, alle anderen Keime in der Lösung überwachsen. Mit dem schnellstwachsenden Keim wird ein Organismus präferiert, der zu den normal wachsenden verschieden ist. Bislang ging man zudem davon aus, dass jede Form einer Dauerlagerung zu unterschiedlich langen Wachstumsverzögerungen bei der Rekonstitution führt. Die Kombination von mikrobiologischer Vitaminbestimmung und der Gefriertrocknung einer exakten Zahl von Keimen in Gegenwart eines konservierenden Zuckers wie Trehalose in einem Kulturgefäß wie der Kavität einer Mikrotiterplatte oder einem Eppendorfgefäß war nicht bekannt. Es war auch nicht bekannt, dass nach Zugabe von Wasser und Nährmedium dann diese Keime ohne Verzögerungen in ihrer Gesamtheit zu wachsen beginnen, so dass sie für kontrollierte Wachstumsversuche, wie sie bei der mikrobiologischen Vitaminbestimmung erfolgen, verwendet werden können .

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, dass der Mikroorganismus für die Vitaminbestimmung nicht mehr neu angezchtet werden muss, sondern in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte in definierter Zahl und Beschaffenheit vorliegt. Damit entfallen für das Untersuchungslabor alle Zucht- und Verdünnungsschritte. Es müssen nur exakte Mengen vitamindefizientes Nährmedium sowie Probe beziehungsweise Vitamin-Standardkonzentrationen in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte zugesetzt werden. Da die Keime in den Vertiefungen über die Mikrotiterplatten stets gleich sind, ist der Messbereich insgesamt weniger variant. Das heißt, die Mikrotiterplatten können für bestimmte Inkubationszeiten ausgelegt werden. Auch besteht eine viel geringere Gefahr von Verdünnungsfehlern, da letztlich nur die Probe in einfachen Schritten verdünnt werden muss. Die Lösungen mit festen Standardkonzentrationen des zu untersuchenden Vitamins können dem Teilesatz beigelegt werden. Damit werden die Standardkurven zuverlässiger. Die Kontaminationsgefahr ist reduziert. Die Wachstumsmedien sind charakterisiert und für den jeweiligen Keim vorgetestet. Mit der Vitaminbestimmung kann daher sofort begonnen werden, denn Keimzahl, Wachstumszustand, Genotyp des Keims und Testmedium sind überprüft, und für die Mikrotiterplatte, die Keime und die Testmedien kann eine Haltbarkeit von mindestens 12 Monaten garantiert

werden. Die Platten und die Zutaten müssen nur trocken und keimfrei bei Raumtemperatur, ideal bei 4°C gelagert werden.

Durch die Mikrotiterplatte wird die Bestimmung ferner üblichen ELISA und RIA-Verfahren angepasst. Die Mikrotiterplattentechnik erlaubt größte Probenzahlen, den Einsatz von Pipettierautomaten und eine automatisierte Auslesung und Bestimmung von Keimwachstum und Stoffwechselumsatz.

Verfahrenstechnisch wird die Keimsuspension in einer spezifisch vitamindefizienten Lösung in Gegenwart von Trehalose und/oder Sucrose schockgefroren und gefriergetrocknet. Auch in der Natur überleben Keime, indem sie sich vor dem völligen Austrocknen mit einer glasartigen Zuckerschicht schützen. Dieser natürliche Überlebensmechanismus wird erfindungsgemäß genutzt.

Im Gegensatz zur Gefrierlagerung sind die Zellen nach der erfindungsgemäßen Trehalose/Sucrose-Trockenlagerung sofort bei Zugabe von Flüssigkeit beziehungsweise Wasser wieder aktiv. Der übliche Gefrierschock der Zellen entfällt. Die Stabilität der Zellen wird gewährleistet durch den Zusatz von Trehalose/Sucrose zum Medium Einfrier- und Lagermedium. Die Trehalose und die Sucrose bilden mit den Proteinen der Zelle Wasserstoffbrückenbindungen, so dass die Zellen im natürlichen Trockenzustand über Monate haltbar sind. Es bietet sich an, den Zellen Alkali- und Erdalkalitionen anzubieten wie Magnesium, Calcium, Kalium, Natrium. Für jeden Stamm wird der Puffer für die Trockenlagerung und zur Rekonstituierung der Keime zu optimieren sein. In der Regel wurden bislang übliche Tris- und PBS-Lösungen mit je 10 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} als Lagerpuffer verwendet. Wenngleich sie verwendet werden können, bergen sie den Nachteil, dass gefördert durch den Stress der Gefrier Trocknung und Trockenlagerung sich einige Keime bereits auf eine Mangelumgebung einstellen, mutieren oder anderweitig umorientieren, so dass bei Zusatz von Wasser beziehungsweise Probe Keime vorliegen, die ohne Vitamin wachsen können. Es ist daher vorteilhaft, den Mikroorganismus im Assaymedium (ohne Bestimmungssubstanz) in Gegenwart konservierender Trehalose/Sucrose bei -80°C schockzugefrieren und gefrierzutrocknen. So konservierte Bestimmungskeime sind über Monate bei Raumtemperatur stabil, verändern sich nicht und nach Zusatz von Assaymedium mit und ohne Probe wachsen nur die Keime, welche die Bestimmungssubstanz benötigen. Da durch dieses Vorgehen wirklich keine Keime vorliegen, die ohne das Vitamin beziehungsweise die Bestimmungssubstanz wachsen können, kann das Wachstum in einem Verbrauchsversuch (Runoff-Verfahren) bestimmt werden. Mit anderen Worten: 48 Stunden nach Zusatz von

Wasser und vitaminhaltiger Probe haben sich dann beispielsweise die Keime genau so weit vermehrt, bis alle Bestimmungssubstanz verbraucht ist. Alle anderen für das Wachstum notwendige Substanzen sind im Überschuss vorhanden. Ist die Bestimmungssubstanz verbraucht, stellt der Keim das Wachstum ein. Da die Bestimmung von Endpunkten sehr viel weniger fehleranfällig und bequemer ist als die Bestimmung von relativen Wachstumsgeschwindigkeiten, wird hierdurch insgesamt die Bestimmung genauer und reproduzierbarer.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Trockenkeim-Mikrotiterplatte liegt darin, (i) dass bei einer Massenproduktion eine aufwendige Kalibrierung der Zellzahl pro Vertiefung erfolgen werden kann; (ii) dass die vorbereiteten Trockenkeim-Mikrotiterplatten vorab auf Funktionstüchtigkeit und optimale beziehungsweise Mindestinkubationszeiten getestet werden können – diese Werte stehen dem Anwender als Kenndaten der Trockenkeim-Mikrotiterplatte zur Verfügung - und (iii) dass eine Standard-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gleichzeitig mehrere Mess- und Vergleichsreihen mit Proben und Vergleichsstandards erlaubt. Für das Labor entfallen somit nicht nur die Vorbereitungsschritte (Validierungsstudien, Überprüfung der Genauigkeit der Analysen, Charakterisierung von Standard und Testmedium), sondern alle Schritte können auch in automatischen Verfahren oder durch Analyseautomaten erfolgen.

Durch Zugabe von Wasser oder Nährlösung können die Impfkeime in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte für sofortige Wachstumsversuche homogen revitalisiert werden. Damit können alle Reagenzien für eine mikrobiologische Vitaminbestimmung in einem Kit gebrauchsfertig in den Handel gebracht werden. Nicht nur, dass mit den Wachstumsversuchen dann sofort begonnen werden kann, sondern bei der manuellen Analyse stellt dies generell eine wesentliche Arbeitserleichterung dar bei Steigerung von Qualität und Genauigkeit. Die Mikrotiterplattentechnik erlaubt ferner eine Adaption auf Analysevoll- und -halbautomaten. Weitere Vorteile, Aufgaben und Ausführungsformen der Erfindung sind den nachstehenden Beispielen und den Abbildungen zu entnehmen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

Es zeigt:

Figuren 1-7 graphische Darstellung des Wachstums von verschiedenen Mikroplatten-Trockenkeimen gemäß der Erfindung in Abhängigkeit der Konzentration von verschiedenen Vitaminen im jeweiligen Testmedium.

EINGEHENDE BESCHREIBUNG BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

BEISPIELE

Beispiel 1 - Niacin-Bestimmung (Vitamin-B3)

1. *Vorbereitung der Mikrotiterplatte*

5 Es wurde eine Kultur von *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) aus einem Glycerol-Stock in 10 ml Lactobacillus-Medium übergeimpft und 36 Stunden bebrütet. Die Kultur wurde in der logarithmischen Phase durch Abzentrifugieren (2500 G x 5 Minuten) gestoppt, das resultierende Zellpellet 3 x in 0,85% NaCl-Lösung gewaschen, in 10 ml 200mM Trehalose, 10mM CaCl₂ suspendiert, und dann in etwa 1 zu 10 verdünnt mit

10 Difco™ Niacin-Assaymedium, enthaltend Casaminosäuren 12,0 g/L, Dextrose 40,0 g/L, Natriumacetat 20,0 g/L, L-Cystin 0,4 g/L, DL-Tryptophan 0,2 g/L, Adeninsulfate 20,0 mg/L, Guanine-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Uracil 20,0 mg/L, Thiamin-Hydrochlorid 200,0 µg/L, Calcium-Pantothenat 200,0 µg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 400,0 µg/L, Riboflavin 400,0 µg/L, p-Aminobenzoessäure 200,0 µg/L, Biotin 0,8 µg/L, Dikaliumhydrogen-

15 phosphat 1,0 g/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, Magnesiumsulfat 0,4 g/L, Natriumchlorid 20,0 mg/L, Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 20,0 mg/L sowie 200mM Trehalose, 10mM CaCl₂. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass 1 ml Keimsuspension 10⁷ lebensfähige Keime enthielt. Es wurde 3 µl Keimsuspension in jede Kavität der Mikrotiterplatte gegeben, die Keimsuspension in der Kavität bei -80°C im Gefrier-

20 schrank schockgefroren und das Keimpellet am Boden der Kavität durch Anlegen von Vakuum gefriergetrocknet. Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte enthielt so genau 3x10⁴ lebensfähige Keime *Lactobacillus plantarum* im gleichen Wachstumsstadium und zwar verpackt in einem winzigen Trehalose-/Zucker-/Salzpellet. Es ist darauf zu achten, dass ein klebriges Pellet erzielt wird, da ansonsten das Pellet beim Transport aus der Kavität

25 fallen kann. Ansonsten ist ein klebriger Zucker wie Saccharose oder Dextrose der Einfrierlösung zuzusetzen. Die Platten wurden steril und mit Trockenmittel (Sica) lichtdicht verpackt. So konfektionierte Mikrotiterplatten waren über längere Zeiträume bei Raumtemperatur haltbar, ohne dass dies auf die Wachstumsfähigkeit der Keime einen Einfluss hatte.

30 2. *Mikrobiologische Bestimmung*

Es wurde Niacin (Nikotinsäure und Nikotinsäureamid) quantitativ in Lebensmitteln bestimmt. Das Verfahren ist nicht anwendbar bei Proben, die antibiotische oder wach-

tumshemmende Stoffe enthalten. Niacytin wird von *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) nicht verwertet. Die Niacin-Konzentration wurde über die durch Bakterienwachstum erfolgten Trübung im Vergleich zu einer Standardreihe gemessen.

5 *Material:* Alle Glasgefäße und Gerätschaften für die Verdünnungsreihe wurden von Hand mit einer ca. 1%igen Tween® 80- Lösung vorgewaschen, dann mit Salzsäure (0,1 M) und mit NaOH-Lösung (0,1 M) behandelt, dreimal mit Leitungswasser heiß und kalt gespült und schließlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gefäße und Geräte wurden getrocknet, mit geeigneten Verschlüssen (Metallkappen, Aluminiumfolie) versehen und umwickelt und länger als eine Stunde bei mindestens 250°C behandelt.

10 *Probenlagerung:* Säfte und andere verderbliche Proben wurden bis zum Zeitpunkt der Untersuchung gekühlt gelagert.

Vitaminstandard: 10 mg Niacin wurde mit einer Präzisionswaage in ein geeignetes Glasgefäß eingewogen und unter Rühren in 100 ml Wasser gelöst. Die Konzentration der so hergestellten Stammlösung betrug 0,1 mg Niacin pro Milliliter (= 100000 ng/ml).
15 Diese Lösung wurde in zwei Schritten zunächst 1:100 und dann 1:25 auf eine Endkonzentration von 40 ng Niacin/ml verdünnt. Weitere Verdünnungsstufen wurden angefertigt (0,6 ng/150µl, 1,2 ng/150µl, 2,4 ng/150µl, 3,6 ng/150µl, 4,8 ng/150µl, 6,0 ng/150µl = Standardreihe)

Probenaufarbeitung. Zwischen 1 und 10 g Probe wurden in einem Glasgefäß mit
20 Rührstift eingewogen und mit Wasser auf 100 g aufgefüllt. Das Gefäß wurde verschlossen und bei 120°C 2 min sterilisiert. Die Probe wurde dann so verdünnt, dass die zu erwartende Niacin-Konzentration bei ca. 1,2 ng/150µl lag. Die Proben wurden hierzu im Doppelansatz mit einer Reihe unterschiedlicher Probenverdünnungen extrahiert.

25 *Bebrütung:* In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde 150 µl Standard- und Probenlösung sowie 150µl Niacin-defizientes doppelkonzentriertes Assaymedium (Niacin-Medium) zugegeben und mit einer Luft und Wasser undurchlässigen Folie verschlossen. Die Bebrütung erfolgte für 48 h bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank. Die gewählte Temperatur wurde in einem Bereich von ± 0,5°C konstant gehalten.
30 Zwischen Mediumzusatz und dem Beginn der Bebrütung lagen nicht mehr als 30 Minuten.

Auswertung: Nach Ende der Bebrütung wurde die Trübung der Standards und Proben auf der Mikrotiterplatte mit einem ELISA-Reader (ELISA-Photometer) bei 630 nm

(alternativ 540 nm) gemessen. Aus den Werten des Ansatzes wurde der Mittelwert für die jeweilige Konzentrationsstufe berechnet.

Aufstellen der Kalibrierkurve: Die Extinktionswerte der Standardreihe wurde auf Millimeterpapier aufgetragen bzw. mittels geeigneter Software graphisch dargestellt. Die Funktion der den ermittelten Datenpunkten zugehörigen polynomischen Trendlinie 4. Ordnung wurde errechnet. Das Quadrat des Korrelations-Koeffizienten der Werte muss mindestens mehr als 0,990 betragen. Der Korrelationskoeffizient errechnet sich dabei wie folgt:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Berechnung: Durch Einsetzen der ermittelten Proben-Extinktionswerte in y der Funktionsgleichung und mittels der pq-Formel kann der zugehörige x-Wert errechnet werden. Hilfsweise kann der gesuchte x-Wert aus der graphisch erstellen Eichkurve abgelesen werden. Bei Probenverdünnungen mit starker Eigentrübung wurden die ermittelten y-Werte noch im Vergleich zum Messwert einer mitgeführten Sterilkontrolle korrigiert. Der Korrekturwert ergibt sich aus der Messdifferenz zwischen mitgeführter Sterilkontrolle und einer nicht beimpften (getrübten) Probe nach Inkubation im Wasserbad.

Es empfiehlt sich bei jeder fünften Untersuchung als Maßnahme zur Qualitätssicherung eine definierte Probe mitzuführen. Die Ergebnisse sind in einer Mittelwert-Regelkarte einzutragen; die Karte ist mit den aktuellen Rohdaten abzulegen.

Figur 1 zeigt die ermittelte Standardkurve nach 48 Stunden Inkubation von 5×10^4 Trockenzellen in Niacin-Assaymedium. Trotz der Gefriertrocknung in der Mikrotiterplatte und 4wöchiger Lagerung der Trockenkeim-Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur wurden stetige Wachstumskurven mit *Lactobacillus plantarum* erhalten, welche die Bestimmung von Vitamin-B₃ in Standard und Proben erlaubten.

In einem weiteren Vergleichsversuch wurden gleiche Zellzahlen *Lactobacillus plantarum* 72 Stunden in PBS, 20% Glycerin eingefroren. Im nachfolgenden Wachstumsversuch waren die Glycerin-stabilisierten Zellen zwar lebensfähig, das festgestellte Wachstum korrelierte in keiner Weise mit der Menge an Niacin im Assaymedium. Vielmehr war über alle Niacin-Konzentrationen ein nahezu gleiches Wachstum festzustellen. Hier stammte also das Wachstum in allen Fällen von wenigen Startzellen, also von wenigen Zellen, die in der Lösung einen Startvorsprung hatten.

Anders bei den erfindungsgemäß, in Gegenwart eines konservierenden Zuckers getrockneten Keimen von *Lactobacillus plantarum*. Hier tragen, wie die konzentrationsabhängige Wachstumskurve zeigt, alle eingesetzten Zellen am Umsatz und Wachstum in der zugegebenen Standard- und Probenlösung bei. Die Wachstumskurve ist dann nur noch abhängig vom vorhandenen Niacin.

TABELLE 1

Bestimmung der Niacin-Standardkurve und 8 Proben

Standard mg/100g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Varianz (%)
0,04	0,242 0,247 0,246	3	0,245	0,003	1,08
0,08	0,405 0,399 0,398	3	0,401	0,004	0,945
0,16	0,653 0,654 0,663	3	0,657	0,006	0,839
0,24	0,849 0,926 0,854	3	0,876	0,043	4,917
0,32	0,961 0,972 0,979	3	0,971	0,009	0,935
0,4	1,055 1,085 1,008	3	1,049	0,039	3,699
Probe SPL1	0,416 0,413 0,415	3	0,415	0,002	0,368
SPL2	0,551 0,562 0,556	3	0,556	0,006	0,99
SPL3	0,898 0,892 0,906	3	0,899	0,007	0,782
SPL4	1,077 1,102 1,096	3	1,092	0,013	1,196
SPL5	0,299 0,298 0,295	3	0,297	0,002	0,7
SPL6	0,394 0,409 0,396	3	0,4	0,008	2,038
SPL7	0,672 0,674 0,68	3	0,675	0,004	0,616
SPL8	0,866 0,866 0,866	3	0,866	0	0

Die Konzentrationsangabe richtet sich nach der üblichen Gehaltsangabe in der Lebensmittelchemie. Hierbei werden die Vitamine von 1 g Probeeinwaage in 100 ml Wasser extrahiert, 150 µl Extrakt in eine Kavität der Mikrotiterplatte überführt, mehrfach

konzentriertes Testmedium zugesetzt, die Menge an Vitamin bestimmt und schließlich auf 100 g Probe hochgerechnet. Der Standard wurde dementsprechend mit angesetzt.

Beispiel 2 - Folsäure-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Folsäure (Pteroyl-
 5 glutaminsäure und sonstige Folsäurekonjugate) erfolgten wie in Beispiel 1, nur dass als
 Testorganismus *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 verwendet wurde. Als Assay-
 medium wurde Difco™ Folsäure-Casein-Medium verwendet, enthaltend Aktivkohle be-
 handeltes pankreaseverdautes Casein 10,0 g/L, Dextrose 40,0 g/L, Natriumacetat 40,0
 g/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 1,0 g/L, DL-Trypto-
 10 phan 0,2 g/L, L-Asparagin 0,6 g/L, L-Cystein-Hydrochlorid 0,5 g/L, Adeninsulfat 10,0
 mg/L, Guanin-Hydrochlorid 10,0 mg/L, Uracil 10,0 mg/L, Xanthin 20,0 mg/L, Polysorbat-
 80 0,1 g/L, Glutathion (reduziert) 5,0 mg/L, Magnesiumsulfat 0,2 g/L, Natriumchlorid 20,0
 mg/L, Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 15,0 mg/L, Riboflavin 1,0 mg/L, p-Amino-
 15 benzoessäure 2,0 mg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 4,0 mg/L, Thiamin-Hydrochlorid 400,0
 µg/L, Calciumpantothenat 800,0 µg/L, Nikotinsäure 800,0 µg/L, Biotin 20,0 µg/L, 0,05%
 Ascorbinsäure. Das Lagermedium enthielt 200 mM Trehalose. Der Folsäurestandard war
 in 100 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 6.1, 0,1 % Ascorbinsäure gelöst.

Tabelle 2

20

Folsäure-Standardkurve

Standard pg/150µl	Standard µg/100g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz (%)
3,75	0,25	0,261 0,261 0,269	3	0,264	0,005	1,752
7,5	0,5	0,556 0,536 0,544	3	0,545	0,01	1,846
15	1	0,784 0,788 0,807	3	0,793	0,012	1,55
22,5	1,5	0,986 1,002 1,01	3	0,999	0,012	1,223
30	2	1,121 1,074 1,087	3	1,094	0,024	2,218

Die ermittelte Standardkurve ist in Figur 2 graphisch dargestellt.

Beispiel 3 - Vitamin B₁₂-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin, Hydroxycobalamin) erfolgten wie in Beispiel 1, nur dass als Testorganismus *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (*L. leichmanii*) ATCC 7830 verwendet wurde. Als Assaymedium diente Difco™ B₁₂-Assaymedium, enthaltend Casaminosäuren 15,0 g/L, Dextrose 40,0 g/L, Asparagin 0,2 g/L, Natriumacetat 20,0 g/L, Ascorbinsäure 4,0 g/L, L-Cystein 4,0 g/L, DL-Tryptophan 0,4 g/L, Adeninsulfat 20,0 mg/L, Guanin-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Uracil 20,0 mg/L, Xanthin 20,0 mg/L, Polysorbat-80 2,0 g/L, Magnesiumsulfat (wasserfrei) 0,4 mg/L, Natriumchlorid 20,0 mg/L, Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 20,0 mg/L, Riboflavin 1,0 mg/L, p-Aminobenzoessäure 2,0 mg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 4,0 mg/L, Thiamin-Hydrochlorid 1,0 mg/L, Calciumpantothenat 1,0 mg/L, Niacin 2,0 mg/L, Biotin 10,0 µg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 4,0 mg/L, Pyridoxal-Hydrochlorid 4,0 mg/L, Pyridoxamin-Hydrochlorid 800,0 µg/L, Folsäure 200,0 µg/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 1,0 g/L. Das Lagermedium enthielt zudem 200 mM Trehalose.

TABELLE 3

Vitamin-B₁₂-Standardkurve

Standard µg/100 g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz (%)
0,1	0,264 0,271 0,269	3	0,268	0,004	1,345
0,2	0,531 0,51 0,503	3	0,515	0,015	2,831
0,3	0,727 0,721 0,736	3	0,728	0,008	1,037
0,4	0,88 0,863 0,865	3	0,869	0,009	1,069
0,8	1,086 1,073 1,048	3	1,069	0,019	1,807

20

Die ermittelte Vitamin-B₁₂-Standardkurve ist in Figur 3 graphisch dargestellt.

Beispiel 4 - Biotin-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Biotin erfolgten wie in Beispiel 1 mit *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Als Assaymedium diente Difco™ Biotin-Assaymedium, enthaltend Casamino-säuren 12,0 g/L, Dextrose 40,0 g/L, Natriumacetat 20,0 g/L, L-Cystein 0,2 g/L, DL-Tryptophan 0,2 g/L, Adeninsulfat 20,0 mg/L, Guanin-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Uracil 20,0 mg/L, Thiamin-Hydrochlorid 2,0 mg/L, Riboflavin 2,0 mg/L, Niacin 2,0 mg/L, Calciumpantothenat 2,0 mg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 4,0 mg/L, p-Aminobenzoesäure 0,2 mg/L, Magnesiumsulfat (wasserfrei) 0,4 mg/L, Natriumchlorid 20,0 mg/L, Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 20,0 mg/L, , Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 1,0 g/L. Das Lagermedium enthielt zudem 200 mM Trehalose. Die ermittelte Standardkurve ist in Figur 4 gezeigt.

TABELLE 4

Biotin-Standardkurve

Standard ng/150µl	Standard µg/100g	Messung 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Varianz (%)
0.003	0.2	0.205 0.204 0.203	3	0.204	0.001	0.49
0.009	0.6	0.491 0.506 0.5	3	0.499	0.008	1.513
0.015	1	0.676 0.693 0.686	3	0.685	0.009	1.247
0.021	1.4	0.826 0.822 0.82	3	0.823	0.003	0.371
0.027	1.8	0.986 0.988 0.982	3	0.985	0.003	0.31

15

Die zugehörige Standardkurve ist in Figur 4 gezeigt.

Beispiel 5 - B₆-Pyridoxin-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von B₆-Pyridoxin erfolgten wie in Beispiel 1, nur dass als Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 verwendet wurde. Als Assaymedium wurde Difco™ Pyridoxine-Y-Medium verwendet, enthaltend Dextrose 40,0 g/L, L-Asparagin 4,0 g/L, Ammoniumsulfat 4,0 g/L, Kaliumdihydrogenphosphat 3,0 g/L, Magnesiumsulfat 1,0 g/L, Calciumchlorid 0,49 g/L, DL-Methionin 40,0 mg/L, DL-Tryptophan 40,0 mg/L, DL-Isoleucin 40,0 mg/L, DL-Valin 40,0 mg/L, L-Histidin-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Riboflavin 20,0 mg/L, Biotin 8,0 mg/L, Inositol 5,0 mg/L, Eisensulfat 500 µg/L, Thiamin-Hydrochlorid 400,0 µg/L, Calciumpantothenat 400,0 µg/L, Nikotinsäure 400,0 µg/L, Borsäure 200,0 µg/L, Kaliumjodid 200,0 µg/L, Ammoniummolybdat 40,0 µg/L, Mangansulfat 80,0 µg/L, Kupfersulfat 90,0 µg/L, Zinksulfate 80,0 µg/L. Das Lagermedium enthielt zudem 200 mM Trehalose. Die ermittelte Standardkurve ist in Figur 5 gezeigt.

15

TABELLE 5

B₆-Pyridoxin-Standardkurve

Standard mg/100 g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Varianz (%)
0,004	0,298 0,297 0,301	3	0,299	0,002	0,697
0,008	0,394 0,407 0,398	3	0,4	0,007	1,666
0,012	0,522 0,541 0,552	3	0,538	0,015	2,819
0,016	0,73 0,766 0,762	3	0,753	0,02	2,622
0,024	1,049 1,088 1,07	3	1,069	0,02	1,826

Beispiel 6 - Calciumpantothenat-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Calciumpantothenat erfolgten wie in Beispiel 1 mit *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Als Assaymedium

20

wurde Difco™ Pantothenat-Assaymedium verwendet, enthaltend Casaminosäuren 10,0 g/L, Dextrose 40,0 g/L, Natriumacetat 20,0 g/L, L-Cystine 0,4 g/L, DL-Tryptophan 0,2 g/L, Adeninsulfat 20,0 mg/L, Guanin-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Uracil 20,0 mg/L, Thiamin-Hydrochlorid 200 µg/L, Riboflavin 200 µg/L, Niacin 1,0 mg/L, Pyridoxin 800 µg/L, p-
 5 Aminobenzoessäure 200,0 µg/L, Biotin 1,0 µg/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 1,0 g/L, Magnesiumsulfat 0,4 g/L, Natriumchlorid 20,0 mg/L, Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 20,0 mg/L. Das Lagermedium enthielt zudem 200 mM Trehalose. Die ermittelte Standardkurve ist in Figur 6 gezeigt.

10

TABELLE 6

Ca Pantothenat-Standardkurve

Standard mg/100 g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz (%)
0,08	0,075 0,08 0,073	3	0,076	0,004	4,744
0,16	0,181 0,179 0,178	3	0,179	0,002	0,852
0,32	0,389 0,404 0,392	3	0,395	0,008	2,009
0,48	0,49 0,493 0,491	3	0,491	0,002	0,311
0,64	0,589 0,594 0,588	3	0,59	0,003	0,545

Beispiel 7 - Riboflavin-Bestimmung

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Riboflavin erfolgten
 15 wie in Beispiel 1, nur dass *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 als Testorganismus
 verwendet wurde. Als Assaymedium wurde Difco™ Riboflavin-Assaymedium verwendet,
 enthaltend Cas aminosäuren 10,0 g/L, Dextrose 20,0 g/L, Natriumacetat 15,0 g/L,
 Dikaliumhydrogenphosphat 1,0 g/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g/L, L-Asparagin 0,6
 g/L, L-Cystine 0,2 g/L, DL-Tryptophan 0,2 g/L, Magnesiumsulfat 0,4 g/L, Adeninsulfat
 20 20,0 mg/L, Guanin-Hydrochlorid 20,0 mg/L, Uracil 20,0 mg/L, Xanthin 20 mg/L,

Eisensulfat 20,0 mg/L, Mangansulfat 20,0 mg/L, Natriumchlorid 20,0 mg/L, Pyridoxin-Hydrochlorid 4,0 mg/L, Pyridoxal-Hydrochlorid 4,0 mg/L, p-Aminobenzoessäure 2,0 mg/L, Calcipantothemat 800 µg/L, Folsäure 800 µg/L, Nikotinsäure 800 µg/L, Thiamin-Hydrochlorid 400 µg/L, Biotin 1,0 µg/L. Das Lagermedium enthielt zudem 200 mM

5 Trehalose.

TABELLE 7

B₂ Riboflavin - Standardkurve

Standard mg/100g	Messung bei 630 nm	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz (%)
0,1	0,196 0,209 0,206	3	0,204	0,007	3,342
0,2	0,383 0,404 0,408	3	0,398	0,013	3,371
0,3	0,624 0,616 0,628	3	0,623	0,006	0,981
0,4	0,752 0,755 0,771	3	0,759	0,01	1,345
0,5	0,855 0,886 0,9	3	0,88	0,023	2,616

Die ermittelte Standardkurve ist in Figur 7 gezeigt

10 *Beispiel 7 - Thiamin(Vitamin B1)-Bestimmung - hypothetisch*

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte und die Bestimmung von Riboflavin erfolgen wie in Beispiel 1, nur dass *Weissella viridescens* ATCC 12706 als Testorganismus verwendet wird. Als Assaymedium wird Difco™ Thiamin-Assaymedium LV verwendet, enthaltend Thiamin-freien Hefeextrakt 10,0 g/L, Thiamin-freies Trypton 20 g/L, Dextrose
15 20,0 g/L, Natriumcitrat 10,0 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 10,0 g/L, Natriumchlorid 10,0 g/L, Magnesiumsulfat 1,6 g/L, Eisensulfat 0,08 g/L, Mangansulfat 0,28 g/L, Polysorbat-80 2,0 g/L. Das Einfriermedium enthält zudem 200 mM Trehalose.

Der Schutzbereich der Erfindung ergibt sich aus den nachstehenden Ansprüchen, welche gleichfalls zur Offenbarung gehören.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur quantitativen mikrobiologischen Bestimmung von einzelnen Vitaminen, Aminosäuren oder anderen lebensnotwendigen Stoffen in einem Stoffgemisch, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Kulturgefäß für die mikrobiologische Wachstums- und Stoffwechselbestimmung eine vorbestimmte Zahl vitaler Zellen eines geeigneten Mikroorganismus nach Zusatz von konservierenden Zuckern, Schockgefrieren und Gefrieretrocknung trocken gelagert werden.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen in einer Einfrierlösung, enthaltend 200 bis 500 mM Trehalose/Sucrose, bevorzugt 200 bis 250 mM Trehalose, schockgefroren und gefrieretrocknet werden.
10
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Einfrierlösung das Testmedium für die mikrobiologische Bestimmung ist.
15
4. Verfahren nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei die Zellen bei einer Temperatur zwischen -10 und -100°C , bevorzugt zwischen -18 und -80°C schockgefroren und dann gefrieretrocknet werden.
20
5. Verfahren nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei die Bestimmungssubstanz ausgewählt ist aus Vitamin-B₃ (Niacin, Nicotinsäure, Nicotinsäureamid), Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin, Hydroxycobalamin), Folsäure (Folsäure, Pteroylglutaminsäure, Folsäurekonjugate), Biotin, Pantothenensäure (Panonthensäure, Panhenol), Vitamin B₁ (Thiamin, Thiaminpyrophosphat), Vitamin B₂ (Riboflavin, Riboflavinphosphat), Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat), Lysin, Methionin, Cystin, Cholin, Inositol.
25
6. Verfahren nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*, *Enterococcus hirae*; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus helveticus*, *L. veridescenc*, *Streptococcus faecalis*.
30

7. Verfahren nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei das Kulturgefäß eine Mikrotiterplatte ist.
8. Testbesteck zur quantitativen mikrobiologischen Bestimmung von einzelnen Vitaminen, Aminosäuren oder anderen lebensnotwendigen Stoffen in einem Stoffgemisch, umfassend ein Kulturgefäß für die mikrobiologische Wachstums- und Stoffwechselbestimmung, in dem eine vorbestimmte Zahl vitaler Zellen eines geeigneten Mikroorganismus enthalten sind, die durch Zusatz von konservierenden Zuckern, Schockgefrieren und Gefriertrocknung gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7 haltbar gemacht sind.
9. Testbesteck nach Anspruch 8, wobei die Bestimmungssubstanz ausgewählt ist aus Vitamin-B₃ (Niacin, Nicotinsäure, Nicotinsäureamid), Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin, Hydroxycobalamin), Folsäure (Folsäure, Pteroylglutaminsäure, Folsäurekonjugate), Biotin, Pantothenensäure (Pantothenensäure, Panthenol), Vitamin B₁ (Thiamin, Thiaminpyrophosphat), Vitamin B₂ (Riboflavin, Riboflavinphosphat), Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat), Lysin, Methionin, Cystin, Cholin, Inositol,
10. Testbesteck nach Anspruch 8 oder 9, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*, *Enterococcus hirae*; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus helveticus*, *L. veridescenc*, *Streptococcus faecalis*.
11. Testbesteck nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei das Kulturgefäß die Vertiefung einer Mikrotiterplatte ist, bevorzugt einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.

* * * *

Fig. 1

Niacin-Kalibration

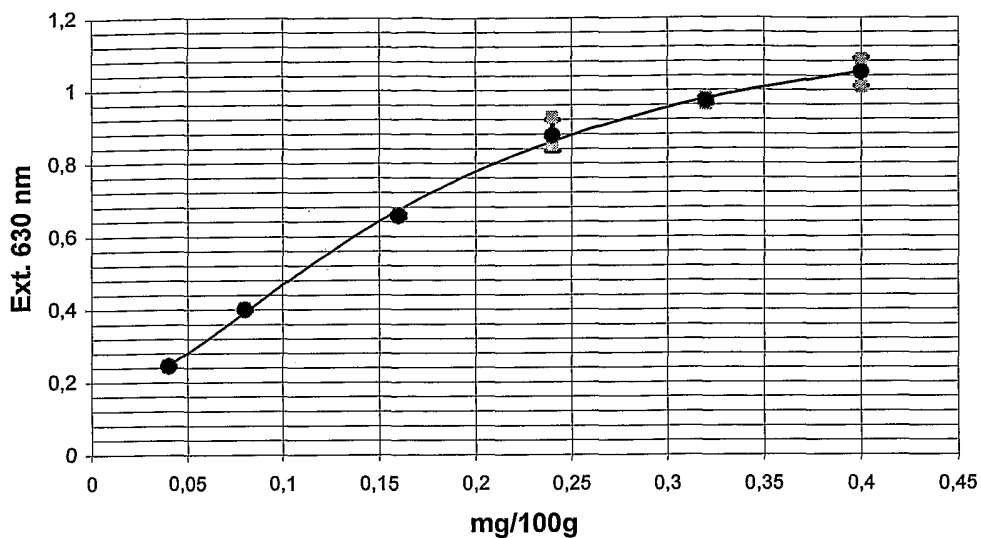
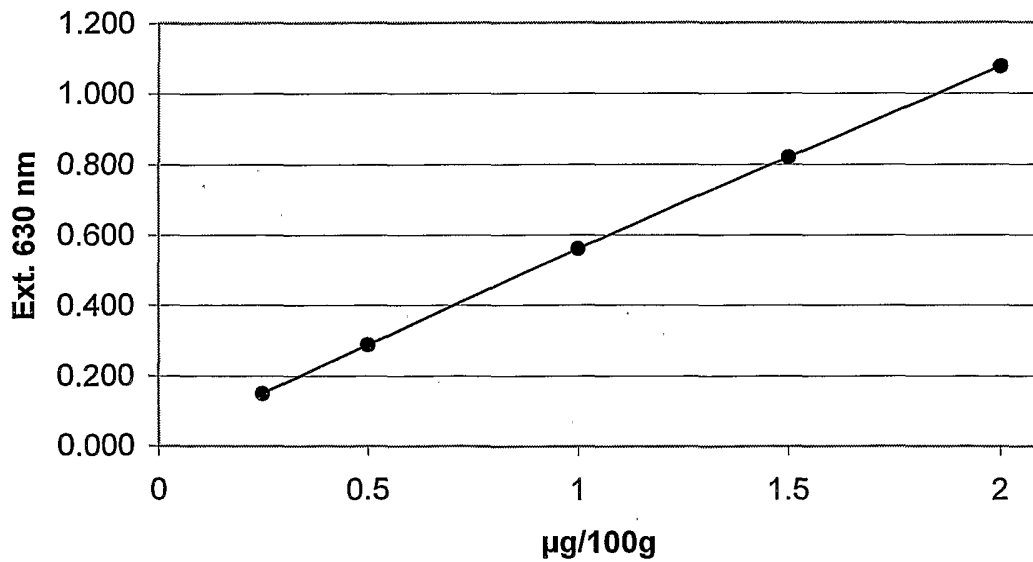


Fig. 2

Folsäure-Standardkurve



2 / 4

Fig. 3

Vitamin B12-Kalibration

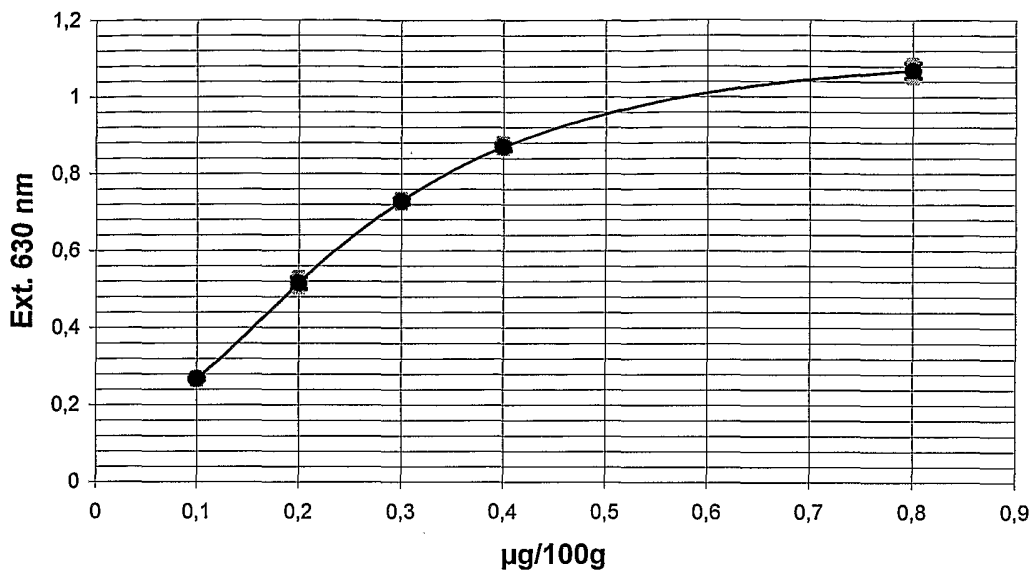
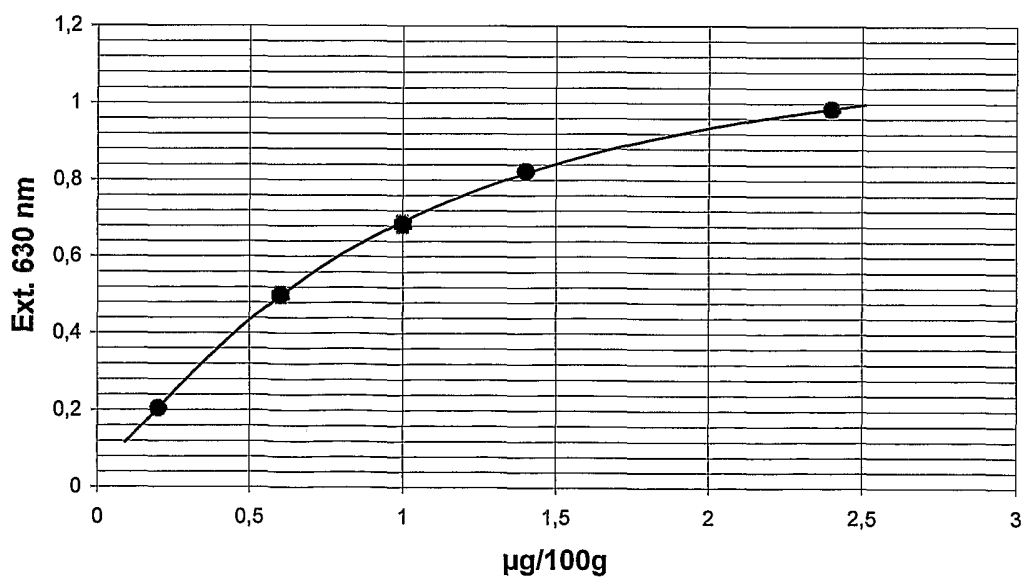


Fig. 4

Biotin-Kalibration



3 / 4

Fig. 5

Vitamin B6-Kalibration

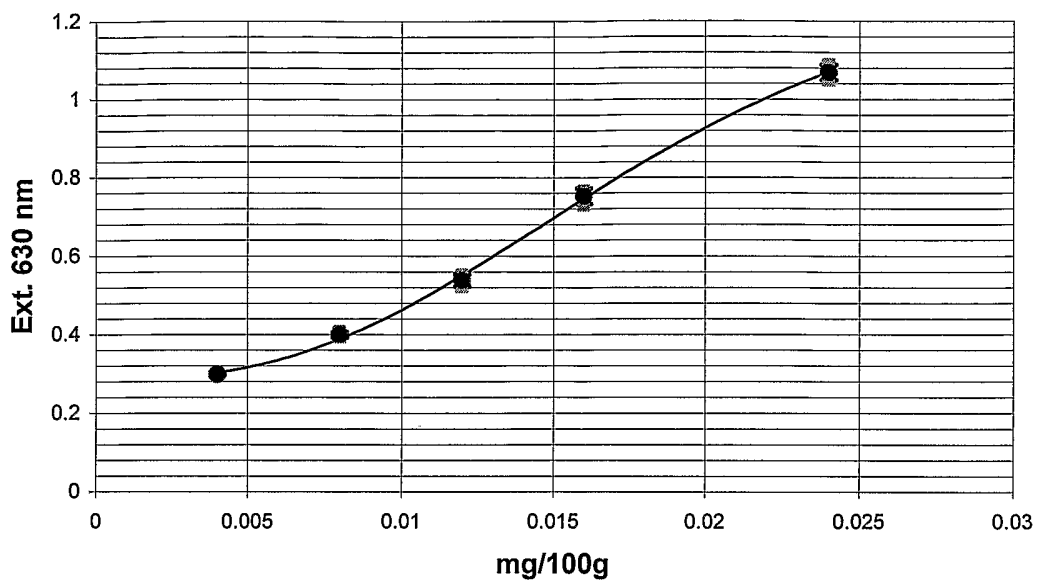
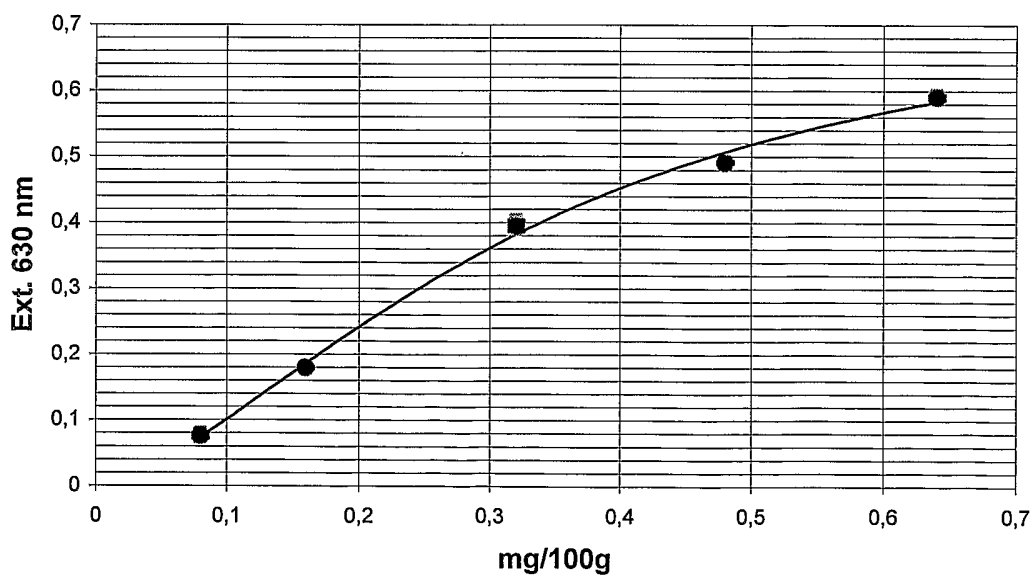


Fig. 6

Kalibration Ca-Pantothenat



4 / 4

Fig. 7

Riboflavin-Standardkurve

