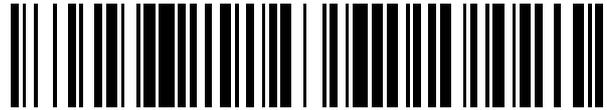


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 679**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2005 E 05779466 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1774021**

54 Título: **Método y kit para la determinación microbiológica de vitaminas en mezclas de sustancias**

30 Prioridad:

**30.07.2004 DE 102004037062**  
**25.01.2005 DE 102005003457**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2014**

73 Titular/es:

**IFP PRIVATES INSTITUT FUR  
PRODUKTQUALITAT GMBH (100.0%)  
TELTOWKANALSTRASSE 2  
12247 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**ARMBRUSTER, FRANZ PAUL y  
WEBER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 442 679 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 y kit para la determinación microbiológica de vitaminas en mezclas de sustancias

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método y a un kit para la determinación cuantitativa de sustancias importantes para la vida que se encuentran en mezclas de sustancias en general y principalmente en alimentos para animales, productos alimenticios, cosméticos, medicamentos, productos farmacéuticos, fluidos corporales, muestras médicas y otras muestras analíticas.

Antecedentes de la invención

10 Por vitaminas se entienden sustancias necesarias para la vida que el organismo debe ingerir mediante la alimentación. En el caso de una alimentación balanceada, la demanda diaria de vitaminas de las personas está completamente satisfecha. En caso de desnutrición o de una alimentación deficiente o de un trastorno de resorción, puede surgir una deficiencia de vitaminas y conducir a enfermedades tales como el escorbuto, beriberi, ceguera nocturna e incluso la muerte. Productos nutritivos complementarios tales como la leche de soja para los lactantes se complementan por lo tanto con vitaminas. De otra manera, los productos alimenticios también se mezclan con  
15 vitaminas. La actividad biológica de las vitaminas depende de su estructura; se indica en unidades de peso o en unidades internacionales (IE o EU). Pero el contenido de vitaminas de una muestra se determina sólo difícilmente y con alto consumo de tiempo. Esto se aplica particularmente para las vitaminas hidrosolubles y las trazas de vitaminas B<sub>12</sub>, ácido fólico y biotina.

20 El contenido de vitamina en una mezcla de sustancias puede determinarse (i) mediante métodos químico-físicos, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Estos son muy poco sensibles para trazas de vitaminas como vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico y biotina. (ii) con métodos inmunológicos. Estos no son suficientemente precisos para muchas determinaciones debido a efectos de matriz y tienen que adaptarse a cada matriz de la muestra. En estos surgen interferencias con otros componentes de la matriz, particularmente en el caso de nutrientes para lactantes, nutrientes para gatos suero y sangre. (iii) además, el contenido de vitaminas puede  
25 determinarse en ensayos con animales, lo cual no es relevante en la práctica, y (iv) mediante métodos microbiológicos. En este caso, se cultiva un microorganismo, para el cual la vitamina a determinarse es imprescindible, en una solución nutriente deficiente de manera específica, se mezcla con la muestra o con un estándar de vitamina y se mide su crecimiento o su metabolismo a intervalos, por ejemplo por medio de titulometría, gravimetría, turbidimetría o nefelometría. En relación con los antecedentes de la determinación microbiológica  
30 pueden mencionarse además las siguientes publicaciones: 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 Enzymol., 1997, 281, 43-53; CONRAD, PB et al, Cryobiology, 2000, 41, 17-24. En la determinación microbiológica tiene que aplicarse varias series de dilución de modo que al final del tiempo de incubación se encuentre un valor de crecimiento o metabólico en el rango de medición de las series de  
35 concentración estándar paralelas. Para cada ensayo tiene que prepararse una curva estándar válida solamente para esta mezcla. Además, por razones de seguridad y precisión, cada etapa de concentración de la serie estándar y de la serie de la muestra tiene que aplicarse al menos tres veces. El contenido de vitamina de la muestra se determine entonces por medio de comparación con los contenidos de vitamina conocidos de la serie estándar paralela. En términos generales, no son posibles datos de precisión válidos; el coeficiente de variación debe encontrarse, no obstante, en aproximadamente 10 por ciento o más bajo. La suspensión del microorganismo para la inoculación de  
40 las series estándar y de la muestra no puede almacenarse y debe cultivarse nuevamente para cada ensayo de crecimiento. Por lo tanto, existe siempre la incertidumbre de si la suspensión de inoculación fue cultivada correctamente o si el microorganismo tiene la sensibilidad y especificidad deseadas. La determinación microbiológica de las vitaminas es muy laboriosa y requiere mucho tiempo y necesita una organización del  
45 laboratorio considerable. Sólo unos pocos laboratorios en el campo de los alimentos se han especializado en este tipo de análisis. Los médicos de laboratorio han cesado de usar este método en diagnósticos humanos debido a que es muy dispendioso han que hasta hoy no se encuentran disponibles métodos equivalentes para la determinación del contenido de vitamina activo biológicamente. Tal como antes, la determinación microbiológica es sin embargo el método de referencia para todos los otros métodos.

50 Resumen de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar un método mejorado y un kit para la determinación microbiológica de vitaminas, aminoácidos, principalmente lisina, metionina o cistina y otras sustancias importantes para la vida tales como colina o inositol, el cual tiene la desventaja del estado de la técnica y el cual es fundamentalmente capaz de automatizarse.

Este objetivo se logra por medio de un método para la determinación microbiológica cuantitativa de vitaminas, aminoácidos individuales, o de otras sustancias necesarias para la vida, en una mezcla de sustancias, en el cual se almacena en seco en el contenedor del cultivo para la determinación microbiológica de crecimiento y metabólica un número predeterminado de células vitales de un microorganismo adecuado después de adicionar azúcares conservantes, congelar de inmediato y secar por congelamiento. Para este propósito se congelan de inmediato las células y se secan por congelamiento en una solución congelante que contiene adicionalmente 200 a 500 mmol/L de trehalosa, preferiblemente 200 a 250 mmol/L de trehalosa. La solución congelante es preferiblemente el medio de ensayo para la determinación microbiológica. En el método, las células se congelan de inmediato a una temperatura entre -10 y -100°C, preferiblemente entre -18 y -80°C. El kit de ensayo o el equipo de prueba según la invención comprenden microorganismos preservados de esta manera en un número predeterminado en uno o varios contenedores de cultivo para los ensayos de crecimiento en las determinaciones microbiológicas. Los contenedores de cultivo son preferiblemente las cavidades de una placa de microtitulación.

El método de la invención se caracteriza porque un número exacto de células de un microorganismo adecuado se conservan de tal manera en un contenedor de prueba en la presencia de un azúcar conservante, no reductor, y de un nutriente específico para el ensayo que las células pueden almacenarse por lapsos de tiempo más largos a temperatura ambiente y que todas las células siguen creciendo homogéneamente después de la adición del líquido. El secamiento y la conservación se efectúan con modificaciones ligeras según el organismo mediante liofilización, en cuyo caso los microorganismos se congelan de inmediato a -80°C en un volumen pequeño, preferiblemente 0,5 a 100 microlitros, particularmente preferible 1 a 10 microlitros y luego se liofilizó. El azúcar conservante no reductor es preferiblemente trehalosa. También pueden adicionarse sacarosa (*sucrosa*) y azúcares simples tales como dextrosa a fin de contrarrestar los daños por secamiento del microorganismo. Las concentraciones empleadas preferiblemente son 200 a 500 mmol/L de trehalosa (con o sin sacarosa), preferiblemente 200 a 350 mmol/L de trehalosa, particularmente preferible 200 a 250 mmol/L de trehalosa. La concentración de trehalosa debe estar al menos aproximadamente en 200 mmol/L. La adición de iones divalentes tales como Ca<sup>2+</sup> durante el secamiento mejora el inicio del crecimiento. A fin de evitar que los microorganismos durante la liofilización y el almacenamiento en seco ajusten su metabolismo a un medio deficiente, preferiblemente se congelan de inmediato y se liofilizan en el medio de ensayo de más tarde, naturalmente en ausencia de la sustancia que va a determinarse. De esta manera se evita que durante la liofilización y el almacenamiento en seco se generen microorganismos que pueden crecer sin la sustancia a determinar, la vitamina. Este tipo de microorganismos se forman regularmente de otra manera, conducen a un fondo de medición y en casos individuales a resultados erróneos.

El kit se proporciona como un producto intermedio del método de acuerdo con la invención. El kit de ensayo para la determinación microbiológica de vitaminas incluye agentes preparados tales como estándares calibrados y soluciones nutrientes para la preparación de las curvas de crecimiento. El experto conoce que el metabolismo de los microorganismos puede determinarse mediante productos metabólicos finales, tales como etanol o ácido láctico. El kit de ensayo contiene entonces reactivos para la detección de estos productos metabólicos finales, por ejemplo mediante una reacción de color adecuada. El crecimiento de las bacterias también puede determinarse elegantemente por medio de quimioluminimetría mediante el contenido de ATP después de la digestión de la pared bacteriana y adicionando luciferina y luciferasa.

El método de acuerdo con la invención es adecuado en principio para la determinación microbiológica del contenido de todas las vitaminas, precursores de vitaminas, derivados de vitaminas, aminoácidos y otras sustancias importantes para la vida. En particular se recomienda para la detección de vitaminas en trazas. Como ejemplo pueden mencionarse:

#### Microorganismos para la detección

Las sustancias activas de vitamina, biológicas, más importantes se indican respectivamente en paréntesis.

45	Vitamina B <sub>12</sub> (Cianocobalamina, hidroxicobalamina)	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ( <i>L. leichmanii</i> ) ATCC 7830
	Ácido fólico (ácido fólico, ácido pteroilglutámico conjugados de ácido fólico)	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469
50	Biotina	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
	Ácido pantoténico (ácido pantoténico, pantenol)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
	Niacina (ácido nicotínico, amida de ácido nicotínico)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
55	Vitamina B <sub>1</sub> (Tiamina, pirofosfato de tiamina)	<i>Lactobacillus fermentus</i> ATCC 9338, <i>Weissella (Lactobacillus) viridescens</i> ATCC 12706
	Vitamina B <sub>2</sub> (Riboflavina, fosfato de riboflavina)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 <i>Lactobacillus helveticus</i>
	Vitamina B <sub>6</sub>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080

(Piridoxina, piridoxal, piridoxamina, piridoxal-5'-fosfato)

Colina

Inositol

5 Lisina, metionina, Cistina

*Saccharomyces faecalis*

*Neurospora crassa* ATCC 9277

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Una ventaja particular de la determinación de vitaminas de acuerdo con la invención es que aparte de ahorrar trabajo y tiempo también se determinan todos los compuestos con acción biológica equivalente. Esto tiene muchas ventajas para los campos de los alimentos y la diagnosis humana:

10 El campo de los alimentos con el ejemplo de ácido nicotínico y la amida de ácido nicotínico. Ambas fuerzas son igualmente activas como vitaminas. Por lo regular sólo se declaran y asesina incluso cuando ambas formas de la vitamina están presentes. La determinación microbiológica detecta ambos compuestos.

15 Diagnosis humana: aquí también es ventajoso el análisis microbiológico. Hasta ahora los análisis de suelo han sido interpretados de manera equivocada ya que los métodos convencionales solamente detectan formas individuales de una vitamina. El análisis microbiológico proporciona el contenido verdadero de la vitamina biológicamente activa.

Es sorprendente que el método de acuerdo con la invención proporcione curvas de crecimiento reproducibles con el estándar y la muestra. Durante décadas, los microorganismos han sido mantenidos en glicerina y otras soluciones congelantes o en nitrógeno líquido. También se conocía la liofilización y el secamiento de microorganismos y horas. El estado de la técnica enseña además el secado y el almacenamiento de microorganismos procariotas o virus en presencia de trehalosa y cationes divalentes, por ejemplo en las cavidades de una placa de microtitulación si se debe evitar una cadena de frío cerrada (véase patentes de Estados Unidos 6 610 531; 5 149 653). El objetivo de este método de almacenamiento es, sin embargo, la viabilidad básica de los microorganismos y la retención de la identidad genética e inmunológica. Por otra parte, también se conocía que después de un largo almacenamiento, por ejemplo en una solución congelante, los microorganismos necesitan lapsos de tiempo, diferentes en su duración, hasta que tengan lugar el metabolismo y el crecimiento. Si los microorganismos después de congelarse se transfieren a una solución de cultivo, entonces por lo regular el microorganismo que se regenera más rápido y comienza a crecer primero, sobrepasa a todos los otros microorganismos en la solución. Con el microorganismo que crece más rápido se prefiere un organismo que sea diferente de los organismos que crecen normalmente. Hasta ahora, además, se suponía que cualquier forma de almacenamiento de largo plazo conduciría después de reconstituir a retrasos en el crecimiento de diferentes duraciones. La combinación de determinación microbiológica de vitamina y secado por congelamiento de un número exacto de microorganismos en presencia de un azúcar conservante, tal como trehalosa contenedor del cultivo tal como la cavidad de una placa de microtitulación o un contenedor Eppendorf no era conocida. Tampoco se conocía que después de adicionar agua y medio nutriente estos microorganismos comenzaran en su integridad a crecer sin retraso de manera que pudieran emplearse para ensayos de crecimiento controlado, tales como los efectuados en la determinación microbiológica de vitaminas.

La ventaja del método de acuerdo con la invención reside en que el microorganismo para la determinación de vitamina ya no necesita cultivarse de nuevo, pero está presente en los pocillos de una placa de microtitulación en un número y estado definidos. De esta manera, el laboratorio de ensayo prescinde de todos los pasos de cultivo y dilución. Solamente tiene que adicionarse cantidades exactas de medio nutriente deficiente en vitamina así como las muestras o las concentraciones estándar de vitamina en los pocillos individuales de la placa de microtitulación. Puesto que los microorganismos en los pocillos sobre las placas de microtitulación siempre son iguales, el rango de medición es menos variable en total. Esto significa que las placas de microtitulación pueden configurarse para determinados tiempos de incubación. También existe un riesgo menor de errores de dilución puesto que finalmente solamente la muestra necesita diluirse en pasos sencillos. Las soluciones con concentraciones estándares fijos de la vitamina que va estudiarse pueden estar incluidas en el kit. Con esto las curvas estándar son más confiables. Se reduce el riesgo de contaminación. Los medios de cultivo se caracterizan y se ensayan previamente para el microorganismo respectivo. De esta manera, la determinación de vitamina puede iniciarse inmediatamente puesto que el número de microorganismos, el estado de crecimiento, el genotipo del microorganismo y el medio de prueba han sido verificados y para la placa de microtitulación, los microorganismos y los medios de ensayo puede garantizarse un tiempo de almacenamiento de al menos 12 meses. Las placas y los ingredientes sólo necesitan almacenarse secos y libres de gérmenes a temperatura ambiente, idealmente a 4 °C.

Mediante la placa de microtitulación se adapta la determinación a los métodos usuales ELISA y RIA. La tecnología de placa de microtitulación permite grandes cantidades de muestras, el empleo de dispositivos automáticos de pipeteo una lectura y determinación automatizadas del crecimiento del microorganismo y de nivel metabólico.

55 De acuerdo con la técnica del método, la suspensión del microorganismo se congela inmediatamente y se secan por congelamiento en una solución específica deficiente de vitamina en presencia de trehalosa y/o sacarosa. En la naturaleza también sobreviven los microorganismos protegiéndose del secado completo con una capa de azúcar glaseada. Este mecanismo de supervivencia natural se utiliza de acuerdo con la invención.

En contraste al almacenamiento congelado, de acuerdo con el almacenamiento en seco con trehalosa de acuerdo con la invención, las células están activas de nuevo inmediatamente después de adicionar líquido o agua. Se suprime el choque de congelamiento habitual de las células. La estabilidad de las células se asegura por medio de la adición de trehalosa/sacarosa al medio congelante y de almacenamiento. La trehalosa y la sacarosa forman con las proteínas de las células enlaces de puente de hidrógeno de modo que las células pueden mantenerse en estado seco natural durante meses. Es apropiado proporcionar a las células iones de metal alcalino y alcalinotérreo tales como magnesio, calcio, potasio, sodio. Para cada cepa, debe optimizarse el amortiguador de pH para el almacenamiento en seco y para la reconstitución de los microorganismos. Por lo regular, hasta ahora, en calidad de amortiguadores de pH de almacenamiento se han empleado soluciones convencionales Tris y PBS cada una con 10 mmol/L de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Aunque podrían emplearse, estos tienen la desventaja de que estimulados por el estrés del secamiento por congelación y almacenamiento en seco algunos microorganismos se adaptan a un ambiente deficiente, mutan o se reorientan de otra manera de modo que al adicionar agua o la muestra se presentan microorganismos que pueden crecer sin vitamina. Por lo tanto es ventajoso congelar inmediatamente y secar por congelamiento el microorganismo en el medio de ensayo (sin la sustancia que va a determinarse) en presencia de trehalosa/sacarosa conservante -80 °C. Los microorganismos que van a determinarse, que se conservan de esta manera, son estables durante meses a temperatura ambiente, no se modifican y después de adicionar medio de ensayo, con y sin muestra, crecen sólo los microorganismos que necesitan la sustancia que va a determinarse. Puesto que de esta manera de proceder de hecho no están presentes microorganismos que podrían crecer sin la vitamina o la sustancia que va a determinarse, el crecimiento puede determinarse en un método de consumo (método run-off). En otras palabras: 48 horas después de adicionar agua y muestra que contiene vitamina, los microorganismos se han multiplicado, por ejemplo, exactamente tanto que se consume toda la sustancia que va a determinarse. Todas las otras sustancias necesarias para el crecimiento están presentes en exceso. Si la sustancia que va a determinarse se consume, el microorganismo deja de crecer. Puesto que la determinación de puntos finales es mucho menos propensa a error y más conveniente que la determinación de velocidades relativas de crecimiento, de esta manera la determinación se vuelve, en total, más exacta y reproducible.

La ventaja de la placa de microtitulación de microorganismo seco de acuerdo con la invención se encuentra en (i) que con la producción en masa puede efectuarse una calibración detallada del número de células por pocillo; (ii) que las placas de microtitulación de microorganismo seco preparadas previamente pueden ensayarse con anticipación para funcionalidad y tiempos de incubación óptimos o mínimos; estos valores están disponibles al usuario como datos característicos de la placa de microtitulación de microorganismo seco, y (iii) que una placa de microtitulación estándar que tiene 96 pocillos permite simultáneamente muchas series de medición y comparación con muestras y estándares de comparación. El laboratorio puede prescindir de esta manera no solamente de los pasos de preparación (estudios de validación, ensayo de la exactitud de los análisis, caracterización de medio estándar y de ensayo) sino de todos los pasos que también pueden efectuarse en el proceso automático o por medio de dispositivos automáticos de análisis.

Adicionando agua o medio nutriente, los microorganismos inoculados en los pocillos de la placa de microtitulación pueden revitalizarse de manera homogénea para ensayos de crecimiento inmediatos. De esta manera, todos los reactivos para una determinación microbiológica de vitamina pueden colocarse en el mercado en un kit listo para usar. No solamente que el ensayo de crecimiento puede iniciarse inmediatamente sino en el caso de análisis manual, esto representa generalmente una facilitación sustancial del trabajo a efectuarse, con un incremento en la calidad y la precisión. La técnica de placa de microtitulación permite además una adaptación a dispositivos analíticos semiautomáticos o totalmente automáticos. Otras ventajas, objetivos y modalidades de la invención pueden entenderse a partir de los siguientes ejemplos y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

Éstos muestran:

Figuras 1-7 son una representación gráfica del crecimiento de diferentes microorganismos secos-microplacas de acuerdo con la invención dependiendo de la concentración de diferentes vitaminas en el medio de prueba respectivo.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

## 50 EJEMPLOS

### Ejemplo 1-determinación de niacina (vitamina B3)

#### 1. Preparación de la placa de microtitulación

Se sobre-inoculó un cultivo de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) a partir de un stock de glicerina en 10 ml de medio de *Lactobacillus* y se incubó por 36 horas. El cultivo se detuvo en la fase logarítmica mediante centrifugado

(2500 G x 5 minutos), el pellet de célula resultante se lavó 3 x en solución de NaCl al 0,85%, se suspendió en 10 ml 200 mmol/L de trehalosa, 10 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> y luego se diluyó en aproximadamente 1 a 10 con medio de ensayo de niacina Difco™ que contiene casamino ácidos 12,0 g/L, dextrosa 40,0 g/L, acetato de sodio 20,0 g/L, L-cistina 0,4 g/L, DL-triptófano 0,2 g/L, sulfato de adenina 20,0 mg/L, guanina clorhidrato 20,0 mg/L, uracilo 20,0 mg/L, tiamina clorhidrato 200,0 mg/L, pantotenato de calcio 200,0 mg/L, piridoxina clorhidrato 400,0 mg/L, riboflavina 400,0 mg/L, ácido p-aminobenzoico 200,0 mg/L, biotina 0,8 mg/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L, hidrofosfato de potasio 1,0 g/L, sulfato de magnesio 0,4 g/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, sulfato de hierro 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 20,0 mg/L así como 200 mmol/L de trehalosa, 10 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>. La solución se ajustó de tal manera que 1 ml de suspensión del microorganismo contuviera 10<sup>7</sup> microorganismos vitales. 3 µl de suspensión del microorganismo se introdujo a cada pocillo que se congeló inmediatamente en el congelador a -80 °C y el pellet de microorganismo se secó por congelamiento en la base del pocillo mediante la aplicación de vacío. Cada pocillo de la placa de microtitulación contenía exactamente 3x10<sup>4</sup> de microorganismos vitales *Lactobacillus plantarum* en la misma etapa de crecimiento y estos se empacó en un pellet diminuto de trehalosa/azúcar/sal. Debe prestarse atención al hecho que se logra un pellet pegajoso puesto que de otra manera el pellet podría caerse del pocillo durante el transporte. De otra manera, debe agregarse azúcar pegajoso tal como sacarosa o dextrosa a la solución congelante. Las placas se empacaron de manera estéril y con un agente secante (Sica) de manera hermética para la luz. Las placas de microtitulación preparadas de esta manera pudieron mantenerse por largos períodos de tiempo a temperatura ambiente, sin que esto tuviera influencia en la capacidad de crecimiento de los microorganismos.

## 2. Determinación microbiológica

La niacina (ácido nicotínico y amida de ácido nicotínico) se determinó cuantitativamente en alimentos. El método no es aplicable en muestras que contienen antibióticos sustancias que impiden el crecimiento. La niacina no se consume por parte de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). La concentración de niacina se midió por medio de la turbiedad causada por el crecimiento bacteriano en comparación con una serie estándar.

Material: Todos los contenedores de videos y aparatos para las series de dilución se lavaron previamente a mano con una solución Tween® 80 de aproximadamente 1%, luego se trataron con ácido clorhídrico (0,1 M) y con solución de NaOH (0,1 M), se colgaron con agua de grifo, caliente y fría, tres veces y finalmente se lavaron con agua destilada. Los contenedores y aparatos se secaron, se proporcionaron cierres adecuados (tapas metálicas, lámina de aluminio) y se envolvieron y trataron por más de una hora a al menos 250 °C.

Almacenamiento de muestras: jugos y otras muestras perecederas se almacenaron refrigerados hasta el momento.

Estándar de vitamina: 10 mg de niacina se pesaron con una balanza de precisión en un contenedor de vidrio adecuado y revolviendo se disolvieron en 100 ml de agua. La concentración de la solución básica producida de esta manera fue de 0,1 mg de niacina por mililitro (= 100000 ng/ml). Esta solución se diluyó luego en dos pasos, primero 1:100 y luego 1:25 hasta una concentración final de 40 ng niacina/ml. Se prepararon otras etapas de dilución (0,6 ng/150µl, 1,2 ng/150µl, 2,4 ng/150µl, 3,6 ng/150µl, 4,8 ng/150µl, 6,0 ng/150µl = serie estándar)

Preparación de la muestra. Entre 1 y 10 g de muestra se pesaron en un contenedor de vidrio con un agitador y se completaron con agua hasta 100 g. El contenedor se cerró y se esterilizó a 120 °C durante dos minutos. La mezcla se diluyó entonces de tal manera que la concentración de niacina a esperar era de alrededor de 1,2 ng/150µl. Para este propósito se extrajeron las muestras en duplicado con una serie de diluciones de muestra diferentes.

Incubación: en los pocillos de una placa de microtitulación se adicionaron 150 µl de solución de estándar y de muestra así como 150 µl de un medio de ensayo doblemente concentrado, deficiente de niacina (medio de niacina) y luego se cerró con una lámina impermeable al aire y al agua la incubación se efectuó durante 48 horas a una temperatura de 37° en una incubadora.

La temperatura seleccionada se mantuvo constante dentro de un rango de ±0,5°C. Entre la adición del medio y el inicio de la incubación no hubo más de 30 minutos.

Evaluación: después de finalizar la incubación, se midió la turbidez de los estándares y de las muestras en la placa de microtitulación con un lector ELISA (fotómetro ELISA) a 630 nm (de modo alternativo a 540 nm). A partir de los valores de las mezclas se calculó un valor medio para la etapa de concentración respectiva.

Preparación de la curva de calibración: los valores de extinción de las series estándar se graficaron o sobre papel milimétrico o se representaron gráficamente por medio de un software adecuado. Se calculó la función de la línea de tendencia polinómica de 4º orden correspondiente a los puntos de datos determinados. El cuadrado de los coeficientes de correlación de los valores debe ser por lo menos de más de 0,990. El coeficiente de correlación se calcula de esta manera tal como sigue:

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

5 Cálculo: estableciendo los valores de extinción de la muestra determinada como y en la ecuación de la función y por medio de la fórmula pq, puede calcularse el valor de x correspondiente. Subsidiariamente, el valor de x buscado puede leerse de la curva de calibración producida gráficamente. En diluciones de la muestra que tienen turbidez propia fuerte, los valores determinados de y se corrigieron en comparación con el valor medido de un control estéril que se llevó a cabo conjuntamente. El valor de corrección resulta de la diferencia de medición entre el control estéril llevado a cabo conjuntamente y una muestra no inoculada (turbia) después de incubar en un baño de agua corrupción.

10 Se recomienda en el caso de cada quinto ensayo realizar conjuntamente una muestra definida para asegurar la calidad los resultados se interesan en una carta de regulación como un valor promedio. Esta carta debe almacenarse con los datos primarios actuales.

15 La figura 1 muestra la curva estándar determinada después de 48 horas de incubación de  $5 \times 10^4$  células secas en medio de ensayo de niacina. A pesar del secado por congelamiento en la placa de microtitulación y almacenamiento por cuatro semanas del microorganismo seco - placa de microtitulación a temperatura ambiente, se obtuvieron curvas de crecimiento consistentes con *Lactobacillus plantarum*, las cuales permitieron la determinación de vitamina B3 en el estándar y en las muestras.

20 En un ensayo comparativo adicional, el mismo número de células de *Lactobacillus plantarum* fue congelado durante 72 horas en PBS, glicerina de 20%. En el siguiente ensayo de crecimiento, aunque las células estabilizadas con glicerina estaban vitales, el crecimiento determinado no se correlacionó de ninguna manera con la cantidad de niacina en el medio de ensayo. Más bien, a través de todas las concentraciones de niacina se determinó un crecimiento virtualmente uniforme. Aquí el crecimiento se originó de esta manera en todos los casos a partir de unas pocas células iniciales, es decir a partir de pocas células que tuvieron una ventaja de inicio en la solución.

25 Esto fue de otra manera en el caso de los microorganismos de *Lactobacillus plantarum* secados de acuerdo con la invención en presencia de un azúcar conservante. Aquí, tal como muestra la curva de crecimiento dependiente de concentración, todas las células contribuyen a la actividad y crecen en la solución adicionada de estándar y de muestra. La curva de crecimiento es entonces dependiente solamente de la niacina presente.

Tabla 1

Determinación de la curva estándar de niacina y 8 muestras					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
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

(continuación)

Determinación de la curva estándar de niacina y 8 muestras					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
Muestra 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

- 5 Los datos de concentración dependen de los datos de contenido usuales en la química de alimentos. Aquí, las vitaminas extraen de 1 g de peso de muestra en 100 ml de agua, se transfieren 150 µl de extracto a un pocillo de la placa de microtitulación, se adicionan medio de ensayo concentrado varias veces, se determina la cantidad de vitamina y finalmente se ajusta a 100 g de muestra. La muestra se calcula de manera correspondiente.

#### Ejemplo 2 - determinación de ácido fólico

- 10 La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de ácido fólico (ácido pteroilglutámico y otros conjugados de ácido fólico) se efectuó tal como en el ejemplo 1, excepto que sólo se empleó *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 como organismo de ensayo. Como medio de ensayo se utilizó medio de ácido fólico-caseína Difco™ que contiene caseína digerida de páncreas tratada con carbón activado, 10,0 g/L, dextrosa 40,0 g/L, acetato de sodio 40,0 g/L, dihidrofosfato de potasio 1,0 g/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L, DL-triptófano 0,2 g/L, L-asparagina 0,6 g/L, L-cisteína-clorhidrato 0,5 g/L, sulfato de adenina 10,0 mg/L, guanina-clorhidrato 10,0 mg/L,
- 15 uracilo 10,0 mg/L, xantina 20,0 mg/L, polisorbato-80 0,1 g/L, glutatona (reducida) 5,0 mg/L, sulfato de magnesio 0,2 g/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, sulfato de hierro 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 15,0 mg/L, riboflavina 1,0 mg/L, ácido p-aminobenzoico 2,0 mg/L, piridoxina-clorhidrato 4,0 mg/L, diaminas-clorhidrato 400,0 µg/L, pantotenato de calcio 800,0 µg/L, ácido nicotínico 800,0 µg/L, biotina 20,0 µg/L, 0,05% de ácido ascórbico. El medio de almacenamiento contenía 200 mmol/L de trehalosa. El estándar de ácido fólico se disolvió en 100 mmol/L de
- 20 amortiguador de pH fosfato de potasio, pH 6.1, 0,1 % ácido ascórbico.

Tabla 2

Curva estándar de ácido fólico						
Estándar pg/150µl	Estándar µg/100g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
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

La curva estándar determinada se ilustra gráficamente en la figura 2

#### 5 Ejemplo 3-determinación de vitamina B<sub>12</sub>

La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina, hidroxicobalamina) se efectuaron como en el ejemplo 1, excepto que se empleó *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (L. leichmanii) ATCC 7830 como organismo de prueba. Como medio de ensayo sirvió el medio de ensayo Difco™ B<sub>12</sub> que contiene casamino ácidos 15,0 g/L, dextrosa 40,0 g/L, asparagina 0,2 g/L, acetato de sodio 20,0 g/L, ácido ascórbico 4,0 g/L, L- cisteína 4,0 g/L, DL-triptófano 0,4 g/L, sulfato de adenina 20,0 mg/L, guanina-clorhidrato 20,0 mg/L, uracilo 20,0 mg/L, xantina 20, 0 mg/L, polisorbato-80 2,0 g/L, sulfato de magnesio (anhidro) 0,4 mg/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, sulfato de hierro 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 20,0 mg/L, riboflavina 1,0 mg/L, ácido p-aminobenzoico 2,0 mg/L, piridoxina-clorhidrato 4,0 mg/L, tiamina-clorhidrato 1,0 mg/L, pantotenato de calcio 1,0 mg/L, niacina 2,0 mg/L, biotina 10,0 mg/L, piridoxina- clorhidrato 4,0 mg/L, piridoxal- clorhidrato 4,0 mg/L, piridoxamina- clorhidrato 800,0 µg/L, ácido fólico 200,0 µg/L, dihidrofosfato de potasio 1,0 g/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L. El medio de almacenamiento contenía además 200 mmol/L de trehalosa.

Tabla 3

Vitamina-B12 Curva estándar					
Estándar mg/100g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
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 La curva estándar determinada de vitamina B<sub>12</sub> se representa gráficamente en la figura 3.

#### Ejemplo 4-determinación de biotina

5 La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de biotina se efectuaron como en el ejemplo 1 con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Como medio de ensayo sirvió el medio de ensayo de biotina Difco™ que contiene casamino ácidos 12,0 g/L, dextrosa 40,0 g/L, acetato de sodio 20,0 g/L, L-cisteína 0,2 g/L, DL-triptófano 0,2 g/L, sulfato de adenina 20,0 mg/L, guanina-clorhidrato 20,0 mg/L, uracilo 20,0 mg/L, tiamina-clorhidrato 2,0 mg/L, riboflavina 2,0 mg/L, niacina 2,0 mg/L, pantotenato de calcio 2,0 mg/L, piridoxina-clorhidrato 4,0 mg/L, ácido p-aminobenzoico 0,2 mg/L, sulfato de magnesio (anhidro) 0,4 mg/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, sulfato de sodio 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 20,0 mg/L, dihidrofosfato de potasio 1,0 g/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L. El medio de almacenamiento contenía además 200 mmol/L de trehalosa. La curva estándar determinada se muestra en la figura 4.

10

Tabla 4

Biotina-Curva estándar					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
STD1	0,205	3	0,204	0,001	0,49
	0,204				
	0,203				
STD2	0,491	3	0,499	0,008	1,513
	0,506				
	0,5				
STD3	0,676	3	0,685	0,009	1,247
	0,693				
	0,686				
STD4	0,826	3	0,823	0,003	0,371
	0,822				
	0,82				
STD5	0,986	3	0,985	0,003	0,31
	0,988				
	0,982				

La curva estándar correspondiente se muestra en la figura 4.

#### Ejemplo 5-determinación de B<sub>6</sub>-piridoxina

15 La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de B<sub>6</sub>-piridoxina se efectuaron como en el ejemplo 1, excepto que como organismo de ensayo se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080. Como organismo de ensayo se usó medio de piridoxina – Y Difco™ que contiene dextrosa 40,0 g/L, L-asparagina 4,0 g/L, sulfato de amonio 4,0 g/L, dihidrofosfato de potasio 3,0 g/L, sulfato de magnesio 1,0 g/L, cloruro de calcio 0,49 g/L, DL-metionina 40,0 mg/L, DL-triptófano 40,0 mg/L, DL-isoleucina 40,0 mg/L, DL-valina 40,0 mg/L, L-histidina-clorhidrato 20,0 mg/L, riboflavina 20,0 mg/L, biotina 8,0 mg/L, inositol 5,0 mg/L, sulfato de hierro 500 µg/L, tiamina-clorhidrato 400,0 µg/L, Pantotenato de calcio 400,0 µg/L, ácido nicotínico 400,0 µg/L, ácido bórico 200,0 µg/L, yoduro de potasio 200,0 µg/L, molibdato de amonio 40,0 µg/L, sulfato de manganeso 80,0 µg/L, sulfato de cobre 90,0 µg/L, sulfato de zinc 80,0 µg/L. El medio de almacenamiento contenía además 200 mmol/L de trehalosa. La curva estándar determinada se muestra en la figura 5.

25

Tabla 5

B <sub>6</sub> -Piridoxina-Curva estándar					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
0,004	0,298	3	0,299	0,002	0,697
	0,297				
	0,301				
0,008	0,394	3	0,4	0,007	1,666
	0,407				
	0,398				
0,012	0,522	3	0,538	0,015	2,819
	0,541				
	0,552				

(continuación)

B <sub>6</sub> -Piridoxina-Curva estándar					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
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

**Ejemplo 6 - determinación de pantotenato de calcio**

- 5 La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de pantotenato de calcio se efectuaron como en el ejemplo 1 con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Como medio de ensayo se utilizó medio de ensayo pantotenato Difco™ que contenía casamino ácidos 10,0 g/L, dextrosa 40,0 g/L, acetato de sodio 20,0 g/L, L-cistina 0,4 g/L, DL-triptófano 0,2 g/L, sulfato de adenina 20,0 mg/L, guanina-clorhidrato 20,0 mg/L, uracilo 20,0 mg/L, tiamina-clorhidrato 200 mg/L, riboflavina 200 mg/L, niacina 1,0 mg/L, piridoxina 800 mg/L, ácido p-aminobenzoico 200,0 mg/L, biotina 1,0 mg/L, dihidrofosfato de potasio 1,0 g/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L, sulfato de magnesio 0,4 g/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, sulfato de hierro 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 20,0 mg/L. El medio de almacenamiento contenía además 200 mmol/L de trehalosa. La curva estándar determinada se muestra en la figura 6.

Tabla 6

Ca Pantotenato-Curva estándar					
Estándar mg/100 g	Medición a 630 nm	Cantidad	Valor medio	Desviación estándar	Varianza (%)
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

**15 Ejemplo 7-determinación de riboflavina**

- La preparación de la placa de microtitulación y la determinación de riboflavina se efectuaron como en el ejemplo 1 sólo que se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 como organismo de ensayo. Como medio de ensayo se utilizó medio de ensayo de riboflavina Difco™, que contiene cas aminoácidos 10,0 g/L, dextrosa 20,0 g/L, acetato de sodio 15,0 g/L, hidrofosfato dipotásico 1,0 g/L, dihidrofosfato de potasio 1,0 g/L, L-asparagina 0,6 g/L, L-cistina 0,2 g/L, DL-triptófano 0,2 g/L, sulfato de magnesio 0,4 g/L, sulfato de adenina 20,0 mg/L, guanina-clorhidrato 20,0 mg/L, uracilo 20,0 mg/L, xantina 20 mg/L, sulfato de hierro 20,0 mg/L, sulfato de manganeso 20,0 mg/L, cloruro de sodio 20,0 mg/L, piridoxina-clorhidrato 4,0 mg/L, piridoxal-clorhidrato 4,0 mg/L, ácido p-aminobenzoico 2,0 mg/L, pantotenato de calcio 800 µg/L, ácido fólico 800 µg/L, ácido nicotínico 800 µg/L, tiamina-clorhidrato 400 µg/L, biotina 1,0 µg/L. El medio de almacenamiento contenía además 200 mmol/L de trehalosa.

25

Tabla 7

<b>B2 Riboflavina -Curva estándar</b>					
<b>Estándar mg/100g</b>	<b>Medición a 630 nm</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Valor medio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Varianza (%)</b>
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

La curva estándar determinada se muestra en la figura 7.

- 5 El campo de protección de la invención resulta de las siguientes reivindicaciones que pertenecen igualmente a la divulgación.

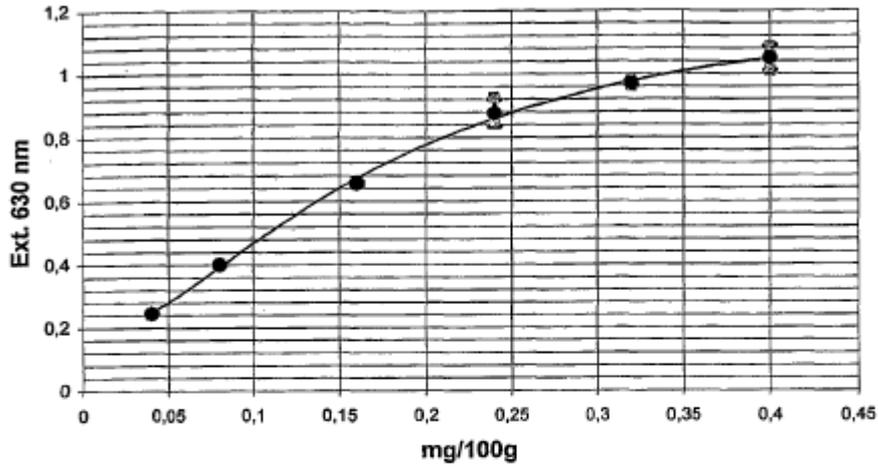
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación microbiológica cuantitativa de vitaminas, aminoácidos individuales u otras sustancias esenciales para la vida en una mezcla de sustancias, caracterizado porque en el contenedor del cultivo para la determinación del crecimiento y metabolismo se congela inmediatamente y se seca por congelamiento una cantidad predeterminada de células vitales de un microorganismo adecuado en una solución congelante en presencia de 200 a 500 mmol/L de trehalosa y porque las células se almacenan secas en el recipiente de cultivo hasta su uso.
2. Método según la reivindicación 1, en cuyo caso la solución congelante contiene 200 a 250 mmol/L de trehalosa.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en cuyo caso la solución congelante es el medio de ensayo para la determinación microbiológica.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso las células se congelan inmediatamente a una temperatura entre -10 y -100°C, preferiblemente entre -18 y -80°C y luego se secan por congelamiento.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso la sustancia que va determinarse se selecciona de vitamina B<sub>3</sub> (niacina, ácido nicotínico, amida de ácido nicotínico), vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina, hidroxicobalamina), ácido fólico (ácido fólico, ácido pteroilglutámico, conjugados de ácido fólico), biotina, ácido pantoténico (ácido pantoténico, pantenol), vitamina B<sub>1</sub> (tiamina, pirofosfato de tiamina), vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina, fosfato de riboflavina), vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina, piridoxal, piridoxamina, piridoxal-5'-fosfato), lisina, metionina, cistina, colina, inositol.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso el microorganismo se seleccionan de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, *Enterococcus hirae*; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus helveticus*, *L. veridescenc*, *Streptococcus faecalis*.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso el contenedor del cultivo es una placa de microtitulación.
- 25 8. Kit de ensayo para la determinación microbiológica cuantitativa de vitaminas, aminoácidos individuales o de otras sustancias esenciales para la vida en una mezcla de sustancias, el cual comprende contenedores de cultivo para el desarrollo microbiológico y la determinación de metabolismo, en cuyo caso los contenedores de cultivo son los pocillos de una placa de microtitulación que contienen respectivamente una cantidad predeterminada de células vitales de un microorganismo adecuado, los cuales mediante adición de una solución congelante contienen 200 a 30 500 mmol/L de trehalosa y se vuelven capaces de conservarse mediante congelamiento inmediato y secamiento por congelamiento para un almacenamiento seco a temperatura ambiente.
9. Kit de ensayo según la reivindicación 8, en cuyo caso el microorganismo se selecciona de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, *Enterococcus hirae*; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus helveticus*, *L. veridescenc*, *Streptococcus faecalis*.

35

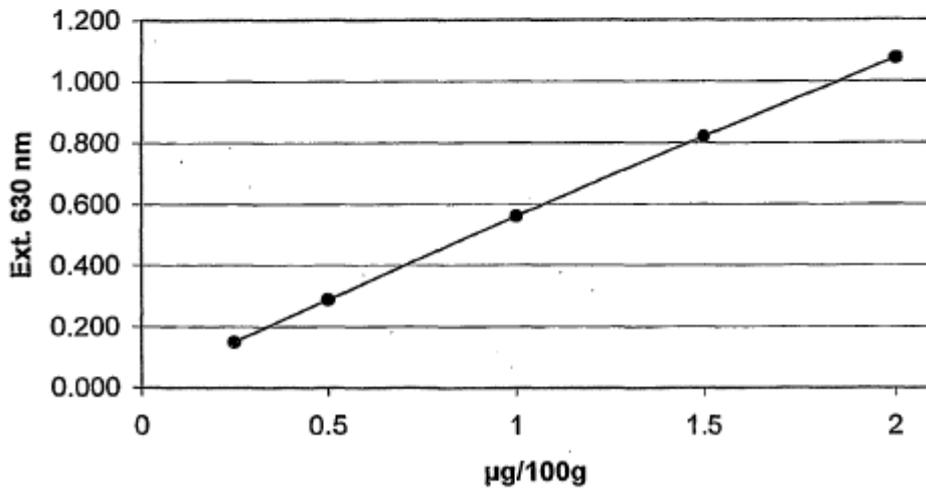
**Fig. 1**

**Calibración de niacina**



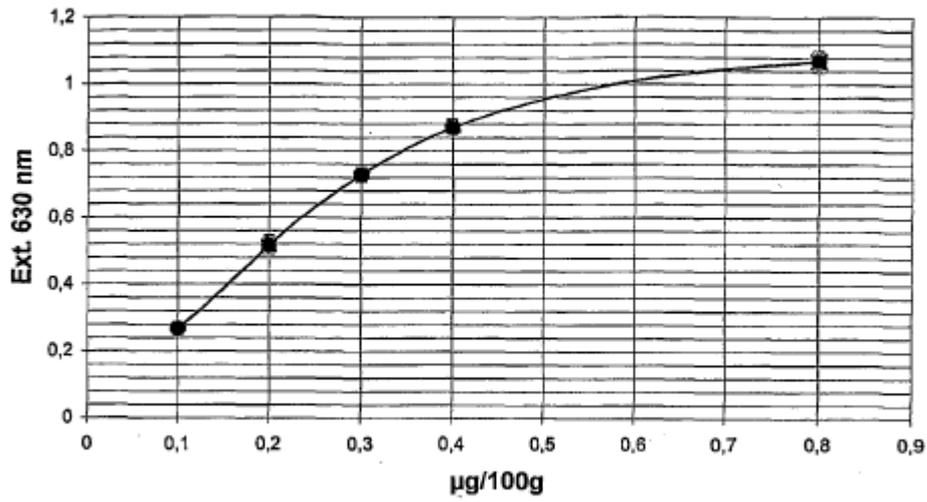
**Fig. 2**

**Curva estándar ácido fólico**



**Fig. 3**

Calibración - Vitamina B12



**Fig. 4**

Calibración - biotina

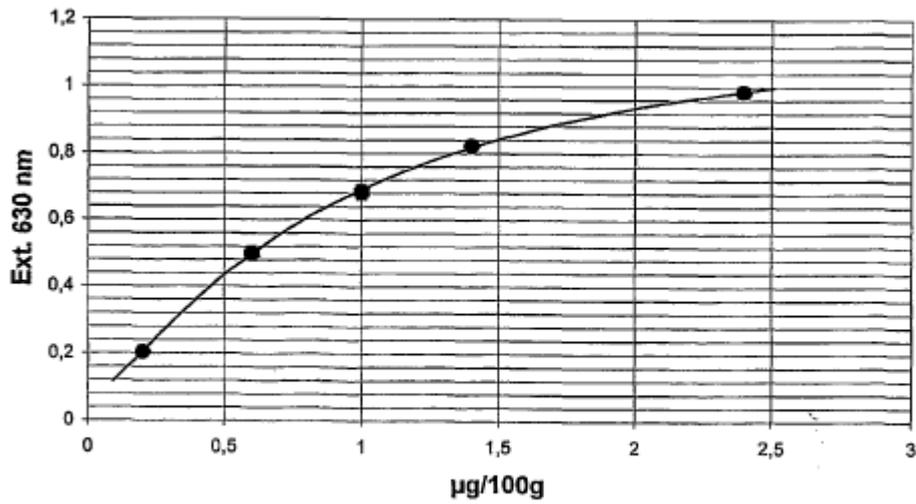


Fig. 5

Calibración - vitamina B6

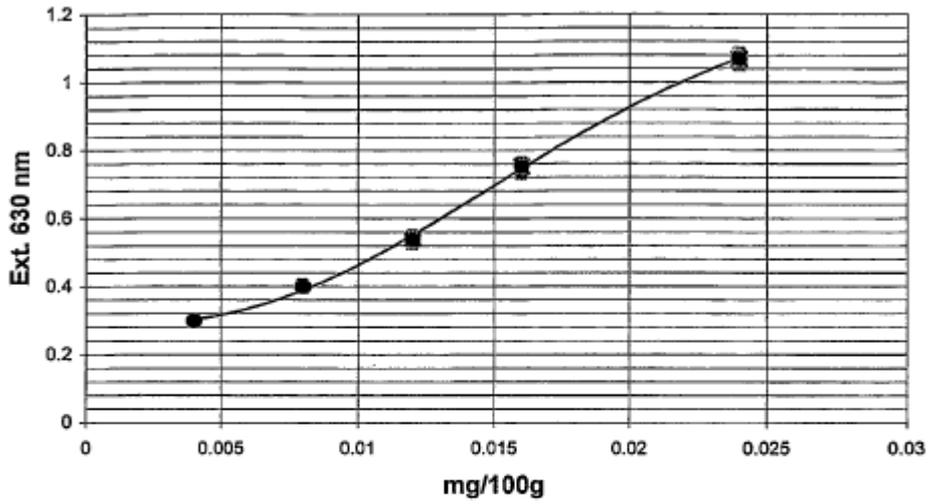


Fig. 6

Calibración Ca pantotenato

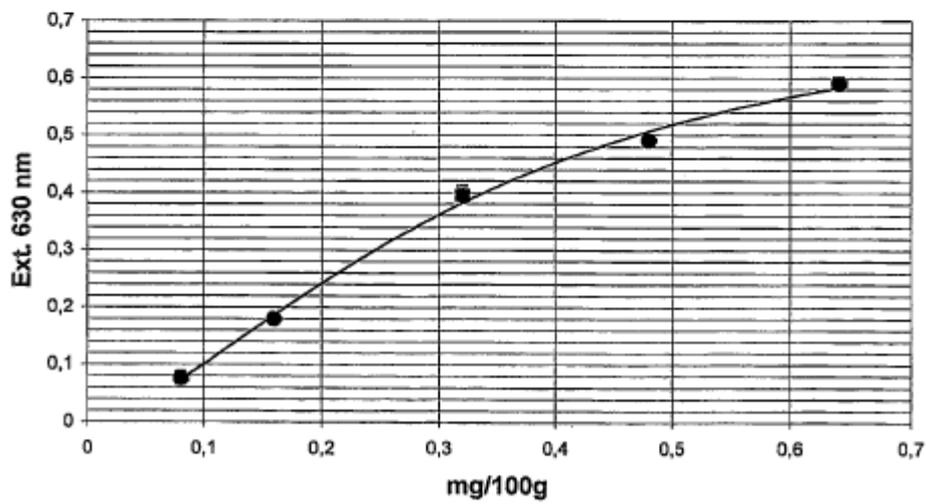


Fig. 7

Curva estándar - riboflavina

