



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **240 030 A1**

4(51) C 12 Q 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 279 355 3	(22)	05.08.85	(44)	15.10.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Gartz, Jochen, Dr. rer. nat.; Pickert, Henning, Dr. rer. nat.; Zirkler, Walter, Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen. Das Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches und wenig aufwendiges Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen zu entwickeln, derart, daß keine Lipide, die Analysenergebnisse verfälschen können und eine selektive Bestimmung in der Suspension von Kohlenwasserstoffen, Biomassekonzentrationen und der Kohlenwasserstoffe in den Zellen ermöglichen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem kohlenwasserstoff- und mikroorganismenhaltige Dispersionen mit vorzugsweise nichtbrennbaren, mit Wasser nicht mischbaren halogenierten Kohlenwasserstoffen, die sich im Siedepunkt stark von den eingesetzten Kohlenwasserstoffen unterscheiden, versetzt, extrahiert und anschließend das Lösungsmittel, die Biomasse und die Kohlenwasserstoffe in den Zellen nach bekannten Verfahren analysiert werden. Die Erfindung kann zur Analytik mikrobieller Biomassen dienen.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Dispersion mit nichtbrennbaren, mit Wasser nicht mischbaren halogenierten Kohlenwasserstoffen versetzt, extrahiert und anschließend abgetrennt werden und danach die Bestimmungen der Kohlenwasserstoffe in dem Lösungsmittel, der Kohlenwasserstoffe in den Zellen und der Biomassekonzentration erfolgen.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als halogenierte Kohlenwasserstoffe Methylenchlorid und/oder Chloroform verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Extraktion bei 0 bis 50 °C, vorzugsweise bei Raumtemperatur erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen, die bei der Herstellung von Biomassen unter Verwendung von flüssigen Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoffquelle anfallen.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Die quantitative Bestimmung von Kohlenwasserstoffen in den Erdöldestillat enthaltenden Biomassesuspensionen wird bekanntermaßen durch Entwässerung der Proben durch Zusatz eines Überschusses an Aceton und anschließendem Waschen der Biomasse mit n-Hexan vorgenommen. Dabei werden die in den Mikroorganismen enthaltenden Kohlenwasserstoffe und Lipide herausgelöst. Die Auswaage der Biomassemenge nach der Trocknung und die Auswaage des extrahierten Anteils nach der Trocknung und dem Abdestillieren des Lösungsmittels ergibt im Vergleich zur Einwaage die Biomassekonzentration und den Gehalt an Gesamtextrakt. Der Nachteil dieser Methode ist, daß die Lipide in der Kohlenwasserstofffraktion erscheinen, dadurch wird bei der Analyse ein zu hoher Kohlenwasserstoffgehalt vorgetäuscht, die Biomassekonzentrationen werden dagegen durch das Fehlen der Lipide zu niedrig bestimmt.

Eine exakte Bestimmung des Gehaltes an Kohlenwasserstoffen und der Biomassekonzentration ist bei diesem bekannten Verfahren durch eine Abtötung der Mikroorganismen mit nachfolgender Lipidherauslösung nicht möglich. Außerdem ist keine selektive Bestimmung der Kohlenwasserstoffe in den Zellen, in Abgrenzung zu den freien Kohlenwasserstoffen in der Suspension und auf den Zellen, möglich.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches und wenig aufwendiges Verfahren zur Kohlenwasserstoffbestimmung in mikroorganismenhaltigen Dispersionen zu entwickeln, mit dem eine selektive Bestimmung der Kohlenwasserstoffe in der Suspension und auf den Zellen einerseits und eine Bestimmung der Biomassekonzentration mit exakter Bestimmung der Kohlenwasserstoffe in den Zellen andererseits erreicht werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, solche Lösungsmittel für die Kohlenwasserstoffbestimmung auszuwählen, die die Mikroorganismenzelle nicht zerstören, einerseits die Verfälschung der Analysenwerte durch gelöste Lipide vermieden wird und andererseits intrazellulärer Kohlenwasserstoff von dem extrazellulären getrennt bestimmbar werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem die Biomassedispersionen mit nichtbrennbaren, mit Wasser nicht mischbaren halogenierten Kohlenwasserstoffen, die sich in den Siedepunkten stark von den eingesetzten Kohlenwasserstoffen unterscheiden, versetzt, extrahiert und anschließend abgetrennt werden. Danach können die Biomassen sowie die in den nicht geschädigten Zellen vorhandenen Kohlenwasserstoffe nach bekannten Analysenmethoden genau bestimmt werden, zum Beispiel sind durch den Einsatz der Gaschromatographie nach dem Aufschluß der Zellen die Kohlenwasserstoffe genau bestimmbar. Im organischen Lösungsmittel lassen sich die Kohlenwasserstoffe bestimmen, die ursprünglich in der Dispersion frei vorhanden waren und teilweise die Oberflächen der Zellen benetzten.

Als halogenierte Kohlenwasserstoffe werden Methylenchlorid und/oder Chloroform verwendet, die Arbeitstemperatur beträgt 0–50 °C, vorzugsweise Raumtemperatur.

Beispiel:

Es wurde eine kohlenwasserstoffhaltige Biomassesuspension verwendet, die bei der kontinuierlichen aeroben Fermentation der Hefe *Candida lipolytica* mit Erdöldestillat als Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 1 bis 2% Biomasse erzeugt wurde. 200 ml dieser Suspension wurden mit 200 ml Methylenchlorid versetzt und im Scheidetrichter 5 min intensiv durchgeschüttelt. Es ist ebenfalls möglich, zur Extraktion mechanische Rührer zu benutzen. Nach der Trennung der Emulsion wird die wäßrige Suspension noch dreimal mit je 200 ml Methylenchlorid extrahiert. Die zweite Lösungsmittelfraktion ist, wie die erste, intensiv gelbgefärbt, die nächsten sind fast farblos. Nach der Abtrennung des Methylenchlorides im Scheidetrichter wird die wäßrige Suspension der Biomasse zentrifugiert und abgetrennt. Eine Gefriertrocknung der pastenförmigen Masse (12 Std.) schließt sich an. Durch Auswaage der Biomasse und Rückrechnung wird die Biomassekonzentration ermittelt. Nach Verdampfen des Methylenchlorides wird die Menge der Kohlenwasserstoffe, die frei in der Lösung vorlagen, gravimetrisch bestimmt. Nach Aufschluß der Biomasse mit bekannten Verfahren (alkalischer Aufschluß) wird die Kohlenwasserstoffmenge in den Zellen, z. B. mittels Gaschromatographie bestimmt.

Biomassekonzentrationen: 1,2% (bezogen auf die Suspension)

Kohlenwasserstoffkonzentration: 3% (bezogen auf den Gehalt in der Suspension)

Kohlenwasserstoff der Zellen: 2% (bezogen auf trockene Biomasse)