



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **230 641 A3**4(51) **G 01 N 25/16**
C 07 J 9/00
C 12 P 33/16

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP G 01 N / 256 466 2	(22)	09.11.83	(45)	04.12.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Zellstoff- und Zellwollewerke, 2900 Wittenberge, Bad Wilsnacker Straße 43, DD
(72)	Otto, Claus, Dr. rer. nat., DD

(54) Prüfverfahren zur Kontrolle des Herstellungsprozesses eines zur Fermentation geeigneten β -Sitosterol-kristallisates

(57) Die Erfindung beruht auf einem Prüfverfahren zur Kontrolle des Herstellungsprozesses eines zur Fermentation geeigneten β -Sitosterolkristallisates. Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung eines einfachen Prüfverfahrens, dessen Ergebnis eine rasche Korrektur des β -Sitosterol-Herstellungsprozesses mit dem Ziel einer optimal fermentierbaren β -Sitosterolbereitstellung ohne zusätzliche Verfahrensschritte zuläßt. Aufgabe der Erfindung ist es, unter Umgehung des Fermentationstestes mit den jeweiligen Bakterienstämmen im Labormaßstab ein ökonomisches Prüfverfahren zu entwickeln, das eine schnelle Prozeßänderung erlaubt. Die erfindungsgemäße Lösung sieht vor, die Intensität der Deflexion der Grundlinie im Bereich von 50–80°C eines Thermogramms nach dem Prinzip der thermomechanischen Analyse, durchgeführt an einem zylindrischen Probekörper, einer Druckbelastung von 0,2 bis 10 kg/cm² und Aufheizgeschwindigkeiten von 0,5–15°C min⁻¹ in Beziehung zur Fermentierbarkeit zu sehen.

Patentanspruch:

Verfahren zur Beurteilung der Fermentierbarkeit von β -Sitosterolkristallisaten aus Sulfatharzseife oder deren Verarbeitungsprodukten mittels der Thermomechanischen Analyse, in deren Verlauf man zylindrische Proben des Kristallisates unter einem Stempeldruck von $0,2$ bis 10 kp cm^{-2} mit $0,5$ bis $15^\circ \text{C min}^{-1}$ aufheizt und ihre Längenänderung registriert, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Intensität der Deflexion der Grundlinie im Temperaturbereich von 50 bis 80°C als Maß für die Fermentierbarkeit ermittelt.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ermittlung der Fermentierbarkeit von Sterolkristallisaten, insbesondere von Sterolkristallisaten aus Sulfatharzseifen oder deren Verarbeitungsprodukten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Sterole auf der Basis vegetabiler Fette und Öle werden weltweit erzeugt und einem mikrobiologischen Seitenkettenabbau unterworfen. Je nach Selektivität des Mikroorganismus wird als Zielprodukt z. B.

4-Androsten-3,17-dion isoliert und für die Partialsynthese von Steroiden benutzt.

Auch Sterole auf der Basis von Sulfatharzseife werden als Rohstoffquelle für den Seitenkettenabbau eingesetzt.

Das aus Sulfatharzseife isolierte im wesentlichen β -Sitosterol enthaltende Kristallisat kann aus ökonomischen Gründen nicht in einer 100%igen Reinheit hergestellt werden. Es wird jeweils das Verfahren der Gewinnung von β -Sitosterolkristallisaten angestrebt, das bei günstiger Ökonomie eine gute Fermentierbarkeit des β -Sitosterolproduktes gewährleistet. Die Begleitstoffe des β -Sitosterolkristallisates beeinflussen die Reaktivität des jeweils für die Fermentation zu dem gewünschten Zielprodukt eingesetzten Bakterienstammes gravierend.

Für die objektive Beurteilung der Fermentierbarkeit gegebener Sterolprodukte kann ein Verfahren angewendet werden, welches die Umsetzung durch den gewählten Mikroorganismus zu den gewünschten Zielprodukten beinhaltet und wie es in DE-OS 2936125 A1 beschrieben ist, wobei vorausgesetzt wird, daß alle Konditionen für den Abbau konstant gehalten werden können und die Reaktivität des Mikroorganismus reproduzierbar ist. Das Verfahren zur Beurteilung der Fermentierbarkeit von β -Sitosterolkristallisaten durch Mikroorganismen mit der anschließenden Isolation des Zielproduktes stellt ein sehr aufwendiges Verfahren dar und kann in keinem Falle für die Kontrolle des Verfahrensablaufes zur Gewinnung von β -Sitosterolkristallisaten ökonomisch eingesetzt werden. Dieses Verfahren ist für die laufende Produktionskontrolle an Bedingungen geknüpft (reproduzierbare Aktivität des Bakterienstammes), die einmal nur unter hohem Kostenaufwand realisiert werden können und deren Ergebnisse auf Grund der Zeitdauer der Prüfung für die Überwachung einer laufenden Produktion und für ein schnelles Eingreifen in die Prozeßparameter nicht nutzbar sind.

Eine häufige Methode zur Charakterisierung von Sterolkristallisaten ist die Gaschromatographie. Sie besitzt — bei gezielter Durchführung — den Vorteil der Konzentrationsermittlung z. B. des β -Sitosterols neben Campesterol und den hydrierten Formen und weiteren organischen Substanzen. Trotzdem ist sie nicht in der Lage, die oft in Spuren vorliegenden und außerdem synergistisch wirkenden Inhibitoren der Fermentation komplex zu erfassen und damit ein β -Sitosterolkristallisat für den Mikroorganismus als geeignet zu identifizieren. Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der β -Sitosterolkristallisate ist die Ermittlung des Schmelzpunktes. Hohe Schmelzpunkte dokumentieren eine große Reinheit, während niedrige Schmelzpunkte auf eine Vielzahl von Begleitstoffen verweisen. Hierbei kann aber bei Schmelzpunktdepressionen über den Charakter (Qualität und Quantität) der Begleitstoffe keine Aussage gemacht werden.

Ferner können noch übliche Methoden, wie Drehwinkel, Farbe oder Löseverhalten zur Charakterisierung der Sterolkonzentrate eingesetzt werden, die aber stets nur jeweils einen Parameter ermitteln, der nicht ausreichend in Beziehung zur Fermentierbarkeit des β -Sitosterolkristallisates steht.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung eines unter Betriebsbedingungen durchführbaren Prüfverfahrens, dessen Ergebnisse so rechtzeitig vorliegen, daß eine Steuerung des Prozesses der Sitosterolherstellung auf eine optimale Fermentierbarkeit des erzeugten Produktes ohne nachträgliche zusätzliche Verfahrensschritte möglich ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein für den β -Sitosterolhersteller ökonomisches komplexes Verfahren zur Beurteilung der Fermentierbarkeit zu entwickeln, das ohne den Fermentationstest durch das jeweilige Bakterium auskommt und eine rasche Produktionssteuerung zuläßt. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, das dadurch charakterisiert ist, daß die β -Sitosterolkristallisatprobe in eine zylindrische Form gebracht wird, ihre Längenänderung bei einer Druckbelastung von $0,2$ bis 10 kp/cm und Aufheizgeschwindigkeiten von $0,5$ bis $15^\circ \text{ min}^{-1}$ im Temperaturbereich von 20°C bis 100°C registriert und die Deflexion der Grundlinie (Null-Linie) im Bereich von 50 bis 100°C zur Beurteilung der Fermentierbarkeit herangezogen wird.

So ist die in Fig. 1 definierte Deflexion der Grundlinie und die Intensität in deutlicher Beziehung zur Fermentierbarkeit des untersuchten β -Sitosterolkristallisates gesetzt. Bei entsprechender Druckbelastung erfolgt in Abhängigkeit von der Temperatur ein Sintern des zylindrischen Probekörpers. Es wurde überraschend gefunden, daß das Ausmaß des Sinterns in Beziehung zur Menge der spezifischen Begleitstoffe steht, die den Fermentationsprozeß inhibierend beeinflussen.

Die Durchführung des Prüfverfahrens und die Auswertung des Thermogrammes sind in ca. 1 h abgeschlossen und gestatten einen sofortigen Eingriff in die Technologie der Herstellung des β -Sitosterolkristallisates aus Sulfatharzseife bzw. deren Verarbeitungsprodukte.

Gegenüber den bekannten Verfahren zur Beurteilung der Fermentierbarkeit von β -Sitosterolkristallisaten weist die erfindungsgemäße Lösung nachstehende Vorteile auf:

Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfach und gestattet es, über die Auswertung der Deflexion der Grundlinie aus einem einzigen Meßvorgang geringste Veränderungen in der Zusammensetzung von β -Sitosterolkristallisaten auf der Basis von Sulfatharzseife zu erfassen, die in direkter Beziehung zur Fermentierbarkeit stehen. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt einen raschen Eingriff in die Technologie der β -Sitosterolherstellung. Es erspart umfangreiche Verfahrensschritte einer simulierten Fermentation des β -Sitosterolkristallisates und der Ermittlung von Zielprodukten der Fermentation.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll an nachstehendem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Jeweils 20 mg β -Sitosterolkristallisatproben wurden in einen zylindrischen Probenbehälter gefüllt (Proben 1–5). Nach reproduzierter Verdichtung der Proben im Zylinder wird mittels eines Stempels ein Druck von $0,2 \text{ kp cm}^{-2}$ auf den zylindrischen Probenkörper gegeben. Der mit den Probenmaterialien gefüllte Behälter wird mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 8°C min^{-1} aufgeheizt. Die Intensität der Deflexion der Grundlinie (Längenänderung des Probenkörpers) wird über eine Verstärkung zur Anzeige gebracht. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse bezüglich der Ermittlung der Intensität der Deflexion aufgeführt und der Ermittlung des Umsetzgrades zum Zielprodukt des Fermentationsversuches gegenübergestellt.

Tabelle 1

Auswertung der Deflexion der Grundlinie und Fermentierbarkeit von β -Sitosterolkristallisaten

Probe Nr.	Deflexion der Grundlinie		Fermentierbarkeit (%)
	T_w ($^\circ\text{C}$)	H (mm)	
1	65	1,0	100 ^x
2	70	1,3	96
3	68	1,0	98
4	70	14,0	50
5	65	1,0	99

^x Standardqualität

Die Proben 1 bis 5 entstammen der laufenden β -Sitosterolkristallisat-Produktion. Nachdem in der Probe 4 ein hoher Wert der Deflexionsintensität nach Bild 1 erkannt worden ist, wurden die Kristallisationsbedingungen für die Probe 5 nachgebessert. Im Ergebnis der Optimierung des Verfahrens lieferte die folgende β -Sitosterolkristallcharge die mit der Probe 5 ausgewiesenen Parameter und eine wieder optimale Fermentierbarkeit.

