



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 226 902 A1

4(51) C 12 M 1/36

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 M / 267 086 5

(22) 07.09.84

(44) 04.09.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Malzahn, Joachim, Dr. rer. nat.; Brandtstädter, Gisela; Listewnik, Hans-Frieder; Sobek, Klaus; Langner, Jürgen; Birke, Liebtraud, DD

(54) Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erarbeitung von Führungsgrößen zum Betrieb von Verfahrensstufen zur Erzeugung und Aufarbeitung von Mikroorganismen. Ziel der Erfindung ist die gezielte Beeinflussung des technischen Prozesses in bezug auf die Erzeugung von Produkten mit bestimmten gewünschten Eigenschaften, z.B. Proteingehalt, Extrahierbarkeit. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß eine Säure-Basen-Titration durchgeführt wird und aus der Titrationskurve die gewünschten Größen berechnet werden, die – bei Kenntnis der Beziehungen zu den Zielgrößen – selbst zur Führungsgröße werden bzw. in diese eingehen.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen bzw. der Aufarbeitung von Mikroorganismen, beispielsweise der Erzeugung mikrobieller Futtermittel, sowie zur Charakterisierung mikrobieller Produkte, vorzugsweise der Oberfläche von Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß mittels Aufnahme und Auswertung der Säure-Basen-Titrationskurve einer aufbereiteten Probe eine qualitative und quantitative Charakterisierung der Probe erfolgt und diese Charakterisierungsgrößen, wegen ihrer Beziehung zu Zielparametern des Prozesses, als Führungsgrößen in Teilstufen bzw. Teilstufen mit vergleichbarer Aufgabe bzw. des Gesamtprozesses genutzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Charakterisierung durch die pK-Werte, d. h. durch die Wendepunkte in der Titrationskurve erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Charakterisierung durch die quantitative Auswertung der Titrationskurve erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Charakterisierung durch Titration zwischen festgelegten pH-Werten erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hin- und Rücktitrationskurve bzw. die aus beiden zu konstruierende Hysteresekurve zur Gewinnung der Führungsgröße genutzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Titration in Form einer einmaligen Zugabe einer definierten Menge an Titrationsmittel erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Fahrweise mikrobieller Verfahrensstufen zur Erzeugung und Aufarbeitung von Mikroorganismen bis zum Endprodukt auf der Grundlage der Charakterisierung des jeweiligen Zustandes der Mikroorganismen bzw. des Produktes.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bekannten Methoden zur Optimierung mikrobieller Verfahrensstufen beruhen auf der Erfassung schnell bestimmbarer Milieufaktoren, z. B. pH-Wert, pO₂-Wert, Konzentration der Nährzusätze und Hilfsstoffe, der Abgasanalyse und dem daraus berechenbaren Stoffumsatz. Aus diesen Informationen wird die Dosierung der entsprechenden Stoffströme abgeleitet (Rotenburger Symposium 1978: Fermentationstechnik, Firma B. Braun, Melsungen AG, Vortrag L. Nyeste u. a., Seite 141; DD-10 006; DD-159 011; SU-791 771). Weitere Möglichkeiten, die für die Charakterisierung des Zustandes von Mikroorganismen genutzt werden, sind die Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit (DE-OS-1 642 821; DD-160 012; GB-2 054 839; SU-911 294; Huber und Werner in vt „Verfahrenstechnik“ 17 [1983] 1: 19–22), die Fluoreszenz- und Lumineszenzanalyse nach erfolgter Adsorption geeigneter Stoffe an der Zelloberfläche (GB-2 116 712; GB-2 095 830; SU-951 112), die spektrophotometrische Untersuchung von Zellbestandteilen, z. B. Cytochrom (DD-154 449), Mikroorganismen-Nachweis über die Biolumineszenz von Adenosintriphosphat nach Zellzerstörung (GB-2 116 709), Proteinanteil (DE-AS-2 365796).

Neben der schon genannten Untersuchungsmöglichkeit mittels Lichtmikroskop, ergänzt durch spezifische Anfärbereaktionen, sind weiterhin die verschiedenen elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden bekannt, die derzeit die ergiebigste Informationsquelle über den Zustand eines Mikroorganismus darstellen, aber auch sehr aufwendig sind.

Zu den bekannten Untersuchungsmethoden von Struktureinheiten der Mikroorganismen zählen die Aussagen über die Zellmembran nach erfolgter Adsorption und Fluoreszenz (SU-1 010 126). Bekannt sind auch die Titration von Zellen ohne weiterreichende Auswertung und Nutzung der Ergebnisse (DD-137 149), ergänzbar durch spektrofotometrische Einrichtungen/Untersuchungen (SU-924 566; SU-951 112).

Des weiteren sind auch die Zusammenhänge zwischen der Titrationskurve einer Hefekultur und dem physiologischen Zustand der Hefeprobe bekannt. Da als Titrationsmittel Ammoniaklösung, die gleichzeitig Substratfunktion besitzt, eingesetzt wird, sind diese Aussagen komplexer Natur. Eine Prozeßsteuerung auf dieser Grundlage wird nicht durchgeführt (C. A.-Zitat 100/1/4767m nach Gidroliz. Lesokhim. Prom.-st. 1983 (6) 5–7).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, das die Bestimmung charakteristischer Größen, vorzugsweise Oberflächeneigenschaften, von Mikroorganismen bzw. der aus ihnen im Verlauf des Verarbeitungsprozesses entstehenden Produkte sowie die Nutzung dieser Charakterisierungsgrößen als Führungsgröße für die Prozeßsteuerung nach Korrelation mit Produkt-Zielparametern ermöglicht.

Aufgabe der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Methode zur Bestimmung von Charakterisierungsgrößen zu entwickeln, die wesentliche Eigenschaften des Untersuchungsobjektes erfaßt.

Merkmale der Erfindung

Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß die das Untersuchungsobjekt, vorzugsweise Mikroorganismen, wie Hefen, enthaltende Probe einer Trennoperation unterzogen wird und, gegebenenfalls nach einer objektabhängigen Reinigung, in CO₂-freiem Wasser in standardisierten Mengenverhältnissen suspendiert und nachfolgend einer Säure-Basen-Titration unterzogen wird. Die erhaltene Titrationskurve liefert die gewünschten Charakterisierungsgrößen, wie die pK-Werte der titrierten funktionellen Gruppen, die Zahl der pro Gruppe vorhandenen Reaktionspartner und weitere aus der mathematischen Behandlung/Abteilung/Integration der Titrationskurve/n gewinnbare Größen, z. B. Flächen der Hysteresekurve.

Zweckmäßigerweise kann die Charakterisierung durch eine quantitative Auswertung der Titrationskurve bzw. durch eine Titration zwischen festgelegten pH-Werten erfolgen. Auch die Titration in Form einer einmaligen Zugabe einer definierten Menge an Titrationsmittel ist möglich.

Diese Charakterisierungsgrößen erhalten, in Verbindung mit den Zielgrößen des Teil- bzw. Gesamtprozesses, die Eigenschaft von Führungsgrößen/Zielgrößen für die Steuerung des technologischen Prozesses auf einer qualitativ höheren Stufe.

Ausführungsbeispiel

Nach Korrektur der primären Meßdaten (pH -Wert, Verbrauch an Titrationslösung) wird aus der Meßwertfolge, die dem produktspezifischen Titrationslösungsverbrauch entspricht, bei einem vorgegebenen pK -Wert die Zahl n der vorhandenen Reaktionspartner berechnet.

Tabelle 1 Abhängigkeit der Zahl der vorhandenen Reaktionspartner vom pH -Wert des Fermenters

pH -Wert im Fermenter	4,1	4,3	4,4	4,7
-------------------------	-----	-----	-----	-----

n in $10^{10} H_3O^+/Zelle$	3,1	2,2	1,7	1,4
-------------------------------	-----	-----	-----	-----

Wie Tabelle 1 zeigt, besteht eine Abhängigkeit zwischen Fermentations- pH und der gefundenen Zahl der Reaktionspartner, deren $pK = 2,5$ ist, auf der Zelloberfläche bzw. in oberflächennahen Bereichen. In erster Näherung ist also die Erzeugung von Mikroorganismen mit definierten Oberflächeneigenschaften, hier z. B. durch pH -Regelung erreichbar.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, welche qualitativen Veränderungen bei wesentlichen Eingriffen beobachtet werden:

Tabelle 2 pK -Wert vor und nach Denaturierung im pH -Bereich von 2,2 bis 4,0

nativ	$pK =$	$2,7 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$
-------	--------	---------------	---------------

denaturiert	pK	$2,3 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$
-------------	------	---------------	---------------	---------------

Auch hier ermöglicht die Berechnung der Zahl der Reaktionspartner bei den pK -Werten eine Einschätzung und weiter die Steuerung des Eingriffs.