



Wirtschaftspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

212 052

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 11/02

C 12 Q 1/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2437 697

(22) 04.10.82

(44) 01.08.84

(71) INSTITUT F. TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE; BERLIN, DD
(72) WEISE, HARTMUT, DR. DIPL.-ING.; SCHELLER, FRIEDER, DR. DIPL.-CHEM.;
SCHUBERT, FLORIAN, DIPL.-ING.; WEISE, URSULA, DR.; DD;

(54) ANWENDUNG TRAEGERFIXIERTER MIKROORGANISMEN ODER ORGANELLEN FUER SENSOREN

(57) Die Erfindung betrifft die Anwendung traegerfixierter Mikroorganismen oder Organellen für Sensoren. Diese Sensoren, wie Elektroden und Thermister, sind zur Testung des Nährstoffverbrauchs, zur Untersuchung über die Eignung von Nährstoffen für die Fermentation, zur Messung der Enzymaktivität, zur Testung der Abbaufähigkeit von Abfallprodukten sowie zur Testung von Wirkstoffen und Pflanzenschutzmitteln geeignet. Ziel der Erfindung ist es, die Mikroorganismen oder Organellen vor Sensoren so zu fixieren, daß die Präparierung der Sensoren schnell erfolgen kann und über lange Zeit mit stabilen Mikroorganismen oder Organellen gearbeitet werden kann. Die traegerfixierten Mikroorganismen oder Organellen sollen sich in unmittelbarer Nähe der Sensoren befinden und eine hohe Permeabilität besitzen, um ein großes unverfälschtes Meßsignal zu ergeben. Die Anwendung traegerfixierter Mikroorganismen oder Organellen für Sensoren erfolgt erfindungsgemäß in der Weise, daß die Mikroorganismen oder Organellen durch An- oder Einlagerung an synthetischen Klebstoff oder Kleblack traegerfixiert und gleichzeitig entweder direkt auf einen Sensor, beispielsweise einen Thermister, aufgebracht werden oder auf sehr dünne Folien aufgetragen werden, die zum Besspannen von Sensoren verwendet werden.

a) Titel der Erfindung

Anwendung trägerfixierter Mikroorganismen oder Organellen für Sensoren

b) Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Anwendung trägerfixierter Mikroorganismen oder Organellen für Sensoren. Diese Sensoren, wie Elektroden und Thermister, sind zur Testung des Nährstoffverbrauchs, zur Untersuchung über die Eignung von Nährstoffen für die Fermentation, zur Messung der Enzymaktivität, zur Testung der Abbaufähigkeit von Abfallprodukten sowie zur Testung von Wirkstoffen und Pflanzenschutzmitteln geeignet.

c) Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Über die Anwendung von Mikroorganismen bei der Messung mit Sauerstoffelektroden existieren insbesondere japanische Arbeiten. Die Forschergruppe um Karube und Suzuki berichtet über die Anwendung von Mikroorganismen, beispielsweise für einen Assimilationstest (Appl. Microbiology and Biotechnology 9 (1980) 305 - 316), für die Bestimmung des gesamten assimilierbaren Zuckers in Fermentationslösungen (Enzyme Microb. Technol. Vol. 2 (1980) 234 - 238) oder zur Herstellung einer Hefeelektrode (Anal. Chim. Acta 109 (1979) 39 - 44). Bei diesen Arbeiten befinden sich die Mikroorganismen zwischen zwei Membranen, die zur Bespannung von Sauerstoffelektroden verwendet werden. Die Mikroorganismen befinden sich somit in einem Dialysebeutel. Die Verwendung eines derartigen Dialysebeutels hat wesentliche Nachteile gegen-

über fest immobilisierten Mikroorganismen, insbesondere in der Handhabung, beim Transport, bei der Lagerung und in der Langzeitstabilität. In einer anderen Arbeit werden die Mikroorganismen an Acetylcellulosefilter mit Agar immobilisiert (Appl. Microbiology and Biotechnology 12 (1981) 102 - 106). Auch bei dieser Form der Immobilisierung treten Schwierigkeiten bei der Stabilität auf. In der DE-OS 30 33 562 wird darauf hingewiesen, daß im Vergleich zu Enzymen und Mikroorganismen Zellen oder Organellen so labil sind, daß bekannte Verfahren für ihre Immobilisierung nicht angewendet werden können, ohne irreversible Veränderungen ihrer komplexen Struktur und eine Zerstörung ihrer Funktion in Kauf nehmen zu müssen. Es wird der Einsatz von Schutzsubstanzen vorgeschlagen.

In der US-PS 14 48 787 wird über die Messung mit einem Thermister berichtet, wobei fixierte Mikroorganismen oder Enzyme angewendet werden. Es werden eine Vielzahl von Immobilisierungsmöglichkeiten aufgeführt, so. z. B. Vernetzung mit Glutaraldehyd, Fixierung an ein Acrylamid-Polymer, physikalische Fixierung an ein Gel oder Adsorption.

Die beschriebenen Immobilisierungsarten sind prinzipiell bei Messungen mit Sensoren anwendbar; die Herstellungsverfahren erfordern jedoch lange Zeit und sind sehr kompliziert, die Langzeitstabilität und die Permeabilität entsprechen nicht immer den Erfordernissen.

d) Ziel der Erfindung

Für eine breite Anwendung der Messung mit Mikroorganismen oder Organellen unter Verwendung von Sensoren ist es erforderlich, eine Fixierungsmethode für Mikroorganismen oder Organellen anzuwenden, die es erlaubt, schnell zu fixieren, problemlos zu transportieren und zu lagern sowie über lange Zeit mit stabilen Mikroorganismen oder Organellen zu messen. Die trägerfixierten Mikroorganismen oder Organellen sollen sich in unmittelbarer Nähe der Sensoren befinden

und eine hohe Permeabilität besitzen, um ein großes unverfälschtes Meßsignal zu ergeben.

e) Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mikroorganismen oder Organellen unter Beibehaltung ihrer Viabilität in unmittelbarer Nähe von Sensoren zu fixieren, so daß eine Trägerfixierung der Mikroorganismen oder Organellen erreicht wird und desweiteren diese trägerfixierten Produkte an dem Sensor fixiert werden. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß die Mikroorganismen oder Organellen an synthetische Klebstoffe nach dem im DD-WP C 12 N/239 361 beschriebenen Verfahren an- oder eingelagert werden. Die Mikroorganismen oder Organellen können direkt in dem Klebstoff suspendiert oder auf den trocknenden Klebstoff aufgebracht werden. Das Klebstoff-Mikroorganismen-Gemisch oder Klebstoff-Organellen-Gemisch kann direkt auf einen Sensor, beispielsweise einen Thermister, aufgetragen werden. Wird das Klebstoff-Mikroorganismen-Gemisch oder Klebstoff-Organellen-Gemisch auf eine sehr dünne Folie, beispielsweise Polyäthylenfolie mit einer Dicke von 8 μm , aufgetragen, so zeigt sich, daß die Diffusionsbehinderung durch die Trägermatrix und durch die Zellmembran so gering ist, daß diese Folien zum Bespannen von Sensoren, beispielsweise Sauerstoffelektroden, verwendet werden können. In gleicher Weise ist die Verklebung von Zellen möglich.

Als Klebstoffe kommen einfache synthetische Kleber bzw. -mischungen, wie beispielsweise eine Mischung aus Epoxydharz EGK 19, Buna WB 196 HT, Cumaronharz, Piadurool, Polyacrylat und Essigsäureäthylester, oder einfache handelsübliche Kontaktklebstoffe, z. B. Epasol-Kontakt, oder auch Kleblacke, wie beispielsweise Mischungen aus Polyvinylacetat, Kolophonium, Nitrocellulose und Essigsäureäthylester, oder einfache handelsübliche Kleblacke, wie z. B. Asolofix, in Frage. Es ist selbstverständlich, daß nur solche Produkte verwendet werden können, deren Einzelkomponen-

ten bzw. insbesondere Lösungsmittel nicht toxisch wirken.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren treten folgende wesentliche Vorteile auf:

- die Trägerfixierung erfordert keine komplizierten Geräte und keine komplizierten Verfahren;
- die Verwendung handelsüblicher Klebstoffe oder Kleblacke ist möglich;
- neben der Trägerfixierung der Mikroorganismen oder Organellen ist eine gleichzeitige Fixierung an den vorgesehenen Platz möglich;
- das Kleber-Mikroorganismen-Gemisch bzw. Kleber-Organellen-Gemisch zeichnet sich durch hohe Abriebfestigkeit aus;
- das Kleber-Mikroorganismen-Gemisch bzw. Kleber-Organellen-Gemisch ist durch eine große Permeabilität gekennzeichnet und erlaubt die Fixierung an dünne Folien, die zur Bespannung von Sensoren geeignet sind;
- das Kleber-Mikroorganismen-Gemisch bzw. Kleber-Organellen-Gemisch kann direkt auf Sensoren fixiert werden;
- fixierte Mikroorganismen oder Organellen können problemlos transportiert und ihre aktuellen Werte zeitverscho-ben bestimmt werden;
- die verblüffend hohe Langzeitstabilität > 60 Tage erlaubt den Einsatz insbesondere für gezielte Langzeituntersuchungen, z. B. bei Tests von Wirkstoffen und Pflanzenschutzmitteln;
- durch das Auftragen sehr dünner Schichten und nachfolgende schnelle Verdampfung des Lösungsmittels können die trägerfixierten Mikroorganismen oder trägerfixierten Organellen nach < 10 Minuten zur Messung mit Sensoren verwendet werden.

f) Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll anhand von Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

- a) 1,25 g handelsüblicher Kleber, Epasol-Kontakt, wurde mit 30 ml Essigsäureäthylester gemischt.
- b) Von einer Schrägagarkultur von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte die Beimpfung einer Glucose-Nährbouillon. Nach einer Standzeit von 72 Stunden und 48 Stunden bei 37 °C wurde nach Zugabe neuer Glucose-Nährbouillon bei 29 °C geschüttelt. Nach 24 Stunden wurde die Hefe zentrifugiert.

5 µl der Kleberlösung a) wurden auf eine 8 µm dicke Polyäthylenfolie aufgetragen. Auf den trocknenden Tropfen wurden 5 µl der unter b) beschriebenen Hefesuspension gegeben und ca. 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Danach wurde auf die Hefe 5 µl der Kleberlösung a) gegeben. Nach ca. 5 Minuten wurde mit einer Dialysemembran (Nephrophan) abgedeckt und beide Seiten wurden fest zusammengedrückt. Diese Doppelfolie wurde zum Bespannen einer Sauerstoffelektrode verwendet (Elektrode, Polyäthylenfolie, Klebstoff, *Saccharomyces cerevisiae*, Klebstoff, Nephrophan). Diese Elektrode taucht in eine gerührte, auf 30 °C temperierte Meßzelle, die 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 enthält. Die Sauerstoffkonzentration wird mittels Meßverstärker bei einer angelegten Spannung von -600 mV gemessen und in Skalenteilen angezeigt bzw. über einen Schreiber erfaßt. Die Sauerstoffkonzentration fällt zunächst infolge der Veratmung endogener Reservestoffe und steigt anschließend wieder. Nach ca. 45 Minuten wird ein steady state erreicht. Nach Zugabe von 100 µl einer Lösung von 500 mg Glucose/100 ml ergab der maximale Anstieg der Strom-Zeit-Kurve einen Wert von 170 bzw. 175 Skt. Nach zweimaligem Spülen mit Phosphatpuffer und einer Einstellzeit von ca. 20 Minuten wurde zu 2,05 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 50 µl einer Lösung von 500 mg Glucose/100 ml zugegeben. Der maximale Anstieg der Strom-Zeit-Kurve erreichte einen Wert von 103 bzw. 104 Skt. Nach erneutem Spülen mit Phosphatpuffer und nach einer Einstell-

zeit von ca. 20 Minuten wurden zu 2,08 ml Phosphatpuffer 20 μ l einer Lösung von 500 mg Glucose/100 ml zugegeben. Der maximale Anstieg der Strom-Zeit-Kurve erreichte einen Wert von 50 bzw. 48 Skalenteilen.

Die so präparierte *Saccharomyces cerevisiae*-Elektrode wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen für Messungen verwendet.

Beispiel 2

c) 100 mg handelsüblicher Kleber, Asolofix, wurde mit 30 ml Essigsäureäthylester gemischt.

5 μ l der Kleberlösung c) wurden auf eine 8 μ m dicke Polyäthylenfolie aufgetragen. Auf den trocknenden Tropfen wurden 5 μ l der im Beispiel 1 beschriebenen Hefesuspension gegeben und ca. 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Danach wurden auf die Hefe 5 μ l der Kleberlösung c) gegeben. Nach ca. 5 Minuten wurde mit einer Dialysemembran (Nephrophan) abgedeckt und beide Seiten wurden fest zusammengedrückt. Die Verwendung dieser Doppelfolie zum Besspannen einer Sauerstoffelektrode erfolgte entsprechend dem Beispiel 1. Die erhaltenen Meßwerte nach der Zugabe von Glucoselösung und die Stabilität der Elektrode entsprachen denen des Beispiels 1.

Beispiel 3

Eine entsprechend Beispiel 1 hergestellte Elektrode tauchte in eine gerührte, auf 30 °C temperierte Meßzelle, die 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 enthält. Nach Erreichen des steady state wurden 500 μ l einer Lösung von 2 g Saccharose/100 ml zugegeben. Der maximale Anstieg der Strom-Zeit-Kurve erreichte einen Wert von 150 bzw. 153 Skt. Demgegenüber wurde nach Zugabe von 500 μ l einer Lösung von 1 g Saccharose/100 ml nur ein Wert von 72 bzw. 73,5 Skt. gemessen.

Beispiel 4

Es wurde die Elektrode aus dem Beispiel 3 verwendet. Zur Untersuchung kamen Fermentationslösungen mit dem Ziel, die gesamt-assimilierbare Substanz zu bestimmen. Dazu wurde über einen Schreiber der Gesamtstromverlauf aufgezeichnet und der Endwert wurde zur Berechnung verwendet. Parallel dazu wurde von den Fermentationslösungen der Gehalt an reduzierbaren Substanzen (RS) mit DNS bestimmt. Wird der Anfangswert = 100 % gesetzt, so ergibt sich folgender Verlauf.

	% assimilierbare Substanz	% RS
0. Stunde	100	100
24. Stunde	31	52
26. Stunde	24	38
28. Stunde	6	5

Beispiel 5

Von einer Schrägagarkultur wurde *Bacillus subtilis* in einen 500 ml-Standkolben mit Glucose-Nährbouillon (50 ml) überimpft und bei 30 °C 24 Stunden geschüttelt. Danach wurde zentrifugiert.

Die Herstellung und Verwendung der Mikroorganismenfolie erfolgte entsprechend Beispiel 1, jedoch wurde an Stelle von *Saccharomyces cerevisiae* 5 µl der Suspension von *Bacillus subtilis* verwendet. Nach Erreichen eines steady state wurden zu den vorgelegten 2 ml Phosphatpuffer 100 µl einer Lösung von 500 mg Glucose/100 ml zugegeben. Da die erhaltenen kinetischen Werte nach der Zugabe von Glucose wesentlich geringer als im Beispiel 1 waren, wurde über einen Schreiber der Gesamtstromverlauf aufgezeichnet. Nach Zugabe von 500 µl einer Lösung von 500 mg Glucose/100 ml wurde eine maximale Veränderung des Stromwertes von 78 und 80 Skalenteilen gemessen. Bei Zugabe von 500 µl einer Lösung von 500 mg Saccharose/100 ml betrug der Meßwert 30 bzw. 31 Ska-

lenteile. Die Zugabe von 500 μ l einer Lösung von 500 mg Maltose/100 ml ergab einen Meßwert von 15 Skalenteilen.

Beispiel 6

Aspergillus niger wurde nach dem Beimpfen einer Glucose-nährlösung 48 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Danach wurde zentrifugiert.

5 μ l der Kleberlösung a) wurden auf eine 8 μ m dicke Polyäthylenfolie aufgetragen. Auf den trocknenden Kleber wurde ca. 10 mg Mycel gegeben. Nach ca. 10 Minuten wurde auf das Mycel 5 μ l der Kleberlösung a) gegeben. Mit einer Dialysemembran (Nephrophan) wurde nach ca. 5 Minuten abgedeckt und beide Seiten wurden fest zusammengedrückt. Die Verwendung dieser Doppelfolie zum Bespannen einer Sauerstoffelektrode erfolgte entsprechend dem Beispiel 1.

Nach Erreichen eines steady state wurden in die vorgelegten 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 jeweils 100 μ l unterschiedlicher Kohlenhydratlösungen (500 mg/100 ml) zugegeben. Die Veränderung des Stromwertes wurde mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Bei der Glucoselösung wurde eine maximale Veränderung des Stromwertes von 60 Skalenteilen gemessen. Nach Zugabe von Saccharoselösung wurde ein Wert von 25 Skalenteilen gemessen und nach Zugabe von Maltose ein Wert von 38 Skalenteilen. Die mit *Aspergillus niger* präparierte Elektrode wurde über einen Zeitraum von 60 Tagen für Messungen verwendet.

Beispiel 7

Eine Mikroorganismenmischkultur aus einer Gülleprobe wurde in ein Glucose enthaltendes Medium übertragen und 24 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Danach wurde zentrifugiert. Die Herstellung und Verwendung der Mikroorganismenfolie erfolgte entsprechend Beispiel 1, jedoch wurde an Stelle von *Saccharomyces cerevisiae* 5 μ l der Suspension der Mischkultur verwendet.

Nach Erreichen des steady state wurden Glucoselösungen unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Da besonders geringe Glucosekonzentrationen untersucht werden sollten und somit kleine Meßsignale erhalten wurden, kam nicht der maximale Anstieg der Strom-Zeit-Kurve, sondern der Endwert zur Auswertung. Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung ergibt sich dadurch, daß die Messung des Sauerstoffverbrauchs nach Abschaltung der Rührung zur Auswertung benutzt wird.

2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, auf 30 °C temperiert, wurden vorgelegt und gerührt. Nach Einstellung eines steady state wurden 50 µl einer Lösung von 50 mg Glucose/100 ml zugegeben. Für die O₂-Abnahme wurde auf dem Schreiber ein Wert von 7 Skalenteilen gemessen. Nach zweimaligem Spülen mit Phosphatpuffer und der Einstellung eines steady state nach ca. 20 Minuten wurden in die 2 ml Phosphatpuffer 100 µl einer Lösung von 50 mg Glucose/100 ml zugegeben. Für die O₂-Abnahme wurde auf dem Schreiber ein Wert von 15 Skalenteilen gemessen.

In einem weiteren Versuch wurde der Sauerstoffverbrauch gemessen, der nach Abschaltung der Rührung eintrat.

2 ml Phosphatpuffer	35	Skt.
2 ml Phosphatpuffer + 50 µl(50 mg Gluc./100 ml)	47	Skt.
2 ml Phosphatpuffer + 100 µl(50 mg Gluc./100 ml)	62,5	Skt.
2 ml Phosphatpuffer + 200 µl(50 mg Gluc./100 ml)	82,5	Skt.

Beispiel 8

Von einer aus Kaninchenleber gewonnenen Mikrosomen-Suspension (100 nMol Cytochrom P-450/ml) wurden 20 µl zur Präparierung einer Sauerstoffelektrode entsprechend dem Beispiel 1 verwendet.

Die so präparierte Elektrode tauchte in 2 ml gerührten und auf 25 °C temperierten 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4.

Nachdem sich ein stationärer Grundstrom eingestellt hatte, erfolgte die Zugabe von 100 µl NADPH-Lösung bekannter Kon-

zentration. Daraufhin trat eine Verkleinerung des Stromsignals ein, wobei nach einem steilen Abfall unmittelbar nach NADPH-Zugabe der Übergang zu einem stationären Gebiet erfolgte. Der Meßwert ergab sich als Abstand zwischen dem Grundstrom und dem erreichten stationären Stromendwert. Nach Absaugen der Meßlösung und zweimaligem Spülen mit Puffer wurde neuer Puffer in die Meßzelle gegeben, die damit für die nächste Messung vorbereitet ist.

In der beschriebenen Weise wurden NADPH-Lösungen verschiedener bekannter Konzentrationen vermessen und aus den erhaltenen Meßwerten wurde eine Eichkurve aufgezeichnet.

Zur Messung der Isocitratdehydrogenase-Aktivität wurde eine Lösung mit 0,5 mM NADP⁺ und 30 mM D,L-Isocitrat in die Meßzelle gegeben. Nachdem der Strom einen konstanten Wert erreicht hatte, wurden 50 µl einer Isocitratdehydrogenase enthaltenden Fermentationslösung zugegeben. Durch die Enzymreaktion erfolgte ein Abfall der Strom-Zeit-Kurve, da NADPH gebildet wurde. Aus der Eichkurve kann damit die Isocitratdehydrogenase-Aktivität errechnet werden.

Beispiel 9

Auf einen Thermister (Precision Thermistor YSJ, Yellow Springs Instrument Co., mit einem Widerstand von 10 kOhm bei 25 °C) wurden 10 µl der Kleberlösung a) aufgebracht. Auf den trocknenden Kleber wurden 5 µl der Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Beispiel 1) gegeben und nach 10 Minuten wurde auf die Hefe 10 µl der Kleberlösung a) aufgetragen. Dieser so präparierte Thermister, der mit einem elektronischen Temperaturmeßinstrument verbunden wurde, ragt in eine thermostatierte Meßzelle, durch die kontinuierlich auf 30 °C temperierter 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 bzw. Phosphatpuffer-Glucose-Gemische gepumpt wurden.

Die durch die Verstoffwechslung eintretende Temperaturveränderung und die dadurch bedingte Änderung im Widerstand des Thermisters wurden von dem elektronischen Temperatur-

meßinstrument und einer modifizierten Wheatstone-Brücke, ausgestattet mit einem hochstabilen, hochempfindlichen Verstärker, gemessen. Die Temperaturänderungen wurden direkt mit einem Schreiber registriert. Die Vorrichtung ergab einen Vollausschlag auf dem Aufzeichnungsgerät (100 mV) bei einer Temperaturänderung (ΔT) von 0,02 °C.

Durch die Vermessung unterschiedlicher Glucosekonzentrationen konnte eine Eichkurve aufgenommen werden.

Tritt eine Inaktivierung der Mikroorganismen oder Organellen ein, wird die Kleberschicht mit Essigsäureäthylester vom Thermister gelöst und kann danach sofort neu mit Mikroorganismen oder Organellen präpariert werden.

Erfindungsansprüche

1. Anwendung trägerfixierter Mikroorganismen oder Organellen für Sensoren, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen oder Organellen durch An- oder Einlagerung an synthetischen Klebstoff oder Kleblack trägerfixiert und gleichzeitig entweder direkt auf einen Sensor, beispielsweise einen Thermister, aufgebracht werden oder auf sehr dünne Folien aufgetragen werden, die zum Bespannen von Sensoren verwendet werden.
2. Anwendung nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die trägerfixierten Mikroorganismen oder Organellen auf eine Polyäthylenfolie aufgetragen und zum Bespannen von Sauerstoffelektroden verwendet werden.