

Entwicklung neuer Methoden zur schnellen Probennahme und Probenprozessierung für Stoffwechseluntersuchungen

Julian da Luz, Hendrich Quitmann und An-Ping Zeng*

Einleitung

Für die Prozessentwicklung in der industriellen Biotechnologie ist eine genaue Kenntnis der verwendeten Organismen und ihres Stoffwechsels notwendig. Aufgrund der hohen Reaktionsraten von Metaboliten im Stoffwechsel von Mikroorganismen muss zur Untersuchung intrazellulärer Metaboliten eine Probennahme und Probenprozessierung innerhalb kürzester Zeit erfolgen. Insbesondere das Abkühlen der Proben (Quenching), mit dem ein Stopp aller enzymatischen Reaktionen erreicht wird, ist hierbei ein kritischer Schritt. Einerseits muss dies sehr schnell erfolgen, um eine Veränderung der Metabolitkonzentrationen nach der Probennahme zu verhindern, andererseits muss ein Austritt von Metaboliten aus den Zellen aufgrund eines Kälteschocks verhindert werden.

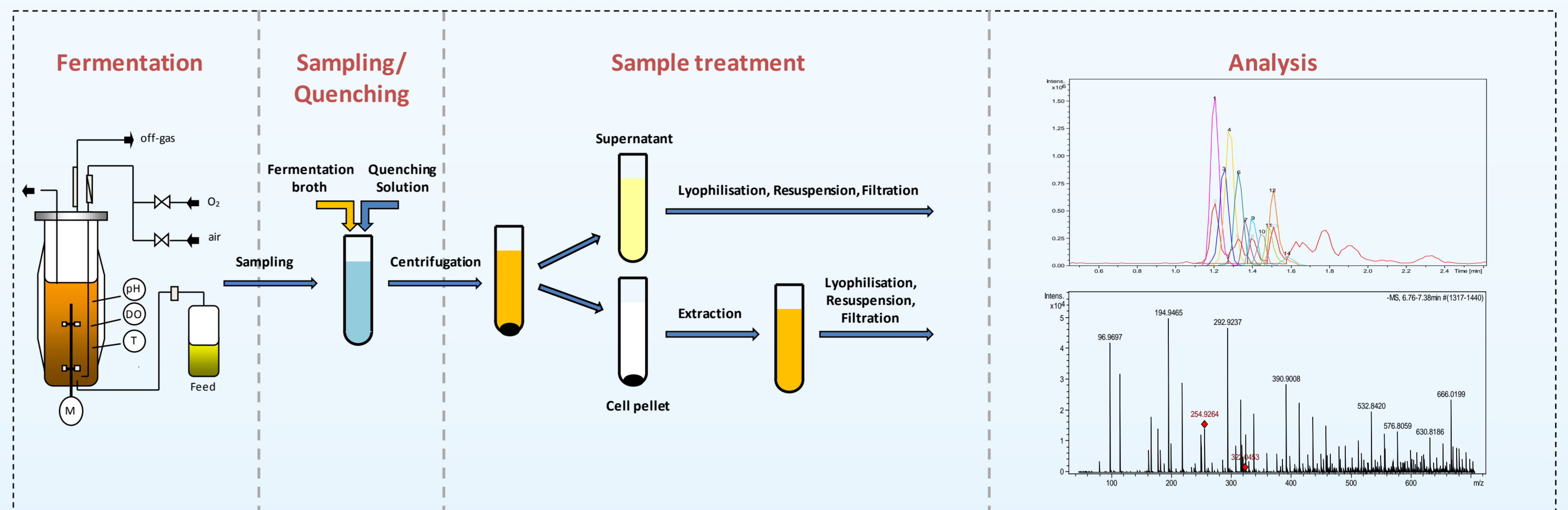


Abb. 1: Arbeitsschritte zur Analyse von Metaboliten und Stoffwechselwegen

Automatisierte Schnellprobennahme

In unserem Institut wurde eine Anlage entwickelt, um vollständig automatisiert Proben aus einem Bioreaktor zu entnehmen und durch sofortiges Quenchen einen nahezu vollständigen Stopp aller enzymatischen Reaktionen in der Probe zu erreichen. Die Dosierung der Proben erfolgt wie in Abb. 2 dargestellt durch ein Ventilsystem, welches durch seine vollständige Automatisierung eine sehr hohe Genauigkeit hinsichtlich Probenzeitpunkt sowie Probenvolumen ermöglicht. Über das Ventilsystem werden die Proben direkt in ein parallelisiertes Abfüllsystem geleitet (Abb. 3) und dort zeitgleich mit einer kalten Quenchinglösung (Üblicherweise wird Methanol/Wasser bei -40°C verwendet) abgefüllt. Durch dieses gleichzeitige Einbringen von Probe und Quenchinglösung in das Probenröhrchen wird eine sehr gute Vermischung beider Flüssigkeiten erreicht. Mit diesem System können bis zu vier Proben pro Sekunde entnommen werden, wobei von der Entnahme aus dem Bioreaktor bis zum Abkühlen der Probe auf unter -10°C nicht mehr als eine Sekunde vergeht.

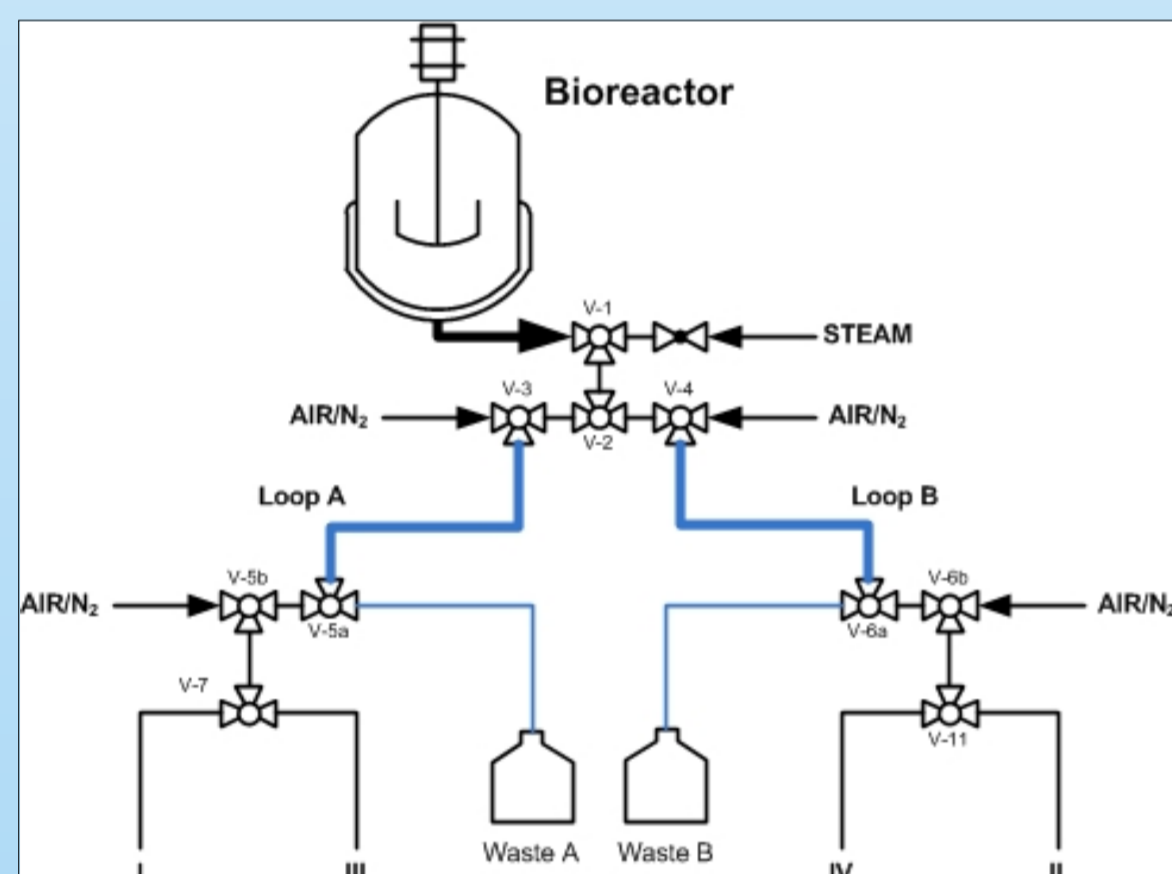


Abb. 2: Schematische Darstellung des Probennahme-Ventilsystems

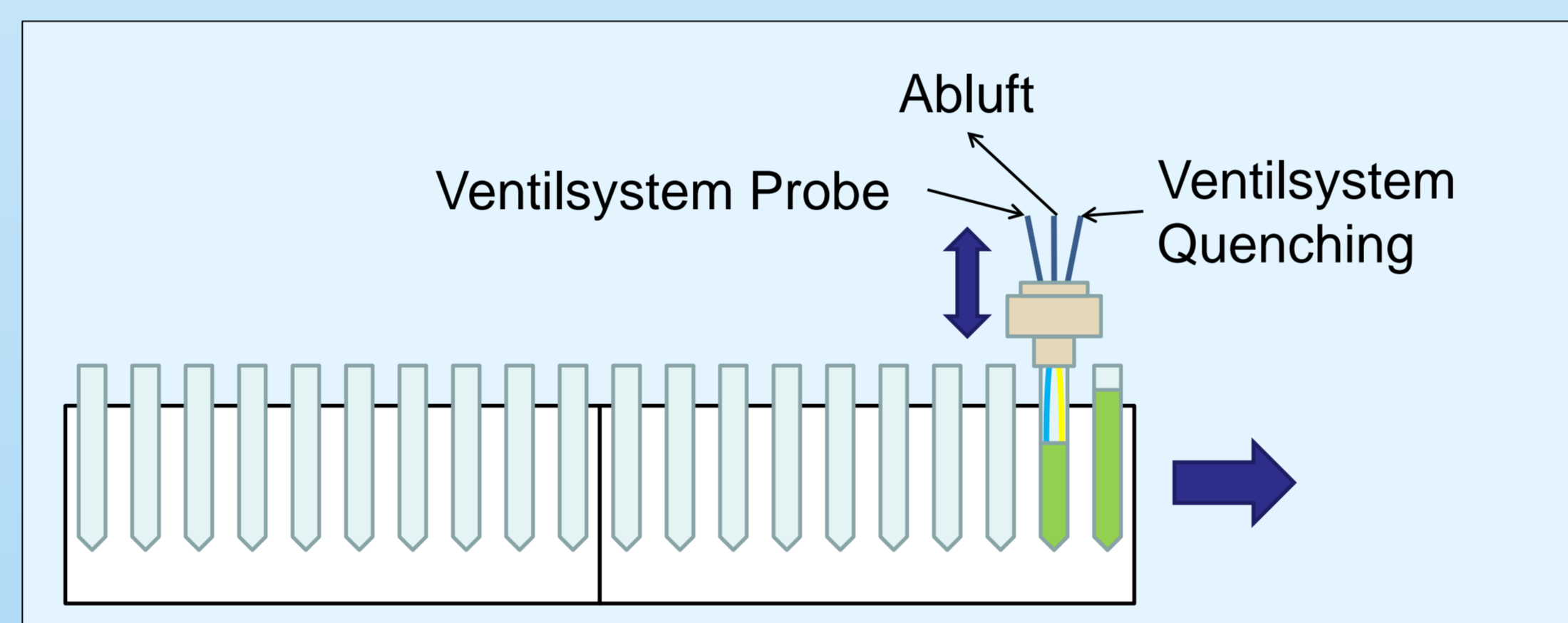


Abb. 3: Schematische Darstellung des Abfüllsystems

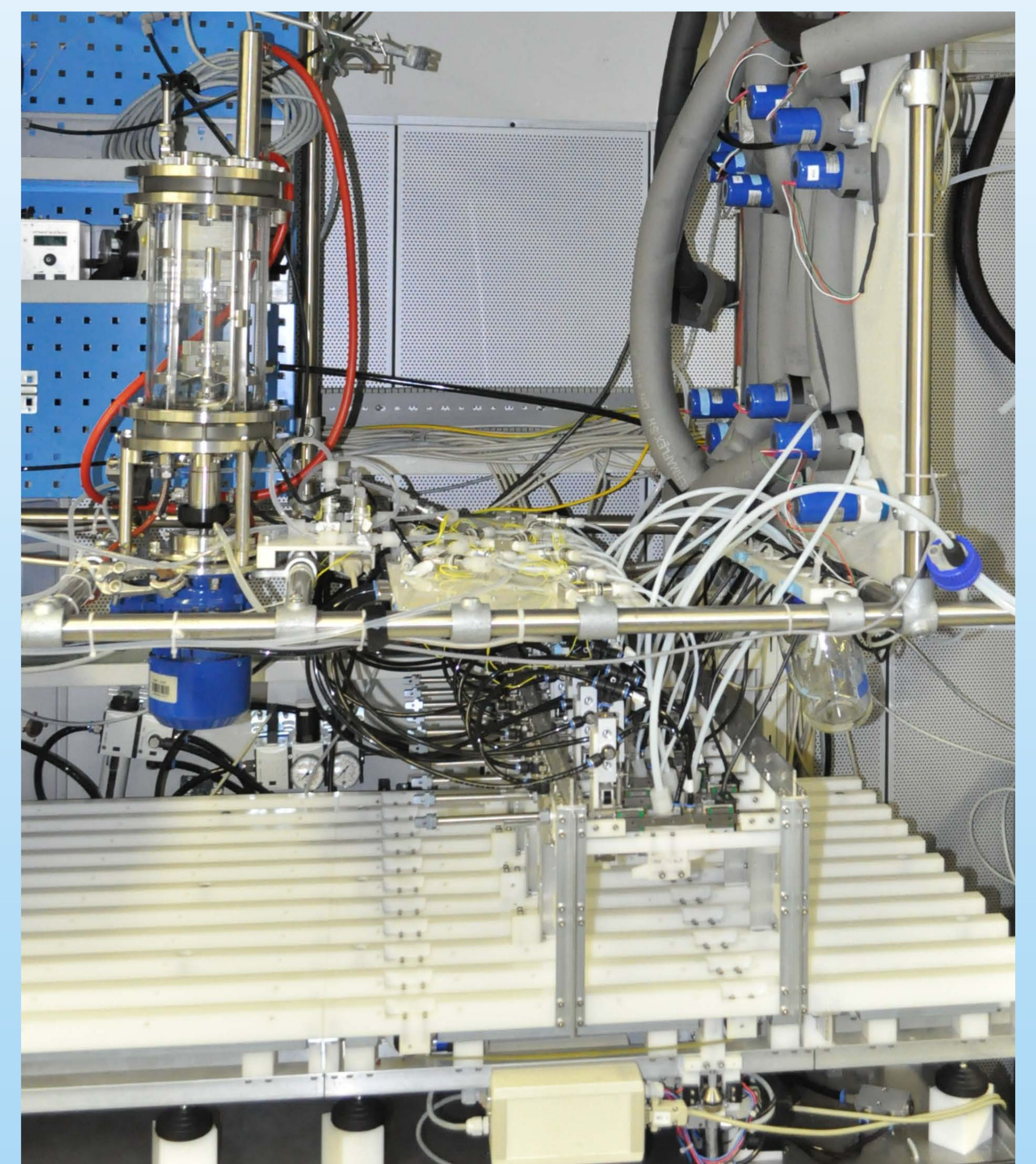


Abb. 4: Foto der Anlage zur schnellen Probennahme (Bioreaktor, Ventilsysteme für Probennahme und Quenching, Abfüllsystem)

Entwicklung einer Methode zur Schnellfiltration

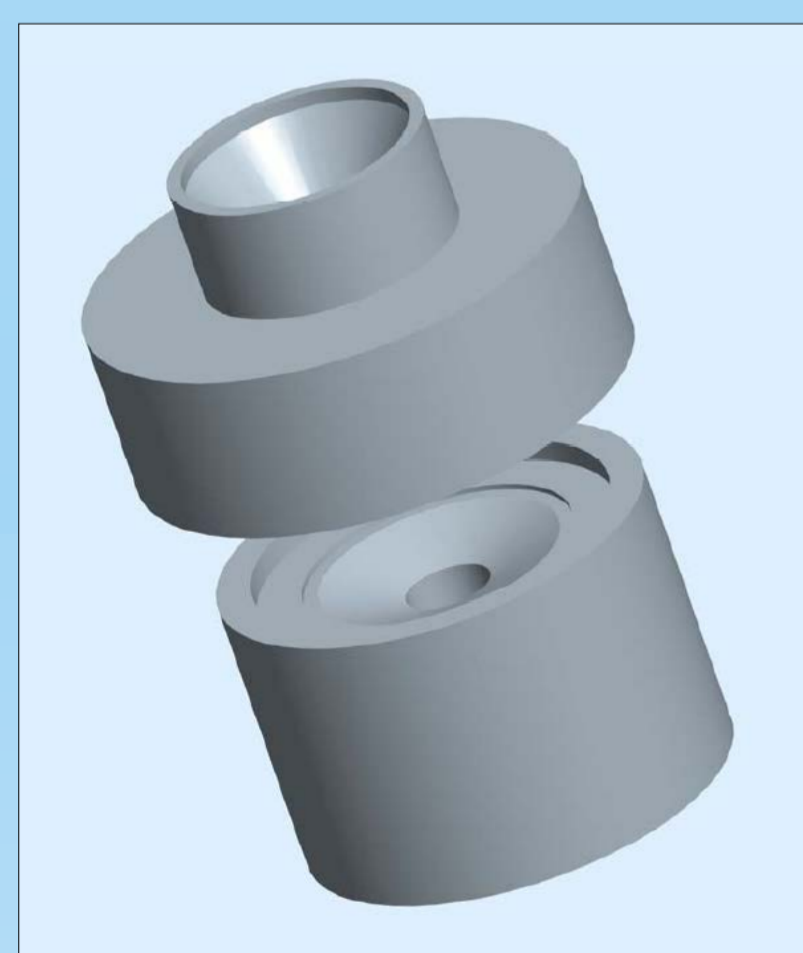


Abb. 5: Filtrationsmodul aus Edelstahl zur druckgetriebenen Filtration von Fermentationsbrühen

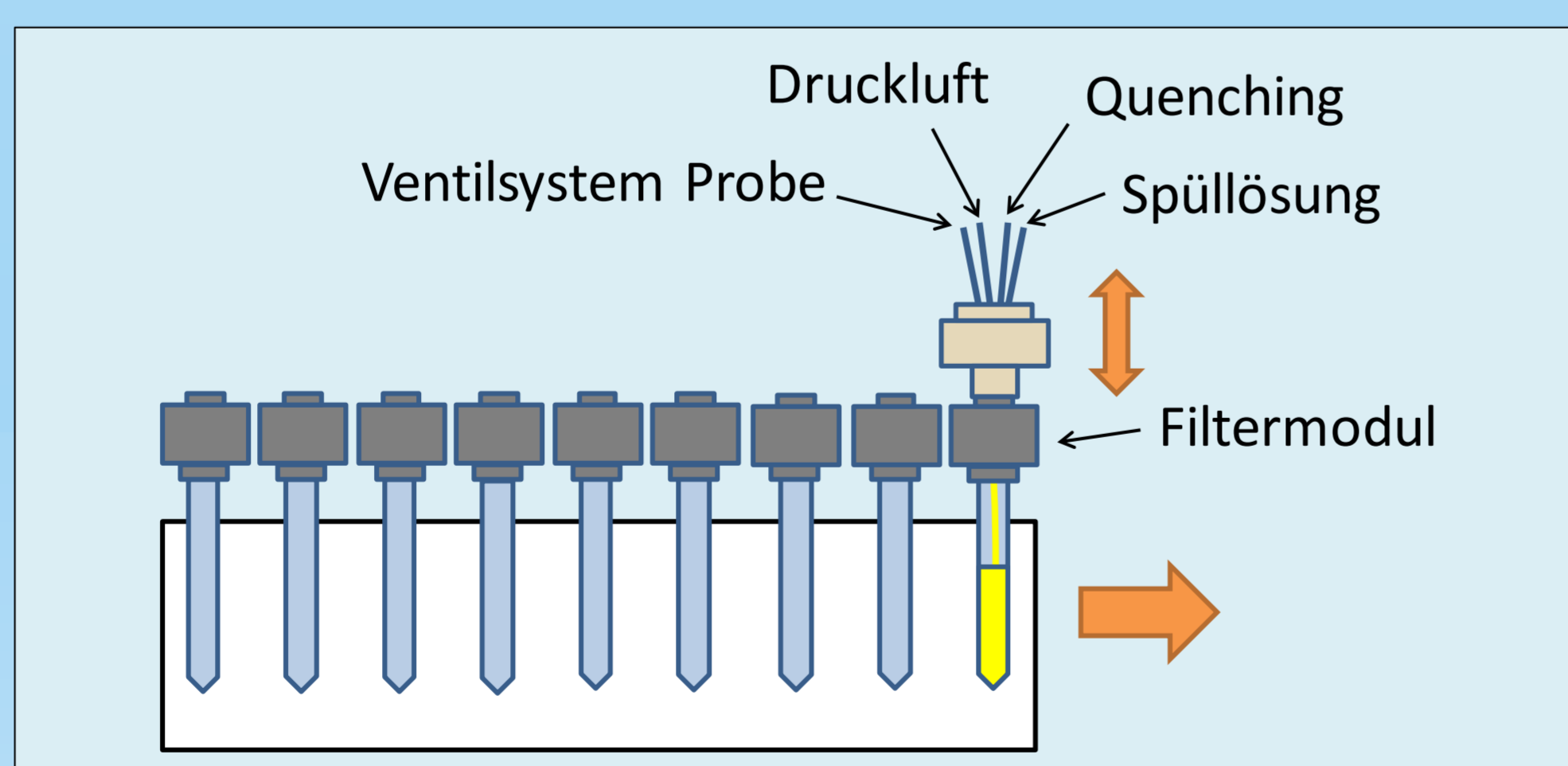


Abb. 6: Integration des Filtrationsmoduls in die Abfüllanlage

Bei der Analyse intrazellulärer Metaboliten in Mikroorganismen tritt häufig das Problem eines Kälteschocks auf. Hierbei wird die Zellintegrität durch ein Quenchen mit kaltem organischem Lösungsmittel geschädigt und es kommt zu einem Verlust intrazellulärer Metaboliten in das extrazelluläre Medium. Um dieser Problematik zu begegnen, reicht eine üblicherweise auf den Quenchingschritt folgende Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation nicht aus, da gezeigt werden konnte, dass die Leckage von Metaboliten aus dem Zytosol innerhalb weniger Sekunden nach dem Quenchen der Probe bereits zu enormen Fehlern führt [1]. In diesem Projekt wird daher eine Methode zur Schnellfiltration entwickelt, mit der eine Trennung von Exo- und Endometabolom noch vor dem Quenchingschritt stattfindet und somit ein unkontrollierter Verlust von Metaboliten nahezu ausgeschlossen werden kann [2].

Suche

Interessante Fragestellungen in den Bereichen Metabolomics und Stoffflussanalyse für mögliche Kooperationsprojekte. Weiterhin suchen wir Hilfestellung und Erfahrung im Bereich der chemischen Analytik kleiner Moleküle.

Biete

Möglichkeit zur Durchführung von Metabolom-Experimenten zur Untersuchung von Stoffwechselwegen, Stoffflussanalysen mittels Isotopenmarkierung, sowie Erfahrung in den Bereichen Probennahme, Quenching und Extraktion von Metaboliten aus Mikroorganismen. Entsprechendes Equipment für Probennahme/Quenching, Extraktion, Probenverarbeitung (Zentrifugation bei -19°C , Gefriertrocknung, Vakuumkonzentration), sowie Analytik (AA-Analytik mittels HPLC, sowie HPIC, LC-MS/MS) stehen zur Verfügung.

Literatur:

- [1] M. Wellerdiek et al. (2009). Bioprocess Biosyst Eng 32:581-592
[2] C. Wittmann et al. (2004). Anal Biochem 327, 135-139

Kontakt

*Prof. Dr. A.-P. Zeng
Technische Universität Hamburg-Harburg
Bioprocess- and Biosystems Engineering, Denickestr. 15, D-21073 Hamburg, Germany
Phone: +49 / 40 / 42878-4183, e-mail: aze@tu-harburg.de