



GERSTEL



Newsletter

GET GERSTELIZED!

News von GERSTEL GmbH & Co. KG · Eberhard-Gerstel-Platz 1 · 45473 Mülheim an der Ruhr · Telefon +49 (0) 208 - 76503-0 · gerstel@gerstel.de

BIOTECHNICA 2008 - Special Edition

Oktober 2008

SPME-Headspace-Technik zur Analyse von Stoffwechselprozessen

Längst haben die Gas- und Hochleistungs-Flüssigchromatographie ihren Platz in der Biotechnologie gefunden. Mithilfe von GC und HPLC lassen sich in Verbindung mit der SPME-Headspace-Technik enzymatische Reaktionen sowie Stoffwechselprozesse einfach überwachen und exakt nachvollziehen und dies im Minimaßstab: in klassischen Headspace-Vials.

Im Verlauf enzymatischer und mikrobieller Reaktionen werden die Ausgangsstoffe mithilfe von Biokatalysatoren wie Enzymen, Mikroorganismen, pflanzlichen und tierischen Zellen in eine Substanz definierter chemischer Zusammensetzung umgewandelt. Die Reaktion verläuft bei zehn bis 40 °C und einem milden pH-Wert von 5 bis 9. Die Ausgangsstoffe werden regio- und enantioselektiv umgesetzt und die Zielmoleküle bleiben in ihrer Struktur erhalten. Zur Detektion und Auswertung des Stoffwechsels bedarf es einer Analysetechnik, die den spezifischen Bedingungen Rechnung trägt. Dies gelingt mit der GC- beziehungsweise HPLC; beide



Vorgänge untersuchen und schnell Ergebnisse über deren Umsetzung voll automatisiert produzieren.

Fragen zum Versuchsaufbau

Das Reaktionssystem sollte über ein Reaktionsgefäß verfügen, das sterilisier- und verschließbar ist. Es sollte von einer Größe sein, die eine Einpassung in gängige Autosampler, eine möglichst effiziente Handhabung sowie einen hohen Probendurchsatz möglich macht. Die Probe sollte sich für ein homogenes aerobes mikrobielles Wachstum gut durchmischen und

sich sowohl luftdicht als auch luftdurchlässig verschließen lassen. Wie sich im Verlauf zeigte, ermöglicht es die GC, die Reaktionskinetik laufender biologischer Prozesse einfach zu überwachen und zu analysieren und zwar in GC-Headspace-Vials (HS-Vials). Es stellte sich auch heraus, dass es durch Modifikation des Vialdeckels gelingt, aerobe und anaerobe biologische Prozesse zu etablieren und reproduzierbare Reaktionen mit einem

Trenntechniken haben sich inzwischen in der bioanalytischen Praxis bewährt. Mit so genannten Chiralitäts-Säulen lassen sich die biologischen Reaktionsprodukte von den Ausgangsstoffen abtrennen.

Schwächen der derzeitigen Technik

Bei den verfügbaren Mikrotiterplatten- und Schüttlersystemen sind Reaktions- und Analyseneinheit voneinander getrennt. Das ist zwar bei gängigen optischen Messverfahren nicht so, allerdings ist deren Informationsgehalt bei weitem nicht vergleichbar mit dem moderner GC- oder HPLC-Systeme. Im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsvorhabens hat die in Berlin ansässige Firma BIOWORX, in Zusammenarbeit mit dem Chromatographie-Spezialisten GERSTEL aus Mülheim an der Ruhr sowie mit erfahrenen Anwendern, das GERSTEL-MPS-Bioscreen entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein leistungsfähiges System für das Screening biologischer Anwendungen. In kleinen Testansätzen lassen sich eine große Anzahl unterschiedlicher biochemischer



BIOWORX

**Kooperationsnetzwerk
Weiße Biotechnologie**

Halle 9, Stand B 34

Volumen von 1 bis 15 mL zu realisieren. Um nun das Prozedere nebst Chromatographie und Detektion möglichst automatisiert durchführen zu können, musste ein Autosampler zum Einsatz kommen, der sich entsprechend flexibel einsetzen lässt. Verwendet wurde der GERSTEL-Multi-PurposeSampler (MPS), ein XYZ-Laborroboter für die GC und LC, der seine Bewegungen frei programmierbar in alle drei Raumrichtungen ausführt. Um die biotechnologische beziehungsweise bioanalytische Aufgabe erfüllen zu können, wurde der MPS mit einem flachen induktiv arbeitenden Magnetrührer ausgestattet. Mit diesem Magnetrührer ist es möglich, die Vials im Bereich von 10 bis 120 °C zu temperieren.

Verbesserte Probenvorbereitung

Durch Wahl der idealen Durchmischungsart und -geschwindigkeit lässt sich die Probenvorbereitung nach individuellen Erfordernissen erheblich verbessern. Unter anderem erweist es sich laut Expertenmeinung als überaus schonend für die SPME-Faser, wenn die Probe nicht geschüttelt, sondern gerührt wird. Der Agitator/Stirrer 007 verfügt derzeit über sechs Vialpositionen; an einer Erweiterung auf 32 Positionen wird gearbeitet. Die HS-Vials eignen sich zur Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen. Verschließen lassen sich die Vials mit einer verschraubbaren Kappe aus Edelstahl, die erforderliche Modifikationen zulassen. Für anaerobe Untersuchungen wurde ein Membranverschluss, für aerobe Versuche und aerobes Zellwachstum ein gasdurchlässiger Verschluss (poröses Silikon) entwickelt. Die Vials sind mit und ohne Medium im Dampfsterilisator bei 121 °C zu sterilisieren.

In Zusammenarbeit mit der TFH-Berlin wurde untersucht, inwieweit sich 10- beziehungsweise 20-mL-SPME- und -HS-Vials für Biotransformationssysteme eignen. Systematisch wurden die jeweiligen Füllstände optimiert und geeignete Messarten für die verschiedenen Substanzgruppen

Messart	Empfohlener Füllstand		Geeignet für Substanzgruppe
	10 mL Röhrchen	20 mL Röhrchen	
Headspace	2-6 mL	5-15 mL	Substanzen mit niedrigen Siedepunkt und hohem Dampfdruck
SPME-Gasphase	2-5 mL	5-10 mL	Breites Spektrum in der Gasphase nachweisbarer Substanzen
SPME-Flüssigkeit	5-10 mL	15-20 mL	Hydrophile Substanzen mit hohem Siedepunkt, die kaum noch in der Gasphase nachzuweisen sind

Tabelle 1: Ermittelte Kennwerte für 10 und 20 ml Headspace-Röhrchen mit verschiedenen Substanzen

ermittelt (s. Tabelle 1). Eine weitere Frage war, wie sich die Analyse relevanter biologisch aktiver Substanzen auf das Biotransformationssystem übertragen lässt. Die Untersuchung ergab eine gute Reproduzierbarkeit der Messwerte.

Weil die SPME-HS-Analytik deutlich sensibler ist als die herkömmliche Headspace-Technik konnten auch geringere Konzentrationen problemlos nachgewiesen werden. Einen Beleg liefert die Messung der Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol: Es ergab sich bei Acetophenon ein 85-fach stärkeres Signal. Bei Phenylethanol wurde sogar ein um das 480-fache stärkeres Signal gemessen, was sich durch den Einsatz eines für Alkohole selektiven SPME-Materials erreichen ließ. Deutlich wurde, wie wichtig es ist, die SPME-HS-Messung an die jeweiligen, analytbezogenen Anforderung anzupassen.

Im weiteren Verlauf wurden unterschiedliche Biotransformationen mit direktem SPME-HS-Monitoring durchgeführt. Mithilfe der Kalibriergeraden konnte aus den gemessenen Peakflächen der jeweilige Umsatz berechnet werden. Das Gasphasengleichgewicht stellte sich problemlos ein, wie die Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol in zwei verschiedenen Konzentrationen zeigt (s. Abb. 1). Die Messung erfolgte bei beiden Versuchen mittels SPME-HS aus dem Gasraum. Es ergab sich eine glatt und gleichmäßig verlaufende Umsatzkurve; der 0,25%ige Ansatz wurde zu 90 Prozent, der 0,5%ige Ansatz zur Hälfte durch Mikroorganismen umgesetzt. Auch bei der Biotransformation anderer Substanzen wie 2-Octanon hat sich das SPME-HS-Monitoring bewährt, was durch reproduzierbar gute Ergebnisse deutlich wird.

Um die Kinetik der SPME-Adsorption während des Messvorgangs zu charakterisieren, wurden mit unterschiedlichen SPME-Materialien Sättigungskurven für Standardsubstanzen aufgezeichnet. Das Prozedere sah vor, die Inkubationsdauer der SPME-Nadel im Gasraum des Vials kontinuierlich zu erhöhen, bis die Größe der gemessenen Peakfläche nicht mehr

proportional steigt bzw. sogar stagniert. Als Beispiel einer solchen Messreihe zeigt die Abbildung 2 für Acetophenon und Phenylethanol. Zu erkennen ist die schnelle Sättigung der Nadel mit Acetophenon, wohingegen die Phenylethanol-Peakflächen selbst bei einer Inkubationsdauer von 15 Minuten noch keinen konstanten Wert erreichen. Bei steigender Inkubationszeit verschiebt sich das Gleichgewicht der Anreicherung von Phenylethanol aus dem Gasraum Richtung Nadel. Wichtig ist daher die exakt eingehaltene Inkubationszeit der SPME-Nadel.

Um die Reproduzierbarkeit der SPME-Messungen zu überprüfen, sind Standard-Ansätze mit Analytmischungen mehrfach vermessen worden; für die Ergebnisse

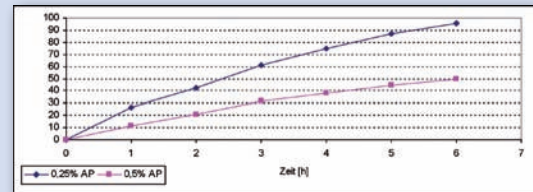


Abbildung 1: SPME Messungen der mikrobiellen Umsetzung von Acetophenon (AP) 0,25% / 0,5%

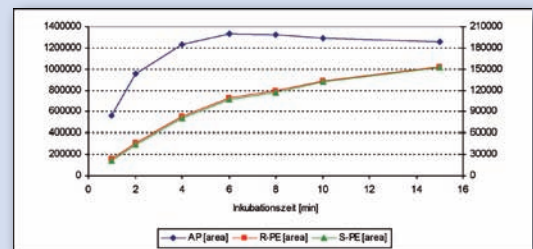


Abbildung 2: Adsorption der Analyten an der SPME-Faser

wurden die Standardabweichung und der prozentuale Fehler berechnet. In Abb. 3 sind Mittelwerte und zugehörige Abweichungen für zwei typische Edukt/Produkt-Gemische dargestellt. Bei gleicher Standardabweichung fällt der Fehler bei kleineren Messwerten stärker ins Gewicht, trotzdem sind die Fehler gering und die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ist für die Zwecke eines Screening-Systems gut.

Für die verwendeten Testsubstanzen wurden mit dem SPME-Messsystem Eichgeraden erstellt und die Reproduzierbarkeit getestet. Mit diesen Eichgeraden konnten die im Screening-Versuch gemessenen Werte in Stoffumsetzungen umgerechnet werden

Impressum

Herausgeber
 GERSTEL GmbH & Co. KG
 Eberhard-Gerstel-Platz 1
 45473 Mülheim an der Ruhr

Redaktion
 Guido Deußing
 ScienceCommunication
 Redaktionsbüro
 Umlandstraße 16
 41464 Neuss
 guido.deussing@t-online.de

Wissenschaftlicher Beirat
 Dr. Eike Kleine-Benne
 eike_kleine-benne@gerstel.de
 Dr. Oliver Lerch
 oliver_lerch@gerstel.de
 Dr. Malte Reimold
 malte_reimold@gerstel.de



Leserdienst
 Andrea Hamm
 aktuell@gerstel.de

Gestaltung
 Paura Design, Hagen
 www.paura.de

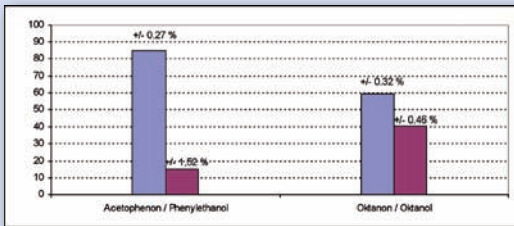


Abbildung 3: Reproduzierbarkeit SPME Messung mit verschiedenen Edukten/Produkten (Substanzen 50:50 Standard)

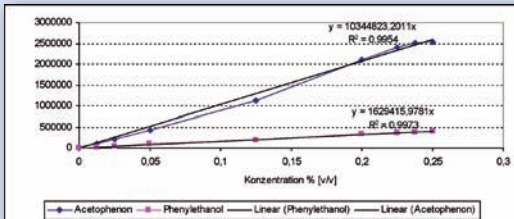


Abbildung 4: Kalibrierkurven Acetophenon und Phenylethanol mit SPME-Faser (Polyacrylate)

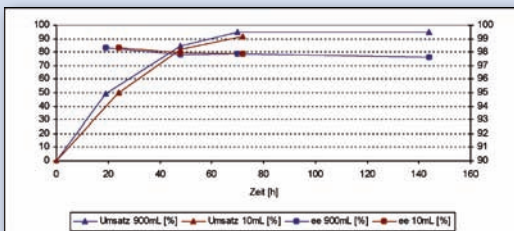


Abbildung 5: Größenvergleich bei der Reduktion von 4-Hydroxy-2-butanon zu 1,3-Butandiol

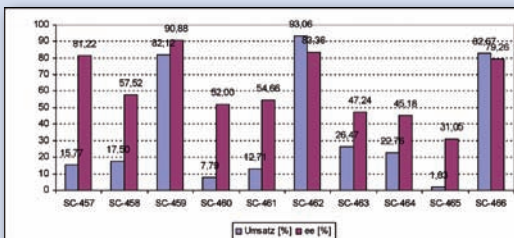


Abbildung 6: Untersuchung von Hefen auf Acetophenon-Reduktion im Screeningsystem mit HS-SPME

(s. Abb. 4), etwa für die Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol. Es zeigt sich über den Messverlauf eine gute Linearität und Reproduzierbarkeit (Korrelation über 0,995). Die Messung wurde bei einer Inkubationszeit der SPME-Nadel in der Gasphase von zehn Minuten erstellt. Allerdings ist es bei höheren Konzentrationen der Substanzen sinnvoll, kürzere Inkubationszeiten zu wählen. Versuche mit zwei und fünf Minuten Inkubationszeit brachten ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit.

Maßstabsübertragbarkeit

In der entwickelten SPME-HS-GC-Reaktions- und Analyseneinheit wurden verschiedene Reihen von Biotransformationen durchgeführt, analysiert und ausgewertet, um die Umsetzung bestimmter Substanzen mit verschiedenen Biokatalysatoren überwachen und verbessern zu

können. Aufgrund der vergleichbar kleinen Versuchsanordnung konnte bereits aus einer geringen Menge an Mikroorganismen und Testsubstanzen eine Vielzahl von Ansätzen erstellt und untersucht werden. Die GC mit chiraler Trennsäule ermöglichte eine schnelle Auswertung der Messergebnisse. Die Untersuchung von miniaturisierten Ansätzen parallel zu Batch-Ansätzen mit 200 bis 2000 mL brachte einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Ansatzgrößen. Wichtige Faktoren für eine gute Maßstabsübertragung sind: identische Temperaturen, eine vergleichbare Belüftung und übertragbare Volumen-Oberflächenverhältnisse. Es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im miniaturisierten System bei einer Maßstabsvergrößerung von fast 1:100 (s. Abb. 5).

Diese Versuche, unter anderem zum Einfluss des pH-Wertes, auf die mikrobielle Aktivität waren wichtig, um die Vorgehensweise allgemein auf andere Versuche übertragen zu können. Ähnliche Versuche wurden zur Temperatur, Belüftung und Eduktkonzentration durchgeführt. Es ergaben sich zwei Parametergruppen, eine Gruppe, die systemunabhängig für jeden Ansatz eingestellt werden kann (z.B. pH, Eduktkonzentration, Zuckerkonzentration, Feeding) und eine Gruppe, die systemabhängig pro Rührsystem (z.B. Temperatur, Belüftung durch Rührerdrehzahl) ist. Die systemabhängigen Parameter sind für die meisten Screening-

Systeme typisch, da etwa die Temperatur innerhalb einer Mikrotiterplatte, innerhalb eines Thermoblocks oder innerhalb einer Temperiereinheit nicht variiert werden kann (s. Abb. 6).

Ausblick und Perspektiven

Durch die spezielle direkte Stoffdetektion kann neben der Umsatzmenge auch eine Aussage über die Umsetzungsqualität (Substanznachweis, Enantioselektivität, etc.) gemacht werden. Das ist ein wichtiger Vorteil gegenüber üblicherweise verwendeten photometrischen Nachweisen. Die Nachweismethoden lassen sich mit der GC schnell entwickeln und führen so zu einem kurzen Weg von der Produkthanfrage zum Produkt. Mit den Erfahrungen dieser Versuchsreihen wurde eine Arbeitsanleitung für das Vorgehen bei der Verwendung des Systems für Screening- und Optimierungsversuche



Abbildung 7: Automatisierte SPME-HS-Probenaufnahme mit dem GERSTEL-MPS-Bioscreen. Durch den Einsatz der SPME-Headspace-Analytik wird die Sensitivität um das 480-fache erhöht.

erstellt. Die SPME-HS-GC-Reaktions- und Analyseneinheit basierend auf dem Gerstel-MPS-Bioscreen ermöglicht eine zeitnahe Entwicklung und Umsetzung von Synthesen. Dank eines raschen Screenings lassen sich in kurzer Zeit bis zu 64 Versuche mit einem breiten Spektrum von Biokatalysatoren parallel analysieren und auswerten. In der voll automatisierten Ausbaustufe ist eine Versuchsabarbeitung rund um die Uhr möglich. Neben der Entwicklung von Biotransformationen können auch Abbauversuche und Stoffwechselvorgänge untersucht und über GC/MS und LC/MS die entstehenden Abbauprodukte verfolgt werden.

Autoren

Thomas Grimm,
BIOWORX, 12489 Berlin,

Dr. E. Kleine-Benne,
GERSTEL GmbH & Co. KG,
45473 Mülheim an der Ruhr,

Prof. Dr. R. Senz,
Technische Fachhochschule Berlin,
13353 Berlin und Dr. C. Piechotta,
Bundesanstalt für Materialforschung und
-prüfung (BAM), 12205 Berlin

Weitere Informationen: BIOWORX
Volmerstr. 7B, 12489 Berlin
Tel.: +49 30 63921041
E-Mail: info@bioworx.de
Internet: www.bioworx.de

GERSTEL-MAESTRO-Software

MAESTRO gestaltet das Zusammenspiel aller GERSTEL-Module und -Systeme effizient und komfortabel:

- „Stand-alone“-Betrieb oder vollintegriert in die Agilent ChemStation
- Eine Sequenztabelle steuert das gesamte System inklusive GC/MS beziehungsweise LC/MS
- Probenvorbereitung per Mausklick mit dem „PrepBuilder“
- PrepAhead: Automatische Mehrfach-Verschachtelung von Probenvorbereitung und Analyse für optimale Produktivität
- Dringende Proben können jederzeit eingeschoben werden
- LOG-file und Service-LOG-file
- Automatische Benachrichtigung per E-Mail bei Systemstörung
- Steuerung von bis zu vier Systemen
- Echtzeit-Anzeige zum Status jedes Moduls
- Interaktive Online-Hilfe in deutscher Sprache

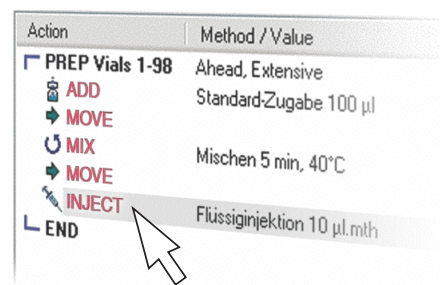
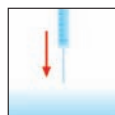


Probenvorbereitung und Probenaufgabe per Mausklick

Der GERSTEL-MultiPurposeSampler MPS ist der multifunktionale Autosampler für die automatisierte Probenvorbereitung und Probenaufgabe in der GC und LC. Jeder einzelne Schritt lässt sich per Mausklick aus einem übersichtlichen Menü der MAESTRO-Software auswählen und mit GC-(GC/MS)- beziehungsweise LC-(LC/MS)-Methoden kombinieren. Die Probenvorbereitung erfolgt, während die vorausgehende Probe analysiert wird. Die zeitliche Mehrfach-Verschachtelung von Probenvorbereitung und Analyse garantiert Ihnen höchste Produktivität.

Mit dem MPS automatisieren Sie unter anderem folgende Probenvorbereitungsschritte und Techniken:

- Zudosierung interner Standards und Derivatisierung
- Verdünnung und Extraktion
- Geheiztes oder gekühltes Konditionieren/Mischen der Proben
- Festphasenextraktion (SPE)
- Wägen von Proben
- SolidPhaseMicro Extraction (SPME)
- AutomatedLinerEXchange (ALEX)
- TwisterDesorption und Analyse (SBSE)
- TwisterBackExtraction (TBE)
- Automated TDU Liner EXchange mit Micro-Vials (ATEX)
- Dynamische Headspace (DHS)



Sämtliche erforderlichen Parameter lassen sich bequem per Mausklick aus einem Menü zu einer Methode zusammenstellen. Beispiel:

- ADD**
Hinzufügen von Lösungsmitteln, Standards oder Reagenzien
- MOVE**
Transport des Vials oder der Kartusche
- MIX**
Schütteln oder Rühren/Heizen der Probe
- INJECT**
Aufgabe der Probe in das GC- oder LC-System

GERSTEL

GLOBAL ANALYTICAL SOLUTIONS

GERSTEL GmbH & Co. KG
Eberhard-Gerstel-Platz 1
45473 Mülheim an der Ruhr
GERMANY
+49 208 - 7 65 03-0
+49 208 - 7 65 03 33
gerstel@gerstel.de
www.gerstel.de

GERSTEL, Inc.
701 Digital Drive
Suite J
Linthicum, MD 21090
USA
+1 410 - 247 5885
+1 410 - 247 5887
info@gerstelus.com
www.gerstelus.com

GERSTEL AG
Enterprise
Surenalstrasse 10
6210 Sursee
SWITZERLAND
+41 41 - 9 21 97 23
+41 41 - 9 21 97 25
gerstel@ch.gerstel.com
www.gerstel.de

GERSTEL K.K.
2-13-18 Nakane
Meguro-ku
152-0031 Tokyo
JAPAN
+81 3 57 31 53 21
+81 3 57 31 53 22
info@gerstel.co.jp
www.gerstel.co.jp



Agilent Technologies
Premier Solution Partner

Änderungen vorbehalten.
GERSTEL®, GRAPHPACK® und
TWISTER® sind eingetragene Marken
der GERSTEL GmbH & Co. KG.
Printed in Germany
© Copyright by GERSTEL GmbH & Co. KG