

Modernisierung der mikrobiologischen Praktika an der Fakultät BCI

1 Antragsteller/in

Lehrstuhl Technische Biochemie
Prof. Dr. Dr. h.c. Oliver Kayser, Dr. Marco Aras

2 Kurzbeschreibung des Projektes

Die von der Technischen Biochemie angebotenen Praktika (Mikrobiologie und Brau-AG) sollen um die Einbindung moderner Analytikmethoden erweitert und modernisiert werden. Hintergrund ist die Übernahme der Leitung des Praktikums durch Herrn Dr. Marco Aras nach der Pensionierung von Herrn Dr. Armin Quentmeier sowie der zukünftigen Neuausrichtung des Praktikums, bei der vermehrt mikrobielle Stoffwechselprodukte untersucht werden sollen. Als Mittel der Wahl ist die HPLC gut geeignet mikrobielle Sekundärstoffe nach Kultivierung qualitativ zu erfassen. Die notwendige HPLC-Anlage ist bereits vorhanden aber kann nicht genutzt werden, da die Software veraltet ist und wegen der technischen Voraussetzungen der RBG nicht ans aktuelle Netz der TU angeschlossen werden kann. In diesem Projekt soll die Beschaffung einer aktuellen Software realisiert werden, damit die HPLC-Methode in den Lehrbetrieb übergehen kann.

3 Details zum Projekt

3.1 Istzustand vor Beantragung

Die vom Lehrstuhl Technische Biochemie zur Verfügung gestellte HPLC-Anlage ist technisch einwandfrei und entspricht den Anforderungen der chemischen Analyse hinsichtlich der Erfassung aller relevanten Metaboliten bei geringer Konzentration. Hierbei handelt es sich um die Agilent 1260 mit folgenden Spezifikationen:

- Detektor: G4212D DAD
- Autosampler: G1329D ALS
- Pumpe: G1312B BinPump
- Entgaser: G1322A Degasser
- Säulenofen: G1316D TCC

Die designierte HPLC-Anlage ist derzeit nicht in Betrieb, da die Software (Bruker Compass HyStar 5.1 Version 5.1.8.1.) veraltet und nicht mehr auf Windows 10 oder höher funktionsfähig ist. Die Vorgaben der Rechnerbetriebsgruppe (RBG) sehen vor, dass mindestens Windows 10 installiert sein muss, damit der Computer ans TU-eigene Netz angeschlossen werden und Zugang zu allen Serviceleistungen erhalten darf. Aus diesem Grund kann diese HPLC aktuell nicht betrieben werden, obwohl sie sich in einem sehr guten technischen Zustand befindet. Daher sollte diese Anlage bestmöglich für die Lehre Verwendung finden, da diese Form der Analytik immer mehr Anwendung in biochemischen Fragestellungen findet und somit frühestmöglich gefördert werden sollte. Und da in allen angebotenen Praktika zurzeit kaum chromatographische Methoden gelehrt und angewendet werden, besteht hier die große Chance die Studierenden frühzeitig mit dieser Methode in Kontakt zu bringen. Der Computer für die neue Software steht bereit und kann sofort nach Installation der HPLC-Software von Agilent betrieben werden.

3.2 Projektziel/Projektbeschreibung

Das beantragte Projekt hat zum Ziel, dass mit der Einführung moderner Analytikmethoden die Studierenden in sämtlichen von der TB bzw. vom Biozentrum angebotenen Praktika mit state-of-the-

art Methoden in Berührung kommen und sich der Lerneffekt im Umgang mit Messinstrumenten deutlich verbessert. Die im bisherigen Praktikum durchgeführten Methoden entsprechen nicht dem Industriestandard. Der dort vorherrschende Einsatz von HPLC-Technik verlangt grundlegende Fertigkeiten auch von unseren Studierenden, die wir bis heute nur hinreichend liefern. Studierende, die sich für Praktika im Biozentrum entscheiden, können ab dem SoSe 2022 auf ein großes Set von Methoden zurückgreifen, die Sie in ihrem späteren Berufsleben anwenden werden. Dafür wurden auch für die bestehenden Praktika neue Versuche entwickelt bzw. die Möglichkeit geschaffen, eine HPLC-Methode in bestehenden Versuchen zu involvieren.

Des Weiteren bietet die Einbindung der HPLC in den Lehrbetrieb den Vorteil, die Studierenden nicht nur im Umgang mit der Analytik zu schulen, sondern auch die Ergebnisse mittels dem bald einzuführenden elektronischen Laborjournal „Sciformation“ zu verknüpfen und die generierten Daten optimal zu verwalten und zu präsentieren.

3.3 Einzelmaßnahmen, Schritte etc.

Um die HPLC möglichst vielfältig in die bestehenden Praktika einzubinden, wurden in den beiden Praktika (Mikrobiologie und Brau-AG) die Voraussetzungen geschaffen. Im Folgenden wird aufgelistet welche Maßnahmen für welches Praktikum ergriffen wurden und wie sich die HPLC-Analytik dort eingliedern wird:

1. Mikrobiologisches Praktikum:

Für das Mikrobiologische Praktikum soll der neue Versuch „Blue genes“ etabliert werden.

- Herstellung des Indigo-Farbstoffes mit einem rekombinanten E. coli-Stamm

Der Versuch wird in dem Lehrbuch „Mikrobiologisches Praktikum“ (Steinbüchel, Oppermann-Sanio, Ewering, Pötter; 3. Auflage 2021) beschrieben und stellt eine optimale Möglichkeit dar, Mikrobiologie und Analytik sehr gut zu verbinden. Die HPLC-Analytik wird mit den Standardmethoden der Technischen Biochemie durchgeführt.

Indigo als einer der ältesten Farbstoffe wurde nachweislich vor über 4000 Jahren bereits in Ägypten zur Färbung von Kleidung und zum Zeichnen eingesetzt. Durch seine kräftige Farbe eignet sich Indigo hervorragend zur Färbung von Pflanzen- und Tierfasern und soll deshalb im Praktikum angewendet werden. Für die Produktion des Indigos wird der entsprechende Stamm E. coli pSKBEC/PP:3,3 (DSM 15371) benötigt. Dieser Stamm kann in Standardmedium kultiviert und anschließend das produzierte Indigo und seine Vorstufen extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt und spektroskopisch analysiert werden. Dazu wird eine einsatzbereite HPLC-Anlage benötigt, die zur Auftrennung der Bestandteile des Extraktes führt und das produzierte Indigo qualitativ nachweisen lässt. Anschließend wird das produzierte Indigo genutzt, um z.B. ein Stück Baumwollstoff einzufärben.

Die Technische Biochemie wird diesen benötigten E. coli-Stamm von der DSMZ kaufen und in die bestehende Stammsammlung eingliedern. Die laufenden Kosten für die HPLC und die Bereitstellung der Säule werden durch die bestehenden Wartungsverträge des Biozentrums gedeckt.

Folgende Methode wird als neue Praktikumsaufgabe eingebracht:

Als Versuchsziel soll der Indigo-Farbstoff mithilfe des rekombinanten E. coli pSKBEC/PP:3,3 synthetisiert und partiell gereinigt werden. Der extrahierte Farbstoff und ggf. seine Vorstufen sollen anschließend mittels HPLC-Analyse qualitativ nachgewiesen werden. Zusätzlich soll der Farbstoff für die Einfärbung von Baumwolltextilien verwendet werden. Die Versuchsdurchführung soll wie folgt ablaufen:

Tag 1: Mit Material einer Einzelkolonie werden nachmittags 10 ml LB-Amp-Nährlösung in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben beimpft. Die Kultur wird bei 37 °C unter Schütteln bebrütet.

Tag 2: Mit 1 ml der Vorkultur werden vormittags 200 ml TB-Amp-IPTG-Nährlösung in einem 1.000 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen beimpft. Die Suspension wird unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Tag 3: Zunächst werden die Zellen im Phasenkontrast mikroskopiert; deutlich sollten die dunkel gefärbten Einschlusskörper an den Zellpolen zu sehen sein. Aus der tief dunkelblau gefärbten Kultur werden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3.500 × g) geerntet. Die Zellen werden zunächst in 50 ml H₂O dem. suspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Suspendieren der Zellen in 50 ml 70 % (v/v) Ethanol und Zentrifugation werden die Zellen in 50 ml 96 % (w/v) Ethanol aufgenommen und zentrifugiert. Das auf diese Weise gewaschene Zellmaterial wird bei – 20 °C eingefroren. Anschließend werden die Zellen in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Tag 4: Die getrockneten Zellen werden in einer Reibschale zerkleinert. Das Material wird in ein Schraubdeckelglas überführt und mit ca. 5 ml Anilin versetzt. Es folgt eine ca. einstündige Inkubation des verschlossenen Röhrchens bei 150 °C im Thermoblock oder in einem Ölbad. In dieser Zeit wird das Röhrchen mit Hilfe einer Holzange mehrmals geschwenkt. Während einer anschließenden 24-stündigen Inkubation im Eisbad kommt es zur Präzipitation der Farbpigmente.

Tag 5: Die Farbkristalle werden durch Filtration über ein Papierfilter mit nachfolgendem Spülen mit 96 % (w/v) Ethanol und H₂O aus der Flüssigkeit gewonnen.

Die anschließende HPLC-Analyse von Indigo soll wie folgt ablaufen:

Die extrahierte Probe wird 1:1 mit DMSO verdünnt anschließend zentrifugiert und filtriert (0.45 µm Filter) zur Entfernung von Schwebstoffen bevor sie dann direkt in die HPLC injiziert werden kann.

Die HPLC-Analyse wird mit folgenden Parametern durchgeführt (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Chromatographiebedingungen zum qualitativen Nachweis von Indigo

Säule	Agilent Poroshell 120 ECC18, 4.6 x 100 mm, 2.7 µm column
Lösungsmittel	A: ACN + 0.4 % TFA, B: H ₂ O + 0.4 % TFA
Gradient	0 – 5 Min :20 % A, 80 % B 5 – 15 Min: 50 % A, 50 % B 15 – 17 Min: 100 % A, 0 % B 17 – 20 Min: 20 % A, 80 % B
Injektionsvolumen	5 – 10 µl
Flussrate	1 ml / Min
Stopzeit	20 Minuten
Temperatur	30 °C
Wellenlänge	600 nm

Als Standard wird Indigo (CAS-Nummer 482-89-3) verwendet, sodass anhand der Retentionszeit die Synthese von Indigo nachgewiesen werden kann.

Die restliche Probe soll dann für die Einfärbung von Baumwolle verwendet werden.

Die Tage 1 & 2 werden vorbereitend für das Praktikum durch die Betreuer durchgeführt und erst ab Tag 3 beginnen die Studierenden mit dem mikrobiologischen und analytischen Teil. Die generierten Daten können dann mithilfe des Elektronischen Laborjournals erfasst und abgebildet werden.

2. Brau-AG:

In der Brau-AG sollen die Studierenden über mehrere Wochen hinweg alle Schritte zur Bierherstellung aus Hopfen, Malz, Gerste und Wasser selbstständig planen und durchführen. Hierbei wird Bier im Ansatz von 50 - 100 Litern hergestellt und der Gärungsprozess stetig überwacht. Um die Bierqualität zu gewährleisten, werden die gebrauten Biere hinsichtlich ihrer Bildung von Bitterstoffen, sogenannten Humulonen oder Lupulonen, mittels HPLC untersucht. Diese Bitterstoffe entstehen bei der Bierproduktion und geben dem Bier die charakteristische Bitternote. Eine solche Analyse wird zurzeit nicht angewendet, aber sie kann für zukünftige Projektarbeiten in der Brau-AG als zusätzlicher Posten der Qualitätskontrolle dienen.

Folgende Methode wird als neue Praktikumsaufgabe eingebracht:

- Auf Basis der „on-site quality control of beer“, die von der Firma Agilent (<https://www.agilent.com>) veröffentlicht wurde, wird die Qualitätskontrolle der gebrauten Biere durchgeführt.
- Nach Beendigung des Brauansatzes werden Proben der hergestellten Biere entnommen und für eine HPLC-Analyse aufbereitet
- Dazu wird das Bier extensiv entgast und direkt zur Analyse in die HPLC eingespritzt
- Die HPLC-Analyse wird mit folgenden Parametern durchgeführt (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Chromatographiebedingungen zur Analyse von Bierbitterstoffen

Säule	Agilent Poroshell 120 ECC18, 4.6 x 100 mm, 2.7 µm column
Lösungsmittel	ACN/H ₂ O + H ₃ PO ₄ (52:48, v/v), pH 2.8 + 1 ml EDTA 0.1 M (isokratisch)
Flussrate	1.8 ml / min
Stopzeit	20 Min
Injektionsvolumen	5 µl (Standards) oder 20 µl (Bierproben] Injektionen mit Needle wash
Temperatur	35 °C
Wellenlänge	270 nm / 4 nm, Ref.: off
Peakweite	> 0.0025 min (0.5 s. response time)

- Für die präzise Identifizierung und Mengenbestimmung der Bitterstoffe sollen drei nichtreduzierte und sechs reduzierte Isohumulone als Standard verwendet werden (z.B. DCHAIso, ICS-I3 und Tetra ICS-T2).
- Diese Standards werden nach Herstellerangaben verwendet.
- Die Studierenden sollen anhand ihrer Ergebnisse dann den Gehalt an gemessenen Bitterstoffen in IBU (international bitterness unit) errechnen und mit Literaturwerten für ihre Biersorten vergleichen (z.B. Beer Judge Certification Programm, Inc., <https://www.bjcp.org/bjcp-styleguidelines/>).

Alle gemessenen Daten sollen dann in Kombination mit dem elektronischen Laborjournal ausgewertet und abgebildet werden.

Der Lehrstuhl Technische Biochemie wird die benötigten Standards kaufen und diese für die Brau-AG zur Verfügung stellen.

3.4 Geplante Laufzeit

Die geplante HPLC-Analytik für die angebotenen Praktika der Technischen Biochemie wird ab dem Wintersemester 2022 eingeführt und hat eine unbefristete Laufzeit.

3.5 Indikatoren zur Evaluation des Projektes

- Evaluierungsbogen der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
- Drei Protokolle der Umsetzung durch drei Studierendengruppen
- Eigene Evaluierung wird durchgeführt
 - o Fragebögen für die Studierenden der jeweiligen Praktika

3.6 Nachhaltigkeit/Verstetigung

Nach Projektbewilligung steht den Studierenden der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen ein aktualisiertes Angebot an Praktika zur Verfügung, welches den Lernerfolg durch die Anwendung moderner Analytikmethoden fördern soll. Durch die unbefristete Einbindung der HPLC-Analytik in bestehende Praktika wird auch nachhaltig der moderne Industriestandard gelehrt und es findet eine bessere Vorbereitung auf das spätere Berufsleben der Studierenden statt.

Die Verknüpfung der Analytikmethoden mit der Nutzung des elektronischen Laborjournals „Sciformation“ fördert diesen Lernprozess sehr und vermittelt modernes und digitales Arbeiten nach aktuellem Maßstab.