

Kalorimetrische Bestimmung der katalytischen Aktivität immobilisierter Enzyme

Von der Fakultät für Chemie und Physik
der Technischen Universität Bergakademie Freiberg
genehmigte

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr.rer.nat.

von Diplomchemiker Hagen Graebner
geboren am 07.11.1970 in Zschopau

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Gert Wolf, Freiberg
Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Roewer, Freiberg
Prof. Dr. rer. nat. habil. Heiner Kaden, Ziegra-Knobelsdorf

Tag der Verleihung: 08.03.2001

Dank

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die direkt oder indirekt am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle ist das Herr Prof. Dr. G. Wolf, der mir es ermöglichte, an dieser interessanten und anspruchsvollen Themenstellung zu arbeiten. Durch seine jederzeit gewährte Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft hat er maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dies gilt in nicht minderem Maße für Frau Dr. R. Hüttl, ohne deren beständiges Interesse am Fortgang der Arbeiten, ständige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und praktischen Hinweise diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. G. Roewer und Frau Dr. U. Georgi danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bei der gemeinsamen Bearbeitung der Sol-Gel-Projekte.

Herrn Dipl.-Chem. R. Kirchner danke ich für die zahllosen Stunden der Diskussion über die mathematische Beschreibung von Kalorimetern. Für die Hilfe bei Rechnerproblemen, insbesondere die Rettung versehentlich gelöschter Daten, möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Seidel bedanken. Herrn Dr. J. Lerchner gilt mein Dank für die Hilfe bei Fragen im Zusammenhang mit dem IC-Kalorimeter.

Da eine wissenschaftliche Arbeit ohne praktische Unterstützung undenkbar ist, schulde ich an dieser Stelle Frau R. Härtel, Frau H. Hergott und Frau G. Melzer meinen Dank. In diesem Zusammenhang möchte ich auch den Herren Dipl.-Ing. S. Braun und Dipl.-Ing. M. Jobst für die Hilfe bei elektronischen Problemen danken. Den Mitarbeitern der Werkstatt danke ich für die Realisierung auch ausgefallener Wünsche. Den Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Chemie danke ich für die angenehme Atmosphäre, in der ich in den vergangenen Jahren arbeiten durfte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Silke und meinen Eltern für die stete Unterstützung auch in schwierigen Situationen.

Dem Freistaat Sachsen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei an dieser Stelle für die finanzielle Förderung der Arbeit gedankt.

Freiberg, im September 2000

Für Silke, Roman und Konrad

Inhaltsverzeichnis

Dank.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	V
Symbole und Abkürzungen.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XV
1 Problemstellung.....	1
2 Wissensstand.....	3
2.1 Kinetik enzymatischer Reaktionen und Enzymaktivität	3
2.2 Immobilisierung von Enzymen	7
2.2.1 Immobilisierung durch Kopplung	7
2.2.2 Immobilisierung durch Einschluss	13
2.2.3 Eigenschaften immobilisierter Enzyme	14
2.3 Nicht-kalorimetrische Methoden zur Bestimmung der	
Enzymaktivität	17
2.4 Kalorimetrische Methoden zur Untersuchung enzymatischer	
Reaktionen	20
2.4.1 Batch-Kalorimeter	21
2.4.2 Strömungskalorimeter	23
2.4.3 Miniaturisierte Kalorimeter	28
3 Zielsetzung	33
4 Experimentelles	35
4.1 Geräte und Chemikalien	35
4.1.1 Geräte	35
4.1.2 Enzyme	35

4.1.3	Chemikalien	35
4.2	Immobilisierungsvorschriften.....	37
4.2.1	Immobilisierung von Enzymen auf porösem Glas.....	37
4.2.2	Immobilisierung auf Eupergit C.....	37
4.2.3	Immobilisierung durch Sol-Gel-Technik	38
4.2.4	Quervernetzung auf Papier mit Glutardialdehyd	38
5	Der Enzymthermistor.....	39
5.1	Aufbau des Gerätes und Messprinzip	39
5.2	Kalibrierung des Enzymthermistors.....	42
5.3	Entwicklung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Enzymthermistors	47
5.3.1	Das Reaktionsmodell	48
5.3.2	Das Kalorimetermodell	51
5.3.3	Anwendung der Modelle zur Optimierung der Messstrategie	53
5.3.4	Anwendung auf eine ausgewählte chemische Reaktion	59
5.3.5	Untersuchung teilkristalliner Gläser als Trägermaterial zur Enzymimmobilisierung	60
5.4	Untersuchung von Immobilisaten mit Substratimpulsen	63
5.4.1	Impulsbetrieb.....	63
5.4.2	Immobilisierung von Enzymen mittels Sol-Gel-Technik	68
5.4.3	Gele aus Tetraethoxysilan	70
5.4.4	Gele aus Alkyltriethoxysilanen	73
6	IC-Kalorimeter	79
6.1	Aufbau des Kalorimeters	79
6.2	Ausgewähltes Modellenzysystem.....	80
6.3	Charakterisierung des IC-Kalorimeters.....	81
6.3.1	Elektrische Kalibrierung	82
6.3.2	Chemische Kalibrierung.....	85
6.3.3	Untersuchung des IC-Kalorimeters mit nativer Katalase.....	85
6.4	Untersuchung von Immobilisaten mit dem IC-Kalorimeter	90
6.4.1	Verwendete Immobilisate	90
6.4.2	Einfluss des Immobilisates auf die Parameter des IC-Kalorimeters	92

6.4.3	Aktivitätsbestimmung von immobilisierten Enzymen mit dem IC-Kalorimeter.....	95
6.4.4	Ergebnisse der Untersuchung einzelner Immobilisattypen.....	96
7	Zusammenfassung.....	101
A.	Anhang	105
A.1.	Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität	105
A.2.	Konzentrationsbestimmungen	110
A.3.	Herleitung des Zusammenhanges für die Temperaturänderung im Enzymthermistor	113
	Literatur.....	115

Symbole und Abkürzungen

α	Proportionalitätsfaktor
A	Extinktion
a	Aktivität
APTS	Aminopropyltriethoxysilan
c_E	Enzymkonzentration
c_{E0}	Startkonzentration des Enzyms
c_{ES}	Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes
c_P	Produktkonzentration
c_S	Substratkonzentration
c_{S0}	Startkonzentration des Substrates
c_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
C_p	Spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck
CPG	Controlled-Pore Glass
ΔT	Temperaturänderung
$\Delta_R H$	Molare Reaktionsenthalpie
ϵ	Empfindlichkeit
ϵ_M	Mikromolarer Extinktionskoeffizient
E	Enzym
E.C.	Enzyme Commission Number
ES	Enzym-Substrat-Komplex
FIA	Fließinjektionsanalyse
f	Verdünnungsfaktor
f_{kal}	Kalibrierkonstante
h	Peakhöhe, Signalthöhe

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k	Geschwindigkeitskonstante
K_M	Michaelis-Konstante
K'_M	Michaelis-Konstante des immobilisierten Enzyms
$K_{M, app}$	Scheinbare Michaelis-Konstante
n	Stoffmenge
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
P	Produkt
P_{heiz}	Heizleistung
ppb	parts per billion
q	Wärme
\dot{q}	Wärmeleistung
ρ	Dichte
r	Reaktionsgeschwindigkeit
r_0	Startreaktionsgeschwindigkeit
r_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
r'_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit des immobilisierten Enzyms
$r_{max, app}$	Scheinbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit
R_{th}	Thermischer Widerstand
S	Substrat
τ	Zeitkonstante
t	Zeit
T	Temperatur
TEOS	Tetraethoxysilan
U_{th}	Thermospannung
v	Volumen
\dot{v}	Strömungsgeschwindigkeit
V_K	Kartuschenvolumen
V_P	Probenvolumen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Aktivierung von Glas mit Aminopropyltriethoxysilan, [4].....	10
Abbildung 2: Anbindung von Enzym an Aminopropyltriethoxysilanaktiviertes Glas mit Glutarialdehyd als Kopplungsreagenz, [4]	10
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Enzymthermistors [138].....	39
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Messkartusche des Enzymthermistors mit eingebautem Immobilisat.....	40
Abbildung 5: Kalibrierung des Enzymthermistors mit drei Enzym-Substratsystemen, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min.....	44
Abbildung 6: Kalibriergeraden für Enzymthermistor in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit	45
Abbildung 7: Abhängigkeit der Kalibrierkonstante von der Strömungsgeschwindigkeit	45
Abbildung 8: Abhängigkeit der gemessenen Temperaturdifferenz vom Ort der Wärmefreisetzung	47
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Produkt- und Substratkonzentration einer nach Michaelis-Menten verlaufenden enzymatischen Reaktion.....	48
Abbildung 10: Verteilung der Produkt- und Substratkonzentration entlang der Längsachse der Kartusche	50
Abbildung 11: Verteilung der Wärmeleistung entlang der Längsachse der Kartusche unter steady-state-Bedingungen	50
Abbildung 12: Prinzipskizze zur Wärmeleistungsbilanz für ein Segment der Kartusche	51
Abbildung 13: Temperaturprofil entlang der Längsachse der Kartusche	52
Abbildung 14: Temperaturdifferenz berechnet als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit.....	54
Abbildung 15: Temperaturdifferenz berechnet als Funktion der Substratkonzentration	54
Abbildung 16: Prinzipskizze zum Ablauf der Fehlersimulation.....	55

Abbildung 17: Prozentualer Fehler der Michaelis-Konstante K_M als Funktion des prozentualen Temperaturfehlers, für $\Delta T = f(c_{S0})$ und $\Delta T = f(\dot{v})$	56
Abbildung 18: Prozentualer Fehler der Geschwindigkeitskonstante k_2 als Funktion des prozentualen Temperaturfehlers, für $\Delta T = f(c_{S0})$ und $\Delta T = f(\dot{v})$	56
Abbildung 19: Abhängigkeit der Fehler von K_M und k_2 von der gewählten Strömungsgeschwindigkeit bei Messung von $\Delta T = f(c_{S0})$	58
Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse für photometrische und kalorimetrische Messungen mit immobilisierter Invertase	60
Abbildung 21: Aktivitätsbestimmung an modifizierten porösen Gläsern	62
Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit des Messsignal für Continuous Flow und Impulsbetrieb	65
Abbildung 23: Einfluss des Impulsvolumens auf die Signalform, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min, Impulsvolumen 0,25 bis 12 ml	66
Abbildung 24: Abhängigkeit der Signalthöhe von der Immobilisatmasse für Invertase auf Eupergit C bei Impulsbetrieb.....	67
Abbildung 25: Abhängigkeit der Signalthöhe von der Immobilisatmasse für Urease auf Eupergit C bei Impulsbetrieb	67
Abbildung 26: Prinzip des zweistufigen Sol-Gel-Prozesses zur Herstellung von Immobilisaten, nach [42].....	70
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität der Glucose-Oxidase bei der Alterung eines Sols mit Glutardialdehyd, GOD: SiO ₂ = 1:15 g.....	72
Abbildung 28: Kalorimetrische Untersuchung des Additiveinflusses auf die Aktivität von Sol-Gel-Immobilisaten, (GOD: SiO ₂ = 1: 15 g).....	73
Abbildung 29: Aktivität verschiedener Immobilisate aus Alkyltriethoxysilanen im Vergleich zu Gel aus reinem Tetraethoxysilan, (GOD: SiO ₂ = 1: 15 g).....	75
Abbildung 30: Einfluss des Enzymgehaltes auf die Aktivität einer Gelschicht aus Aminopropyltriethoxysilan und Tetraethoxysilan (0,4:1)	76
Abbildung 31: Stabilität der katalytischen Aktivität einer Gelschicht aus Aminopropyltriethoxysilan und Tetraethoxysilan (0,4:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.....	76
Abbildung 32: Der Wärmeleistungsdetektor, nach [149]	79

Abbildung 33: Aufbau des miniaturisierten kalorimetrischen Sensors nach [48]	80
Abbildung 34: Signalantwort des IC-Kalorimeter mit trockenem Chip auf einen rechteckförmigen Heizimpuls beim Aufheizen (links) bzw. Abkühlen (rechts), • - Thermospannung(U_{th}), — Heizleistung(P_{heiz})	83
Abbildung 35: Signalantwort des IC-Kalorimeters mit 7 μ l Wasser auf dem Chip auf einen rechteckförmigen Heizimpuls beim Aufheizen (links) bzw. Abkühlen (rechts), • - Thermospannung(U_{th}), — Heizleistung(P_{heiz})	83
Abbildung 36: Abhängigkeit der elektrisch ermittelten Zeitkonstante des IC-Kalorimeters vom Volumen des Tropfens	84
Abbildung 37: Abhängigkeit der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeter vom Volumen des Tropfens	85
Abbildung 38: Abhängigkeit der Peakhöhe von der eingesetzten Katalaseaktivität, ($k_{phot} = k_1$ aus photometrischer Aktivitätsbestimmung)	87
Abbildung 39: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch gemessener Geschwindigkeitskonstante für unkorrigierte Messkurven.....	88
Abbildung 40: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch gemessener Geschwindigkeitskonstante für dynamisch korrigierte Messkurven.....	89
Abbildung 41: Zeitkonstanten bei Verwendung einer makroporösen Glasmembran (Stärke 0,33 mm) mit unterschiedlichen Volumina Wasser im Vergleich zu Zeitkonstanten ohne Trägermaterial	92
Abbildung 42: Vergleich der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters bei Einbau einer 0,33 mm starken Glasmembran gegenüber dem Verhalten ohne Immobilisat für unterschiedliche Wassermengen.....	93
Abbildung 43: Abhängigkeit des registrierten Wärmeumsatzes von der Wasserstoffperoxidkonzentration für Katalase immobilisiert auf makroporöser Glasmembran gegenüber nativer Katalase	94
Abbildung 44: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch ermittelter Geschwindigkeitskonstante für immobilisierte Katalase.....	95
Abbildung 45: Abhängigkeit der Masse gebundener Katalase von der Stärke der verwendeten makroporösen Glasmembran und der Konzentration der eingesetzten Katalaselösung.....	96
Abbildung 46: Makroporöse Glasmembranen, katalytische Aktivität in Abhängigkeit von angebotener Katalasekonzentration und Membranstärke	97

Abbildung 47: Stabilität der katalytischen Aktivität des Immobilisats über einen Zeitraum von 200 Tagen	98
Abbildung 48: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten für 3 makroporöse Glasmembranen mit Regenerierung des Trägers und erneuter Immobilisierung	99
Abbildung 49: Einfluss des verwendeten Additivs auf die Aktivität von Sol-Gel-Immobilisaten auf Filterpapier	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für anorganische Materialien als Träger für immobilisierte Enzyme.....	11
Tabelle 2: Beispiele für organische Materialien als Träger für immobilisierte Enzyme.....	12
Tabelle 3: Kalibrierkonstanten des Enzymthermistors bei Verwendung verschiedener Enzym-Substrat-Systemen, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min	44
Tabelle 4: Kinetische Parameter für immobilisierte Invertase.....	60
Tabelle 5: Kopplungsausbeute für modifizierte Gläser im Vergleich zu Ausgangsglas	61
Tabelle 6: Ergebnisse der Immobilisierung von Invertase an Träger aus teilkristallinem Glas	62
Tabelle 7: Verhältnis zwischen photometrisch und kalorimetrisch ermittelter Geschwindigkeitskonstante bei Auswertung nicht korrigierter Messkurven	89
Tabelle 8: Zeitkonstante in Abhängigkeit von der Wärmekapazität der eingebauten Probe, Berechnung von c_p aus der Masse der Membranen, spezifische Wärmekapazität des Glases $800 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	93
Tabelle 9: Veränderung der Parameter des IC-Kalorimeters bei unterschiedlichen Einbauten, elektrische Kalibrierung.....	95

1 Problemstellung

Enzyme sind für viele wesentliche chemischen Umsetzungen in der belebten Welt verantwortlich. Die außerordentlich hohe Wirksamkeit und gleichzeitig bemerkenswerte Selektivität dieser biologischen Katalysatoren haben bereits seit langer Zeit das Interesse der Chemiker geweckt. Neben dem Einsatz als Katalysatoren für industrielle Synthesen besitzen Enzyme herausragende Bedeutung in der Sensorik. Die Verwendung von Enzymen wird erschwert durch ihren relativ hohen Preis und ihre Empfindlichkeit gegenüber den Bedingungen außerhalb der lebenden Zelle. Durch Bindung des Enzyms an feste Träger (Immobilisierung) wird die Abtrennung des Katalysators vom Reaktionsmedium und so seine mehrfache Verwendung möglich. Außerdem wird durch die Bindung zwischen Enzym und Träger eine deutliche Stabilisierung des Enzymmoleküls erreicht. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Bindungsverfahren und Trägermaterialien für Enzyme erprobt, die jeweils den Anforderungen bestimmter Anwendungen Rechnung tragen. Durch die Immobilisierung werden die katalytischen Eigenschaften des Enzyms in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Immobilisierungsparametern verändert. Häufig kommt es zu einer Verringerung der katalytischen Wirksamkeit, oder bevorzugte Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, etc.) ändern sich. Um eine Optimierung ihrer Eigenschaften in Anpassung an die jeweilige Anwendung zu erreichen, ist es notwendig, die katalytischen Eigenschaften der Enzymimmobilisate zu untersuchen. Das zentrale Kriterium für den Einsatz eines immobilisierten Enzyms besteht in seiner katalytischen Wirksamkeit, d.h. seiner Aktivität. Die Aktivität eines Katalysators ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der eine chemische Reaktion in seiner Gegenwart abläuft. Die Ermittlung der Aktivität immobilisierter Enzyme erfordert somit die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion. Dazu ist es notwendig, die Änderung der Konzentration eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer zu verfolgen, was kontinuierlich, in definierten Zeitabständen oder durch Messung der benötigten Zeit zum Erreichen eines bestimmten Umsatzgrades erfolgen kann.

Trotz der immensen Bedeutung, die die Bestimmung der Aktivität immobilisierter Enzyme für ihren technischen Einsatz besitzt, fehlt bisher eine universell anwendbare Methode, um solche Aktivitäten zuverlässig zu ermitteln. Wünschenswert wäre es, über eine Bestimmungsmethode zu verfügen, die, unabhängig vom eingesetzten Enzym-Substrat-System und der verwendeten Kombination von Enzym und Träger, bei möglichst geringem Substanzverbrauch, auf einfache Weise zuverlässige und vergleichbare Aktivitätsangaben liefert.

Leider ist die direkte Messung der Konzentration nur für wenige Substrate oder Produkte enzymatischer Reaktionen möglich. Sehr oft ist es notwendig, durch komplizierte Reaktionsketten chemisch messbare Spezies zu erzeugen, was den Aufwand der Experimente steigen lässt, und neben den Kosten selbstverständlich auch die Anfälligkeit der Untersuchung für Fehler erhöht. Während dies gleichermaßen für gelöste wie immobilisierte Enzyme gilt, erschwert die variable Form der zur Enzymimmobilisierung verwendeten Träger zusätzlich den Einsatz standardisierter Messverfahren, da die zur Untersuchung gelöster Enzyme eingesetzten Geräte oft nicht zur Untersuchung fester Immobilisate anwendbar sind.

Das kalorimetrische Messprinzip, das zur Untersuchung enzymkinetischer Fragestellungen bereits in früheren Arbeiten verwendet wurde, sollte sich als Grundlage zur Entwicklung einer universellen Methode zur Aktivitätsbestimmung eignen.

Interessant ist besonders, dass dieses in keiner Weise stoffspezifische Messprinzip in Verbindung mit der sehr spezifischen enzymatischen Katalyse hervorragend zur Beantwortung stoffspezifischer Fragestellungen angewandt werden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb, das kalorimetrische Messprinzip zur Bestimmung der Aktivität von Enzymimmobilisaten anzuwenden.

2 Wissensstand

Im Folgenden soll in die Problematik der Bestimmung von Enzymaktivitäten und der Immobilisierung von Enzymen eingeführt werden. Im Anschluss wird ein Überblick zum Problem der kalorimetrischen Untersuchung enzymatischer Reaktionen gegeben.

2.1 Kinetik enzymatischer Reaktionen und Enzymaktivität

Enzyme sind katalytisch aktive, globuläre Proteine, die aufgrund ihrer beträchtlichen Größe (Molmassen im Bereich von 12000 bis 1000000 g/mol [1], Moleküldurchmesser in der Größenordnung von 10 nm [2]) kolloidal in Wasser gelöst werden. Ihre katalytische Aktivität ist an bestimmte Bereiche des Moleküls, die aktiven Zentren gebunden. Diese aktiven Zentren besitzen eine Struktur, die die Ausbildung von Bindungen zwischen dem Enzym und einem bestimmten Substrat ermöglicht. Eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Enzym (E) und Substrat (S) führt zur Bildung eines analytisch nachweisbaren Zwischenproduktes, des Enzym-Substrat-Komplexes (ES), der in einem zweiten Reaktionsschritt in Produkt (P) und freies Enzym (E) zerfällt (1). Diese Eigenschaften,

- große, kolloidal gelöste Moleküle
- Lokalisierung der katalytischen Aktivität an bestimmte Bereiche des Moleküls
- Bildung eines Zwischenproduktes aus Katalysator und Ausgangsstoff

die für das charakteristische kinetische Verhalten enzymatisch katalysierter Reaktionen verantwortlich sind, zeigen größere Ähnlichkeiten mit den Charakteristika heterogener als mit denen homogener Katalysatoren. Aus diesem Grund wurde für Enzyme der Begriff der „*mikroheterogenen Katalyse*“ geprägt. [3].

Eine enzymatisch katalysierte Reaktion kann im Allgemeinen mit dem bereits erwähnten, vereinfachten Mechanismus beschrieben werden:



In dieser Reaktionsgleichung bedeuten:

E freies Enzym

S freies Substrat

ES Enzym-Substrat-Komplex

P Produkt

k_1 Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes

k_{-1} Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes

k_2 Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung

Nach einer sehr kurzen Startphase stellt sich eine konstante Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ein:

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_S c_E - k_{-1} c_{ES} - k_2 c_{ES} = 0 \quad (2)$$

und die Geschwindigkeit der Produktbildung wird durch die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes und die Größe der Geschwindigkeitskonstante k_2 bestimmt.

$$\frac{dc_{Pr}}{dt} = r = k_2 c_{ES} \quad (3)$$

Ist die Startkonzentration des Substrates c_{S0} so groß, dass sie durch Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes praktisch nicht geändert wird ($c_S = c_{S0} - c_{ES} \cong c_{S0}$), d.h. sehr viel größer als die Startkonzentration des Enzyms ($c_{S0} \gg c_{E0}$), ergibt sich die Bilanz:

$$k_1 (c_{E0} - c_{ES}) c_{S0} - (k_{-1} + k_2) c_{ES} = 0 \quad (4)$$

wobei für die Konzentration des freien Enzyms die Differenz zwischen Startkonzentration c_{E0} und Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes c_{ES} eingesetzt wird. Auflösen dieser Gleichung nach der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ergibt:

$$c_{ES} = \frac{c_{E0} c_{S0}}{c_{S0} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (5)$$

Einsetzen dieses Zusammenhanges in (3) führt zur Geschwindigkeitsgleichung für die enzymatische Reaktion:

$$r_0 = \frac{k_2 c_{E0} c_{S0}}{c_{S0} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (6)$$

Nach Zusammenfassen des Verhältnisses der drei Geschwindigkeitskonstanten in Gleichung (1) zur Michaelis-Konstante K_M :

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (7)$$

und des Produktes aus Startkonzentration des Enzyms und der Geschwindigkeitskonstante der Produktfreisetzung zu r_{\max} , der Maximalgeschwindigkeit:

$$r_{\max} = k_2 c_{E0} \quad (8)$$

ergibt sich der Zusammenhang:

$$r_0 = \frac{r_{\max} c_{S0}}{K_M + c_{S0}} \quad (9)$$

Diese Gleichung, die *Michaelis-Menten-Beziehung*, beschreibt für viele enzymatisch katalysierte Reaktionen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates. Dieser Zusammenhang entspricht einer gekrümmten Kurve, die sich für hohe Substratkonzentrationen ($c_{S0} \gg K_M$) der Maximalgeschwindigkeit r_{\max} nähert. In dieser Kurve lassen sich drei Bereiche unterscheiden:

Für niedrige Substratkonzentrationen ($c_{S0} \ll K_M$) ist ein Bereich annähernd linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration zu beobachten. Die enzymatische Reaktion verläuft in diesem Bereich nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung

$$r_0 = \frac{r_{\max}}{K_M} c_{S0} \quad (10)$$

Bei sehr hohen Substratkonzentrationen ($c_{S0} \gg K_m$) wird die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration (Bereich 0. Ordnung) Das Gleichgewicht zwischen freiem Enzym und Substrat einerseits und dem Enzym-Substrat-Komplex andererseits ist dann durch den Überschuss des Substrates so weit nach rechts verschoben, dass alles Enzym als Enzym-Substrat-Komplex gebunden vorliegt ($c_{ES} = c_{E0}$). Man bezeichnet dieses Verhalten als Sättigung des Enzyms. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dann gleich der Maximalgeschwindigkeit.

$$r_0 = r_{\max} \quad (11)$$

Zwischen beiden Grenzfällen verläuft die Reaktion nach einem Zeitgesetz gemischter Ordnung, welches durch die vollständige Michaelis-Menten-Gleichung (9) beschrieben wird.

Bei ausreichend hoher Substratkonzentration ist die Geschwindigkeit der Reaktion demnach nur noch von der Startkonzentration des Enzyms c_{E0} und der Geschwindigkeitskonstante k_2 abhängig. Die im Bereich 0. Ordnung bestimmte Maximalgeschwindigkeit ist ein direktes Maß für die Aktivität des eingesetzten Enzyms. Die

Geschwindigkeitskonstante k_2 ist direkt proportional der Geschwindigkeit mit der die katalysierte Reaktion in Gegenwart des Enzyms abläuft. Sie ist damit ein Maß für die Aktivität des Enzyms. Der zweite die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmende Parameter in Gleichung (9), die *Michaelis-Konstante* K_M , beschreibt das dynamische Gleichgewicht zwischen den einzelnen Teilreaktionen. Die Michaelis-Konstante ist für ein Enzym-Substrat-System eine charakteristische Größe und besitzt die Dimension einer Konzentration. Wenn die Produktbildung sehr viel langsamer als der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes in die Ausgangsstoffe verläuft ($k_2 \ll k_{-1}$), kann die Michaelis-Konstante als Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes betrachtet werden. Sie gibt dann Auskunft über die Affinität zwischen Enzym und Substrat.

Die Michaelis-Menten-Gleichung gilt exakt nur für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, d.h. dass für die Substratkonzentration gilt $c_s = c_{s0}$, eine Bedingung, die im Verlauf der Reaktion nicht mehr erfüllt ist. Die Substratkonzentration nimmt dann den Wert

$$c_s = c_{s0} - c_{pr} \quad (12)$$

an, in dem c_{pr} die Konzentration des gebildeten Produkts darstellt.

Damit erhält die Michaelis-Menten-Gleichung die Form:

$$r = \frac{dc_{pr}}{dt} = \frac{r_{max}(c_{s0} - c_{pr})}{(c_{s0} - c_{pr}) + K_M} \quad (13)$$

Integration der Gleichung (13) in den Zeitgrenzen 0 und t und den Grenzen der Produktkonzentration 0 und c_{pr} ergibt die *integrierte Michaelis-Menten-Gleichung*:

$$t = \frac{K_M}{r_{max}} \ln \frac{c_{s0}}{(c_{s0} - c_{pr})} + \frac{c_{pr}}{r_{max}} \quad (14)$$

Die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt den nichtlinearen Zusammenhang zwischen Produktkonzentration und Reaktionszeit.

Die Aktivität von Enzymen wird durch Messung der Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion unter definierten Bedingungen (pH, Puffer, Substratkonzentration, Temperatur) bestimmt. Die gebräuchlichen Einheiten der Aktivität sind die *Internationale Einheit* (U) und das *katal* (kat). Eine Internationale Enzymeinheit ist definiert als die Enzymmenge, die unter festgelegten Bedingungen pro Minute $1\mu\text{mol}$ Substrat umsetzt. ($1U = 1\mu\text{mol}/\text{min}$). Ein katal entspricht demgegenüber der Menge

Enzym, die 1 Mol Substrat je Sekunde umsetzt. (1 katal = 1mol/s = $6 \cdot 10^7$ U). Daneben sind für bestimmte Enzyme, andere z.B. auf die Geschwindigkeit der Produktfreisetzung bezogene Einheiten gebräuchlich¹. Zur Charakterisierung von Enzympräparaten wird die Aktivität auf die Proteinmenge bezogen und als spezifische Aktivität angegeben (z.B. U/mg). Auf die Definition der Aktivität immobilisierter Enzyme wird weiter unten eingegangen (2.2.3).

2.2 Immobilisierung von Enzymen

Definitionsgemäß [4] werden Enzyme als immobilisiert bezeichnet, wenn sie durch äußere Einwirkung künstlich in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt bzw. örtlich fixiert werden.

Die Einteilung der verschiedenartigen Typen immobilisierter Enzyme kann unter anderem nach dem 1971 von der 1. Enzyme Engineering Conference vorgeschlagenem System [4] erfolgen. In diesem System werden Immobilisierungen durch Kopplung des Enzyms (Ausbildung von Bindungen zwischen Enzym und Trägermaterial) von solchen durch Einschluss des Enzyms unterschieden.

Ziel aller Immobilisierungsverfahren ist die Herstellung von Enzym-Träger-Komplexen mit möglichst hoher katalytischer Aktivität. Weitere Kriterien für den Einsatz von Enzymimmobilisaten sind ihre Stabilität unter Lager- und Einsatzbedingungen, sowie ihre mechanische Stabilität.

2.2.1 Immobilisierung durch Kopplung

Enzyme können durch Ausbildung von Bindungen zu weiteren Enzymmolekülen oder anderen Proteinen (Quervernetzung, *Cross-Linking*) oder durch Kopplung an Trägermaterialien in eine unlösliche Form überführt werden.

Unter Nutzung bifunktioneller Reagenzien ist es möglich, *kovalente Bindungen zwischen Enzymmolekülen* zu erzeugen, die zur Entstehung hochmolekularer, nicht mehr wasserlöslicher Aggregate führen. Es werden Immobilisate von relativ unregelmäßiger, gelatinöser Form erhalten [4]. Mit dieser Art der Immobilisierung lassen sich auch flächige Immobilisate herstellen, die in ihrer Form an verschiedene

¹ Die Aktivität der α -Amylase wird beispielsweise angegeben als Geschwindigkeit der Glucosefreisetzung aus Stärke unter definierten Bedingungen.

Oberflächen angepasst werden können. Damit eignet sich diese Immobilisierung besonders gut zur Anbindung von Enzymen für die Verwendung in Biosensoren [5], [6], [7]. Das am meisten verwendete Reagenz zur Quervernetzung von Enzymen ist Glutardialdehyd [4], mit dem die N-terminalen Aminogruppen der Proteinketten unter Bildung Schiffscher Basen verknüpft werden. Daneben werden Diisocyanate und Diisothiocyanate [4] zur Quervernetzung von Enzymen benutzt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass mechanisch instabile Immobilisate entstehen. Außerdem befinden sich zwangsläufig viele aktive Zentren der Enzymmoleküle im Innern der Aggregate und sind damit besonders hochmolekularen Substraten nur schlecht zugänglich. Die entstehenden kovalenten Bindungen können zur Konformationsänderung des Enzyms und Aktivitätsverlust führen (2.2.3). Die Eigenschaften der Immobilisate lassen sich zum Teil verbessern, wenn durch *Co-Crosslinking* außer dem Enzym noch katalytisch inaktive Moleküle in das Netzwerk eingebunden werden [7]. Dazu werden meist andere geeignete Proteine, z.B. Albumine [7], [8] oder Gelatine [9] verwendet.

Die größte und vielfältigste Gruppe von Immobilisaten beruht auf der *Bindung des Enzyms an anorganische oder organische Trägermaterialien*. Die fast unüberschaubare Vielfalt trägergebundener Enzyme kann nach dem Typ der Bindungen zwischen Enzym und Träger und der Art des verwendeten Trägermaterials klassifiziert werden. Hier soll ein kurzer Überblick über die verschiedenen möglichen Bindungsformen und einige wichtige Trägermaterialien gegeben werden.

Die *Adsorption* von Enzymen an feste Träger wurde bereits 1916 von NELSON und GRIFFIN zur Immobilisierung von Invertase an Aktivkohle angewandt [10], sie ist damit die älteste bewusst angewandte Form der Enzymimmobilisierung. Neben rein physikalischen Kräften (van-der-Waals-Kräfte) spielen bei der Wechselwirkung der komplexen Proteinmoleküle mit dem Träger weitere Bindungskräfte eine Rolle (hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Bindungen). Der genaue Anlagerungsmechanismus ist häufig nicht eindeutig zu definieren und wird deshalb vereinfachend als Adsorption zusammengefasst. Vorteil dieser Immobilisierung ist ihre einfache Durchführbarkeit. Das Enzym wird sehr schonend an den Träger gebunden, seine Aktivität wird dadurch nur wenig beeinträchtigt. Die schwache Bindung zwischen Träger und Enzym führt allerdings auch zu einer geringen Stabilität der Immobilisate, die bereits durch geringe Änderungen des Milieus zur Ablösung des

Enzyms vom Träger führt [4]. Eine bedeutend festere Bindung des Enzyms an den Träger kann durch die Ausbildung *kovalenter Bindungen* zwischen Protein und Träger erreicht werden. Nachteil dieser Immobilisierung ist ein häufig beträchtlicher Verlust der enzymatischen Aktivität, der bis zur völligen Inaktivität einzelner Moleküle führen kann [11]. Dagegen besitzen kovalent gebundene Enzyme eine deutlich erhöhte Stabilität unter Prozess- und Lagerbedingungen [12]. Zur Anbindung an den Träger können verschiedene funktionelle Gruppen des Enzyms genutzt werden. Um eine Schonung des Enzyms bei der Immobilisierung zu erreichen, wird eine notwendige Aktivierung der zur Bindung genutzten Gruppen meist durch vorherige Funktionalisierung des Trägers erreicht. Bei der Aktivierung des Trägers besteht die Möglichkeit, durch geeignete Reagenzien sogenannte *Spacer* oder *Zwischenstücke* zwischen Träger und Enzym einzufügen, die eine größere Beweglichkeit und Zugänglichkeit des Enzyms ermöglichen [3], [13].

Die Charakteristika des Enzym-Träger-Komplexes werden in hohem Maße durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Trägermaterials determiniert [3]. Wichtige Parameter sind Form, Größe und Porosität des Trägers. Durch diese Merkmale wird die zur Bindung des Enzyms zur Verfügung stehende spezifische Oberfläche und deren Zugänglichkeit für das Substrat bestimmt. Das Material des Trägers muss im Reaktionsmilieu eine ausreichende Stabilität und Benetzbarkeit besitzen und die Bindung des Enzyms durch Art und Dichte der zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen ermöglichen.

Im Folgenden werden einige wichtige anorganische und organische Trägermaterialien und die für diese Trägermaterialien verwendeten Immobilisierungsverfahren vorgestellt.

Einer der am häufigsten zur Immobilisierung von Enzymen verwendeten *anorganischen Träger* ist poröses Glas [4], [14], [15]. Glas hat den Vorteil inkompressibel zu sein, besitzt gute Benetzungseigenschaften und kann leicht regeneriert werden. Dieses Trägermaterial wird als *Controlled-Pore Glass (CPG)*² von unterschiedlichen

² Poröse Gläser sind, neben polymeren Kieselsäuren und SiO₂-Zeolithen, eine Gruppe der „Hochkieselsäurehaltigen Adsorbentien“, je nach Zusammensetzung der charakteristischen Gerüststruktur unterscheidet man amorphe poröse Gläser und poröse Gläser mit kristallinen Anteilen. [14]. Bezüglich ihrer Porengröße werden diese Materialien eingeteilt in mikroporöse (Porengröße 0,6 – 1,5 nm), mesoporöse (Porengröße 1,5 – 10 nm) und makroporöse (Porengröße über 10 nm) Gläser [15].

Herstellern in verschiedenen Variationen als Enzymträger kommerziell angeboten. Die native Oberfläche des porösen Glases ist zur Bindung von Enzymen nicht geeignet und muss vor der Anbindung von Enzymen aktiviert, d.h. mit den dazu benötigten funktionellen Gruppen, bevorzugt Aminoalkylgruppen, versehen werden. Dazu dienen hauptsächlich unterschiedliche Silane, vor allem Aminoalkylethoxy- und Aminoalkylchlorosilane [16]. Am Beispiel des häufig verwendeten Aminopropyltriethoxysilan wird dieses Verfahren in Abbildung 1 dargestellt:

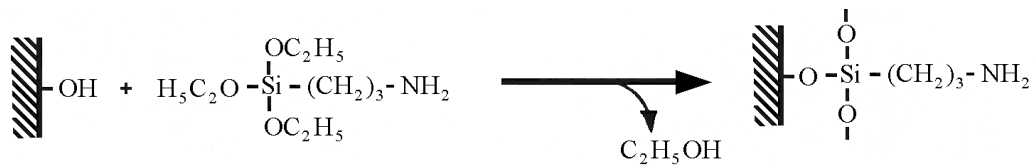


Abbildung 1: Prinzip der Aktivierung von Glas mit Aminopropyltriethoxysilan, [4]

Anschließend kann mit Hilfe bifunktioneller Reagenzien die eigentliche Kopplung des Enzyms an den Träger erfolgen. In Abbildung 2 wird dies am Beispiel einer Kopplung mit Hilfe von Glutardialdehyd gezeigt:

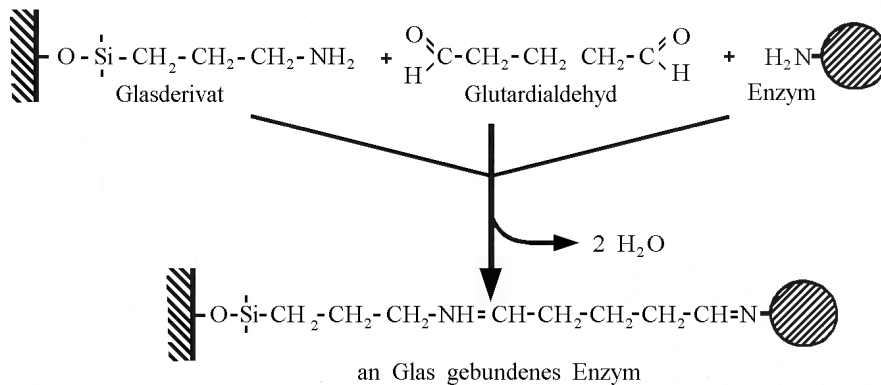


Abbildung 2: Anbindung von Enzym an Aminopropyltriethoxysilanaktiviertes Glas mit Glutardialdehyd als Kopplungsreagenz, [4]

Neben porösem Glas sind in der Literatur noch andere anorganische Materialien als Enzymträger für Immobilisierungen beschrieben. Einen Überblick gibt Tabelle 1:

Trägermaterial	Bindungstyp	Immobilisiertes Enzym	Referenz
Graphit	Kovalente Kopplung über Carbodiimid bzw. über 2,4,6-Trichlorotriazin	Glucose-Oxidase, Peroxidase	[17]
Controlled-Pore Glass (CPG)	Kovalente Kopplung über Aminopropyltriethoxy-silan /Bernsteinsäureanhydrid/ Aktivierung mit Thionylchlorid	Glutamat-Dehydrogenase	[18]
Kieselgel	Adsorption	Lipase	[19]
Aluminiumoxid	Adsorption	Lipase	[19]
Aluminiumoxid	Kovalente Kopplung über Trichlorazin bzw. Glycidol	Lipase, Penicillin G Acylase	[20]
Controlled-Pore Glass	Kovalente Kopplung über Aminopropyltriethoxy-silan/Glutardialdehyd	Glucose-Oxidase	[21]
Siliciumnitrid	Kovalente Kopplung über verschiedene bifunktioneller Reagenzien	Penicillinase	[22]

Tabelle 1: Beispiele für anorganische Materialien als Träger für immobilisierte Enzyme

Neben anorganischen Materialien dienen *synthetische und natürliche Polymere* als Träger für immobilisierte Enzyme. Deren Vielfalt erlaubt es nicht, eine auch nur annähernd vollständige Übersicht über die in Frage kommenden Materialien zu geben. Hier sollen deshalb nur einige Beispiele angeführt werden.

Natürliche Polymere, die als Träger für Enzyme in Frage kommen, sind z.B. Polysaccharide wie Cellulosederivate [23], [24], Agarose [25] oder Chitosan [26]. Diese Polymere werden wie anorganische Träger vor der Immobilisierung durch das Einfügen geeigneter funktioneller Gruppen aktiviert. Polysaccharide besitzen beispielsweise Hydroxylgruppen, die sich u.a. durch Bromcyan, Carbonyldiimidazol [24], Chlortriazin, Benzochinon oder Übergangsmetallsalze aktivieren lassen [3].

Synthetische Polymere können im Gegensatz zu natürlichen Materialien in ihren Eigenschaften gezielt an die Anforderungen der Enzymimmobilisierung angepasst werden.

Trägermaterial	Bindungstyp	Immobilisiertes Enzym	Referenz
Polyvinylalkohol, Fasern	Ionische Bindung	Invertase	[27]
Nylon-Fasern	Kovalente Bindung über Benzochinon bzw. Glutardialdehyd	Glucose-Oxidase	[13]
Polysulfonmembranen	Kovalent über verschiedene funktionelle Gruppen, adsorptiv	Invertase	[28]
Aminierte Styrol-Acryl-Amidcopolymere	Kovalente Kopplung an COOH und NH ₂ -Gruppen	Peroxidase/Glucose-Oxidase	[29]
Polysaccharide (Agarose, Cellulose)	Kovalente Kopplung über Tosylierung	Lipase	[30]
Ionenaustauscher auf Basis von Aminosulfat-Polystyren	Kovalente Kopplung mit Benzochinon	Amylase, Invertase	[31],[32]
Polyethylenphthertephtal atfasern	Kovalente Kopplung über Methylacrylsäure bzw. Acrylamid	Urease	[33]
Epoxyfunktionalisierte Copolymerisate aus Divinylacetatharnstoff und Vinylacetat	Kovalente Bindung an der Epoxyfunktion	Trypsin, Chymotrypsin, Urease, Penicillinase	[34]
Epoxyfunktionalisiertes Polyacrylamid (Eupergit)	Kovalente Bindung an der Epoxygruppe	Glucose-Oxidase	[35]
Cellulose	Kovalente Kopplung nach Bromcyanaktivierung, bzw. Aktivierung mit Carbonyldiimidazol	α -Amylase,	[24]
Cellulose	Verschiedenste kovalente und ionische Kopplungen	Invertase	[23]
Chitosan	Kovalente Kopplung mit Glutardialdehyd	Urease	[26], [36]
Agarose	Kovalente Kopplung durch Glycerolaktivierung	Trypsin	[25]

Tabelle 2: Beispiele für organische Materialien als Träger für immobilisierte Enzyme

Funktionelle Gruppen, die eine besonders effektive und schonende Immobilisierung des Enzyms erlauben, können gezielt durch Verwendung entsprechender Monomere in das Polymer integriert werden. Die Form der Träger kann vielfältig variiert werden, um den Ansprüchen der unterschiedlichen Einsatzfelder zu entsprechen. Tabelle 2 zeigt einige organische Trägersysteme.

2.2.2 Immobilisierung durch Einschluss

Bei der *Immobilisierung durch Einschluss* werden die Enzymmoleküle physikalisch an ihrem Platz gehalten, ohne dass chemische Bindungen zur umgebenden Matrix ausgebildet werden, dadurch werden sie in ihrer Konformation (Tertiärstruktur) nicht beeinträchtigt. Das Enzym kann entweder durch semipermeable Membranen vom Reaktionsraum getrennt oder in das polymere Netzwerk geeigneter Matrices eingeschlossen werden.

Wird das Enzym durch eine semipermeable, nur für das Substrat und die Produkte durchlässige, Membran in einem bestimmten Teil des Reaktionsraumes zurückgehalten, spricht man von *membranabgetrennten Enzymen*. Das Enzym ist unter diesen Bedingungen innerhalb des durch die Membran abgetrennten Raumes völlig frei beweglich. Die Aktivität dieser Immobilisate wird hauptsächlich durch Diffusionsinflüsse bestimmt. Eingesetzt werden solche membranabgetrennten Enzyme in Membranreaktoren, bei denen sich das Enzym in Hohlfasern [4], [37] befindet oder durch Ultrafiltrationsmembranen in einem bestimmten Teil des Reaktors zurückgehalten wird. Zur Membranabtrennung von Enzymen zählt auch der Einschluss in Mikrokapseln. Bei dieser, relativ selten angewandten, Form der Enzymimmobilisierung [4] wird das Enzym im Innern von Kapseln aus semipermeabler Membran zurückgehalten. Hergestellt werden können solche Kapseln z.B. durch Grenzschichtpolymerisation [38]. Allerdings wird auch der Einschluss von Enzymen in Gelkügelchen als Mikroverkapselung bezeichnet [39]. Ein Sonderfall der echten Mikroverkapselung ist der Einschluss des Enzyms in Liposomen, deren Membranen aus Lipid-Doppelschichten in ihren Eigenschaften den Membranen lebender Zellen ähneln [4], [40].

Eine bedeutungsvolle Methode zur Immobilisierung von Enzymen stellt die *Matrixeinhüllung* dar. Bei dieser Form der Immobilisierung werden Enzymmoleküle aufgrund ihrer Größe einzeln im polymeren Netzwerk der meist gelartigen Matrix zurückgehalten, während die Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle nicht

behindert wird. Die Immobilisierung ist für das Enzym schonend, da keine Ausbildung von kovalenten Bindungen erfolgt. Als Matrix können unterschiedliche gelbildende organische und anorganische Substanzen dienen.

Großes Interesse finden Immobilisate, die mit Hilfe der Sol-Gel-Technologie hergestellt werden können. Durch gesteuerte Hydrolyse von Precursorverbindungen, z.B. Alkyl-ethoxysilanen, wird ein Sol hergestellt, das im weiteren Verlauf der Reaktion durch Kondensation zu einem dreidimensionalen Netzwerk verfestigt wird. Aufgrund der sehr milden Reaktionsbedingungen eignet sich das Verfahren sehr gut zur schonenden Enzymimmobilisierung [41], [42], [43]. Die geometrische Form der hergestellten Immobilisate ist sehr variabel.

2.2.3 Eigenschaften immobilisierter Enzyme

Der Erfolg der Enzymimmobilisierung wird durch zwei Größen beschrieben, die *Proteinbeladung* und die *Aktivität* des Enzym-Träger-Komplexes [3]:

Proteinbeladung

Die Proteinbeladung bezeichnet die Enzymmenge die an eine bestimmte Menge Träger gebunden wurde (mg Enzym je g Trägermaterial). Die Proteinbeladung kann durch Aufstellen einer Proteinbilanz ermittelt werden. Dazu wird die Menge des während der Immobilisierung nicht gebundenen Enzyms bestimmt und gegen die eingesetzte Enzymmenge aufgerechnet. Bei Immobilisierungen durch Quervernetzung oder Matrixeinschluss ist die Menge des immobilisierten Enzyms im Allgemeinen gleich der ursprünglich eingesetzten Menge. Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Proteinbeladung sind beispielsweise Elementaranalyse des Enzym-Träger-Komplexes, Proteinbestimmung nach Ablösen des Enzyms vom Träger oder Aminosäureanalyse nach Hydrolyse des trägergebundenen Enzyms. Die Proteinbeladung gibt noch keinen Aufschluss über die katalytische Wirksamkeit des Enzym-Träger-Komplexes. Diese wird bestimmt durch seine Aktivität.

Aktivität

Die katalytische Wirksamkeit des Enzym-Träger-Komplexes ist in gleicher Weise definiert wie die Aktivität freier Enzyme (s. Abschnitt 2.1). Die Aktivität des Enzym-Träger-Komplexes kann als seine *spezifische Aktivität* oder als *relative Aktivität* des gebundenen Enzyms angegeben werden.

Spezifische Aktivität

Zur Angabe der spezifischen Aktivität wird die Aktivität des Enzym-Träger-Komplexes auf seine Masse bezogen. Sie wird als U bzw. katal je mg Enzym-Träger-Komplexes angegeben. Oft wird der Anteil des Enzyms an der Masse des Enzym-Träger-Komplexes vernachlässigt und die spezifische Aktivität nur auf die Masse des Trägers bezogen.

Relative Aktivität

Die relative Aktivität beschreibt das Verhältnis zwischen wirksamer, d.h. tatsächlich ermittelter, und gebundener, aus Proteinbeladung und spezifischer Aktivität des immobilisierten Enzyms zu erwartender, Aktivität.

Immobilisierte Enzyme weisen gegenüber der gleichen Menge nativen Enzyms gewöhnlich eine bedeutend geringere Aktivität auf. Daher ist die in der Literatur häufig zu findende Praxis, den Erfolg einer Immobilisierung nur durch Angabe der gebundenen Enzymmenge zu charakterisieren, nicht korrekt.

Neben der unmittelbar nach der Immobilisierung erreichten Aktivität des Enzymträger-Komplexes ist die Stabilität seiner katalytischen Wirksamkeit unter Lagerungs- und Prozessbedingungen ein entscheidendes Kriterium für die Auswahl eines bestimmten Immobilisierungsverfahrens.

Die Veränderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Enzymmoleküls bei der Immobilisierung wird u.a. verursacht durch [3]

- **Sterische Hinderung**

Aktive Zentren des Enzyms werden durch Abschirmungseffekte des Trägers in ihrer Zugänglichkeit beeinträchtigt.

- **Veränderung der Proteinkonformation**

Infolge der Bindungsbildung zwischen Enzym und Träger sind Verzerrungen in der räumlichen Anordnung des aktiven Zentrums möglich.

- **Chemische Effekte**

Durch die Bindungsbildung sind Veränderungen der ionischen Gruppen der aktiven Zentren möglich, die zur Veränderung des pH-Optimums des Enzyms führen.

- **Einflüsse des Trägermilieus**

Indirekte Einflüsse des Trägers auf die kinetischen Parameter des Immobilisats sind möglich, wenn Wechselwirkungen zwischen Trägeroberfläche und löslichen Reaktanten der Enzymreaktion auftreten. Die Wechselwirkungen führen zum Auftreten von Verteilungsgleichgewichten, die Konzentrationen an der Trägeroberfläche sind nicht mehr mit denen in der umgebenden Lösung identisch.

Die kinetischen Parameter des Immobilisats spiegeln diese Veränderungen wider. Um die kinetischen Parameter immobilisierter Enzyme von denen nativer zu unterscheiden, werden sie durch einen hochgestellten Strich gekennzeichnet (z.B. r'_{\max} und K'_M). Die ermittelten Werte stellen Mittelwerte über die Eigenschaften aller am Träger immobilisierten Enzymmoleküle dar, da aus der Bindung des Enzyms verschiedene, jeweils unterschiedlich stark gebundener Populationen des Enzyms resultieren können [11].

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k'_2 des immobilisierten Enzyms aus

r'_{\max} zu:

$$k'_2 = r'_{\max} / c_{E0} \quad (15)$$

ist nur möglich, wenn die Zahl der aktiven Enzymmoleküle im Immobilisat bekannt ist.

Neben Wechselwirkungen zwischen Trägeroberflächen und Substratmolekülen beeinflusst besonders die Diffusion des Substrats ins Innere des Enzym-Träger-Komplexes seine katalytische Wirksamkeit. In diesem Fall sind die im Innern der Immobilisatpartikel vorliegenden Konzentrationen von Substrat und Produkt verschieden von denen in der umgebenden Lösung. Die Auswertung der an solchen Enzym-Träger-Komplexen gewonnenen experimentellen Daten mit den Methoden der Enzymkinetik führt zu scheinbaren kinetischen Parametern (z.B. $K_{M, \text{app}}$ und $r_{\max, \text{app}}$) die von den diffusionsbestimmenden Größen beeinflusst werden.

2.3 Nicht-kalorimetrische Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von Enzymen ist im Allgemeinen die zeitabhängige Messung der Konzentration der Substrate bzw. Produkte während der Reaktion notwendig. Zur Bestimmung der Konzentration von Reaktionsteilnehmern ist in der enzymatischen Analytik die Nutzung verschiedener konzentrationsproportionaler Größen wie Extinktion, Potential oder Leitfähigkeit gebräuchlich.

Die weitaus größte Bedeutung in der Untersuchung enzymatischer Reaktionen besitzen photometrische Verfahren, deshalb sollen diese im folgenden beispielhaft dargestellt werden.

Durch Messung der Extinktion ist teilweise die „direkte“ Bestimmung der Konzentration von Substraten oder Produkten möglich. Beispielsweise wird bei der photometrischen Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Katalase [44] die Konzentration des Wasserstoffperoxids durch Messung der Extinktion bei 240 nm bestimmt. Für manche Enzyme kann die Bestimmung der Aktivität mit Hilfe eines künstlichen chromogenen Substrates, d.h. eines Stoffes mit struktureller Analogie zum natürlichen Substrat, vorgenommen werden, dessen Umsetzung photometrisch detektierbare Produkte liefert. Beispiele hierfür sind die Aktivitätsbestimmung von β -Galactosidase mit o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid [44] (Messung der Nitrophenolkonzentration) oder alkalischer Phosphatase mit Nitrophenylphosphat (ebenfalls Messung der Nitrophenolkonzentration). Hauptnachteil der Verwendung solcher Substrate ist, dass die gemessene Aktivität nicht ohne weiteres auf das natürliche Substrat übertragen werden kann [44].

Eine sehr große Zahl von Enzymsubstraten bzw. -produkten muss durch Anwendung von Folgereaktionen mit einer konzentrationsproportionalen Größe verknüpft werden. Solche Folgereaktionen umfassen u.a. die Umsetzung des Substrates mit Farbstoffvorstufen zu photometrisch detektierbaren Verbindungen [45]. Dieses Prinzip wird z.B. angewandt bei der Aktivitätsbestimmung von α -Amylase durch Bestimmung der reduzierenden Zucker mit 3,5-Dinitrosalicylsäure/K-Na-Tartrat [44]. Eine weitere Möglichkeit der Geschwindigkeitsmessung ist die Kopplung der Reaktion mit weiteren enzymatischen Schritten in denen Produkte des zu untersuchenden Enzyms zu photometrisch detektierbaren Verbindungen umgesetzt oder unter Verbrauch solcher Spezies abgebaut werden. Solche Enzymketten können mehrere Schritte umfassen, wie bei der photometrischen Bestimmung der Invertaseaktivität, bei der die aus Saccharose

freigesetzte Glucose mit Glucose-Oxidase oxidiert wird. Mittels Peroxidase wird mit dem dabei freigesetzten Wasserstoffperoxid 2,2'-Azino-bis-3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure zu einer gefärbten Verbindung oxidiert [46]. Unter Verbrauch der spektrophotometrisch detektierbaren Spezies Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NADH) kann zum Beispiel die Aktivität der Urease bestimmt werden, indem das im zweiten Teilschritt [47] der Ureasereaktion entstehende Ammonium durch NADH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase mit α -Ketoglutatarat unter NADH-Verbrauch zu Glutamat umgesetzt wird [44], [46]. Alle diese spektrophotometrischen Messverfahren besitzen den Nachteil, nur in völlig klaren und ungefärbten Lösungen einwandfrei zu funktionieren. Diese Einschränkung wirkt sich besonders bei der Untersuchung immobilisierter Enzyme aus, da Störungen z.B. durch Immobilisatpartikel kaum zu vermeiden sind.

Für viele enzymatische Reaktionen sind Folgereaktionen bis hin zu Enzymketten notwendig. Bei in-situ-Messungen muss dabei gewährleistet sein, dass die Folge-reaktion bedeutend schneller als die zu untersuchende Reaktion verläuft, um Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeit zu vermeiden. Das bedeutet auch eine genaue Abstimmung der Reaktionsbedingungen, um eine optimale Funktion aller Enzyme zu gewährleisten. Die Alternative, die ex-situ-Messung der Reaktionsprodukte nach Abstoppen der Reaktion in diskreten zeitlichen Abständen, bedeutet einen erheblichen experimentellen Mehraufwand. In beiden Fällen ist die Verwendung weiterer Enzyme und Co-Faktoren notwendig, was sowohl die Kosten, als auch die Fehleranfälligkeit der Messungen deutlich erhöht.

Neben photometrischen Methoden können unterschiedliche elektrochemische Verfahren zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen eingesetzt werden. In Frage kommen dabei z.B. Messungen des Potentials, des Stroms oder der Leitfähigkeit. Eine Alternative zur oben beschriebenen photometrischen Bestimmung der Ureaseaktivität ist beispielsweise die Messung der Zunahme der Leitfähigkeit der Reaktionslösung durch die freigesetzten Ammonium-Ionen [48], [49]. Die Freisetzung bzw. der Verbrauch von Wasserstoff-Ionen, also die Änderung des pH-Wertes im Laufe der Reaktion wird bei der Bestimmung der Aktivität von Enzymen mittels der pH-stat Methode [50] genutzt. Dabei wird einer Lösung automatisch soviel Lauge zutitriert, wie notwendig ist um den pH-Wert konstant zu halten. Der Verbrauch an Lauge pro Zeiteinheit bietet ein Maß für die Aktivität des Enzyms. Dieses Verfahren kann unter anderem zur Bestimmung der

Aktivität von Lipase, Acetylcholinesterase und Trypsin angewandt werden [45], [50]. Enzymatische Reaktionen, die unter Verbrauch bzw. Freisetzung von Sauerstoff verlaufen, wie die durch Oxidasen katalysierten Umsetzungen verschiedenster Substrate, sind der Untersuchung mit sauerstoffsensitiven Elektroden [51] zugänglich. Auch hier kann durch Einsatz von Enzymketten die Untersuchung von Reaktionen ermöglicht werden, die diesem Messprinzip direkt nicht zugänglich sind. Direkt bestimmbar mit diesem Verfahren sind beispielsweise die Aktivitäten von Katalase (Freisetzung von Sauerstoff), Glucose-Oxidase oder Tyrosinase, (Verbrauch von O₂) [50]. Indirekt zugänglich ist u. a. die Aktivität von Cellulase, durch Oxidation der freigesetzten Glucose mit Glucose-Oxidase und Messung des Sauerstoffverbrauchs [50].

Alle Methoden zur elektrochemischen Bestimmung der Enzymaktivität können nur angewandt werden, wenn entsprechend nachweisbare chemische Spezies an der zu untersuchenden Reaktion beteiligt sind. Während diese Verfahren im Gegensatz zu optischen Methoden auch in gefärbten oder Feststoffe enthaltenden Medien durchgeführt werden können, sind die Anforderungen an die Zusammensetzung des Mediums naturgemäß sehr hoch. So kann zum Beispiel bei konduktometrischen und pH-abhängigen Messungen nur in ungepufferten Lösungen gearbeitet werden. Aufgrund der großen Einflüsse von Puffermedium, pH-Wert und Ionenstärke der Lösung auf die kinetischen Eigenschaften des Enzyms, sind die so ermittelten Werte nur bedingt vergleichbar. Bei amperometrischen Messungen muss ausgeschlossen werden, dass Substanzen im Reaktionsmedium vorliegen, die selbst an der Elektrode umgesetzt werden könnten.

Außer den beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität existieren noch weitere, meist auf wenige Enzyme bzw. Reaktionen beschränkte Messmethoden, wie Radiometrie, HPLC oder Gelelektrophorese [44], [45], [50], auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die beschriebenen Methoden zur Aktivitätsbestimmung sind nur auf bestimmte enzymatisch katalysierte Reaktionen (Oxidation, Hydrolyse etc.) anwendbar. In der Regel erlauben diese Verfahren nur integrale Messungen, d.h. die Ermittlung der aktuellen Reaktionsleistung muss durch Differenzierung der entsprechenden Messkurve gewonnen werden.

Bei der Untersuchung immobilisierter Enzyme erweist es sich sehr oft als weiterer Nachteil, dass die bisherige Entwicklung und Optimierung der Aktivitätsbestimmungs-

verfahren für gelöste Enzyme erfolgte, so dass die oben beschriebenen, unterschiedlichen Formen immobilisierter Enzyme zu apparativen Problemen führen können.

Insgesamt muss festgestellt werden, dass die hier beschriebenen Messprinzipien wenig geeignet sind, um eine möglichst universelle, von Enzym und Trägersystem unabhängige Methode zur Untersuchung immobilisierter Enzyme zu entwickeln.

2.4 Kalorimetrische Methoden zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen

Der Vorteil des kalorimetrischen Messprinzips gegenüber photometrischen oder elektrochemischen Analysenmethoden liegt vor allem in der Universalität der Kalorimetrie, da jede chemische, d.h. auch jede enzymatisch katalysierte Reaktion mit einer Wärmetönung verbunden ist [52]. Es werden deshalb keine spezifischen Anforderungen an die Indikation, wie z.B. Farbe oder Leitfähigkeit der Lösung gestellt. Die Kalorimetrie erlaubt weiterhin die direkte Verfolgung des zeitlichen Verlaufs einer Reaktion.

Bei der kalorimetrischen Untersuchung enzymatischer Reaktionen können thermodynamische oder kinetische Fragestellungen im Vordergrund stehen. Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit liegt das Gewicht dieser Darstellung auf kalorimetrischen Untersuchungen zur Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen, um die Möglichkeiten kalorimetrischer Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zu ermitteln.

Bei kinetischen Untersuchungen mit kalorimetrischen Methoden ist zu beachten, dass der mit dem untersuchten Prozess verbundene Wärmeaustausch durch das dynamische Verhalten des verwendeten Kalorimeters beeinflusst wird [53]. Das dynamische Verhalten des Kalorimeters wird durch seine Zeitkonstante τ beschrieben. Eine hohe Zeitkonstante bedeutet dabei eine langsame Antwort des Kalorimeters auf den Wärmeimpuls und entsprechend eine stark verschmierte Wiedergabe des zeitlichen Verlaufs der Reaktion in der Messkurve.

Für die einzelnen Kalorimetertypen existieren verschiedene mathematische Methoden, die die Rekonstruktion der ursprünglichen Wärmeflusskurve aus der aufgezeichneten kalorimetrischen Messkurve erlauben [53]-[55].

In der Literatur wird zur Untersuchung von enzymatischen Reaktionen die Verwendung von *Batch-Kalorimetern* und *Strömungskalorimetern* (*Durchflusskalorimeter*, *Flow-Kalorimeter*) beschrieben [56].

Strömungskalorimeter (*Flow-Kalorimeter*) sind Kalorimeter, bei denen das Reaktionsmedium durch eine Messzelle fließt. Der zu untersuchende Vorgang findet im Innern der Messzelle statt. Gemessen wird die örtliche Änderung der Temperatur (2.4.2)

Im Gegensatz dazu befindet sich im *Batch-Kalorimeter* eine Reaktionskomponente in einem Reaktionsgefäß. Die Reaktion wird durch Injektion einer zweiten Reaktionskomponente gestartet und die Temperaturänderung im Kalorimeter als Funktion der Zeit gemessen.(2.4.1)

In einem weiteren Schwerpunkt soll die Entwicklung miniaturisierter kalorimetrischer Messanordnungen, d.h. von Anordnungen mit Probenvolumina im μl -Bereich dargestellt werden³.(2.4.3)

2.4.1 Batch-Kalorimeter

Batch-Kalorimeter werden seit längerer Zeit zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen eingesetzt.

Bereits 1953 schlug LANDAHL die Bestimmung der Katalase-Aktivität in Blutproben mit Hilfe kalorimetrischer Messungen vor [57]. Die Maximaltemperatur, die in einer einfachen Anordnung bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxidlösung gemessen wurde, konnte in einem weiten Bereich mit der Katalase-Aktivität korreliert werden.

Ein bedeutend weiterentwickeltes isothermes Batch-Kalorimeter wurde von GRIME et al. zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von α -Chymotrypsin [58] und Cholinesterase [59] genutzt. Die Autoren bestimmten die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Anstieg der Temperatur-Zeit-Kurve. BEEZER [60] beschreibt die Bestimmung der Michaelis-Konstante K_M von Urease aus kalorimetrischen Messungen. Die Temperaturänderung ΔT innerhalb einer Minute nach dem Start der Reaktion

³ Da eine eindeutige Definition des Begriffs miniaturisierte Kalorimeter nicht existiert, ist die Einordnung solcher Geräte schwierig, aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften sollen miniaturisierte Kalorimeter hier jedoch getrennt behandelt werden.

(proportional der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit) wird dazu in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt. KIRSTEIN et al. [61] untersuchten die kinetischen Eigenschaften von Glucose-Oxidase bei Verwendung von Methylenblau als Mediator. Unter Annahme einer Pseudo-Einsubstratkinetik wurden die Michaelis-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit bestimmt. Dazu wurde die innerhalb der ersten 10 Minuten der Reaktion freigesetzte Wärmemenge als Maß für die Reaktionsleistung genutzt. Die Bestimmung der Aktivität von Urease und die Untersuchung der Hemmung des Enzyms durch Schwermetalle wird von ANTONELLI et al. [62] beschrieben. Die maximale Thermospannung die während des Experimentes gemessen wurde, konnte direkt mit der Aktivität des verwendeten Enzyms korreliert werden. HÜTTL et al. beschreiben den Einsatz von isoperibolen Kalorimetern vom Typ LKB 8700 und NTK 82 [63] zur kinetischen und thermodynamischen Untersuchung unterschiedlicher enzymatischer Reaktionen. Zum Einsatz kamen Glucose-Oxidase [64]-[66] und Urease [47]. Aus den aufgezeichneten Messkurve wurde der adiabatische Temperatur-Zeit-Verlauf durch Korrektur nach Regnault-Pfaundler [55] rekonstruiert. Die Startreaktionsleistung (Anfangsgeschwindigkeit) der untersuchten enzymatischen Reaktionen wurde aus dem linearen Anfangsanstieg dT/dt der rekonstruierten Messkurven ermittelt. Durch Messung der Startreaktionsleistung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration konnten die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante der betreffenden Enzyme bestimmt werden. Das Verfahren wurde in weiteren Untersuchungen [46] angewandt, um die Hemmung von Urease [67] und Invertase [68] durch unterschiedliche Schwermetall-Ionen zu untersuchen. In diesen Untersuchungen konnten neben der Ermittlung der Inhibierungskonstanten für die eingesetzten Metall-Ionen auch die Inhibierungsmechanismen ermittelt werden [46]. Die kalorimetrische Untersuchung der Schwermetallhemmung von Urease wird ebenfalls von LEZSKO et al. [69] beschrieben. Die Autoren verwenden zur Bestimmung der kinetischen Parameter (K_M und r_{max}) sowie zur Untersuchung der Hemmung des Enzyms mit Fluorid [70] gleichfalls aus korrigierten Messkurven ermittelte Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion. Beim eingesetzten Kalorimeter handelt es sich um ein isoperiboles Batch-Kalorimeter der Firma Ecolab (Krakow). Die Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Parameter enzymatischer Reaktionen mittels Batch-Wärmeflusskalorimetrie (LKB 2107) beschreiben LIANG et al. [71]. Die Autoren benutzten zur Auswertung der nach TIAN [54] korrigierten kalorimetrischen Messkurve die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (2.1). In einer weiteren Arbeit [72] dieser

Gruppe wird dieses Batch-Wärmeflusskalorimeter zur Untersuchung der Umsetzung unterschiedlicher Substrate durch Laccase benutzt.

Für die Untersuchung immobilisierter Enzyme werden kalorimetrische Messungen im Batch-Modus kaum eingesetzt. Der Grund dafür liegt u.a. in Schwierigkeiten beim reproduzierbaren Einbringen definierter Immobilisatmengen. Das notwendige Rühren der Reaktionsmischung in großvolumigen Batch-Kalorimetern kann darüber hinaus zur mechanischen Zerstörung der Immobilisate führen.

Nachteilig wirkt sich bei kalorimetrischen Messungen im Batch-Modus vor allem der relativ hohe Zeitbedarf solcher Untersuchungen aus, der eine breitere Anwendung für Routinemessungen erschwert. Besonders zeitaufwendig ist häufig die Einstellung des thermischen Gleichgewichts im Kalorimeter. Dieses Problem kann durch Messungen mit Strömungskalorimetern (2.4.2) bzw. durch Verwendung miniaturisierter kalorimetrischer Anordnungen (2.4.3) z.T. gelöst werden.

2.4.2 Strömungskalorimeter

Die Verwendung von Strömungskalorimetern bietet im Vergleich mit der Batch-Kalorimetrie einige Vorteile [73]:

- Vermeidung einer langen Zeit zur Einstellung eines thermischen Gleichgewichts, damit größere Messfrequenz als bei Batch-Kalorimetern
- Vermeidung störender Verdunstungseffekte durch Fehlen einer Gasphase
- Impulsbetrieb möglich (*Fließinjektionsanalyse, FIA*)
- Gute Eignung für die Verwendung immobilisierter Enzyme

Aus diesen Gründen werden solche Kalorimeter vielfach zur Untersuchung biochemischer Prozesse eingesetzt

MONK und WADSÖ entwickelten ein Wärmeflusskalorimeter mit Strömungszelle [73], mit dem auch kinetische Untersuchungen an gelösten Enzymen [74] möglich sind. Die Bestimmung von Enzymaktivitäten mit dieser Anordnung erfolgt durch Messung im Bereich 0. Ordnung (2.1). Dazu wird die Enzymlösung mit der Substratlösung in Kontakt gebracht und durch die Kalorimeterzelle gepumpt. Die Höhe des auftretenden Basislinienversatzes kann als direktes Maß für die Aktivität des untersuchten Enzyms genutzt werden. Die Autoren beschreiben die Bestimmung der Aktivität von Glucose-Oxidase, Alkalischer Phosphatase, Cholinesterase und Lactat-Dehydrogenase.

Eine weiterentwickelte Form dieses Kalorimeters wurde von BEEZER et al. [75] benutzt, um die Kinetik enzymatischer Reaktionen zu untersuchen. Die Autoren stellen in dieser Arbeit die mathematischen Zusammenhänge zur Beschreibung sehr schneller und langsamer Reaktionen in einer Mischzelle (Mischung der reagierenden Komponenten innerhalb der Kalorimeterzelle) und einer Durchflusszelle (Mischung der Reaktionskomponenten vor der Kalorimeterzelle) dar. Bestimmt werden können mit dem beschriebenen Gerät sowohl die Michaelis-Konstante K_M , als auch die Geschwindigkeitskonstante k_2 der enzymatischen Reaktion. Dazu wird die Wärmeleistung bei der betreffenden Reaktion unter Bedingungen 1. und 0. Ordnung gemessen. In weiteren Arbeiten zeigen BEEZER und STUBBS die Anwendung dieses Verfahrens zur kalorimetrischen Untersuchung der Urease-katalysierten Harnstoffspaltung [76] und der Cholinesterasereaktion [77]. Neben der Bestimmung der Michaelis-Konstante von Urease auf diesem Weg, kann der Einfluss des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion untersucht werden. Aus den Messungen zur Aktivität der Cholinesterase unter dem Einfluss von Organophosphor-Pestiziden leiten die Autoren eine Möglichkeit der kalorimetrischen Konzentrationsbestimmung solcher Substanzen durch Bestimmung der Hemmwirkung auf das Enzym ab. Zur Aktivitätsbestimmung wurde wie von WADSÖ [74] vorgeschlagen und von BEEZER et al. in [75] abgeleitet, der Basislinienversatz unter der Bedingung genutzt, dass die Reaktion nach einem Zeitgesetz 0. Ordnung verläuft. CHA nutzte die Methode u.a. zur Untersuchung der Hemmwirkung von Schwermetall-Ionen auf Urease [78].

Neben der Untersuchung gelöster Enzyme beschreiben einige Autoren die Anwendung von Strömungskalorimetern zur Bestimmung kinetischer Eigenschaften immobilisierter Enzyme. FINCH und OWUSU et al. zeigten in ihren Arbeiten eine Möglichkeit, die molare Reaktionsenthalpie und kinetische Parameter durch Anwendung der Strömungskalorimetrie zu bestimmen. Zum Einsatz kamen auf porösem Glas co-immobilisierte Glucose-Oxidase und Katalase [79], Urease [80], sowie immobilisierte Hefezellen [81]. Das Immobilisat wird als Festbettreaktor im Kalorimeter angeordnet. Die Autoren nutzen die Wärmeleistung der Reaktion als Äquivalent für die Reaktionsgeschwindigkeit und setzen diese in die Michaelis-Menten-Gleichung ein. Damit wird statt der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit eine mittlere Geschwindigkeit der Reaktion verwendet. Verschiedene Ansätze zur Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung [3] wurden benutzt, um die kinetischen Konstanten der untersuchten Reaktionen zu bestimmen. Zusätzlich beziehen die Autoren in ihr Modell eine mögliche

Substrathemmung bei hohen Konzentrationen und Diffusionseinflüsse ein. Von KURVITS und SIIMER [82] wird ein LKB 2277 (*Bioactivity Monitor - Thermal Activity Monitor*) zur kinetischen Untersuchung enzymatischer Reaktionen verwendet. Es handelt sich bei diesem Gerät um ein Wärmeflusskalorimeter, das auf Grundlage der Arbeiten von SUURKUUSK und WADSÖ [83] entwickelt wurde. Dieses Kalorimeter kann sowohl im Batch- wie im Flow-Modus betrieben werden. Die kinetischen Parameter der Invertase-katalysierten Hydrolyse von Saccharose konnten im Flow-Modus bestimmt werden, wenn der Umsatzgrad der Reaktion bei ausreichend geringen Werten gehalten wurde, um die Voraussetzungen der Anfangsgeschwindigkeit zu erfüllen.

Eine Kombination von Batch- und Strömungskalorimetrie stellt die *Stopped-Flow-Technik* dar. Diese wurde zusammen mit der Fließinjektionsanalyse entwickelt [84]. Bei dieser Technik wird der Strom des flüssigen Reaktionsmediums nach dem Mischen der Komponenten (Start der Reaktion) gestoppt. Die Reaktion läuft dann im Prinzip wie in einem Batch-Kalorimeter in der Zelle ab und die entsprechenden Auswertungsansätze sind zu verwenden. Bei der Anwendung der Stopped-Flow-Technik in Strömungskalorimetern ist allerdings häufig problematisch, dass es beim Stop des Mediums in der Zelle zu einer Verschiebung der Basislinie kommen kann. Auf die Probleme der Stopped-Flow-Technik für kalorimetrische Anwendungen weisen KODAMA und KOMETANI [85] hin. In einem selbstentwickelten Wärmeflusskalorimeter verwendeten die Autoren, neben intensiven Arbeiten zur Kalibrierung des Gerätes, die Reaktion von Myosin mit Adenosintriphosphat als Modellreaktion. Zur Untersuchung einzelner Reaktionsschritte bei der Hydrolyse von Magnesium-Adenosintriphosphat durch Nitrogenase setzten THORNELEY et al. [86] ebenfalls ein Kalorimeter im Stopped-Flow-Betrieb ein. BEEZER et al. beschreiben in ihrer Arbeit [75] die kinetische Auswertung der Wärmeleistungs-Zeit-Kurve des oben beschriebenen Strömungskalorimeters (LKB 10700-1) mit Mischzelle im Stopped-flow-Betrieb.

Neben der Entwicklung von Kalorimetern für die Untersuchung kinetischer oder thermodynamischer Fragen, richtete sich das Interesse seit Beginn der siebziger Jahre darauf, zur Bestimmung von Substratkonzentrationen das universelle kalorimetrische Messprinzip mit der hohen Spezifität enzymatischer Umsetzungen zu koppeln. Dabei stellte sich früh heraus, dass die Verwendung immobilisierter Enzyme Vorteile gegenüber dem Einsatz von Enzymlösungen besitzt. Nachdem sich einige Arbeiten mit der

direkten Immobilisierung auf dem thermischen Transducer befassten („*Thermal Enzyme Probes*“) [87]- [90], wurden Anordnungen entwickelt, bei denen der Enzym-Träger-Komplex in Form einer Säule in einer Kartusche angeordnet ist und die Temperaturänderung des strömenden Mediums am Ausgang der Kartusche mittels Thermistoren registriert wird. Die wichtigsten grundlegenden Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von den Arbeitsgruppen BOWERS/CARR („*Flow Enthalpimeter*“) [91], [92] und MOSBACH/DANIELSSON („*Enzyme Thermistor*“) [93]-[98] durchgeführt. An der Weiterentwicklung dieser Geräte waren u.a. die Gruppen um SCHEPER [99]-[101] und SCHMIDT [102] beteiligt. Mittels solcher, z.T. kommerzialisierter, Geräte kann die Konzentration einer Vielzahl unterschiedlicher Analyten gemessen werden. Dabei wird, im Gegensatz zu den genannten Arbeiten, bei denen die Untersuchung enzymatischer Reaktionen im Vordergrund steht [75], [80], auf eine exakte mathematische Beschreibung der Geräte weitgehend verzichtet. Lediglich für das von CARR vorgestellte Gerät, das sich im Aufbau der Messzelle wesentlich vom Enzymthermistor von MOSBACH/DANIELSSON unterscheidet, wird von SCHIFFREEN [103] eine theoretische Beschreibung des Verhaltens gegeben. Diese Untersuchungen gehen allerdings von einer adiabatischen Zelle und einem sehr schnellen, vollständigen Umsatz des Substrates aus. Ein Zusammenhang zwischen Peakparametern und der Aktivität der verwendeten Enzymsäule wird nicht in die Betrachtungen einbezogen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im Allgemeinen durch Vergleich mit Kalibriergeraden.

Neben den Arbeiten zur Bestimmung von Substratkonzentrationen, auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll, wurde der Enzymthermistor auch zur Untersuchung der Aktivität von gelösten Enzymen eingesetzt [97]. Auch HUNDECK verwendete den von ihm entwickelten Mehrkanalenzymthermistor [101] zur Enzymaktivitätsbestimmung. In beiden Geräten werden dazu Enzym- und Substratstrom kurz vor der Messzelle zusammengeführt. Die Aktivität wird aus Kalibrierkurven ermittelt.

Zu quantitativen Bestimmung der Aktivität immobilisierter Biokatalysatoren (Enzyme und ganze Zellen) wird ein Enzymthermistor nach DANIELSSON in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe STEFUCA/GEMEINER verwendet. In ihren Arbeiten [104]-[111] stellen die Autoren ein mathematisches Modell vor, mit dem die Bestimmung von kinetischen Parametern immobilisierter Enzyme durch Messungen mit dem Enzymthermistor

möglich ist. Für diese mathematische Beschreibung werden folgende Annahmen gemacht:

- Die Änderung der Substratkonzentration und der Temperatur in der Kartusche sind so gering, dass Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit während des Weges nicht signifikant sind. Die Kartusche des Enzymthermistors wird demzufolge als differentieller Reaktor beschrieben. Dies gilt laut Literatur [112] nur dann, wenn der Umsatz im Reaktor höchstens 5% beträgt.
- Die Strömung im Reaktor kann als Pfropfenströmung (*Plug-Flow*) beschrieben werden.
- Die Oberflächengeschwindigkeit der Strömung ist ausreichend groß, um eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch externen Massentransfer zu vermeiden.
- Der Wärmeverlust aus dem Reaktor wird vernachlässigt und der Reaktor als adiabatisch angenommen.

Um zeitlich konstante Bedingungen im Innern der Kartusche zu erhalten, wird im Gegensatz zum Vorgehen bei der Bestimmung von Substratkonzentrationen die Substratlösung nicht in Form von Impulsen, sondern als konstanter Strom bis zum Erreichen eines stationären Zustandes („*steady-state*“) in den Reaktor eingebracht. Wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt sind, ist die gemessene Temperaturänderung am Kartuschenausgang proportional der Reaktionsgeschwindigkeit, und kann als deren Äquivalent in die entsprechende Geschwindigkeitsgleichung eingesetzt werden. STEFUCA/GEMEINER et al. bestimmten mit diesem Ansatz u.a. Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante können die gemessenen Temperaturänderungen ΔT direkt gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen werden. Für die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit r_{\max} ist es notwendig, eine Kalibrierung des Kalorimeters vorzunehmen, um einen direkten Zusammenhang zwischen der in der Zelle freigesetzten Wärme und der Temperaturänderung am Kartuschenausgang zu erreichen. Da ein Kalibrierheizer zur elektrischen Kalibrierung im Enzymthermistor nicht vorgesehen ist, schlagen die Autoren vor, durch Analyse des Reaktionsgemisches nach Verlassen des Kartusche eine Korrelation zwischen Umsatz und Temperaturänderung zu bestimmen [109], [111], [113]. Dieser Ansatz ist problematisch, da, wie von STEFUCA und GEMEINER [111] beschrieben, bei höherem ΔT offensichtlich doch ein signifikanter Teil der freigesetzten

Wärme über die Reaktorwand verloren geht. Damit wird die Temperaturänderung am Ende der Kartusche auch vom Ort der Wärmefreisetzung bestimmt.

Das beschriebene Verfahren ist auf die Untersuchung von Immobilisaten mit relativ geringer Aktivität beschränkt. Höhere Enzymaktivitäten können dazu führen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in der Enzymsäule nicht mehr konstant ist [111].

Für das schnelle Screening von unterschiedlichen Immobilisaten zum Vergleich der Aktivität, z.B. zur Optimierung von Immobilisierungsverfahren, ist die Methode zudem sehr zeitaufwendig.

2.4.3 Miniaturisierte Kalorimeter

Der breite Einsatz der oben beschriebenen Kalorimeter wird trotz ihrer Universalität dadurch behindert, dass es sich um relativ große, ortsfest zu installierende Geräte handelt. Demgegenüber steht ein zunehmender Bedarf an einfach zu handhabenden, transportablen Anordnungen. Hinzu kommt, dass in bestimmten Anwendungsfeldern nur sehr geringe Analytmengen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden in den vergangenen 10 bis 15 Jahren große Anstrengungen unternommen, möglichst kleine, transportable Kalorimeter bzw. Sensoren zu entwickeln. Die meisten dieser Arbeiten haben rein sensorische Anwendungen zum Ziel und verwenden immobilisierte Enzyme als Erkennungseinheit. Bei der Entwicklung der miniaturisierten Anordnungen werden von einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche messtechnische Ansätze verfolgt.

Als temperatursensitive Elemente werden zum einen Thermistoren und zum anderen (integrierte) Thermosäulen eingesetzt.

Thermistoren als thermische Transducer werden vor allem von XIE und DANIELSSON [98], [114]-[120] in Kombination mit immobilisierten Enzymen eingesetzt. Bei den meisten dieser miniaturisierten Anordnungen handelt es sich um Weiterentwicklungen des Enzymthermistor-Prinzips [95], [96]. Das Enzym wird auf sphärische Träger (z.B. CPG) immobilisiert und in Form von kleinen Enzymkartuschen verwendet [118], [120]. Die Analyse von Substratgemischen wird bei einigen Varianten [116], [120] durch Anwendung von Enzymkaskaden mit entsprechender Anzahl von Thermistorpaaren ermöglicht. Diese Anordnung ist relativ unflexibel und nur für eine beschränkte Anzahl von Analyten im Gemisch anwendbar.

Die Autoren entwickelten außerdem einen sogenannten „Chip Biosensor“, bestehend aus einem Siliciumchip mit eingeätzten Kanälen, in die das Enzym direkt immobilisiert

wird [115]. Auch bei diesem Gerät erfolgt die Temperaturmessung durch Thermistorpaare. Hauptsächliches Einsatzgebiet der von XIE und DANIELSSON entwickelten Geräte sind medizinische Anwendungen [98].

Außer dem Prinzip des Enzymthermistors wurde auch das der „*Thermal Enzyme Probes*“ für miniaturisierte Anordnungen aufgegriffen. SHIMOHIGOSHI et al. [121], [122] entwickelten ein miniaturisiertes Kalorimeter, das aus zwei Thermistoren in einer gemeinsamen Messzelle besteht, von denen einer mit immobilisiertem Enzym, der andere mit inaktivem Träger umhüllt ist. Durch die Zwillingbauweise können Störeffekte eliminiert und die Anordnung ohne Themostatierung betrieben werden.

Ein anderer Ansatz wird durch die Herstellung von Sensorchips mit integrierten Thermosäulen möglich (Dünnschichtthermosäulensysteme). Biosensoren auf der Basis solcher Transducer wurden zuerst von MUEHLBAUER [123]-[125] zur Entwicklung eines Glucosesensors genutzt, bei dem Glucose-Oxidase mit Katalase auf einer Dünnschichtthermosäule co-immobilisiert wird. Die Dünnschichtthermosäule bildet den Boden einer Durchflusszelle, beim Durchfluss von Glucoselösung durch die Messzelle wird die Thermospannung in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten gemessen.

Das Konzept der Dünnschichtthermosäulen wird auch in den Arbeiten von KÖHLER [126], [127] und STEINHAGE [128] benutzt. Die von KÖHLER entwickelten Thermosäulenchips wurden in Strömungs- und Batch-Kalorimetern eingesetzt. Da die direkte Immobilisierung des Enzyms (Glucose-Oxidase und Katalase) nicht zu ausreichender Aktivität auf der sensitiven Fläche des Chips führte, wurde die Durchflussmimik mit einer Enzymkartusche kombiniert, in der sich auf Eupergit C immobilisiertes Enzym befand. Im Gegensatz zur Strömungs-Anordnung, die nur zur Substratanalytik eingesetzt wurde, kann mit der Batch-Variante im Prinzip auch die Bestimmung der Aktivität gelöster Enzyme erfolgen. Die Auswertung geschieht durch Auftragung der Peakhöhe (maximale Wärmeleistung) bzw. der Gesamtdauer der Reaktion gegen die eingesetzte Enzymaktivität. Allerdings erscheint diese Form der Auswertung ungenau, da die Eigendynamik des Kalorimeters bei dieser Art der Auswertung vernachlässigt wird.

Demgegenüber werden von OEHMGEN, LERCHNER und WOLF bedeutend weiterentwickelte Algorithmen zur kinetischen Auswertung der Messsignale miniaturisierter Batch-Wärmeflusskalorimeter vorgestellt. Die Autoren nutzen damit ein von ihnen entwickeltes miniaturisiertes Wärmeflusskalorimeter auf der Basis integrierter Wärme-

leistungsdetektoren [129] zur Untersuchung enzymatischer Reaktion [48], [130], [131]. Die Autoren konnten zeigen, dass es möglich ist, mit Hilfe verschiedener Algorithmen zur kinetischen Auswertung der Messsignale, die Aktivität von gelösten Enzymen zu bestimmen [48], [132]. Zur kinetischen Auswertung werden die Bestimmung der Startreaktionsleistung aus der Peakhöhe, die Modellierung der gesamten Wärmeleistungskurve oder die Auswertung der Abklingkurve nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung genutzt [48]. Neben der Aktivität von Urease und Peroxidase konnten die Konzentrationen von Inhibitoren, wie Cadmium- und Cyanid-Ionen aus ihrer Hemmwirkung bestimmt werden. Dabei gelingt der Cyanid-Nachweis bis in analytisch interessante Konzentrationen im ppb-Bereich. [132]

Weiterhin konnte das beschriebene IC-Kalorimeter erfolgreich zur Konzentrationsbestimmung für Enzymsubstrate, wie Glucose und verschiedene Phenole eingesetzt werden [133], [134].

In neuesten Arbeiten gelang die Entwicklung von miniaturisierten Strömungskalorimetern auf der Grundlage des IC-Kalorimeters, die unter anderem zur parallelen Bestimmung von Enzymsubstraten eingesetzt werden können [135].

Die in der Literatur beschriebenen Arbeiten zeigen, dass kalorimetrische Methoden hervorragend zur Verfolgung enzymatischer Reaktionen geeignet sind, da keine Einschränkungen hinsichtlich der untersuchbaren Reaktionstypen bestehen.

Während in einer Vielzahl von Arbeiten unterschiedliche Wege zur Aufklärung der kinetischen Parameter gelöster Enzyme gezeigt werden, spielt die Untersuchung immobilisierter Enzyme eine geringere Rolle. Die Arbeiten der Gruppen OWUSU/FINCH und STEFUCA/GEMEINER zeigen die Eignung von Strömungskalorimetern zur Untersuchung von sphärischen Enzymimmobilisaten. Da die reproduzierbare Anordnung dieser Immobilisate am besten als Festbett gewährleistet wird, sind Geräte vom Typ des Enzymthermistors für die kalorimetrische Untersuchung immobilisierter Enzyme besonders gut geeignet. Die mathematischen Ansätze zur kinetischen Auswertung der Messdaten die von diesen Autoren angegeben werden, stellen eine gute Ausgangsbasis dar. Bisher nur unzureichend geklärt sind die Fragen der Kalibrierung solcher Strömungskalorimeter und ihrer mathematischen Beschreibung. Die Betrachtung der Messzelle als differentieller Reaktor und Vernachlässigung von Wärmeverlusten (adiabatischer Reaktor) sind, wie GEMEINER und STEFUCA in ihrer aktuellen Übersicht [111] feststellen, nicht ausreichend.

Für viele Anwendungen, z.B. zur Optimierung von Immobilisierungsverfahren, sind schnelle vergleichende Aussagen zur Aktivität und Stabilität von Enzymimmobilisaten notwendig. Für diesen Zweck sind die bisher in der Literatur vorgeschlagenen Bestimmungsmethoden zu zeitaufwendig, ein schnelles Screeningverfahren fehlt bisher.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die kalorimetrische Bestimmung der katalytischen Aktivität immobilisierter Enzyme. Die Universalität des kalorimetrischen Messprinzips bietet die Voraussetzung, die Bestimmung der katalytischen Aktivität der Immobilisate unabhängig vom immobilisierten Enzym, dem verwendeten Trägersystem und dem Immobilisierungsverfahren durchzuführen.

Im Vordergrund der Arbeiten steht dabei die Charakterisierung von Enzym-Träger-Komplexen bei der Entwicklung und Optimierung von Immobilisierungsverfahren.

Aufgrund der unterschiedlichen geometrischen Form der Immobilisate war es notwendig, verschiedene Kalorimeter für die Aktivitätsbestimmung einzusetzen.

Zur Untersuchung sphärischer Immobilisate stand der Enzymthermistor, ein isoperiboles Strömungskalorimeter, zur Verfügung. Der Enzymthermistor wurde bisher vielfach in der enzymatischen Substratanalytik eingesetzt. Zur Ermittlung kinetischer Parameter immobilisierter Enzyme war die Entwicklung eines mathematischen Modells für die Beschreibung der kalorimetrischen Anordnung notwendig. Dieses Modell sollte zur Erarbeitung von Messstrategien und zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität von Modellimmobilisaten verwendet werden.

Für die Untersuchung flächiger Immobilisate bietet das am Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Bergakademie Freiberg entwickelte IC-Kalorimeter sehr gute Voraussetzungen. Dazu war es erforderlich, den Einfluss des Immobilisates auf die Empfindlichkeit und das dynamische Verhalten des Kalorimeters durch chemische und elektrische Kalibrierung zu bestimmen. Die so ermittelten katalytischen Aktivitäten der verwendeten flächigen Immobilisate sollten mit einer photometrischen Referenzmethode überprüft werden.

4 Experimentelles

4.1 Geräte und Chemikalien

4.1.1 Geräte

Kalorimeter

Enzymthermistor nach DANIELSSON [96], Modell 9000, Teltec, Lund, Schweden

Batch-IC-Kalorimeter, Technische Universität Bergakademie Freiberg

Sonstige Geräte:

Peristaltische Pumpe Typ UNIPAN 306, Wissenschaftlicher Apparaturbaubetrieb UNIPAN, Warschau, Polen

UV/VIS/NIR Spektrometer, Unicam 8625, Unicam Limited, Cambridge, Großbritannien

4.1.2 Enzyme

Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4), *Aspergillus niger*, Firma Serva

Urease (EC 3.5.1.5), Schwertbohne, Firma Serva

Katalase (EC 1.11.1.6), *Aspergillus niger*, Firma Serva

Invertase (EC 3.2.1.26), Hefe, Firma Boehringer Mannheim

Peroxidase (EC 1.11.1.7), Meerrettich, Firma Serva

4.1.3 Chemikalien

Puffersubstanzen:

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (Tris), Firma Biomol

Natriumdihydrogenphosphat

Dinatriumhydrogenphosphat

Kaliumdihydrogenphosphat

Essigsäure

Natriumhydroxid

Salzsäure

Enzymsubstrate:

Wasserstoffperoxid, 30%, "medizinisch reinst", *Firma Merck*

Glucose, "Biochemika", *Firma Fluka*

Saccharose, "für biochemische Zwecke", *Firma Merck*

Harnstoff, "für Biochemische Zwecke", *Firma Merck*

Chemikalien zur Aktivitätsbestimmung

2,2'-Azino-bis-3-ethylthiazoline 6-sulfonsäure-Diammoniumsalz, *Firma Sigma-Aldrich*

4-Aminoantipyrin, *Firma Sigma-Aldrich*

N,N-Dimethylanilin, *Firma Sigma-Aldrich*

o-Dianisidinhydrochlorid, *Firma Merck*

Sonstige Chemikalien

Glutardialdehyd, Lösung, 25%, *Firma Merck*

Tetraethoxysilan, *Firma Fluka*

3-Aminopropyltrethoxysilan (APTS), *Firma Fluka*

3,5-Dinitrosalicylsäure, *Firma Fluka*

Coomassie-Blau G, *Firma Merck*

Kaliumnatriumtartrat, *Firma Merck*

Trägermaterialien:

Eupergit C, *Firma Röhm-Pharma, Weiterstadt*

Poröses Glas

Trisoperl, *Firma Schuller, Werk Steinach*

SIRAN©, *Firma Schott, Mainz*

Makroporöse Glasmembranen, *Arbeitsgruppe Prof. Janowski, Martin-Luther-Universität Halle*

Teilkristallisierte poröse Gläser, *Arbeitsgruppe Prof. Schwieger, Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen*

4.2 Immobilisierungsvorschriften

4.2.1 Immobilisierung von Enzymen auf porösem Glas

Die Immobilisierung von Enzymen auf porösem Glas umfasst nach der Methode von WEETALL [16] die Silanisierung des Glases, die Aktivierung mit Glutardialdehyd und die Kopplung des Enzyms. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Arbeitsgruppe DANIELSSON (Lund) [136] in der folgenden Form verwendet:

Zur Silanisierung werden die, durch einstündiges Kochen mit 5% Salpetersäure oder 30% Wasserstoffperoxid gereinigten, Glasträger in einer Lösung von 2,2 ml Aminopropyltriethoxysilan und 18 ml H₂O suspendiert und mit 6 n HCl ein pH-Wert von 3,5 eingestellt. Die Suspension wird dann unter gelegentlichem Schütteln 4 h bei 75°C gehalten. Anschließend wird das Glas abfiltriert und mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Nach Trocknung bei 135°C für 4 h können die so mit Aminopropylgruppen funktionalisierten Träger längere Zeit aufbewahrt werden. Zur Aktivierung der Aminogruppen werden die Träger in 2,5 % Glutardialdehydlösung (pH = 7, Phosphatpuffer) gebracht und ca. 1 h bei reduziertem Druck gehalten, um Luft aus den Poren zu entfernen und eine vollständige Benetzung zu erreichen. Bei der Reaktion mit Glutardialdehyd nimmt das Glas je nach Typ eine rosa bis fleischrote Farbe an. Das aktivierte Glas wird gründlich mit Phosphatpuffer gewaschen, bis kein Geruch nach Glutardialdehyd mehr festgestellt werden kann. Der aktivierte Träger kann für einige Zeit unter Puffer bei 4°C gelagert werden. Zur Kopplung des Enzyms wird die gewünschte Menge Glas mit dem lyophilisierten Enzym in möglichst wenig Phosphatpuffer gemischt. Die Kopplung erfolgt innerhalb von 12-15 h bei 4°C. Nach gründlichem Waschen mit Puffer kann das Immobilisat im Kühlschrank unter Puffer gelagert werden. Abbildung 1 und Abbildung 2 (S. 10) zeigen schematisch die bei den beschriebenen Stufen ablaufenden Vorgänge.

4.2.2 Immobilisierung auf Eupergit C

Eupergit C® [137], (Röhm-Pharma) ist ein kommerziell als Träger zur Immobilisierung von Proteinen angebotenes Co-Polymerisat aus Methacrylimid und N,N'-Methyl-bis-(methacryl)-amid, an dessen Oberfläche sich reaktive Oxirangruppen befinden, an die Proteine mit Sulfhydryl-, Amino- oder Hydroxylgruppen kovalent gebunden werden können. Da es sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen Glasträgern um einen

bereits aktivierten Träger handelt, ist die Immobilisierung recht leicht durchzuführen. Der Träger wird entweder nach Waschen mit eiskaltem Wasser oder ohne weitere Vorbehandlung mit dem zu immobilisierendem Enzym in Pufferlösung suspendiert und unter gelegentlichem Schütteln 12-15 h bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wird das Immobilisat abfiltriert und mit Pufferlösung gründlich gewaschen. Auch dieser Enzym-Träger-Komplex kann bei 4°C unter Puffer längere Zeit aufbewahrt werden.

4.2.3 Immobilisierung durch Sol-Gel-Technik

Die Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Technik wurde von GEORGI [42] ausführlich beschrieben, und soll daher hier nur kurz wiedergegeben werden.

Die Präparation der Sole erfolgte in zwei Stufen:

1 mol des Precursors (Tetraethoxysilan, TEOS) wird in 13 mol absolutem Ethanol gelöst. Die Hydrolyse des Precursors wird durch Zugabe von 16 mol H₂O und 0,003 mol HCl unter Rühren gestartet.

Die Zugabe des Enzyms als Lösung erfolgt durch Zugabe des in Phosphatpuffer gelösten Enzyms zu einem 45 min vorhydrolysierten Sol. Zur Herstellung additivmodifizierter Gele wird das Additiv gemeinsam mit dem Enzym in Form 0,5 M Lösungen zugegeben. Anschließend wird der pH-Wert des Sols mit 0,08 mol/l NaOH eingestellt, um die Gelzeit des Systems festzulegen. Die Herstellung von Schichten erfolgt durch Dip-Coating und anschließende Trocknung bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchte. Die Aufbewahrung der Immobilisate erfolgt trocken bei 4°C.

Zur Herstellung der Immobilisate für das IC-Kalorimeter wurden je 2 µl des Sols auf Filterpapierscheiben aufgebracht und in einer Atmosphäre mit definiertem Feuchtigkeitsgehalt getrocknet.

4.2.4 Quervernetzung auf Papier mit Glutardialdehyd

Zur Herstellung der Immobilisate wurden 2 µl Katalaselösung (Konzentration zwischen 0,09 bis 9 mg/ml) auf Filterpapierscheiben aufgetropft, ca. 10 min getrocknet und anschließend das Enzym mit 2 µl Glutardialdehydlösung vernetzt. Die Immobilisatscheiben können trocken im Kühlschrank gelagert werden.

5 Der Enzymthermistor

5.1 Aufbau des Gerätes und Messprinzip

Als Messsystem zur Untersuchung sphärischer Enzymimmobilisate wurde ein von DANIELSSON und MOSBACH [138] entwickelter Enzymthermistor eingesetzt. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein isoperiboles Strömungskalorimeter mit Messung lokaler Temperaturdifferenzen zwischen einer Messkartusche (Enzymkartusche) und einer Referenzkartusche.

Das Immobilisat wird in der Messkartusche in Form eines Festbettes zwischen porösen Filterplatten angeordnet (Abbildung 4). Am Ausgang der Kartuschen sind Thermistoren angebracht, deren Widerstandsdifferenz mit Hilfe einer Wheatstonebrücke gemessen wird. Ein Verstärker erlaubt die Einstellung verschiedener Empfindlichkeitsbereiche. Vorausgesetzt wird, dass die Temperatur am Ausgang der Referenzkartusche der Eingangstemperatur der Messkartusche entspricht. Das Messsignal (in mV) wird mit Hilfe eines Rechners aufgezeichnet. Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der Messanordnung.

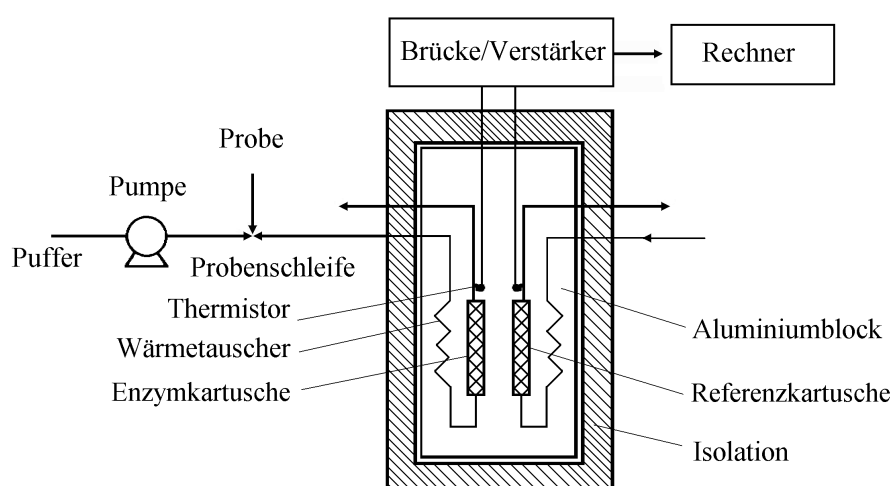


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Enzymthermistors [138]

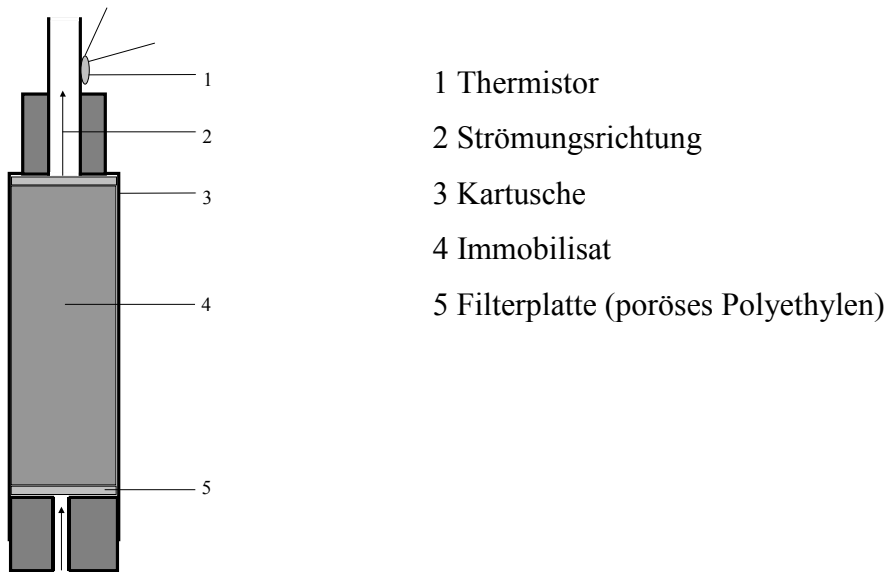


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Messkartusche des Enzymthermistors mit eingebautem Immobilisat

Wie in 2.4.2 ausgeführt, wurden Geräte dieses Typs ursprünglich zur Konzentrationsbestimmung von Enzymsubstraten entwickelt. Dazu werden Immobilisate sehr hoher Aktivität verwendet, um einen möglichst vollständigen Umsatz des Analyten und damit ein hohes Messsignal zu erreichen. Die Bestimmung der Substratgehalte erfolgt mit Kalibrierkurven, die mit Lösungen bekannter Konzentration erhalten werden. Bei diesen Untersuchungen wird die Substratlösung nach dem Prinzip der Fließinjektionsanalyse [84] in Form von diskreten Impulsen über das Immobilisat geleitet. Für die exakte Bestimmung der kinetischen Parameter der immobilisierten Enzyme ist diese Form der Substrataufgabe ungünstig, da durch die Dispersion des Substratimpulses im Puffermedium die Konzentration am Immobilisat nicht bekannt ist. Zur Untersuchung von Enzymimmobilisaten wird daher die Substratlösung als konstanter Strom über das Immobilisat geleitet (Continuous Flow), bis sich ein stationärer Zustand (gekennzeichnet durch zeitliche Konstanz des Messsignals) in der Kartusche ausbildet. Die Größe des Messsignals (proportional der Temperaturdifferenz zwischen beiden Kartuschen) wird von einer Reihe von Messbedingungen beeinflusst, deren Konstanz und Kontrolle Voraussetzung für die Durchführung entsprechender Experimente sind.

Eine Beschreibung des Enzymthermistors für die kinetische Untersuchung von Enzymimmobilisaten liefern GEMEINER et al. [104]. Die Autoren gehen dabei von folgenden Voraussetzungen aus:

- Die Änderung der Substratkonzentration und der Temperatur innerhalb der Kartusche sind so gering, dass Konstanz der Reaktionsgeschwindigkeit entlang der Längsachse der Kartusche angenommen werden kann.
- Die Strömung im Reaktor kann als Pfropfenströmung beschrieben werden, d.h. jedes Volumenelement durchläuft die Kartusche ohne Vermischung mit den benachbarten Volumenelementen, in der Kartusche sind keinerlei Totvolumina zu erwarten.
- Die Oberflächengeschwindigkeit der Strömung ist ausreichend groß, um eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Diffusion ins Innere der Immobilisatpartikel zu vermeiden.
- Der Reaktor wird als adiabatisch angenommen.

Wenn die vom eingesetzten Immobilisat katalysierte Reaktion einem Zeitgesetz nach MICHAELIS und MENTEN (7) folgt, ergibt sich für die Temperaturdifferenz ΔT zwischen Ein- und Ausgang der Kartusche folgender Zusammenhang (zur Herleitung s. A.3):

$$\Delta T = \frac{-\Delta_R H \cdot c_E \cdot v_K}{\dot{v} \cdot \rho \cdot C_p} \frac{k_2 \cdot c_S}{(c_S + K_M)} \quad (16)$$

Darin bedeuten:

- \dot{v} - Strömungsgeschwindigkeit
- ρ - Dichte des strömenden Mediums
- v_K -Volumen der Kartusche
- C_p – spezifische Wärmekapazität

Außer von den kinetischen Parametern (K_M und k_2) des Immobilisats und der Menge des immobilisierten Enzyms wird das Signal nach Gleichung (16) von den folgenden Größen bestimmt:

- Strömungsgeschwindigkeit des Mediums
- Konzentration der Substratlösung
- Molare Reaktionsenthalpie der ablaufenden Reaktion
- Spezifische Wärmekapazität des strömenden Mediums

Mit Gleichung (16) können aus der Messung der Temperaturdifferenz die kinetischen Parameter der Reaktion bestimmt werden. Dazu ist allerdings notwendig, dass die Reaktionsgeschwindigkeit entlang der Längsachse der Kartusche konstant ist. Um dies zu erreichen, muss die Bedingung des differentiellen Reaktors erfüllt sein, d.h. der Substratumsatz sollte nicht größer als etwa 5 % sein [112].

Für kinetische Messungen an Enzymimmobilisaten sind prinzipiell nur Variationen der Strömungsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration praktikabel. Zwar kann durch Auswahl geeigneter Puffersysteme die mit einer Reaktion verbundene Wärmeleistung erhöht [47], oder durch Einsatz von Medien mit geringerer Wärmekapazität (organische Lösungsmittel) bei gleicher Wärmeleistung eine höhere Temperaturänderung erzielt werden [98]. Solche Veränderungen würden jedoch sehr starke Änderungen der Umgebungsbedingungen darstellen und daher die kinetischen Parameter des Immobilisats verändern. Sie kommen deshalb nur zur Signalverstärkung bei der Bestimmung von Substratkonzentrationen in Frage.

5.2 Kalibrierung des Enzymthermistors

Um aus den mit dem Enzymthermistor gemessenen Signalen den Stoffumsatz in der Kartusche und daraus die Aktivität des verwendeten Immobilisats berechnen zu können, ist es notwendig, eine Kalibrierung des Gerätes vorzunehmen. Die Signalhöhe h und die Temperaturdifferenz ΔT sind durch den Kalibrierfaktor (Kalibrierkonstante) f_{kal} miteinander verknüpft:

$$h = f_{\text{kal}} \cdot \Delta T \quad (17)$$

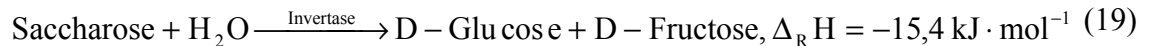
Die Größe des Kalibrierfaktors wird durch die Kennlinie der verwendeten Thermistoren und die Empfindlichkeit der Messbrücke bestimmt.

Da im Gerät kein elektrischer Heizer vorgesehen ist, mit Hilfe dessen eine Kalibrierung durch Joulesche Wärme erfolgen könnte, muss die Kalibrierung auf chemischen Weg erfolgen. GEMEINER et al. [111] schlagen dazu vor, eine Reaktion mit bekannter molarer Reaktionsenthalpie zu verwenden und den Umsatzgrad durch Analyse der Lösung am Ausgang der Kartusche zu bestimmen. Da die Kartusche des Enzymthermistors als adiabatischer Reaktor aufgefasst wird, ergibt sich aus (16) ein einfacher linearer Zusammenhang zwischen Temperaturänderung und freigesetzter Wärme:

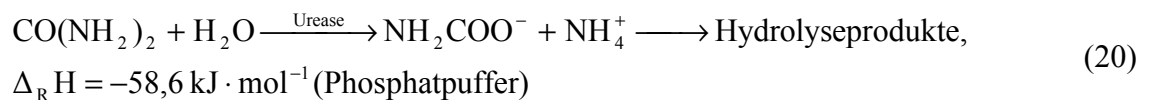
$$h = f_{\text{kal}} \cdot \Delta T = f_{\text{kal}} \cdot \frac{q}{c_p} = f_{\text{kal}} \cdot \frac{-\Delta_R H \cdot n}{c_p} \quad (18)$$

Um das vorhandene Gerät zu kalibrieren, wurden folgende enzymatisch katalysierten Reaktionen eingesetzt:

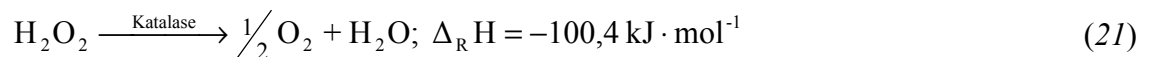
Invertase-katalysierte Saccharosehydrolyse [139]



Urease-katalysierte Harnstoffhydrolyse [47]



Wasserstoffperoxidspaltung durch Katalase [139]



Die eingesetzten Enzyme wurden dazu nach der beschriebenen Methode (4.2.2) auf Eupergit immobilisiert.

Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte für das System Invertase/Saccharose photometrisch durch Bestimmung der Fructose- und Glucosekonzentration mit 3,5-Dinitrosalicylsäure/K-Na-Tartrat [140].

Für das System Katalase/Wasserstoffperoxid konnte der Umsatz durch Messung der Extinktion bei 240 nm [44] bestimmt werden, das Immobilisat war ausreichend aktiv, um einen vollständigen Umsatz des verwendeten Wasserstoffperoxids zu erreichen.

Die Harnstoffhydrolyse wurde nur unter Bedingungen vollständigen Umsatzes gemessen.

Das Ergebnis der Kalibrierungsversuche (Abbildung 5) zeigt, dass für alle drei Systeme eine lineare Abhängigkeit zwischen freigesetzter Wärmemenge q und registrierter Signalhöhe (proportional der Temperaturänderung ΔT) besteht, die ermittelten Kalibrierkonstanten (f_{kal}) sich jedoch für die verwendeten Systeme unterscheiden.

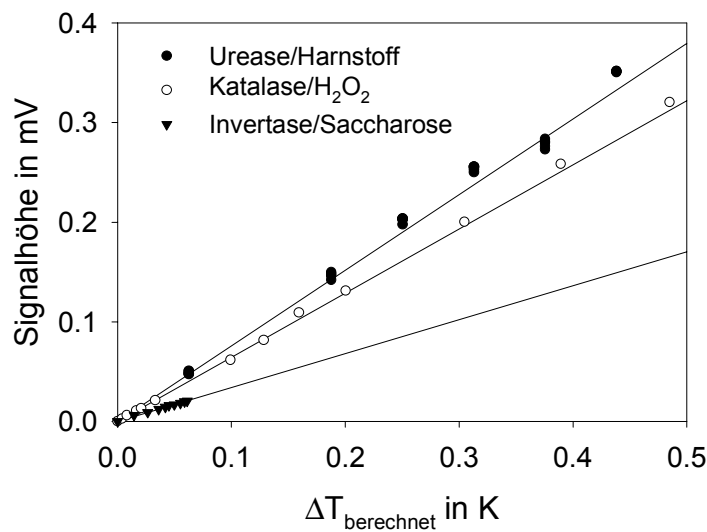


Abbildung 5: Kalibrierung des Enzymthermistors mit drei Enzym-Substratsystemen, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min

Enzym/Substratsystem	Kalibrierkonstante (mV/K ⁻¹)
Invertase/Saccharose	0,328
Urease/Harnstoff	0,722
Katalase/Wasserstoffperoxid	0,639

Tabelle 3: Kalibrierkonstanten des Enzymthermistors bei Verwendung verschiedener Enzym-Substrat-Systemen, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min

Dieses Ergebnis war unerwartet, daher wurden weitere Experimente zur Kalibrierung des Enzymthermistors durchgeführt. Dazu wurde das System Katalase/Wasserstoffperoxid verwendet, da sich bei diesem System, wie oben beschrieben, die Substratkonzentration durch Bestimmung der Absorption bei 240 nm gut bestimmen lässt.

Untersucht wurde der Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Kalibrierkonstante des Gerätes. Bei vollständigem Umsatz des Substrates in der Kartusche des Enzymthermistors hat die Strömungsgeschwindigkeit in erster Linie Einfluss auf den Ort des Substratumsatzes, d.h. zwangsläufig auch auf den Ort der Wärmefreisetzung. Mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit wird der Endpunkt der Reaktion in Richtung Kartuschenausgang verschoben. Wenn kein Wärmeverlust über die Wände der Kartusche erfolgt und die Reaktion vollständig im Innern der Kartusche

abläuft, ist die gemessene Temperaturänderung am Kartuschenausgang nur eine Funktion der Substratkonzentration, nicht der Strömungsgeschwindigkeit.

Die Messungen mit dem System Katalase/Wasserstoffperoxid zeigen allerdings, dass die Kalibrierkonstante des Kalorimeters trotz nachgewiesenen vollständigen Umsatzes eine deutliche Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit aufweist. (Abbildung 6 und Abbildung 7)

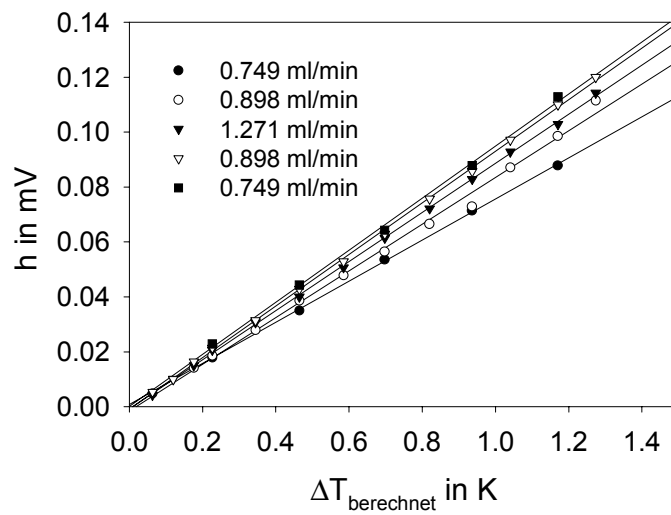


Abbildung 6: Kalibriergeraden für Enzymthermistor in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit

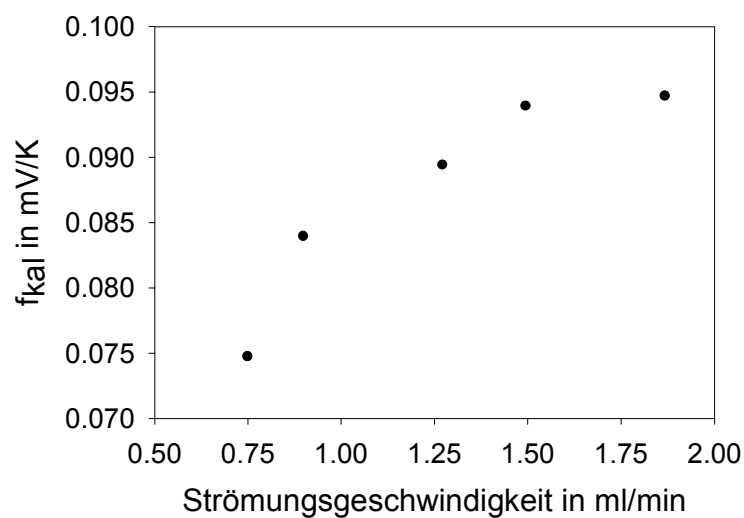


Abbildung 7: Abhängigkeit der Kalibrierkonstante von der Strömungsgeschwindigkeit

Damit wird deutlich, dass der Ort der Wärmefreisetzung, die am Ausgang der Kartusche gemessene Temperaturdifferenz entscheidend beeinflusst.

Bei homogener Verteilung der Enzymaktivität im Reaktionsraum und signifikanter Abnahme der Substratkonzentration in der Lösung beim Durchströmen des Immobilisatfestbettes wird der größte Wärmeanteil in dem vom Detektor (Thermistor) am weitesten entfernten Teil der Kartusche freigesetzt. Auch die Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit ermöglicht nur eine geringfügige Verschiebung der Wärmeleistungsprofils entlang der Längsachse des Reaktors.

Um zu beweisen, dass die gemessene Temperaturdifferenz vom Ort der Wärmefreisetzung abhängt, wurde folgendes Experiment ausgeführt:

Die Kartusche wurde so mit Immobilisat beladen, dass nicht, wie in Abbildung 4 angedeutet, die enzymatische Aktivität homogen entlang der Längsachse verteilt wurde. Je 105 mg (Feuchtmasse) des Immobilisates (Katalase auf Eupergit C) wurden kompakt in unmittelbarer Nähe des Thermistors (Kartuschenausgang, Variante I) bzw. möglichst weit davon entfernt (Kartuscheneingang, Variante II) eingebaut. Um identische Strömungs- und Verweilzeitverhältnisse zu erreichen, wurde der verbleibende Raum in der Kartusche (Fassungsvermögen der Kartusche etwa 500 mg) mit inertem Trägermaterial gefüllt. Durch Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration in der aus dem Gerät austretenden Lösungen konnte gezeigt werden, dass die verwendete Immobilisatmenge ausreichte, um in beiden Fällen einen vollständigen Umsatz des Substrates in der Kartusche zu gewährleisten.

Die Signalhöhen, die mit beiden Varianten für eine Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,02 mol/l bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,27 ml/min gemessen wurden, beweisen, dass der Ort der Wärmeproduktion einen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis besitzt (Abbildung 8).

Es wird im vorliegenden Fall eine um 17 % höhere Temperaturdifferenz gemessen, wenn sich das Immobilisat nahe am Thermistor befindet.

Eine solche Abhängigkeit des gemessenen Signals vom Ort der Wärmefreisetzung ist nur möglich, wenn ein Teil der freigesetzten Wärme über die Wände der Kartusche an den Kalorimeterblock abgeführt wird. Damit kann die in [104] aufgestellte Hypothese, die Kartusche des Enzymthermistors sei als adiabatischer Reaktor zu betrachten, nicht mehr aufrecht erhalten werden. Zusätzlich zu den bereits genannten Größen (Strömungsgeschwindigkeit, Substratkonzentration, molare Reaktionsenthalpie,

Wärmekapazität des strömenden Mediums und kinetische Parameter der Reaktion) wird demnach die gemessene Temperaturdifferenz vom thermischen Widerstand R_{th} der Kartusche bestimmt.

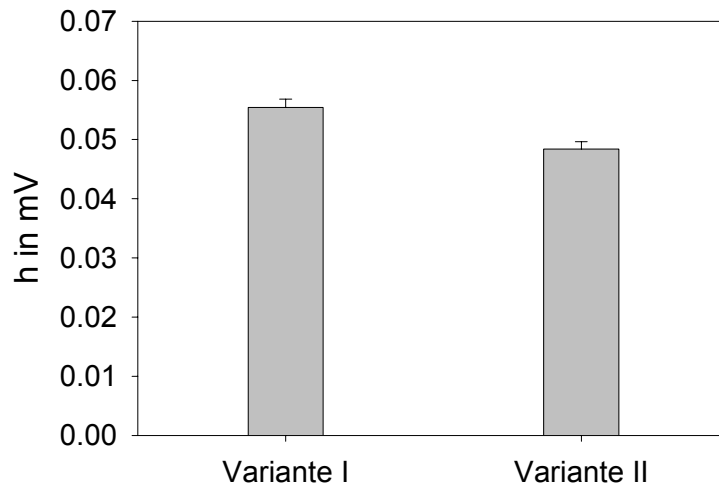


Abbildung 8: Abhängigkeit der gemessenen Temperaturdifferenz vom Ort der Wärmefreisetzung

Eine mögliche mathematische Beschreibung des Enzymthermistors muss die örtliche Verteilung der Wärmefreisetzung einbeziehen. Damit ist auch die Möglichkeit gegeben, die Beschränkung auf den Grenzfall des differentiellen Reaktors aufzugeben.

5.3 Entwicklung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Enzymthermistors

Im Folgenden soll dargestellt werden, wie es mit Hilfe der Kombination zweier relativ einfacher mathematischer Modelle für das Strömungskalorimeter bzw. die darin ablaufende Reaktion möglich ist, das Temperaturprofil für die Kartusche des Enzymthermistors zu berechnen. Damit kann die Größe des Messsignal in Abhängigkeit von den Parametern der Reaktion und des Kalorimeters vorhergesagt werden. Insbesondere ergibt sich dann die Möglichkeit, aus gemessenen Temperaturänderungen die kinetischen Parameter der Reaktion zu bestimmen.

5.3.1 Das Reaktionsmodell

Ziel bei der Aufstellung des Reaktionsmodells war es, Profile der Substrat- und Produktkonzentration entlang der Längsachse des Immobilisatfestbettes zu berechnen, um daraus die Verteilung der Wärmeleistung in der Kartusche des Enzymthermistors ermitteln zu können. Dies ist nur möglich, wenn das Zeitgesetz der Reaktion bekannt ist. Im vorliegenden Fall wurde von einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion ausgegangen, die nach dem Michaelis-Menten-Zeitgesetz (9) abläuft.

Die Michaelis-Menten-Gleichung wird in der Form:

$$\frac{dc_{Pr}}{dt} = \frac{k_2 c_E c_S}{K_M + c_S} \quad (22)$$

verwendet.

Das Lösen dieser Gleichung führt zu dem in Abbildung 9 dargestellten zeitlichen Verlauf der Produktkonzentration.

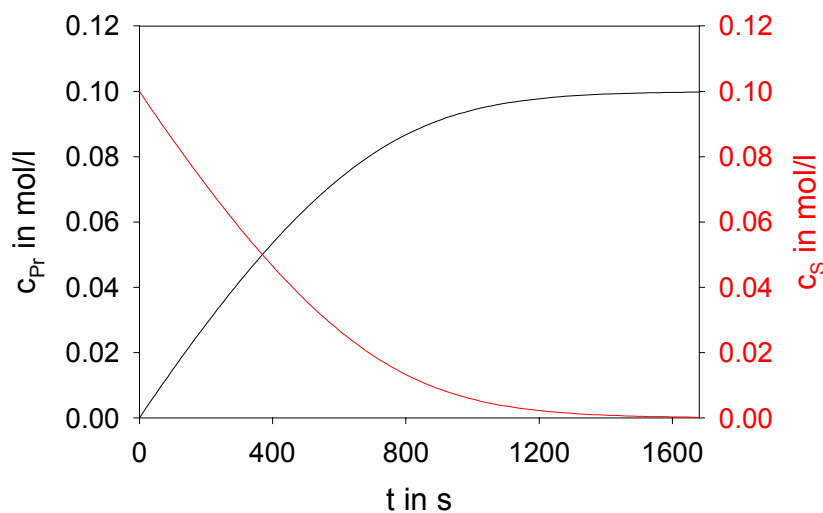


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Produkt- und Substratkonzentration einer nach Michaelis-Menten verlaufenden enzymatischen Reaktion

Um die Zeitachse in Abbildung 9 durch die Ortsachse (entsprechend der Längsachse der Kartusche) zu ersetzen, wird die Kartusche in n identische Segmente mit dem Volumen v_{Seg} unterteilt.

$$v_{Seg} = \frac{V_K}{n} \quad (23)$$

Ist die Zahl der Volumenelemente n ausreichend groß, d.h. das Volumen der einzelnen Segmente ausreichend klein, kann jedes der n Segmente mit dem Modell des idealen

kontinuierlichen Rührkesselreaktors [141] beschrieben werden. Das gesamte Festbett der Kartusche wird dann als Rührkesselkaskade betrachtet.

Für den idealen kontinuierlichen Rührreaktor gelten folgende Annahmen:

- sofortige vollständige Vermischung von Ausgangsstoffen und Produkten
- zeitlich und örtlich konstante Konzentrationen von Ausgangsstoffen und Produkten

Die Substratumsetzung in jedem einzelnen Segment kann dann nach:

$$(c_{SI} - c_{SOu}) \dot{v} = \frac{dc_{SOu}}{dt} v_{seg} \quad (24)$$

berechnet werden. (mit c_{SI} - Input und c_{SOu} - Outputkonzentration des Substrates).

Die Kombination der Gleichungen (22) und (24) ergibt:

$$(c_{SI} - c_{SOu}) \dot{v} = \frac{dn}{dt} = \frac{dc_{Pr}}{dt} v_{seg} = -\frac{dc_{SOu}}{dt} v_{seg} = \frac{k_2 c_E c_{SOu}}{(K_M + c_{SOu})} v_{seg} \quad (25)$$

Die für immobilisierte Enzyme schlecht zu definierende Enzymkonzentration c_E kann in dieser Gleichung wie von SCHELLENBERGER et al. [3] gezeigt, durch die Enzymmenge n_E pro Segment ersetzt werden.

$$c_E = \frac{n_E}{v_{seg}} \quad (26)$$

Der Substratumsatz je Segment ist damit gegeben als:

$$(c_{SI} - c_{SOu}) \dot{v} = n_E k_2 \frac{c_{SOu}}{(K_M + c_{SOu})} \quad (27)$$

Werden die Outputkonzentration von Substrat und Produkt eines Segmentes i gleich den Inputkonzentrationen des jeweils folgenden $i+1$ gesetzt, ist es möglich, die Substratkonzentration in jedem einzelnen Segment und daraus die Verteilung von Produkt und Substrat unter steady-state-Bedingungen zu berechnen (Berechnung durch Differenzbildung). Damit kann die Zeitachse in Abbildung 9 durch die Ortskoordinate der Kartusche ersetzt werden. Die Unterteilung der Kartusche in 100 Segmente erlaubt es, recht genaue Resultate bei vertretbarem Rechenaufwand zu erzielen.

Wenn die Konzentration von Produkt und Substrat in jedem einzelnen Segment bekannt ist, kann daraus die Verteilung der Wärmeleistung in der Kartusche berechnet werden.

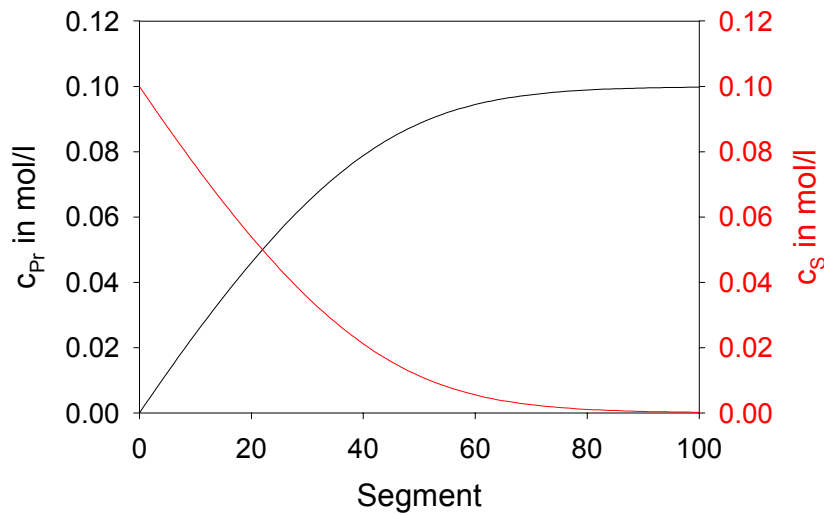


Abbildung 10: Verteilung der Produkt- und Substratkonzentration entlang der Längsachse der Kartusche

Die in jedem einzelnen Segment freigesetzte Wärmeleistung \dot{q} wird erhalten nach:

$$\dot{q} = -\Delta_R H \cdot (c_{SI} - c_{SOu}) \cdot \dot{v} \quad (28)$$

Abbildung 11 macht deutlich, dass der größte Teil der Wärmeleistung im vorderen Teil der Kartusche freigesetzt wird.

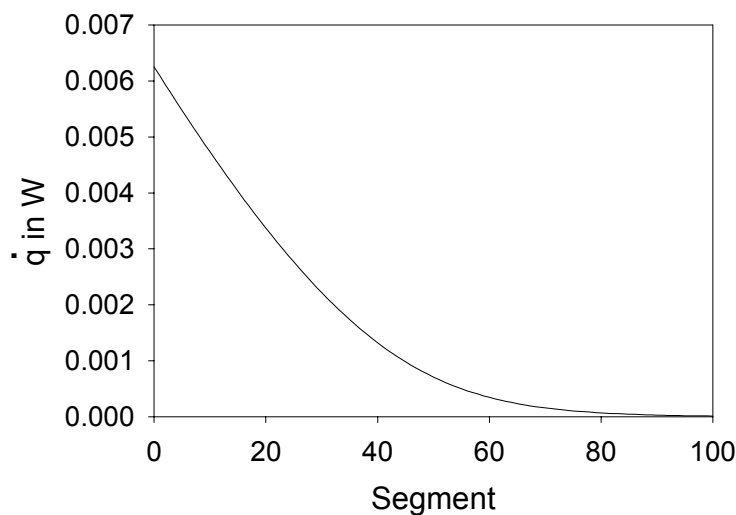


Abbildung 11: Verteilung der Wärmeleistung entlang der Längsachse der Kartusche unter steady-state-Bedingungen

Die örtliche Verteilung der Wärmeleistung in der Kartusche stellt das Bindeglied zum Modell des Strömungskalorimeters dar.

5.3.2 Das Kalorimetermodell

Für die Entwicklung eines mathematischen Modells zur Beschreibung der nicht-adiabatischen Kartusche des Strömungskalorimeters ist eine weitere Vereinfachung notwendig. Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Segmente der Kartusche werden für diesen Teil des Modells als Punkte mit gleichförmiger Temperaturverteilung angenommen.

Im stationären Zustand muss die Summe aus der im Segment freigesetzten, bzw. in das Segment eingetragenen Wärmeleistung einerseits und der durch das strömende Medium ausgetragenen, bzw. über die Wände der Kartusche abgeleiteten Wärmeleistung andererseits gleich null sein.

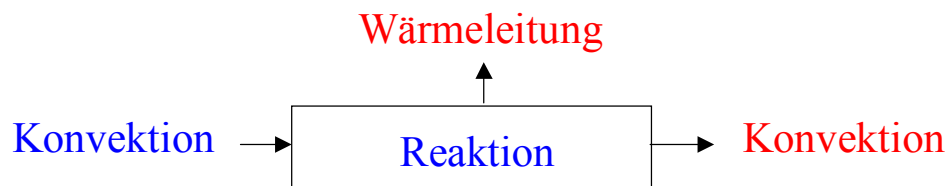


Abbildung 12: Prinzipskizze zur Wärmeleistungsbilanz für ein Segment der Kartusche

Berechnet wird die Temperaturdifferenz $\Delta T_i = (T_i - T_S)$ zwischen dem Segment und der Umgebung.

$$\dot{v} \rho C_p \Delta T_{i-1} + (-\Delta_R H \dot{v} (c_{Pri} - c_{Pri-1})) = \frac{\Delta T_i}{R_{th}} + \dot{v} \rho C_p \Delta T_i \quad (29)$$

Die linke Seite in Gleichung (29) stellt den in das Segment eingetragenen Teil der Wärmeleistung dar, dieser setzt sich zusammen aus einem konvektiven Anteil der aus dem vorhergehenden Segment eingetragen wird ($\dot{v} \rho C_p \Delta T_{i-1}$) und der durch die Reaktion im Segment freigesetzten Wärmeleistung ($-\Delta_R H \dot{v} (c_{Pri} - c_{Pri-1})$). Für das erste Segment ($i = 1$) ist die Temperatur ΔT_{i-1} gleich Null, damit wird auch der linke Konvektionsterm in (29) gleich null. Die Größe c_{Pri} ist die im Segment i gebildete Produktkonzentration, ($c_{Pri} = (c_{SI} - c_{Sou})$).

Die rechte Seite der Gleichung, die die Ableitung der Wärmeleistung aus dem Segment beschreibt, umfasst die Terme $\frac{\Delta T_i}{R_{th}}$, den durch Wärmeleitung an die Umgebung

abgeleiteten Teil der Wärmeleistung und den durch das strömende Medium abgeführten Wärmeleistungsbetrag $\dot{v} \rho C_p \Delta T_i$.

Mit diesem Zusammenhängen wird es möglich, die Temperaturdifferenz für jedes einzelne Segment aus der Wärmeleistungsbilanz zu berechnen (Gleichung (29)) und das Temperaturprofil in der Kartusche zu berechnen:

$$\Delta T_i = \frac{-\Delta_R H \dot{v} (c_{Pri} - c_{Pri-1}) + \dot{v} \rho C_p \Delta T_{i-1}}{\frac{1}{R_{th}} + \dot{v} \rho C_p} \quad (30)$$

In Abbildung 13 ist das aus den Profilen für Produktkonzentration (Abbildung 10) und Wärmeleistung (Abbildung 11) berechnete Temperaturprofil gezeigt.

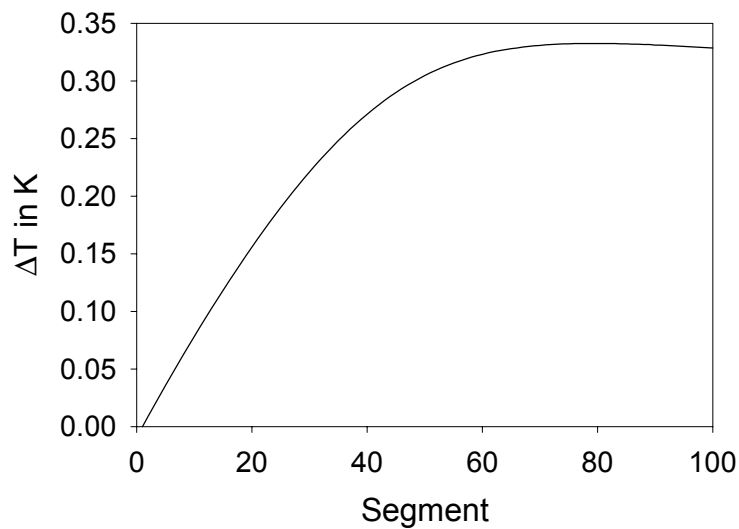


Abbildung 13: Temperaturprofil entlang der Längsachse der Kartusche

Mit Hilfe der Kombination beider Teilmodelle ist es jetzt möglich, aus gemessenen Temperaturdifferenzen ΔT_n für das letzte Segment ($i = n$), durch lineare Regression die kinetischen Parameter von enzymatisch katalysierten Reaktionen zu bestimmen.

Mit der Kombination beider Modelle kann außerdem die Temperaturdifferenz ΔT_n in Abhängigkeit von Reaktionsenthalpie und kinetischen Parametern der Reaktion, Strömungsgeschwindigkeit und Wärmekapazität des strömenden Mediums, sowie dem thermischen Widerstand der Kartusche berechnet werden.

Dieser Ansatz kann weiterhin dazu benutzt werden, für Reaktionen, von denen einige Parameter, wie die Reaktionsenthalpie oder die Größenordnung der Michaelis-Konstante bekannt sind, Strategien für die Untersuchung der Immobilisate zu entwickeln und durch Fehlersimulation zu testen.

Besonders interessant ist dabei, dass mit der vorgestellten Kombination auch Fälle beschrieben werden können, bei denen sich die Reaktionsgeschwindigkeit entlang der Kartusche signifikant ändert.

5.3.3 Anwendung der Modelle zur Optimierung der Messstrategie

Am Beispiel der Invertase-katalysierten Saccharose-Hydrolyse soll gezeigt werden, wie das in den vorhergehenden Abschnitten aufgestellte Modell zur Entwicklung von Messstrategien und zur Bewertung dieser Strategien genutzt werden kann. Die Invertasereaktion wurde als Modellreaktion ausgewählt, weil sie über einen weiten Konzentrationsbereich einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt und umfangreiche Erfahrungen mit diesem Enzym aus früheren Untersuchungen vorlagen [46]. Weiterhin sind für diese Reaktion Werte für $\Delta_R H$, K_M und k_2 sowohl für das native Enzym wie auch für verschiedene Immobilisate bekannt.

Ziel der Arbeiten soll sein, die Werte für die Michaelis-Konstante K_M und die Geschwindigkeitskonstante k_2 aus Messungen von ΔT mit dem Enzymthermistor zu bestimmen. Prinzipiell kann dazu die Temperaturdifferenz ΔT als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit ($\Delta T = f(\dot{v})$ mit $c_{S0} = \text{const.}$, Abbildung 14) oder der Substratkonzentration ($\Delta T = f(c_{S0})$ mit $\dot{v} = \text{const.}$, Abbildung 15) gemessen und mit Hilfe der linearen Regression die kinetischen Parameter bestimmt werden. Für die Berechnung der in Abbildung 14 und Abbildung 15 gezeigten Kurven wurden realistische Werte verwendet, d.h. eine Variation der Strömungsgeschwindigkeit in einem mit dem Enzymthermistor realisierbaren Bereich (0,5 – 2,5 ml/min) und einer Variation der Substratkonzentration zwischen 0 und 0,25 mol/l, unter Beachtung der für das native Enzym bekannten Michaelis-Konstante von 0,04 mol/l.

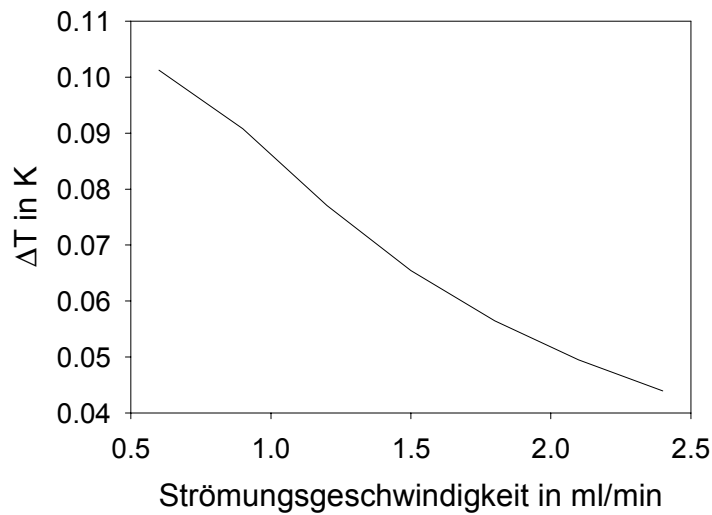


Abbildung 14: Temperaturdifferenz berechnet als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit

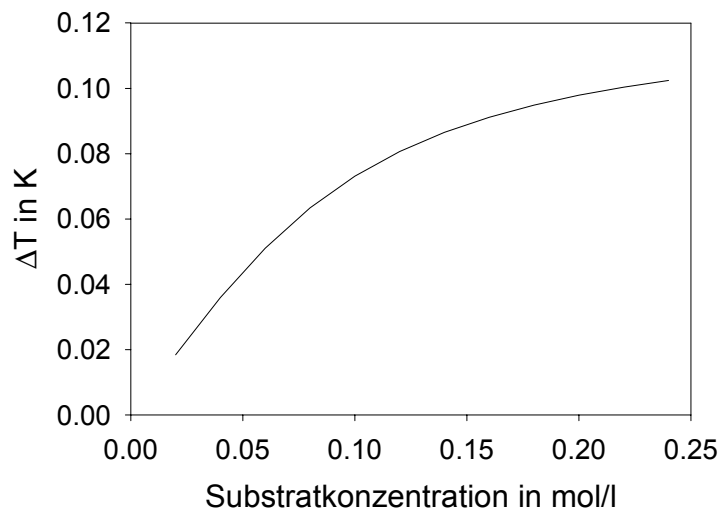


Abbildung 15: Temperaturdifferenz berechnet als Funktion der Substratkonzentration

Durch lineare Regression können prinzipiell aus beiden Kurven die Werte für K_M und k_2 berechnet werden. Es ist allerdings zweifelhaft, ob die aus der linearen Regression erhaltenen Werte den physikalischen Sachverhalt in jedem Fall korrekt wiedergeben. Eine Fehlersimulation sollte zeigen, welche der beiden Varianten für die gegebene Reaktion zuverlässigere Werte liefert, wenn in Betracht gezogen wird, dass unter realen Bedingungen gemessene Werte stets fehlerbehaftet sind.

In Abbildung 16 ist das Vorgehen bei dieser Fehlersimulation als Prinzipskizze dargestellt:

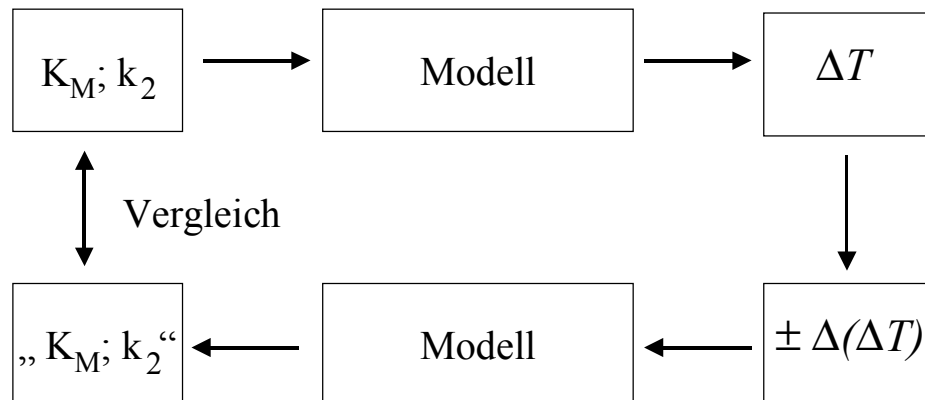


Abbildung 16: Prinzipskizze zum Ablauf der Fehlersimulation

Erster Schritt der Fehlersimulation ist die Berechnung von ΔT mit vorgegebenen („wahren“) Werten für K_M und k_2 . Im zweiten Schritt werden die erhaltenen Werte für ΔT um einen bestimmten Betrag geändert, d.h. Messfehler werden simuliert. Im Fehler der Temperaturdifferenz sind auch mögliche Fehler der Strömungsgeschwindigkeit, Substratkonzentration usw. enthalten, da diese sich als Fehler von ΔT manifestieren.

Aus den nun fehlerbehafteten Kurven $\Delta T = f(c_{S0})$ und $\Delta T = f(\dot{v})$ werden unter Verwendung des Modells mittels linearer Regression entsprechend fehlerbehaftete Werte für die Michaelis-Konstante und die Geschwindigkeitskonstante k_2 bestimmt, die dann mit den vorgegebenen „wahren“ Werten verglichen werden können. In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind die prozentualen Fehler für Michaelis-Konstante K_M und Geschwindigkeitskonstante k_2 als Funktion des Fehlers von ΔT (in %) dargestellt.

Aus den beiden Abbildungen können folgende Aussagen abgeleitet werden:

Die aus Messungen der Temperaturdifferenz als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit bestimmten kinetischen Parameter K_M und k_2 weisen bei Vorgabe eines gleichen prozentualen Fehlers der Temperaturdifferenz eine deutlich größere Unsicherheit (ausgedrückt durch den Fehler in Prozent) auf, als dies bei Messung der Temperaturdifferenz als Funktion der Substratkonzentration der Fall ist.

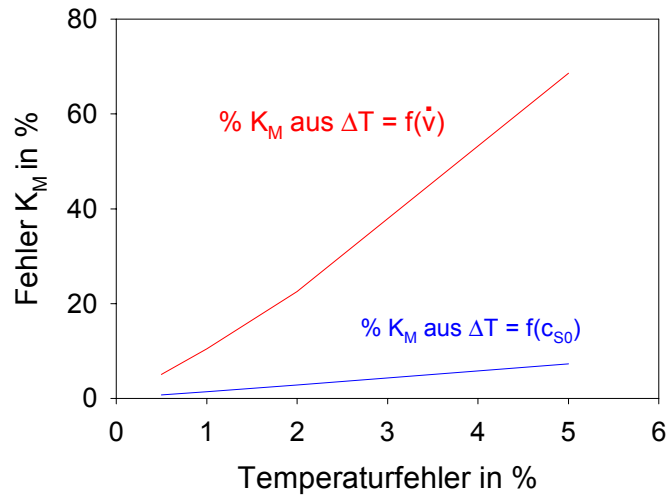


Abbildung 17: Prozentualer Fehler der Michaelis-Konstante K_M als Funktion des prozentualen Temperaturfehlers, für $\Delta T = f(c_{S0})$ und $\Delta T = f(\dot{v})$

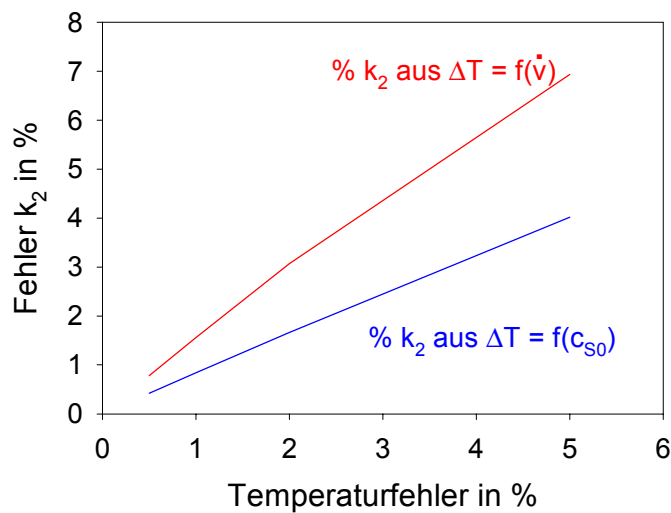


Abbildung 18: Prozentualer Fehler der Geschwindigkeitskonstante k_2 als Funktion des prozentualen Temperaturfehlers, für $\Delta T = f(c_{S0})$ und $\Delta T = f(\dot{v})$

Dieses Verhalten lässt sich damit erklären, dass bei Messung von $\Delta T = f(\dot{v})$ die Bestimmung der kinetischen Parameter aus einer fast linearen Funktion erfolgen muss. Beide kinetischen Parameter wirken annähernd in der gleichen Weise nur auf die Lage

der Funktion (Verschiebung parallel zur y-Achse) ein und sind daher in ihrer Wirkung nur schwer zu trennen. Das führt zu großen Unsicherheiten bei der Bestimmung der Parameter, auch wenn die erhaltenen Werte nach den Maßstäben der linearen Regression nur einen geringen Fehler aufweisen. Bei Messungen von $\Delta T = f(c_{S0})$ hingegen zeigen beide Konstanten deutlich unterschiedliche Einflüsse. Hier bestimmt K_M in erster Linie die Krümmung der Kurve, während Änderungen von k_2 hauptsächlich eine Verschiebung der Werte für ΔT parallel zur y-Achse bewirkt.

Sowohl bei der Messung der Temperaturdifferenz als Funktion der Strömungsgeschwindigkeit, als auch als Funktion der Substratkonzentration reagiert die Michaelis-Konstante bedeutend sensitiver auf Temperaturfehler als k_2 . Bei dieser Aussage ist allerdings zu beachten, dass K_M und k_2 nicht losgelöst voneinander betrachtet werden können, da beide gemeinsam die Messgröße Temperaturdifferenz bestimmen und sowohl bei der Anpassung der Kurven als auch in ihrer physikalischen Bedeutung (7) aneinander gekoppelt sind.

Aus diesen Aussagen folgt, dass durch Messung der Temperaturdifferenz als Funktion der Substratkonzentration zuverlässigere Werte für die kinetischen Parameter ermittelt werden können und daher diese Methode trotz des höheren experimentellen Aufwandes für die Untersuchungen eingesetzt werden sollte.

Da die in Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigten Abhängigkeiten der Fehler für K_M und k_2 bei Variation der Substratkonzentration nur für eine Strömungsgeschwindigkeit berechnet wurden, beschäftigte sich eine weitere Fehlersimulation mit der Verlässlichkeit der ermittelten kinetischen Konstanten aus ΔT - c_{S0} -Kurven, die bei verschiedenen, jeweils konstanten Strömungsgeschwindigkeiten gemessen wurden. Es wurde ein konstanter Fehler für ΔT von 2% vorgegeben. Das Ergebnis dieser Simulation ist in Abbildung 19 dargestellt.

Es wird deutlich, dass bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten, die mit hohen Verweilzeiten der Lösung am Katalysator und entsprechend einem weitgehend vollständigem Umsatz des Substrates über einen weiten Konzentrationsbereich verbunden sind, der Fehler der ermittelten kinetischen Konstanten sehr groß ist. Unter diesen Bedingungen werden annähernd lineare ΔT - c_{S0} -Kurven erhalten, bei denen die Trennung der Einflüsse von K_M und k_2 nur schwer möglich ist.

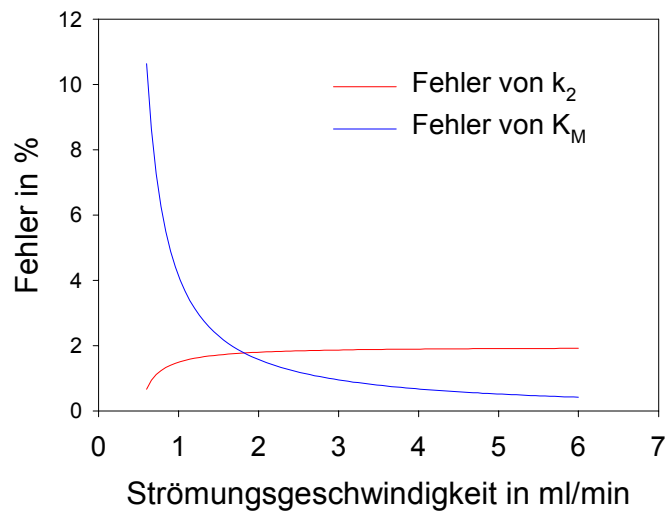


Abbildung 19: Abhängigkeit der Fehler von K_M und k_2 von der gewählten Strömungsgeschwindigkeit bei Messung von $\Delta T = f(c_{S0})$

Auch bei dem in Abbildung 19 dargestellten Zusammenhängen zeigt sich eine deutlich größere Sensitivität der Michaelis-Konstante gegenüber dem Fehler der Temperaturmessung, wohingegen der Fehler der Geschwindigkeitskonstante k_2 relativ konstant bleibt. Auch hier ist das zur Kopplung von K_M und k_2 oben gesagte zu beachten. Besonders gilt dies für die scheinbar geringere Fehleranfälligkeit von k_2 bei sehr niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten. Insgesamt spricht das Simulationsergebnis dafür, Messungen zur Bestimmung der kinetischen Konstanten bei möglichst hoher Strömungsgeschwindigkeit durchzuführen, um einen unvollständigen Umsatz des Substrates über einen weiten Konzentrationsbereich zu gewährleisten. Demgegenüber steht allerdings, dass bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten und einem entsprechenden niedrigem Umsatzgrad die zu messenden Temperaturdifferenzen deutlich geringer werden (Abbildung 14) und deren Messung erschwert wird. Die Verwendung höherer Strömungsgeschwindigkeiten wird zusätzlich durch Probleme bei der technischen Realisierung (Druckaufbau in Zuleitungen etc.) und steigenden Verbrauch von Materialien begrenzt. Damit ergibt sich ein „Fenster“ in den experimentellen Bedingungen (Strömungsgeschwindigkeit, Substratkonzentrationen), innerhalb dessen die Bestimmung der kinetischen Parameter mit gutem Erfolg möglich ist. Dieses Fenster wird sich für einzelne Reaktionen unterscheiden, da aber für die zu untersuchenden Reaktionen die charakteristischen Größen (Molare Reaktionsenthalpie,

Michaelis-Konstante und eventuell k_2) zumindest in ihrer Größenordnung meist bekannt sind, kann man mit dem vorgestellten Ansatz die Lage dieses Fenster abgeschätzt werden.

5.3.4 Anwendung auf eine ausgewählte chemische Reaktion

Die Modellkombination wurde mit Hilfe der Invertase-katalysierten Saccharose-Hydrolyse getestet.

Dazu wurde die Invertase auf Eupergit C (wie unter 4.2.2 beschrieben) immobilisiert und die auf dem Träger immobilisierte Invertasemenge mit Hilfe der Proteinbestimmung nach BRADFORD [142], [143] ermittelt.

Das Immobilisat wurde in die Kartusche des Enzymthermistors eingebaut und bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 2 ml/min die Änderung der Temperatur als Funktion der Substratkonzentration im Bereich von 0,02 - 0,25 mol/l gemessen. Als strömendes Medium diente ein Michaelispuffer (0,05 M Natriumacetat) pH = 4,6. Um das kalorimetrische Modell zu verifizieren, wurde die Glucosekonzentration am Ausgang des Enzymthermistors bestimmt (A.2). Da die Konzentration der Glucose nach (19) gleich der Konzentration der umgesetzten Saccharose ist, konnte durch Messung der Glucosekonzentration der Umsatz in der Kartusche bestimmt werden. Aus dem bekannten Umsatz wurden die Werte für die Michaelis-Konstante K_M und k_2 berechnet. Parallel dazu wurden die kinetischen Parameter aus den gemessenen Temperaturdifferenzen, wie in 5.3.3 erläutert, mit dem beschriebenen Modell bestimmt. Abbildung 20 und Tabelle 4 zeigen den Vergleich der photometrisch und kalorimetrisch erhaltenen Resultate. Der Vergleich gemessener kinetischer Parameter mit Literaturwerten ist kompliziert, da diese sich für verschiedene Träger, experimentelle Bedingungen und Enzymquellen unterscheiden können (2.1). Die gemessenen Werte für K_M liegen innerhalb des zu erwartenden Bereichs und sind auch im Vergleich mit dem für native Invertase in dem verwendeten Puffersystem gemessenen Wert von $0,046 \pm 2$ mol/l [46] plausibel. Die Werte für k_2 sind deutlich kleiner als die Literaturwerte, diese Größe ist im Gegensatz zur Michaelis-Konstante deutlich schwieriger zu bestimmen, außerdem wirken sich hier Unterschiede des Trägermaterials und der Bindungsform besonders stark aus.

Wie man in Abbildung 20 und Tabelle 4 sehen kann, sind die kalorimetrisch bestimmten Werte in guter Übereinstimmung mit den aus umfangreichen

photometrischen Messungen erhaltenen Werten. Die ermittelte Funktion $\Delta T = f(c_{S0})$ stimmt gut mit der aus der Photometrie berechneten Funktion überein.

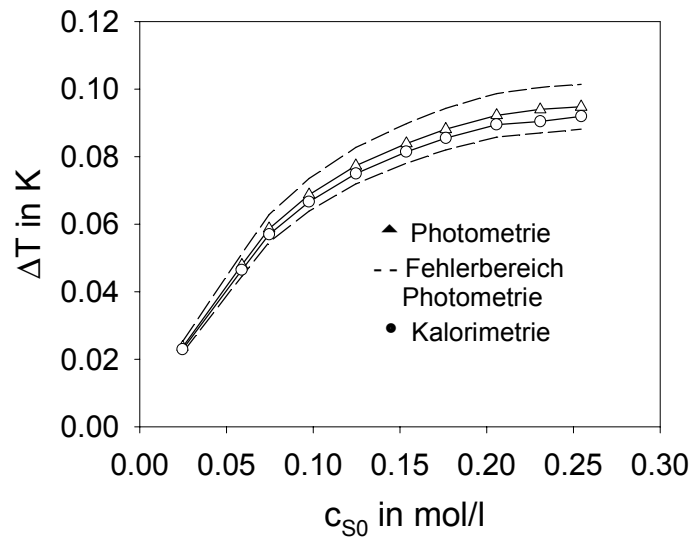


Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse für photometrische und kalorimetrische Messungen mit immobilisierter Invertase

	Strömungskalorimetrie	Photometrie	Literatur [31],[104]
K_M (mol/l)	0,034,2(\pm 4,1%)	0,038 (\pm 11%)	0,029 – 0,100
k_2 (s ⁻¹)	238 (\pm 1%)	250 (\pm 5.1%)	505 – 750

Tabelle 4: Kinetische Parameter für immobilisierte Invertase

Im nachfolgenden Abschnitt soll die Anwendung des Modells zur Untersuchung von Immobilisaten am Beispiel eines modifizierten Trägermaterials gezeigt werden.

5.3.5 Untersuchung teilkristalliner Gläser als Trägermaterial zur Enzymimmobilisierung

Aus porösen Gläsern lassen sich durch hydrothermale Kristallisation Formkörper herstellen, die sich durch unterschiedliche Anteile kristalliner Bereiche auszeichnen. Die Kristallisation in diesem Syntheseschritt kann so gesteuert werden, dass das Glasgerüst gezielt in mikroporöses Material umgewandelt wird und dabei die Geometrie und das Makroporensystem erhalten bleiben. Zusätzlich zum Makroporensystem wird durch den Kristallisationsvorgang ein System von Mikroporen erzeugt. Die so erzeugten

Kompositmaterialien, die demzufolge eine bimodale Porenverteilung besitzen, sollten günstige Voraussetzungen besitzen, um in den Makroporen Enzyme zu immobilisieren und durch die Mikroporen die Zugänglichkeit des Substrates zum Enzym zu verbessern und dadurch eine höhere Aktivität des Immobilisats zu gewährleisten [144].

Durch Immobilisierung von Invertase wurde das Immobilisierungsverhalten von zwei teilkristallisierten Gläsern mit unterschiedlichem Kristallisierungsgrad im Vergleich zum Ausgangsglas untersucht. Die teilkristallisierten Gläser wurden von der Arbeitsgruppe Prof. SCHWIEGER von der Universität Erlangen/Nürnberg zur Verfügung gestellt. Eingesetzt wurden Gläser mit einem Kristallisationsgrad von 15 % (767 K) bzw. 90 % (578 K) und Ausgangsmaterial PG 40 der Firma Schuller, Steinach.

Die Immobilisierung erfolgte wie unter (4.2.1) beschrieben nach dem Verfahren von WEETALL [16]. Bei der Aktivierung der Gläser wurde mit zunehmendem Kristallisationsgrad der Gläser eine deutlich schlechtere Benetzung mit der Glutardialdehydlösung beobachtet. Damit einher ging ein deutlicher Unterschied im Farbumschlag der bei der Glutardialdehydaktivierung poröser Gläser auftritt. Während das Ausgangsglas beim Kontakt mit der Glutardialdehydlösung einen sofortigen Farbumschlag nach ziegelrot zeigte, trat bei der Probe mit 15 % Kristallisationsgrad eine verzögerte Färbung nach rosa und bei dem extrem schlecht zu benetzenden Träger mit 90% Kristallisationsgrad lediglich eine leicht gelbliche Färbung auf.

Auch bei diesem Immobilisierungsexperiment wurde die Kopplungsausbeute mit Hilfe der Proteinbestimmung nach BRADFORD [142] ermittelt. Wie Tabelle 5 zeigt, wurde für die modifizierten Träger entgegen den Erwartungen eine schlechtere Anbindung des Enzyms erreicht, als an das Ausgangsglas.

Träger	Gebundene Invertase in mg/mg Träger	Kopplungsausbeute in %
PG 40	0,0423	42
767 K	0,028	25
578 K	0,0146	15

Tabelle 5: Kopplungsausbeute für modifizierte Gläser im Vergleich zu Ausgangsglas

Die kalorimetrische Bestimmung der Aktivität des Immobilisats erfolgte, wie oben beschrieben, durch Messung von $\Delta T = f(c_{S0})$.

Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt. Wie zu sehen ist, zeigt die Probe 767 K (15% Kristallisationsgrad) eine deutlich geringere Aktivität als das Ausgangsglas. Die Glasprobe 578 K mit einem Kristallisationsgrad von 90% zeigte keinerlei Aktivität bei der kalorimetrischen Messung. Wie die Auswertung der Messkurven (Abbildung 21) zeigt, ist die geringere Aktivität des Immobilisats aus modifiziertem Glas nicht nur auf die geringere Beladung mit Invertase zurückzuführen, auch der Wert der Geschwindigkeitskonstante k_2' ist deutlich geringer.

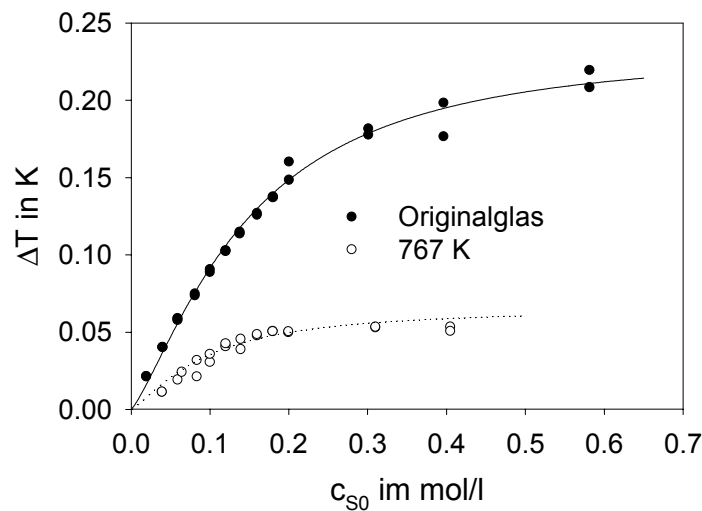


Abbildung 21: Aktivitätsbestimmung an modifizierten porösen Gläsern

Träger	Masse Träger (trocken) in mg	Enzymmasse in mg	Michaelis-Konstante K_M' in mol/l	Geschwindigkeitskonstante k_2' in 1/s
PG 40	231 mg	9,77	0,184	48,5
767 K	189 mg	5,29	0,156	27,6
578 K	170 mg	2,48	-	-

Tabelle 6: Ergebnisse der Immobilisierung von Invertase an Träger aus teilkristallinem Glas

Der Vergleich der k_2' -Werte, die für die Invertase auf PG 40 und 767 K ermittelt wurden, legt den Schluss nahe, dass die Zugänglichkeit des Substrates zum immobilisierten Enzym durch die Modifizierung des Trägers nicht verbessert wurde.

Im Vergleich zu Immobilisaten auf Eupergit C (Tabelle 3) zeigen die hier untersuchten Glasimmobilisate eine geringe Aktivität. Aufgrund der im Vergleich zu Eupergit-Immobilisaten relativ niedrigen Werte für k_2' und sehr hohen Werte für K_M' liegt die Vermutung nahe, dass die kinetischen Eigenschaften des Immobilisats durch Diffusionseinflüsse bestimmt werden.

Möglicherweise hat die Modifizierung des Glases einen ungünstigen Einfluss auf die Oberflächenstruktur im Innern der Poren, die dadurch vor allem schlechter durch wässrige Lösungen benetzt werden können. Mit solchen Effekten ließen sich sowohl die beobachteten Schwierigkeiten bei der Glutardialdehydaktivierung, als auch die Abnahme der Werte für k_2' erklären.

5.4 Untersuchung von Immobilisaten mit Substratimpulsen

5.4.1 Impulsbetrieb

Bei der Entwicklung von Immobilisierungsmethoden wird häufig eine qualitative Aussage benötigt, ob eine bestimmte Veränderung des Immobilisierungsprotokolls zu einer Veränderung der Aktivität führt. Zur Beantwortung dieser Fragen ist das im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Verfahren aufgrund des großen Zeitaufwandes ungünstig.

Wie in 2.4.2 dargestellt, wird die Bestimmung von Substratkonzentrationen mit dem Enzymthermistor in der Weise durchgeführt, dass mit Hilfe einer Probenschleife die Substratlösung in Impulsen mit konstantem Volumen über das Immobilisat in der Messkartusche geleitet wird. Das Messsignal wird in Form einzelner Peaks aufgezeichnet, deren Höhe und Fläche mit deren Konzentration der Lösung korreliert werden können.

Aus der Literatur [98] zur Bestimmung von Substratkonzentrationen ist bekannt, dass ein Nachlassen der Aktivität der verwendeten Immobilisatpackungen zu einer geringeren Signalthöhe führt. Daher wurde geprüft, ob Substratimpulse zur vergleichenden Untersuchung von Immobilisaten geeignet sind und welche Informationen aus solchen Messungen gewonnen werden können.

Im Gegensatz zu der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Methode, die Substratlösung kontinuierlich in das Strömungskalorimeter einzuleiten („Continuous Flow“), ist bei Verwendung von Substratimpulsen eine Verdünnung der Substratlösung durch Dispersion auf dem Weg zur Kartusche zu erwarten.

Der Dispersionskoeffizient als wichtiger Parameter eines Fließinjektionssystems gibt an, in welchem Maße der Substratimpuls auf dem Weg zum Detektor verdünnt wird, er ist definiert [84] als:

$$D = \frac{c_0}{c} \quad (31)$$

mit D -Dispersionsfaktor, c_0 -Konzentration des injizierten Substratimpulses, c -Konzentration eines Volumenelements des Substratimpulses am Detektor (= nach Durchlaufen des Systems). Durch die relativ langen Zuleitungen zwischen Proben- schleife und Detektionssystem ist für den Enzymthermistor ein relativ hoher Dispersionskoeffizient zu erwarten. Da die Höhe des Signals zu einem bestimmten Zeitpunkt direkt proportional der Konzentration am Detektor ist, kann der Dispersionsfaktor aus dem Verhältnis der Signalhöhe und der Signalhöhe bei bekannter Konzentration (bei Continuous Flow) bestimmt werden.

Der Dispersionsfaktor D^{\max} ergibt sich nach:

$$D^{\max} = \frac{c_0}{c^{\max}} \quad (32)$$

Dabei entspricht D^{\max} dem Dispersionsfaktor für das Volumenelement der Probe mit der höchsten Konzentration c^{\max} .

Bei optischen Detektoren ist der Dispersionskoeffizient durch Verwendung von Farbstoffen relativ unproblematisch zu ermitteln, für den Enzymthermistor ist die Bestimmung komplizierter, da das thermische Signal abhängig vom Umsatz des Analyten ist. Da für enzymatische Reaktionen häufig keine lineare Abhängigkeit zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration vorliegt, kann bei unvollständigem Umsatz kein konstanter Dispersionsfaktor bestimmt werden. Die Zusammenhänge zwischen Substratkonzentration und Signalhöhe für Continuous Flow und Substratimpulse zeigen dann einen anderen Verlauf (Abbildung 22).

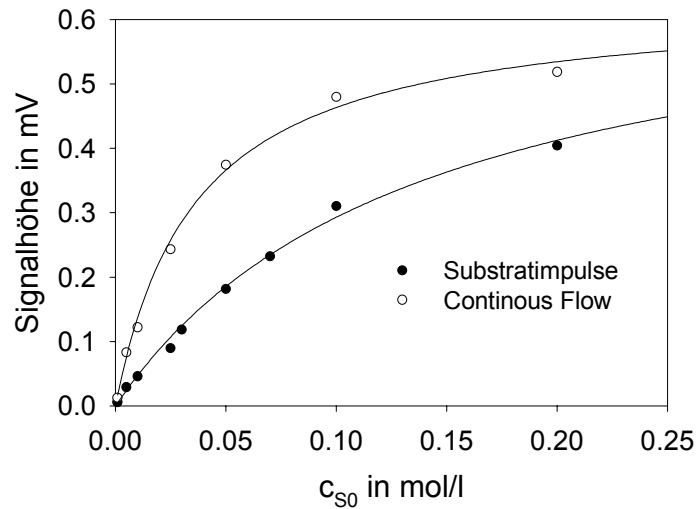


Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit des Messsignal für Continuous Flow und Impulsbetrieb

Nur bei vollständigem Umsatz des Substrates kann der Dispersionsfaktor näherungsweise durch Vergleich der Signalthöhen für Continuous Flow und Substratimpulse bestimmt werden. Für die verwendete Anordnung wurde für ein Impulsvolumen von 0,5 ml und eine Strömungsgeschwindigkeit von 1,27 ml/min ein Dispersionsfaktor von 2,3 ermittelt. Dieser, für Fließinjektionssysteme vergleichsweise hohe Wert [84], wird wahrscheinlich von den langen Zuleitungen (Wärmetauscher) im Kalorimeter (Abbildung 3) verursacht.

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass der Dispersionsfaktor mit steigendem Impulsvolumen abnimmt, außerdem wird deutlich, dass der Anstieg der gemessenen Peaks durch die Dispersion des Substrates bestimmt wird und vom Impulsvolumen unabhängig ist.

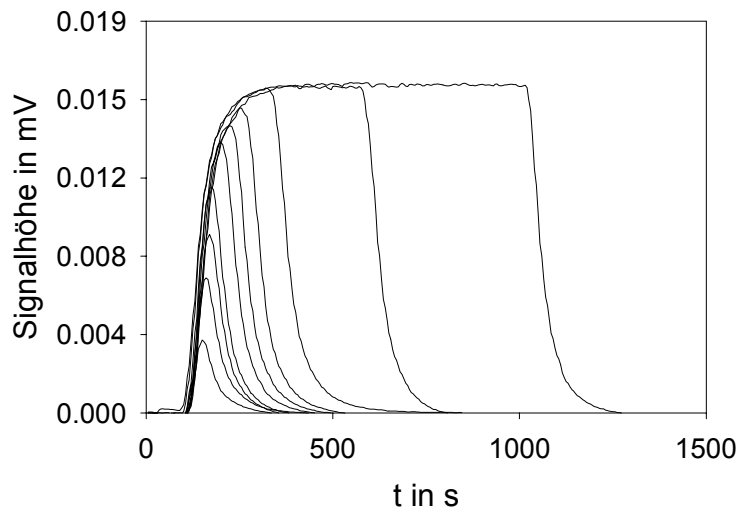


Abbildung 23: Einfluss des Impulsvolumens auf die Signalform, Strömungsgeschwindigkeit 1,27 ml/min, Impulsvolumen 0,25 bis 12 ml

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Bestimmung von kinetischen Parametern mit der Impulsmethode nicht möglich ist. Um die Anwendbarkeit der Methode zum Screening von Immobilisaten zu testen, wozu sie aufgrund des geringeren Zeitaufwandes geeignet erscheint, wurde der Zusammenhang zwischen der Signalthöhe und der Aktivität des Immobilisates untersucht.

Da keine Unterscheidung des Einflusses der Parameter Michaelis-Konstante und Geschwindigkeitskonstante k_2 erfolgen kann, wird die Aktivität des Immobilisats (2.2.3) als Parameter betrachtet, der die Leistungsfähigkeit des Immobilisats angibt und auch Diffusionseinflüsse, Zugänglichkeit des Enzyms etc. umfasst.

Dazu wurden in den Kartuschen Immobilisatpackungen unterschiedlicher Aktivität in folgender Weise hergestellt.

Verschiedene Mengen eines homogenen Immobilisats (Invertase bzw. Urease auf Eupergit C) wurden in die Kartuschen eingewogen (Angabe als Feuchtmasse) und mit inertem Trägermaterial auf einen gleichen Füllstand in der Kartusche aufgefüllt, um eine identische Packung und damit gleiche Strömungsverhältnisse und Verweilzeiten für alle Proben zu erreichen. Dabei wurden aktiver und inerte Träger so miteinander vermischt, dass eine gleichmäßige Verteilung des Immobilisats in der Kartusche resultierte.

Für jede der Kartuschen wurde die kalorimetrische Messung für mehrere Substratkonzentrationen bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit vorgenommen.

Wie die Abbildung 24 zeigt, besteht für die immobilisierte Invertase für alle verwendeten Konzentrationen ein linearer Zusammenhang zwischen der Signalhöhe und der eingesetzten Immobilisatmasse.

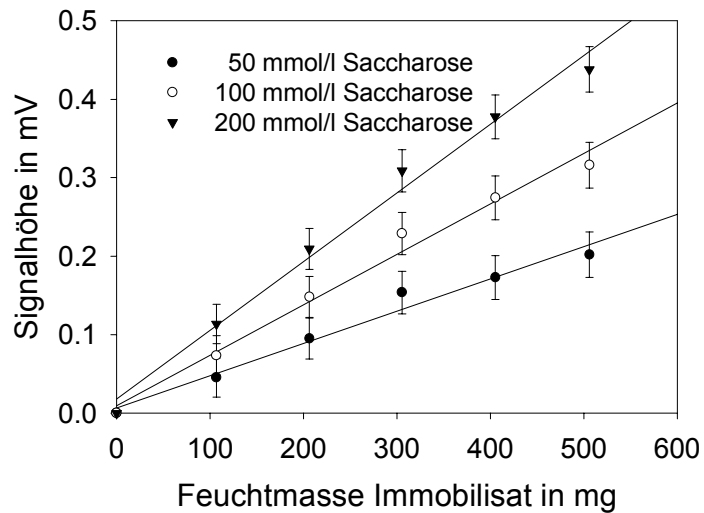


Abbildung 24: Abhängigkeit der Signalhöhe von der Immobilisatmasse für Invertase auf Eupergit C bei Impulsbetrieb

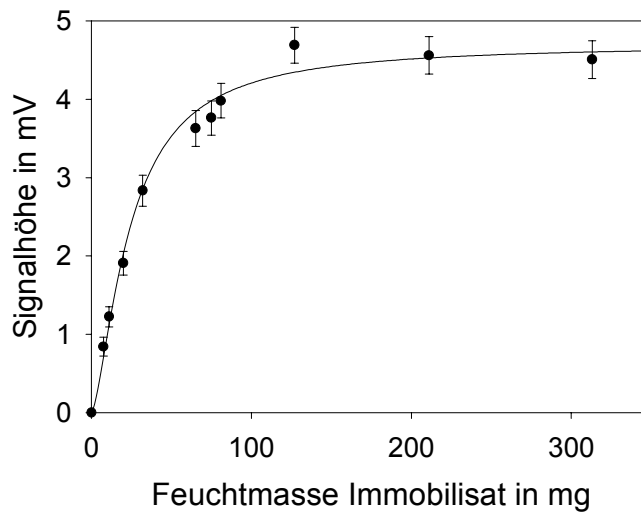


Abbildung 25: Abhängigkeit der Signalhöhe von der Immobilisatmasse für Urease auf Eupergit C bei Impulsbetrieb

Im Gegensatz dazu ist bei der Untersuchung der Urease-Immobilisate (Abbildung 25) zu sehen, dass nach einem annähernd linearen Zusammenhang zwischen Signalhöhe

und Immobilisatmasse (\sim der Aktivität) bei höheren Immobilisatmassen ein Einschwingen der Signalhöhe auf einen konstanten Wert erfolgt.

Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, dass mit Urease bedeutend aktivere Enzym-Träger-Komplexe als mit Invertase hergestellt werden können. Dadurch wird bereits bei geringeren Immobilisatmassen ein vollständiger Umsatz des Substrates in der Kartusche erreicht und die Signalhöhe ist demzufolge nicht mehr von der Aktivität der Enzymsäule abhängig.

Aus diesem Verhalten folgt, dass die vergleichende Untersuchung der Aktivität von Immobilisaten mit der Impulsmethode möglich ist, wenn gewährleistet werden kann, dass der Umsatz des Substrates in der Kartusche ausreichend gering ist. Dieses Kriterium kann durch Variation der Enzymbeladung (Auffüllen mit inaktivem Immobilisat), leicht überprüft werden. Durch Verwendung von vergleichsweise hohen Substratkonzentrationen kann ebenfalls eine ausreichende Substratmenge über die gesamte Länge der Kartusche gewährleistet werden.

Im folgenden soll am Beispiel von Enzymimmobilisierungen mit Hilfe der Sol-Gel-Technik gezeigt werden, wie die Untersuchung von Immobilisaten mit Substratimpulsen als Screeningmethode zur Optimierung von Immobilisierungsverfahren eingesetzt werden kann.

5.4.2 Immobilisierung von Enzymen mittels Sol-Gel-Technik

Die Arbeiten zur Herstellung funktionalisierter Schichten durch Sol-Gel-Technik sind bereits Gegenstand einer eigenständigen Arbeit [42].

Unter einem Sol-Gel-Prozess wird die Bildung eines anorganischer Feststoffes aus einer Lösung verstanden [42], [145]. Dabei reagieren Precursormoleküle (meist siliciumorganische Verbindungen) in einem Prozess aus Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen über die Stufe des Sols (System kolloidaler Teilchen in einem Lösungsmittel) zu einem ungeordneten und verzweigten Netzwerk, einem Gel.

Die Beschaffenheit des Endproduktes wird stark von den Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert im Sol, molares Precursor/H₂O-Verhältnis, Art und Konzentration des Lösungsmittels und Temperatur beeinflusst. Durch Variation dieser Reaktionsbedingungen ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Herstellung von Gelen mit unterschiedlichsten Eigenschaften für verschiedene Anwendungsgebiete. Beispielsweise eignet sich der Sol-Gel-Prozess aufgrund der milden Reaktionsbedingungen sehr gut zur

Herstellung von Enzymimmobilisaten durch Einschluss des Enzyms in das Gelnetzwerk.

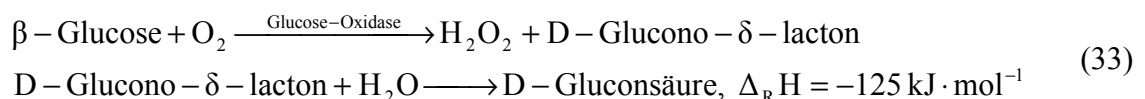
Für die Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten Immobilisate wurden verschiedene siliciumorganische Precursor eingesetzt. Ziel war die Herstellung dünner, homogener, katalytisch aktiver Schichten mit guten Hafteigenschaften und hoher Langzeitstabilität. Durch Modifikationen des Sol-Gel-Prozesses sollte zum einen die Bindung des Enzyms in den Gelen durch Ausbildung von Bindungen zwischen Gelmatrix und Enzym und zum anderen die Zugänglichkeit des Substrates zum Enzym durch Veränderungen der Gelstruktur verbessert werden.

Die Modifizierung der Gele wurde auf 2 Wegen durchgeführt.

Zum einen wurden einem aus Tetraethoxysilan präparierten Sol organische Additive (aromatische und kurz- und langkettige aliphatische Substanzen) mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen (OH, C=O, NH₂) zugesetzt. Der Einfluss von Additiven auf den Ablauf des Sol-Gel-Prozesses und die Eigenschaften der resultierenden Gelschichten ist in der Dissertation von U. GEORGI [42] dargestellt.

Als zweite Möglichkeit zur Modifizierung der Gelschichten wurden Alkyltriethoxysilane R`Si(OC₂H₅)₃ als Precursor verwendet, die im Substituenten R' unter milden Bedingungen potentiell reaktive Gruppierungen, z.B. Amino-, Azomethin- oder Hydroxygruppen, enthalten.

Als Modellenzym wurde vorrangig Glucose-Oxidase (GOD) eingesetzt, die für sensorische Anwendungen im Bereich der Medizin und Biotechnologie besonders interessant ist.



Für die kalorimetrischen Untersuchungen wurden die modifizierten Gele durch Dip-Coating auf einen sphärischen Träger, SIRAN©, ein makroporöses keramisches Material, aufgetragen. Je 400 mg des beschichteten Trägers wurden für die Aktivitätsbestimmung verwendet. Als Maß der Aktivität dient die gemessene Signalhöhe bei Substratimpulsen von 0,5 ml und einer Glucosekonzentration von 0,1 mol/l in 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 25°C und einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,27 ml/min durchgeführt.

5.4.3 Gele aus Tetraethoxysilan

Die Hydrolyse von Tetraethoxysilan $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS) führt zur vollständigen Abspaltung der organischen Gruppen vom Silicium, die Kondensation eines Soles aus diesem Precursor führt daher zu Gelen mit reinem Si-O-Netzwerk, die dadurch keinerlei funktionelle Gruppen enthalten, die eine Anbindung von Enzymen durch chemische Wechselwirkung erlauben. Die Immobilisierung kann in diesem Fall nur durch physikalischen Einschluss des Enzyms in das Gel erfolgen. Bifunktionelle Additive sollten Bindungen zwischen Gelmatrix und Enzym ermöglichen und durch ihren Einfluss auf den Ablauf des Sol-Gel-Prozesses eine Veränderung des Si-O-Netzwerkes bewirken, die die Zugänglichkeit des Enzyms für das Substrat verbessert. Aus entsprechenden Untersuchungen war bekannt, dass die Verwendung der Additive die Kinetik des Sol-Gel-Prozesses beeinflusst und eine Änderung der Struktur der Gelschichten hervorruft [42], [146].

Zur Herstellung der Immobilisate diente der unter 4.2.3 beschriebene zweistufige Prozess. Das Prinzip der Herstellung der Immobilisate ist in Abbildung 26 dargestellt.

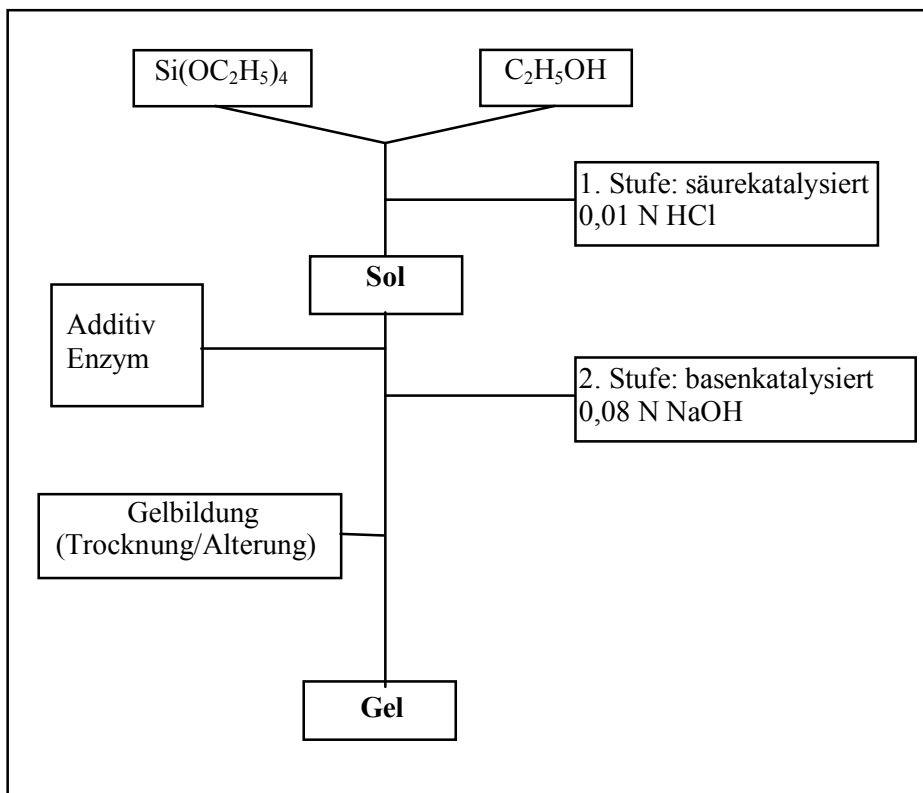
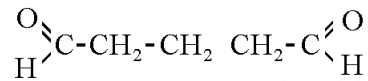


Abbildung 26: Prinzip des zweistufigen Sol-Gel-Prozesses zur Herstellung von Immobilisaten, nach [42]

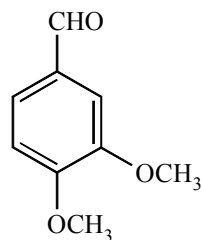
Die Zugabe der Additive bzw. Enzyme erfolgt vor der zweiten, basenkatalysierten Reaktionsstufe.

Bei den Versuchen zur Enzymimmobilisierung wurden folgende Verbindungen als Additive eingesetzt:

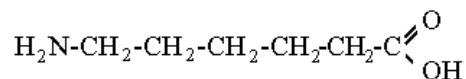
- Glutardialdehyd



- Veratrumaldehyd (3,4-Dimethoxybenzaldehyd)



- Aminocapronsäure



Die Zusammensetzung der Gele wird durch das Stoffmengenverhältnis zwischen dem Additiv und dem Precursor charakterisiert. Der Enzymgehalt der Gele wird auf die bei vollständiger Hydrolyse und Kondensation aus dem Precursor theoretisch entstehende Masse Siliciumdioxid bezogen und als Gramm Enzym je Gramm SiO₂ angegeben.

Wie Untersuchungen des Einschlussverhaltens der Gele [42] zeigen, werden die Enzymmoleküle physikalisch durch Einschluss in das Si-O-Netzwerk gebunden, daneben spielt auch die Bildung von Bindungen zwischen Gelmatrix und Protein eine Rolle.

Beim Einschluss des Enzyms in das Gel sind verschiedene Mechanismen denkbar, die zu einer Verringerung seiner Aktivität führen können. Die Veränderung der Aktivität der Glucose-Oxidase während der Gelbildung wurde photometrisch (A.1) überprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 27. Während zu Beginn des Prozesses annähernd die spezifische Aktivität der verwendeten Glucose-Oxidase (180 U/mg) gemessen wird, nimmt die spezifische Aktivität im Verlauf der Kondensation des Sols ab. Eine Ursache dafür könnten Reaktionen zwischen dem Protein einerseits und den entstehenden Solspezies bzw. dem Additiv andererseits sein. Auch eine veränderte Zugänglichkeit des Enzyms für das Substrat durch das Anwachsen der

Partikel im Sol ist denkbar. Nach 4h Reaktionszeit beträgt die spezifische Aktivität der Glucose-Oxidase im Sol mit 130 U/mg noch 72 % der Ausgangsaktivität und bleibt dann bis zu Erreichen des Gelpunktes annähernd konstant.

Für die Additive Veratrumaldehyd und Aminocaprinsäure werden ähnliche Verläufe für die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Solalter gefunden. Allerdings sind in unmittelbarer Nähe des Gelpunktes nur noch ca. 62 % der Ausgangsaktivität erhalten.

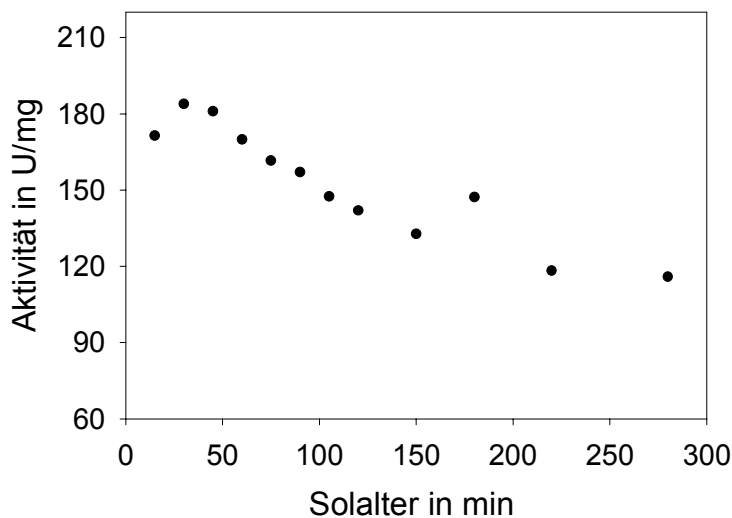


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität der Glucose-Oxidase bei der Alterung eines Sols mit Glutardialdehyd, GOD: SiO₂ = 1:15 g

Abbildung 28 zeigt den Einfluss der verwendeten Additive auf die Aktivität der Immobilisate (Gelschichten auf SIRAN®).

Sowohl die Art des Additivs als auch die eingesetzte Konzentration haben einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität des Immobilisates. Gegenüber einem Immobilisat aus unmodifiziertem Gel werden durch die Verwendung von Additiven deutlich aktivere Immobilisate erzielt. Die besten Ergebnisse werden dabei mit Glutardialdehyd erhalten. Während für Veratrumaldehyd und Aminocaprinsäure eine Sättigungskonzentration zu beobachten ist, oberhalb derer eine Erhöhung der Additivkonzentration nicht zu einer Steigerung der Aktivität führt (etwa 0,1 mol Additiv je mol TEOS), nimmt die Aktivität der Immobilisate aus Glutardialdehyd-modifiziertem Gel bis zu einem Additiv-Precursor-Verhältnis von 0,14:1 zu (Abbildung 28).

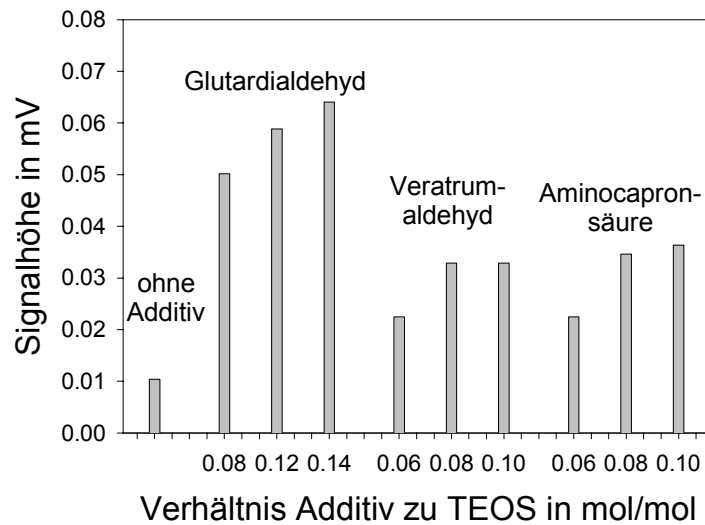


Abbildung 28: Kalorimetrische Untersuchung des Additiveinflusses auf die Aktivität von Sol-Gel-Immobilisaten, (GOD: SiO₂= 1: 15 g)

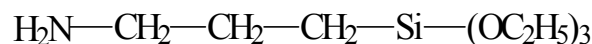
Die bei den einzelnen Additiven beobachteten Aktivitätsunterschiede werden auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Sol und Additiv zurückgeführt. Die gegenüber Glutardialdehyd geringeren Aktivitäten bei Verwendung von Veratrumaldehyd und Aminocapronensäuren werden damit erklärt, dass durch Wechselwirkungen mit Solspezies ein Teil der funktionellen Gruppen des Additivs blockiert wird [42].

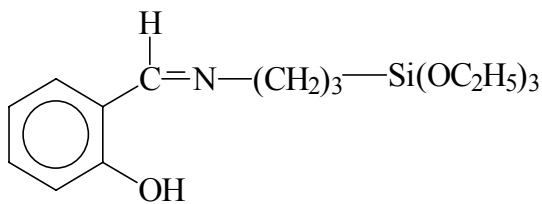
5.4.4 Gele aus Alkyltriethoxysilanen

Werden Alkyltriethoxysilane der allgemeinen Form R'Si(OC₂H₅)₃ als Precursor für die Gelbildung eingesetzt, entstehen Gele, in denen das anorganische Si-O-Netzwerk kovalent gebundene funktionelle Gruppen enthält, an denen weitere Reaktionen stattfinden können. Durch die Variation des Restes R' im Precursormolekül kann eine breite Palette von Gelen mit unterschiedlichsten Eigenschaften erzeugt werden.

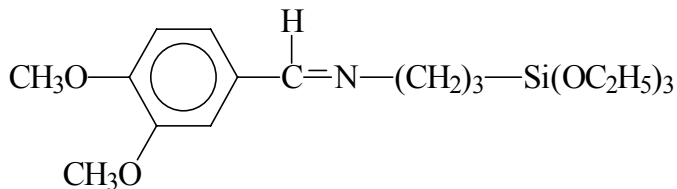
Folgende Alkyltriethoxysilane wurden als Precursor zur Immobilisierung von Enzym eingesetzt:

Aminopropyltriethoxysilan



2-Hydroxybenzyliden-N-propyl-3-triethoxysilylamin (Azomethin II)⁴

3,4-Dimethoxybenzyliden-N-propyl-3-triethoxysilylamin (Azomethin IV)



Diese Alkyltriethoxysilane können sowohl als alleiniger Precursor oder im Gemisch mit Tetraethoxysilan zur Herstellung von Gelen für die Enzymimmobilisierung eingesetzt werden.

Für die Herstellung von Gelen aus Precursorgemischen wurde das Tetraethoxysilan vorhydrolysiert (Stufe 1 des Sol-Gel-Prozesses) und in der 2. Stufe des jeweilige Alkyltriethoxysilan zugegeben. Nach diesem Schritt erfolgte die Zugabe des Enzyms und das Aufbringen des Gel auf SIRAN©. Zur Charakterisierung der Zusammensetzung des Sols dient, analog wie bei der Verwendung von Additiven, das Stoffmengenverhältnis von Alkyltriethoxysilan und Tetraethoxysilan und das Massenverhältnis zwischen Enzym und theoretisch entstehendem SiO₂.

Wie die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse der kalorimetrischen Aktivitätsuntersuchung zeigen, führt die Verwendung der Alkylethoxysilane zu deutlich höheren Aktivitäten als der Einsatz eines unmodifizierten Sols aus Tetraethoxysilan. Offensichtlich wirken die sehr großen funktionellen Gruppen der Alkylethoxysilane als Spacer, die eine offenere Struktur des Gels und damit leichtere Zugänglichkeit des Substrates zum Enzym bewirken.

Für Aminopropyltriethoxysilan wird im Gemisch mit Tetraethoxysilan bei einem APTS:TEOS-Verhältnis von 0,15:1 eine deutlich höhere Aktivität erzielt, als bei Verwendung von APTS als alleinigem Precursor. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Tatsache, dass Sole aus reinem APTS bedingt durch die primäre

⁴ Die Bezeichnungen Azomethin II und IV sind willkürlich gewählte Arbeitsnamen für die gezeigten Verbindungen, sie wurden in Anlehnung an [42] gewählt.

Aminfunktion des Precursors sehr hohe pH-Werte aufweisen, die unter Umständen zur Inaktivierung des Enzyms führen.

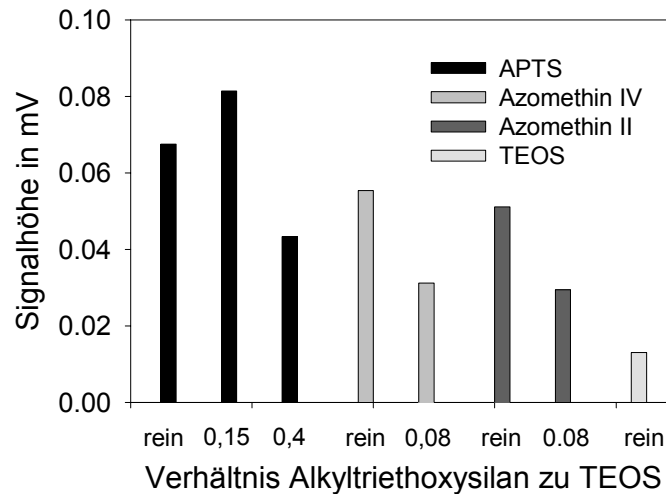


Abbildung 29: Aktivität verschiedener Immobilisate aus Alkyltriethoxysilanen im Vergleich zu Gel aus reinem Tetraethoxysilan, (GOD: $\text{SiO}_2 = 1: 15 \text{ g}$)

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, hat der Enzymgehalt des für die Herstellung der Schichten verwendeten Sols keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivität der Immobilisate. Dieser überraschende Befund kann eventuell damit erklärt werden, dass nicht die Menge, sondern die Zugänglichkeit des immobilisierten Enzyms für die Aktivität des Immobilisates entscheidend ist.

Denkbar ist allerdings auch, dass die durch den Zusatz des Enzyms veränderten Fließeigenschaften des Sols dazu führen, dass beim Dip-Coating unterschiedlich starke Gelschichten, und damit verschiedene Enzymmengen, auf den Träger aufgebracht werden. Die Bestimmung des Enzymgehaltes in den Schichten konnte trotz intensiver Versuche nicht durchgeführt werden, da der Proteingehalt des Immobilisates zu gering war.

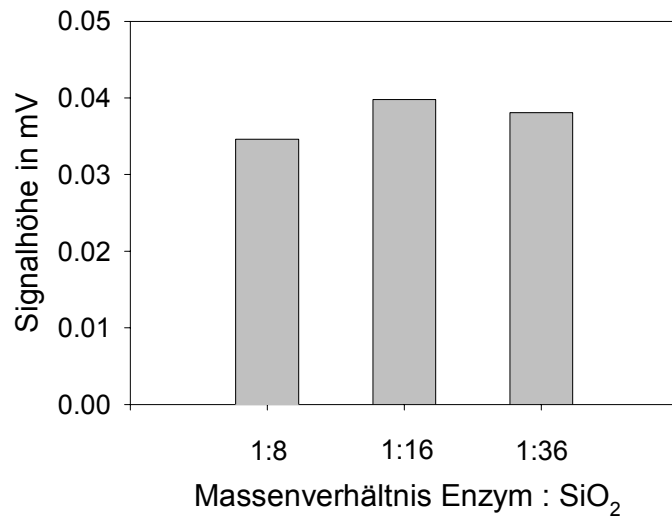


Abbildung 30: Einfluss des Enzymgehaltes auf die Aktivität einer Gelschicht aus Aminopropyltriethoxysilan und Tetraethoxysilan (0,4:1)

Die Stabilität der hergestellten Immobilisate bei Lagerung in Pufferlösung wurde ebenfalls an Schichten aus Alkyltrethoxysilan und Tetraethoxysilan überprüft.

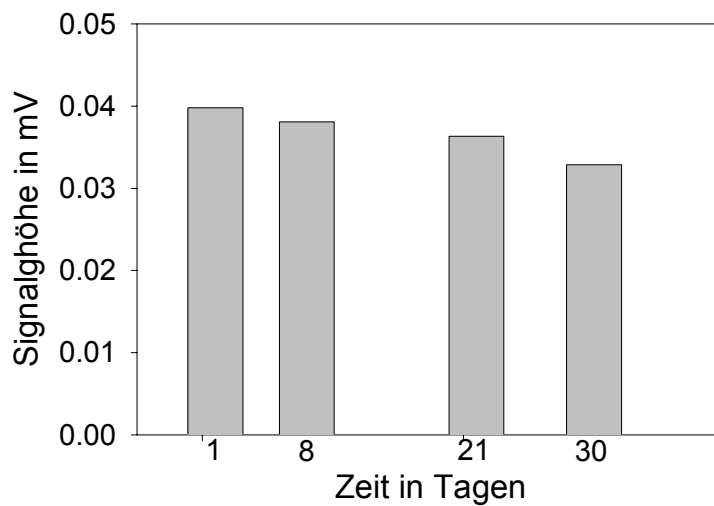


Abbildung 31: Stabilität der katalytischen Aktivität einer Gelschicht aus Aminopropyltriethoxysilan und Tetraethoxysilan (0,4:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen

Wie Abbildung 31 zeigt, weisen die Immobilisate eine beachtliche Stabilität auf, nach 30 Tagen zeigte das ausgewählte Immobilisat noch ca. 82 % der Ausgangsaktivität. Bei

einer weiteren Messung nach 80 Tagen wurde eine Aktivität gefunden, die immer noch 70 % der Ausgangsaktivität entsprach.

Die dargestellten Ergebnisse belegen die vielfältigen Möglichkeiten zur Charakterisierung von Immobilisaten hinsichtlich Aktivität, Langzeitstabilität und Einfluss der Herstellungsbedingungen mit der Impulsmethode. Insbesondere zum Screening von Immobilisaten stellt die Impulsmethode eine interessante Alternative zu anderen, insbesondere nichtkalorimetrischen Verfahren dar.

6 IC-Kalorimeter

Das am Institut für Physikalische Chemie [131], [48] entwickelte miniaturisierte Kalorimeter (IC-Kalorimeter)⁵ wurde in früheren Arbeiten erfolgreich zur Untersuchung enzymatisch katalysierter Reaktionen eingesetzt. OEHMGEN [48] bestimmte damit die Aktivität gelöster Enzyme und konnte eine Möglichkeit der Bestimmung von Schwermetall- und Cyanid-Ionen durch Quantifizierung ihrer Hemmwirkung zeigen.

6.1 Aufbau des Kalorimeters

Das IC-Kalorimeter arbeitet nach dem Wärmeleitungsprinzip [53]. Als Wärmeleistungsdetektor wird ein Silicium-Chip mit Thermosäulenstruktur der Firma Xensor-Integration Delft [129], [131] eingesetzt, der eine aus 164 Al-Si-Paaren bestehende Thermosäulenstruktur besitzt. Zur elektrischen Kalibrierung dient der integrierte Heizer (800 Ω). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kalorimeter kam ein Thermosäulenchip vom Typ LCM 2524 mit einer aktiven Fläche von 16 mm² zum Einsatz. Abbildung 32 zeigt schematisch dessen Aufbau.

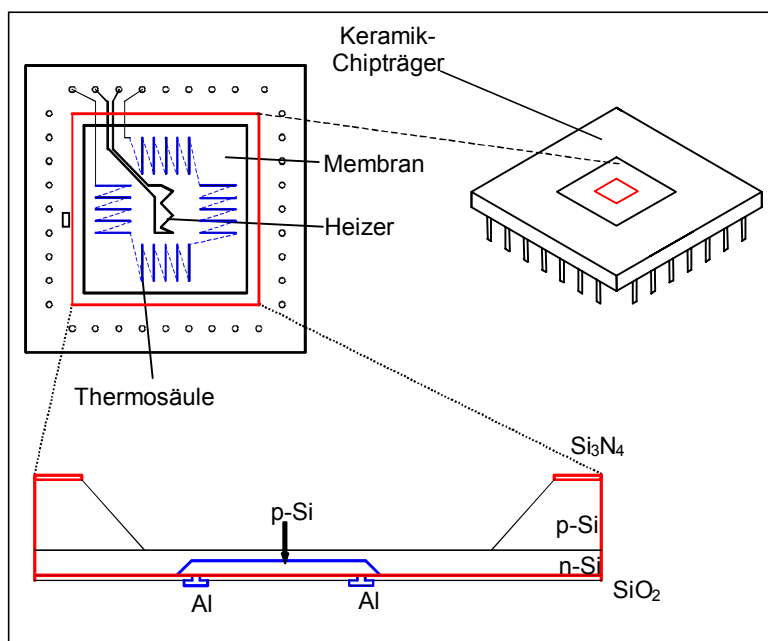


Abbildung 32: Der Wärmeleistungsdetektor, nach [147]

⁵ IC – integrated circuits

Ausführliche Beschreibungen des Kalorimeters finden sich in den Arbeiten von OEHMGEN und LERCHNER [48], [131], [132].

Das massive Aluminiumgehäuse (Kalorimeterblock) des IC-Kalorimeters dient als Wärmesenke. Auf der sensitiven Fläche des Sensor-Chips (Abbildung 32, [147]) wird eine der Reaktionskomponenten (Flüssigkeit oder Immobilisat) vor dem Zusammenbau der Anordnung vorgelegt. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zudosieren der Substratlösung mit Hilfe einer Mikrodosierspritze. Das Kalorimeter wird ohne Thermostatierung betrieben. Abbildung 33 zeigt den Aufbau des Gerätes mit eingebautem Immobilisat.

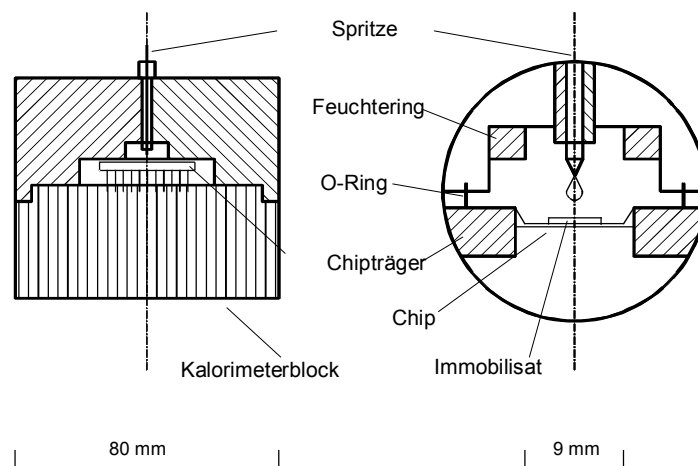
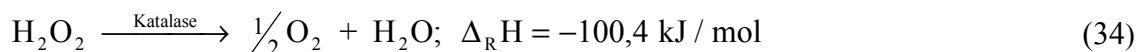


Abbildung 33: Aufbau des miniaturisierten kalorimetrischen Sensors nach [48]

6.2 Ausgewähltes Modellenzymssystem

Katalase (E.C. 1.11.1.6 aus *Aspergillus niger*) diene aufgrund ihrer hohen Aktivität und guten Stabilität als Modellenzym für die Untersuchungen. Die hohe Reaktionsenthalpie der enzymatischen Wasserstoffperoxidzerersetzung in Verbindung mit der Tatsache, dass Wasserstoffperoxid eines der zentralen Moleküle in der enzymatischen Analytik ist, macht diese Reaktion für kalorimetrische Sensoren interessant.



Die Katalase zeigt ein für Enzyme ungewöhnliches kinetisches Verhalten (BERGMEYER [44]). So ist es nicht möglich, das Enzym im experimentell zugänglichen Konzentrationsbereich mit Substrat zu sättigen. Andererseits wird das Enzym bei höheren Konzentrationen an Wasserstoffperoxid durch Bildung inaktiver Enzym-Substrat-Komplexe deaktiviert. Eine Messung der Enzymaktivität bei Substratsättigung

ist nicht möglich und die Michaelis-Konstante K_M von Katalase kann daher nicht bestimmt werden. Da K_M aber deutlich größer als die verwendeten Substratkonzentrationen (0-0,03 mol/l) sein muss, vereinfacht sich die Kinetik der katalysierten Reaktion zu einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Angabe der Katalase-Aktivität als U ($\mu\text{mol}/\text{min}$) muss sich daher auf eine definierte Wasserstoffperoxidkonzentration beziehen. Günstiger, weil unabhängig von der Konzentration der Substratlösung, ist die Angabe der Aktivität der verwendeten Katalase als Geschwindigkeitskonstante k_1 (1/s) einer Reaktion 1. Ordnung gemäß:

$$r = k_1 c_s \quad (35)$$

6.3 Charakterisierung des IC-Kalorimeters

Der Einbau der zu untersuchenden Immobilisate stellt eine vergleichsweise große Änderung der Verhältnisse im IC-Kalorimeter dar, daher ist damit zu rechnen, dass wichtige Parameter des Kalorimeters, wie Empfindlichkeit und dynamisches Verhalten, durch die Immobilisate signifikant geändert werden.

Für die zuverlässige kinetische Untersuchungen von Enzymimmobilisaten mit dem IC-Kalorimeter ist vor allem die genaue Kenntnis der dynamischen Eigenschaften des verwendeten Kalorimeters notwendig.

Da es sich bei dem IC-Kalorimeter um ein Wärmeleitungs-Kalorimeter handelt, kann es nach der Theorie von TIAN und CALVET [48], [54] beschrieben werden. Unter der Annahme, dass der Wärmeaustausch zwischen Kalorimeter und Umgebung mit einem Zeitgesetz 1. Ordnung beschrieben werden kann, wird das dynamische Verhalten des Gerätes durch seine Zeitkonstante charakterisiert. Die Bestimmung der Zeitkonstanten steht daher bei der Charakterisierung des IC-Kalorimeters im Vordergrund.

Die Charakterisierung des IC-Kalorimeters kann entweder „elektrisch“ mit Hilfe des eingebauten Kalibrierheizers (Abbildung 32) oder „chemisch“ durch Verwendung geeigneter Testreaktionen erfolgen.

Die „chemische“ Kalibrierung durch eine schnelle Reaktion, z.B. eine Neutralisation [48], [134] oder Protonierung von Tris⁶ mit HCl [148], [149] hat den Vorteil, dass die Wärmeproduktion an einem definiertem Ort erfolgt und für den Wärmeübergang zwischen Flüssigkeit und Thermosäulenchip die gleichen Bedingungen wie beim Ablauf der zu untersuchenden Reaktion herrschen. Einschränkend wirkt sich bei der

gleichzeitigen Verwendung von Immobilisaten aus, dass die Geschwindigkeit der Reaktion durch Diffusion einer der Komponenten ins Innere des Immobilisats bestimmt wird, und die Reaktion nicht mehr ausreichend schnell abläuft, um damit die Zeitkonstante des kalorimetrischen Anordnung zu bestimmen.

Durch die „elektrische“ Kalibrierung mit dem integrierten Heizer lässt sich dieser Diffusionseinfluss umgehen. Nachteilig ist in diesem Fall die Wärmeproduktion außerhalb des Reaktionsraumes in der Chip-Fläche in unmittelbarer Nachbarschaft der Thermosäulen. Während sich die Bestimmung der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters mit Hilfe des Kalibrierheizers als unproblematisch erweist, ist die Bestimmung der Zeitkonstanten aus den Messkurven von Heizexperimenten komplizierter und mit einem größeren Fehler verbunden.

Um darüber hinaus die Eignung des IC-Kalorimeters zur Untersuchung des Systems Wasserstoffperoxid-Katalase zu überprüfen und einen geeigneten Algorithmus zur kinetischen Auswertung der Messkurven unter den in [48] vorgeschlagenen auszuwählen, wurde die Reaktion von nativer (gelöster) Katalase mit Wasserstoffperoxid untersucht.

6.3.1 Elektrische Kalibrierung

Die Thermospannungs-Zeit-Kurve bei Heizexperimenten mit einem trockenen Chip spiegelt ohne signifikante zeitliche Verzögerung den Verlauf der Heizleistung wider (Abbildung 34). Dagegen ist bei Vorlage von Wasser auf dem Chip eine deutliche Zweiteilung des Signals beim Ein- bzw. Ausschalten des Heizstromes zu erkennen (Abbildung 35).

Diese Zweiteilung kann durch die Wirkung von mindestens zwei Wärmeleitstrecken erklärt werden. Eine Wärmeleitstrecke besteht zwischen Thermosäule und Heizer, diese ist verantwortlich für das schnelle Ansprechen des trockenen Chips und für den ersten, der Rechteckfunktion der Heizleistungs-Zeit-Kurve ohne erkennbare Zeitverzögerung folgenden Teil der Thermospannungs-Zeit-Kurve (Abbildung 35). Eine zweite Wärmeleitstrecke bestimmt den Wärmeübergang zwischen dem Wassertropfen und der Thermosäule, dieser Übergang lässt sich in erster Näherung durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Da der Einfluss der Wärmeleitstrecke zwischen Heizer und Thermosäule auf das dynamische Verhalten des Kalorimeters gegenüber der

⁶ Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

zweiten Wärmeleitstrecke bei einer Reaktion auf dem Chip zurücktritt, wurde nur der zweite Teil des Signals nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung ausgewertet.

Bei dieser Näherung wird nur die Wärmeableitung über die Thermosäulen des Sensorchips berücksichtigt. Weitere Wärmeleitstrecken, vor allem im Innern der verwendeten Probe, werden bei dieser vereinfachten Darstellung vernachlässigt. Eine detaillierte Beschreibung des dynamischen Verhaltens des IC-Kalorimeters unter Beachtung weiterer Wärmeleitstrecken geben LERCHNER et. al. in [150].

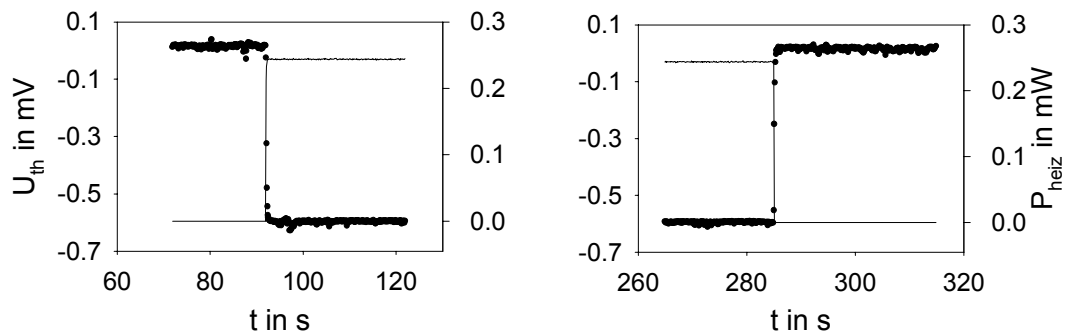


Abbildung 34: Signalantwort des IC-Kalorimeter mit trockenem Chip auf einen rechteckförmigen Heizimpuls beim Aufheizen (links) bzw. Abkühlen (rechts), • - Thermospannung(U_{th}), — Heizleistung(P_{heiz})

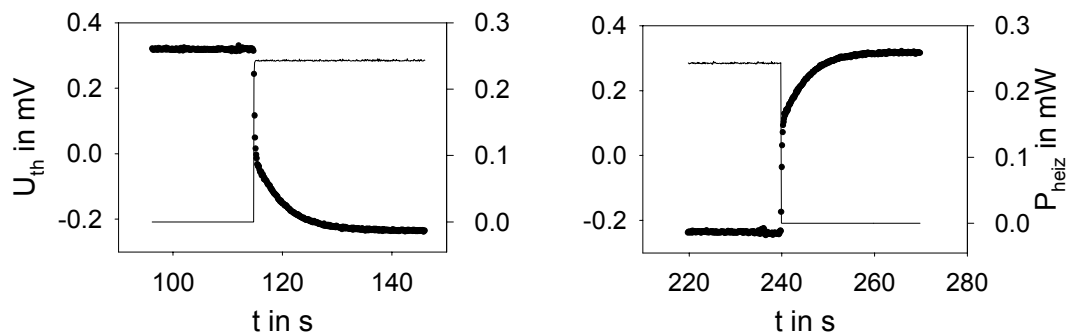


Abbildung 35: Signalantwort des IC-Kalorimeters mit $7\mu\text{l}$ Wasser auf dem Chip auf einen rechteckförmigen Heizimpuls beim Aufheizen (links) bzw. Abkühlen (rechts), • - Thermospannung(U_{th}), — Heizleistung(P_{heiz})

Die mit Hilfe des Kalibrierheizers ermittelte Zeitkonstante des Kalorimeters zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Volumen des eingesetzten Wassertropfens (Abbildung 36).

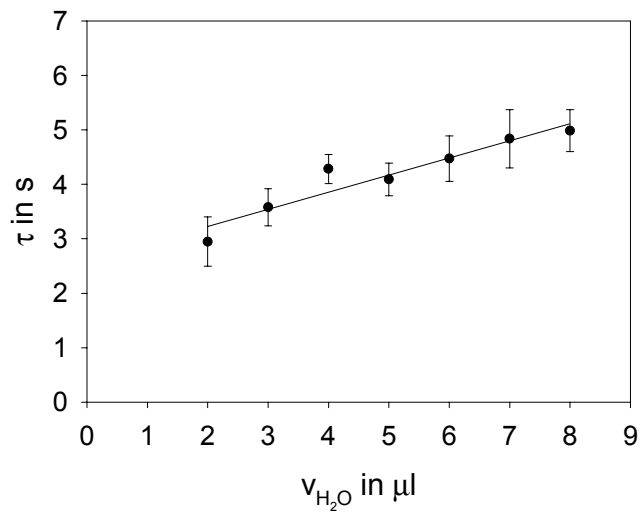


Abbildung 36: Abhängigkeit der elektrisch ermittelten Zeitkonstante des IC-Kalorimeters vom Volumen des Tropfens

Der Anstieg der Regressionsgerade in Abbildung 36 ist mit $(0,31 \pm 0,03)$ s/ μl stärker als durch die Veränderung der Wärmekapazität ($4,186$ mJ/K $\cdot\mu l$) der Probe mit zunehmender Wassermenge bei gleichbleibendem thermischen Widerstand (35 K/W) nach:

$$\tau = c_p R_{th} \quad (36)$$

zu erwarten wäre ($0,15$ s/ μl , bei $R_{th}=35$ K/W).

Dieser Unterschied kann auf die Wirkung nicht berücksichtigter zusätzlicher Wärmeleitstrecken zurückgeführt werden, die durch Vergrößerung des Wassertropfens zunehmend an Einfluss gewinnen.

Auf diese zusätzlichen Wärmeleitstrecken wird auch die beobachtete mathematisch nicht eindeutig beschreibbare Änderung der Empfindlichkeit des Kalorimeters bei Vergrößerung der eingesetzten Flüssigkeitsmenge zurückgeführt, die so nicht zu erwarten war (Abbildung 37).

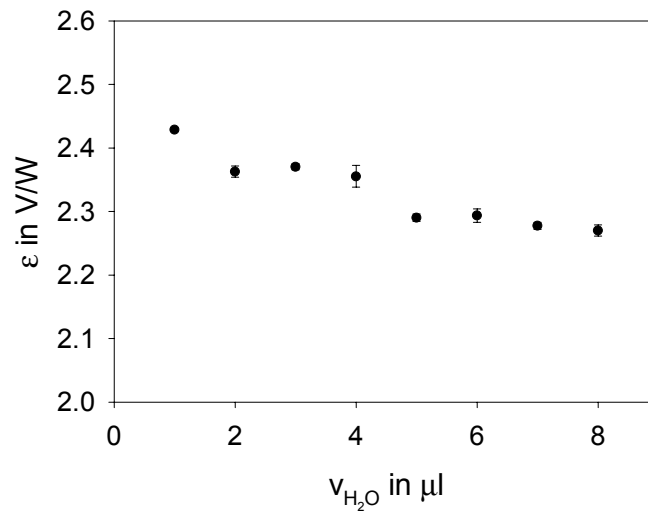


Abbildung 37: Abhängigkeit der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeter vom Volumen des Tropfens

6.3.2 Chemische Kalibrierung

Die Protonierung von Tris mit Salzsäure ($\Delta_{\text{R}}H=47,44 \pm 0,07$ kJ/mol) [149] wurde als schnelle Reaktion zur Überprüfung der elektrisch ermittelten Zeitkonstante des IC-Kalorimeters benutzt.

Dazu wurden 3 μl 0,1 molare Tris-Lösung auf dem Sensorchip vorgelegt und aus der Spritze des Kalorimeters 4,4 μl Salzsäure in Konzentrationen zwischen 0,02 – 0,05 mol/l zudosiert. Durch dieses Vorgehen wird gewährleistet, dass zu jeder Zeit Tris im Überschuss vorliegt und neben der Protonierungsreaktion keine Neutralisation stattfindet.

Unter Verwendung der Protonierungsreaktion wurde für die Zeitkonstante des IC-Kalorimeters ein Wert von $(6,4 \pm 0,95)$ s für die Zeitkonstante ermittelt, dieser liegt etwas über dem elektrisch ermitteltem Wert von $(4,8 \pm 0,91)$ s. Im Rahmen des relativ großen Fehlers ist die Übereinstimmung beider Werte befriedigend.

6.3.3 Untersuchung des IC-Kalorimeters mit nativer Katalase

Die Messungen mit nativer, gelöster Katalase dienten dazu, die Anwendbarkeit des IC-Kalorimeters für das ausgewählte System zu zeigen und den für das verwendete System am besten geeigneten Auswertalgorithmus auszuwählen.

Für die Messungen wurde die in Puffer gelöste Katalase auf dem Chip vorgelegt und die Wasserstoffperoxidlösung aus der Mikrodosierspritze zugegeben.

Für die kinetische Auswertung der Messkurven kommen die folgenden von OEHMGEN [48] vorgeschlagenen Algorithmen in Betracht:

Auswertung der Startwärmeleistung

Die Startwärmeleistung (h , als Maximalwert der gemessenen Thermospannung in mV), d.h. die unmittelbar nach dem Start der Reaktion gemessene, maximale Wärmeleistung, ist über die folgenden Beziehungen mit der Maximalgeschwindigkeit r_{\max} und der Michaelis-Konstante K_M der Reaktion verknüpft:

$$r_0 = h \cdot \alpha = \frac{r_{\max} \cdot c_{S0}}{(c_{S0} + K_M)} \cdot \frac{1}{\alpha} \quad (37)$$

mit:

$$\alpha = \frac{1}{v_p \cdot -\Delta_R H \cdot \varepsilon} \quad (38)$$

und:

$$r_{\max} = r_0 \frac{(c_{S0} + K_M)}{c_{S0}} \quad (39)$$

In diesen Formeln bedeuten:

- r_0 - Startreaktionsgeschwindigkeit
- h - Peakhöhe
- α - Proportionalitätsfaktor
- v_p - Volumen der Probe (Gesamtvolumen aus Enzym- und Substratlösung)
- ε - Empfindlichkeit des Chips

Die Abbildung 38 zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen ermittelter Peakhöhe und der aus photometrischen Messungen bestimmten Aktivität der Katalase.

Für die Bestimmung der Aktivität immobilisierter Enzyme ist der vorgeschlagene Algorithmus aus folgenden Gründen nicht geeignet:

- Für Auswertung des Zusammenhanges Kenntnis der Michaelis-Konstante des Enzyms notwendig, Michaelis-Konstante eines Enzyms bei Immobilisierung möglicherweise geändert (2.2.3), speziell bei Katalase K_M nicht ermittelbar

- Für exakte Auswertung der Messkurven möglichst gute Trennung zwischen Dosier- und Reaktionseffekt notwendig
- Trennung bei der vorliegenden Reaktion 1. Ordnung schwierig, da Messung nicht im Bereich der kinetischen Sättigung möglich

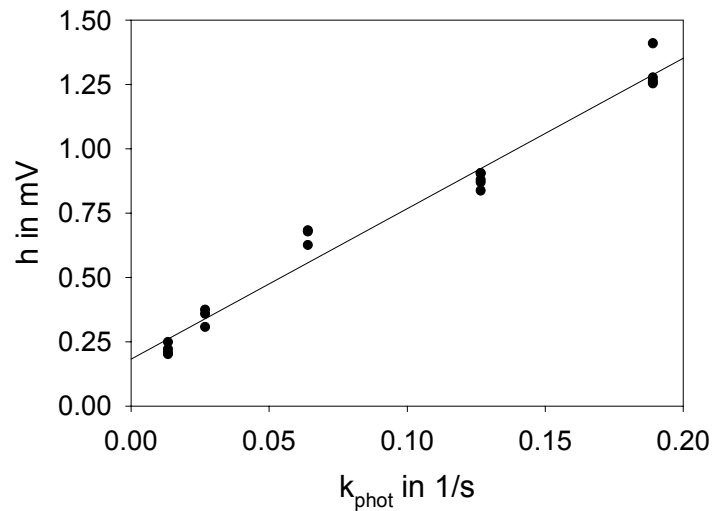


Abbildung 38: Abhängigkeit der Peakhöhe von der eingesetzten Katalaseaktivität, ($k_{\text{phot}} = k_1$ aus photometrischer Aktivitätsbestimmung)

Modellierung der vollständigen Wärmeleistungskurve

Der in [48] vorgeschlagene Weg zur Bestimmung der Aktivität als r_{max} durch Modellierung der gesamten Wärmeleistungskurve wurde speziell für das System Urease/Harnstoff optimiert. Die Modellierung, die auf der Simulation der Reaktion nach dem in einer früheren Arbeit [47] ermittelten zweistufigen Ablauf beruht, setzt die genaue Kenntnis der Kinetik, einschließlich der kinetischen Parameter, der untersuchten Reaktion voraus. Für eine breite Anwendung unabhängig vom gewählten System ist dieser Algorithmus nicht geeignet.

Auswertung der Wärmeleistungskurve nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung

Als eine weitere Möglichkeit zur kinetischen Auswertung der mit dem IC-Kalorimeter erhaltenen Messkurven wird die Modellierung des „hinteren“ Teils der Wärmeleistungs-Zeit-Kurve nach einem Modell 1. Ordnung vorgeschlagen. Da die Wasserstoffperoxidspaltung durch Katalase einem Zeitgesetz 1. Ordnung folgt, sollte sich dieser Algorithmus besonders gut zur kinetischen Auswertung der Messkurven eignen. Für Reaktionen, die wie die Urease-katalysierte Harnstoffhydrolyse, einem Zeitgesetz nach

MICHAELIS und MENTEN (9) folgen, kann diese Auswertung nur eingesetzt werden, wenn die Reaktion soweit fortgeschritten ist, dass nur noch relativ wenig Substrat in der Lösung vorliegt ($c_s \ll K_M$). Die Reaktion kann dann vereinfacht durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung beschrieben werden. In [132] konnten die Autoren zeigen, dass damit relative Aussagen zur enzymatischen Aktivität möglich sind und zur Bestimmung von Inhibitorkonzentrationen genutzt werden können.

Die Auswertung der Wärmeleistungskurven nach diesem Modell ergibt einen linearen Zusammenhang (Abbildung 39) zwischen den Geschwindigkeitskonstanten k_{phot} (k_1 aus photometrischen Messungen) und k_{kal} (k_1 aus Messungen mit dem IC-Kalorimeter).

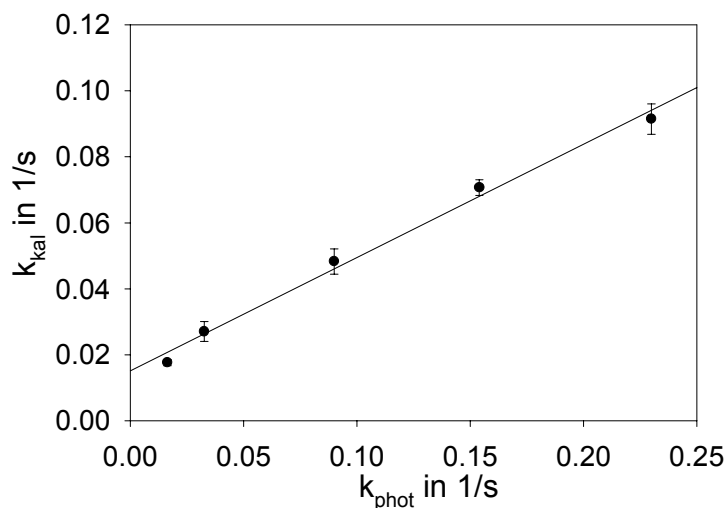


Abbildung 39: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch gemessener Geschwindigkeitskonstante für unkorrigierte Messkurven

Wie aber aus Tabelle 7 deutlich wird, sind die kalorimetrisch bestimmten Werte für die Geschwindigkeitskonstante kleiner als die photometrisch ermittelten, die Abweichungen werden mit steigender Aktivität größer. Dies erklärt auch, warum die Regressionsgerade in Abbildung 39 die y-Achse nicht im Koordinatenursprung schneidet.

Photometrisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante in 1/s	Kalorimetrisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante in 1/s	Faktor $k_{\text{kal}}/k_{\text{phot}}$
0,017	$0,017 \pm 9,5 \cdot 10^{-4}$	1
0,033	$0,027 \pm 3,01 \cdot 10^{-3}$	1,2
0,09	$0,048 \pm 3,82 \cdot 10^{-3}$	1,9
0,1540	$0,071 \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$	2,2
0,23	$0,091 \pm 4,6 \cdot 10^{-3}$	2,5

Tabelle 7: Verhältnis zwischen photometrisch und kalorimetrisch ermittelter Geschwindigkeitskonstante bei Auswertung nicht korrigierter Messkurven

Insgesamt spricht das Ergebnis der Untersuchung zum einen dafür, dass vergleichende Untersuchungen der Enzymaktivität mit dem IC-Kalorimeter auch für das System Katalase-Wasserstoffperoxid möglich sind, dass aber andererseits das dynamische Verhalten des Kalorimeters die Form der aufgezeichneten Wärmeleistungszeitkurven beeinflusst. Auf Grund der in den Abschnitten 6.3.1 und 6.3.2 dargestellten Ergebnisse wurde eine Zeitkonstante von $\tau = 6$ s zur Korrektur der Messkurven verwendet. Werden die korrigierten Kurven nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung ausgewertet, so werden Geschwindigkeitskonstanten erhalten, die den erwarteten Werten entsprechen (Abbildung 40).

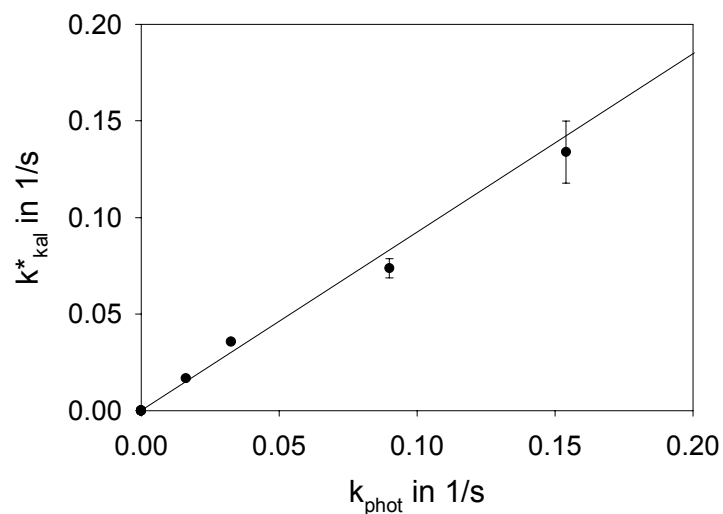


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch gemessener Geschwindigkeitskonstante für dynamisch korrigierte Messkurven

Bemerkenswert ist in Abbildung 40, dass der Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante sehr groß wird, wenn diese sich dem Wert der reziproken Zeitkonstante des Kalorimeters (hier $\sim 0,18 \text{ s}^{-1}$) nähert. Oberhalb dieses Wertes ist mit dieser Methode deshalb keine Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten mehr möglich.

Das IC-Kalorimeter erlaubt es, die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion erster Ordnung zu bestimmen und damit kinetische Untersuchungen am System Katalase-Wasserstoffperoxid durchzuführen. Damit ist die wichtigste Voraussetzung erfüllt, um die Aktivität von Enzymimmobilisaten zu untersuchen.

6.4 Untersuchung von Immobilisaten mit dem IC-Kalorimeter

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das IC-Kalorimeter zur Bestimmung der Aktivität gelöster Enzyme eingesetzt werden kann, sollen nun die Ergebnisse der Untersuchungen von Enzymimmobilisaten mit diesem Gerät gezeigt werden.

Das IC-Kalorimeter kommt aufgrund seiner Konstruktion vorrangig zur Untersuchung flächiger Immobilisate in Frage. Damit kann eine wichtige Lücke bei der kalorimetrischen Untersuchung von Enzymimmobilisaten geschlossen werden.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von BATAILLARD et al. [6], die die direkte Immobilisierung auf der sensitiven Fläche des Chips vorschlagen, standen bei den hier vorgestellten Untersuchungen Immobilisate im Vordergrund, die variable Anordnungen gestatten, um eine schnelle Umstellung des Sensors auf verschiedene Messaufgaben zu ermöglichen. Verschiedene Trägermaterialien und Immobilisierungsmethoden wurden auf ihre Kombinierbarkeit mit dem IC-Kalorimeter getestet.

6.4.1 Verwendete Immobilisate

Makroporöse Glasmembranen

Die verwendeten makroporösen Glasmembranen wurden von der Arbeitsgruppe JANOWSKI an der Universität Halle entwickelt [151], [152]. Es handelt sich dabei um poröse Gläser (2.2.1) die in ihrer Struktur den kommerziell verfügbaren sphärischen porösen Gläsern gleichen. Sie werden aus einem Natriumborosilikatausgangsglas hergestellt. Durch Temperung der Gläser kommt es zur Entmischung in eine lösliche natriumreiche und unlösliche, fast vollständig aus SiO_2 bestehende Phase. Durch Extraktion mit einem geeignetem Extraktionsmittel kann die lösliche Phase entfernt und ein poröses SiO_2 -Skelett erhalten werden. Porengröße- und Verteilung können durch

Kontrolle der Temperungstemperaturen und -zeiten recht genau eingestellt werden [153]. Während bisher solche Gläser in erster Linie als sphärische Partikel hergestellt wurden, konnten JANOWSKI et al. Membranen aus diesem Material entwickeln. Diese Membranen, die eine schwammähnliche Porenstruktur aufweisen, können für die Gasseparation, als Träger für Katalysatoren oder im Bereich der Wirt-Gast-Chemie eingesetzt werden [153]. Aufgrund der strukturellen Übereinstimmung mit klassischen Trägermaterialien war der Einsatz dieser Materialien für die Enzymimmobilisierung naheliegend. Die Immobilisierung erfolgte nach der unter (4.2.1) beschriebenen Methode durch Silanisierung mit Aminopropyltriethoxysilan und Aktivierung mit Glutardialdehyd.

Zur Verfügung standen quadratische Membranen von 0,21; 0,33; 0,54 und 0,8 mm Stärke und jeweils 4 mm Seitenlänge.

Sol-Gel-Materialien

Da sich die Sol-Gel-Technik, wie gezeigt wurde (5.4), [42], [43], hervorragend zur Immobilisierung von Enzymen in dünnen Schichten eignet, wurde sie auch zur Herstellung von Immobilisaten für das IC-Kalorimeter eingesetzt. Das direkte Aufbringen solcher Schichten auf die aktive Fläche des Sensorchips führte allerdings nicht zum gewünschten Erfolg. Aufgrund der mechanischen Empfindlichkeit der Sensormembran ist insbesondere das Ablösen unbrauchbar gewordener Schichten zeitaufwendig und kompliziert. Eine flexible Umstellung des IC-Kalorimeters auf veränderte Messaufgaben ist so nicht zu erreichen. Auch das Anbringen einer polymeren Zwischenschicht zwischen Chip und Immobilisat, die mit geeigneten organischen Lösungsmitteln wieder entfernt werden kann, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Sol-Gel-Immobilisate mit einer Stützschiicht aus Filterpapier hergestellt.

Enzym quervernetzt mit Glutardialdehyd

Neben Sol-Gel-Schichten wurde auch die bekannte Quervernetzung von Proteinen mit Glutardialdehyd zur Herstellung von Immobilisaten für das IC-Kalorimeter eingesetzt. Auch für die Quervernetzung von Katalase mit Glutardialdehyd wurde Filterpapier als Stützschiicht eingesetzt, um die direkte Immobilisierung auf dem Sensorchip zu umgehen.

6.4.2 Einfluss des Immobilisates auf die Parameter des IC-Kalorimeters

Von vorrangigem Interesse beim Einsatz des IC-Kalorimeters zur kinetischen Untersuchung von Enzymimmobilisaten war die Änderung seiner Parameter durch den Einbau der zu untersuchenden Immobilisate bzw. der verwendeten Trägermaterialien. Da die Zeitkonstante des Kalorimeters nach TIAN [54] durch die Wärmekapazität von Kalorimeter und Probe c_p , sowie dem thermischen Widerstand zwischen System und Umgebung R_{th} bestimmt wird (Gleichung (36)), sind Veränderungen des dynamischen Verhaltens durch Änderung beider Größen möglich. Nach den Erfahrungen bei der elektrischen Kalibrierung des Kalorimeters in Abhängigkeit vom Flüssigkeitsvolumen sind auch Änderungen der Empfindlichkeit beim Einbau von Immobilisaten denkbar.

Dynamisches Verhalten

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, wird die Zeitkonstante des Kalorimeters durch die Verwendung einer Glasmembran nur wenig beeinflusst. Auch die Stärke der verwendeten Glasmembran (Tabelle 8), scheint trotz der damit verbundenen unterschiedlichen Werte für die Wärmekapazität der Probe c_p , keinen Einfluss auf die Zeitkonstante des IC-Kalorimeters zu besitzen.

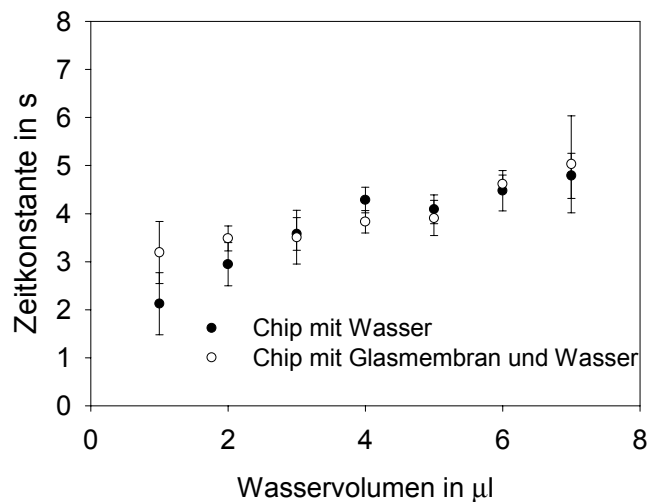


Abbildung 41: Zeitkonstanten bei Verwendung einer makroporösen Glasmembran (Stärke 0,33 mm) mit unterschiedlichen Volumina Wasser im Vergleich zu Zeitkonstanten ohne Trägermaterial

Wärmekapazität in J/K	Zeitkonstante in 1/s	
0,0293	4,84±0,53	7 µl Wasser
0,033	4,8±1,23	7 µl Wasser, Membran 0,21 mm
0,0345	4,54±1,98	7 µl Wasser, Membran 0,33 mm
0,0347	4,41±0,98	7 µl Wasser, Membran 0,54 mm
0,0396	4,58±1,19	7 µl Wasser, Membran 0,8 mm

Tabelle 8: Zeitkonstante in Abhängigkeit von der Wärmekapazität der eingebauten Probe, Berechnung von c_p aus der Masse der Membranen, spezifische Wärmekapazität des Glases $800 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

Empfindlichkeit

In dem für die Messung interessanten Bereich des Probenvolumens (6-8 µl) wird, wie Abbildung 42 zeigt, auch die Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters nicht verändert.

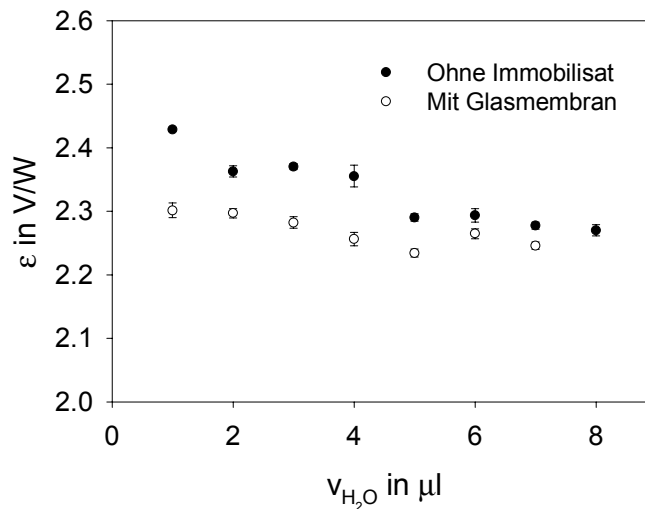


Abbildung 42: Vergleich der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters bei Einbau einer 0,33 mm starken Glasmembran gegenüber dem Verhalten ohne Immobilisat für unterschiedliche Wassermengen

Entscheidender für die Einschätzung der Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters ist der Vergleich des gemessenen Wärmeumsatzes für eine chemische Reaktion, die ohne und mit dem Immobilisat ablaufen kann. Für diesen Test wurde die ausgewählte Modellreaktion, die Wasserstoffperoxidzersetzung durch Katalase, verwendet. Verglichen wurde der gesamte Wärmeumsatz der Reaktion (Integral der Wärmeleistungskurve) für

drei verschiedene Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, weichen die Wärmeumsätze für die auf einer Glasmembran immobilisierte Katalase nur gering von denen ab, die bei Verwendung nativer Katalase erhalten werden. Die Empfindlichkeit des IC-Kalorimeters wird durch die Trägermaterialien nicht wesentlich beeinflusst.

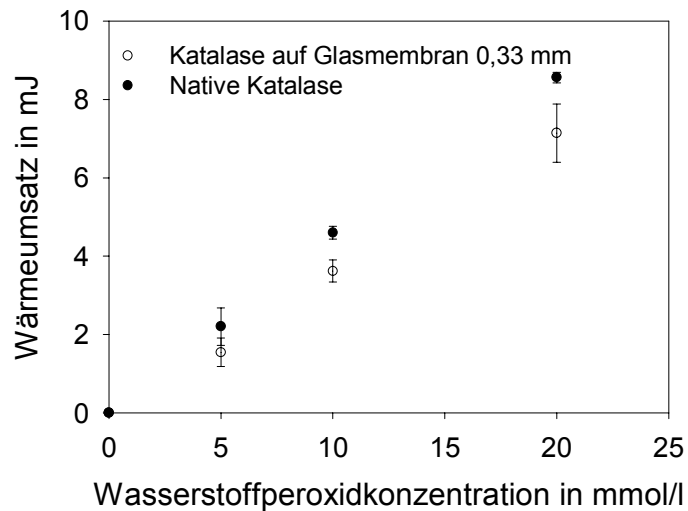


Abbildung 43: Abhängigkeit des registrierten Wärmeumsatzes von der Wasserstoffperoxidkonzentration für Katalase immobilisiert auf makroporöser Glasmembran gegenüber nativer Katalase

Mögliche Veränderung der Parameter des IC-Kalorimeters bei der Verwendung anderer Trägermaterialien sollten hauptsächlich durch die veränderte thermische Anbindung zwischen Chip und Tropfen verursacht werden. Um dies zu überprüfen, wurden zusätzlich zu den Glasmembranen Filterpapier und Parafilm, jeweils als Proben von 4 mm Durchmesser zur Messung verwendet. Während Papier dazu führt, dass der Wassertropfen gleichmäßig auf der aktiven Fläche des Sensorchips verteilt wird, schließt Parafilm den direkten Kontakt zwischen Chip und Tropfen aus und sorgt durch seine hydrophoben Eigenschaften für die Ausbildung eines sehr hohen Tropfens mit einer geringen Kontaktfläche. Wie in Tabelle 9 zu sehen, werden die Parameter des IC-Kalorimeters in der erwarteten Art und Weise von den verwendeten Materialien beeinflusst.

Während die Empfindlichkeit des Kalorimeters unabhängig vom verwendeten Träger gleich bleibt, unterliegt die Zeitkonstante einem deutlichen Einfluss des Trägermaterials. Wird durch den Träger eine verbesserte Anbindung des Wasser-

tropfens an den Chip erreicht (Papier), so resultiert eine geringere Zeitkonstante. Wird die Anbindung verschlechtert (Parafilm), vergrößert sich die Zeitkonstante deutlich. Bei der Untersuchung von Enzymimmobilisaten mit dem IC-Kalorimeter muss daher ein guter thermischer Kontakt zwischen Immobilisat und Sensorchip gewährleistet sein.

Einbau	Zeitkonstante in s	Empfindlichkeit in V/W
7 µl Wasser	4,8 ± 0,53	2,27 ± 0,009
Glasmembran 0,33 mm +7 µl Wasser	5,3 ± 0,92	2,24 ± 0,005
Papier + 7 µl Wasser	3,9 ± 0,24	2,24 ± 0,04
Parafilm + 7 µl Wasser	8,85 ± 2,45	2,29 ± 0,012

Tabelle 9: Veränderung der Parameter des IC-Kalorimeters bei unterschiedlichen Einbauten, elektrische Kalibrierung

6.4.3 Aktivitätsbestimmung von immobilisierten Enzymen mit dem IC-Kalorimeter

Um die Eignung des IC-Kalorimeters zur Bestimmung der Aktivität immobilisierter Enzyme zu zeigen, wurde auf Papier quervernetzte Katalase (4.2.4) benutzt.

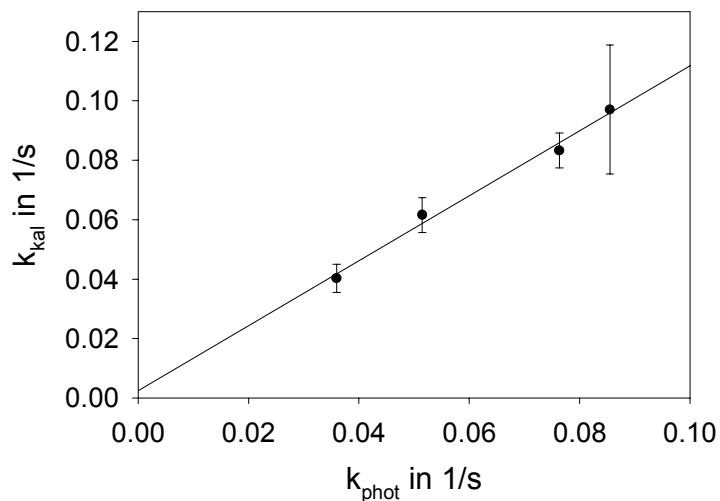


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen photometrisch und kalorimetrisch ermittelter Geschwindigkeitskonstante für immobilisierte Katalase

Die photometrische Bestimmung der Katalaseaktivität auf den Immobilisaten erfolgte mit der im Anhang beschriebenen Methode (A.1).

Wie Abbildung 44 zeigt, besteht nicht nur ein linearer Zusammenhang zwischen kalorimetrisch und photometrisch ermittelter Geschwindigkeitskonstante, die mit beiden Methoden gemessenen Geschwindigkeitskonstanten stimmen auch im Zahlenwert gut überein. Das IC-Kalorimeter kann damit zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität flächiger Enzymimmobilisate benutzt werden.

6.4.4 Ergebnisse der Untersuchung einzelner Immobilisattypen

Makroporöse Glasmembranen

Untersucht wurde der Einfluss von Glasmembranstärke und Konzentration der angebotenen Enzymlösung auf die an den Membranen gebundene Katalasemenge.

Die Bestimmung der gebundenen Enzymmenge erfolgte durch Aufstellen der Enzymbilanz. Dazu wurde mit Hilfe der Methode nach BERGMAYER [44], (A.1) die Restaktivität der Katalase in der Lösung bestimmt.

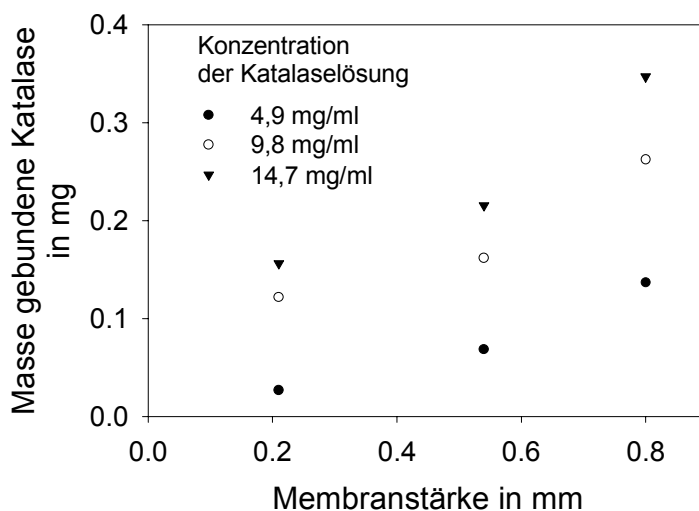


Abbildung 45: Abhängigkeit der Masse gebundener Katalase von der Stärke der verwendeten makroporösen Glasmembran und der Konzentration der eingesetzten Katalaselösung

Anhand der bekannten spezifischen Aktivität des für die Immobilisierung eingesetzten Enzyms ließ sich so die Menge der gebundenen Katalase ermitteln.

Wie in Abbildung 45 zu sehen ist, besteht eine deutliche Abhängigkeit der gebundenen Enzymmenge von der Membranstärke und der Konzentration der verwendeten Katalaselösung. Die Abhängigkeit von der Stärke der Membranen kann als Beweis

dafür gewertet werden, dass die Immobilisierung des Enzyms nicht nur an der Oberfläche, sondern im gesamten Volumen der Membran erfolgt.

Entscheidend für die Anwendung ist die katalytische Aktivität eines Enzym-Träger-Komplexes, diese Aktivität kann durch die kalorimetrische Messung bestimmt werden.

Das Ergebnis der kalorimetrischen Untersuchung der Aktivität der Enzym-Membran-Immobilisate ist in Abbildung 46 dargestellt.

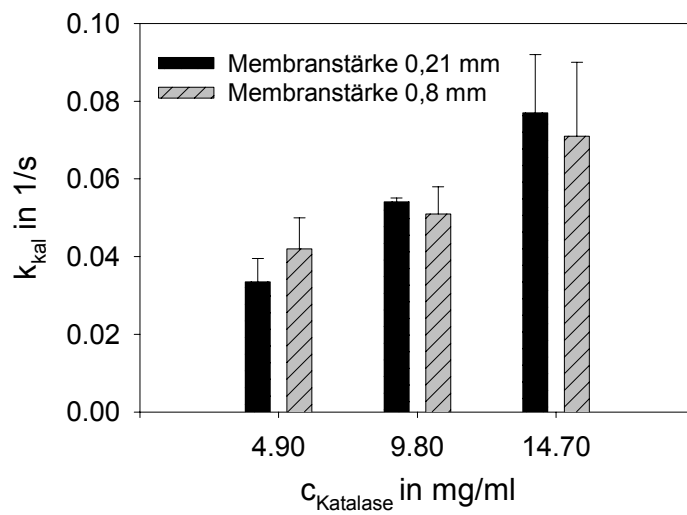


Abbildung 46: Makroporöse Glasmembranen, katalytische Aktivität in Abhängigkeit von angebotener Katalasekonzentration und Membranstärke

Es kann keine Abhängigkeit von der Stärke der Membran festgestellt werden, obwohl, wie in Abbildung 45 gezeigt, die in den Membranen gebundene Katalasemenge mit zunehmender Membranstärke steigt. Lediglich eine Abhängigkeit der kalorimetrisch ermittelten Geschwindigkeitskonstante von der Konzentration der zur Immobilisierung verwendeten Katalaselösung kann festgestellt werden. Dieses Verhalten (Unabhängigkeit der Aktivität von der Membranstärke, aber Abhängigkeit von der Konzentration der Immobilisierungslösung) kann nur dahingehend interpretiert werden, dass offensichtlich die Wasserstoffperoxidlösung beim Aufsetzen des Tropfens nicht ins Innere der Membranen eindringt. Die Reaktion wird vermutlich nur von dem unmittelbar an der Oberfläche der Membran gebundenen Teil der Enzymmoleküle katalysiert. Das im Innern der Membran gebundene Enzym ist demzufolge an der Reaktion nicht beteiligt. Bei höheren Konzentrationen der zur Immobilisierung eingesetzten Katalaselösung ist mit einer Sättigung der Membranoberfläche und damit

Erreichen eines Maximalwertes für die Aktivität zu rechnen, der bei den verwendeten Konzentrationen (maximal 14,7 mg/ml) noch nicht erreicht wurde.

Die Immobilisate auf der Grundlage makroporöser Glasmembranen zeigen gegenüber anderen Immobilisaten eine bemerkenswerte mechanische Festigkeit und lassen sich sehr gut handhaben. Solche Immobilisate auf der Grundlage makroporöser Glasmembranen besitzen daher ein interessantes Potential als aktive Komponente in Biosensoren. Für diesen Einsatz ist die *Stabilität* der Immobilisate, d.h. der Erhalt der Aktivität über einen längeren Zeitraum eine entscheidende Größe. Daher wurde die Aktivität einer Glasmembran über einen Zeitraum von ca. 200 Tagen untersucht. Zwischen den einzelnen Messungen, die als Mehrfachbestimmungen ausgeführt wurden, erfolgte die Lagerung der Membran bei 4°C im Puffermedium.

Wie die Darstellung der Aktivität über diesen Zeitraum zeigt (Abbildung 47), bleibt die Aktivität bis etwa 50 Tage nach der Immobilisierung relativ konstant, danach kommt es zu einer gewissen Abnahme der katalytischen Wirksamkeit.

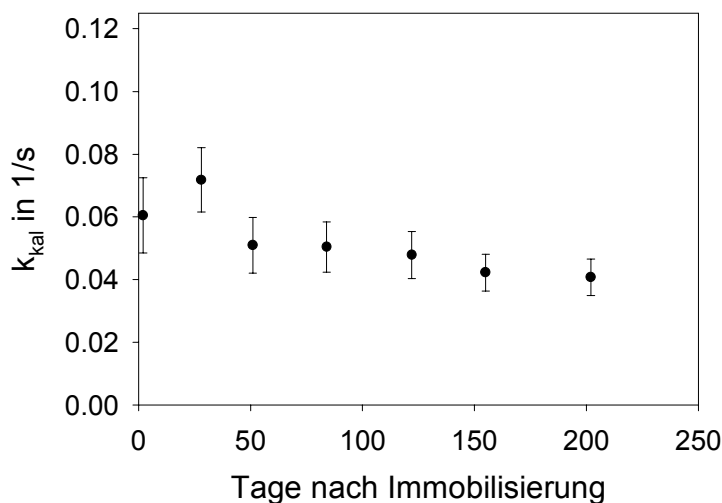


Abbildung 47: Stabilität der katalytischen Aktivität des Immobilisats über einen Zeitraum von 200 Tagen

Eine weitere interessante Frage im Zusammenhang mit der Eignung der makroporösen Glasmembranen für den Einsatz in Biosensoren ist die Möglichkeit die Träger zu *regenerieren*, d.h., das gebundene Enzym und die zur Immobilisierung dienenden funktionellen Gruppen vollständig zu entfernen und eine erneute Immobilisierung durchzuführen.

Aufgrund der chemischen Beständigkeit der Glasmatrix kann die Entfernung des Enzyms durch einstündiges Behandeln mit 30 % H_2O_2 bei Siedetemperatur erfolgen. Die Glasmembran verlor dabei die bei der Glutardialdehydaktivierung (4.2.1) aufgetretene rote Färbung völlig. Eine katalytische Aktivität war nicht mehr nachweisbar. Die gereinigte Membran wurde erneut als Träger zur Immobilisierung von Katalase verwendet. Erster Schritt der Immobilisierung war die erneute Silanisierung des Trägers mit Aminopropyltriethoxysilan. Es konnte bis hin zum Farbwechsel bei der Aktivierung mit Glutardialdehydlösung keinerlei Unterschied im Immobilisierungsverhalten festgestellt werden. Zur Immobilisierung wurde eine Katalaselösung mit einem Enzymgehalt von 9,8 mg/ml eingesetzt. Abbildung 48 zeigt das Ergebnis der kalorimetrischen Aktivitätsbestimmung an den verwendeten Membranen für die erste und die zweite Immobilisierung.

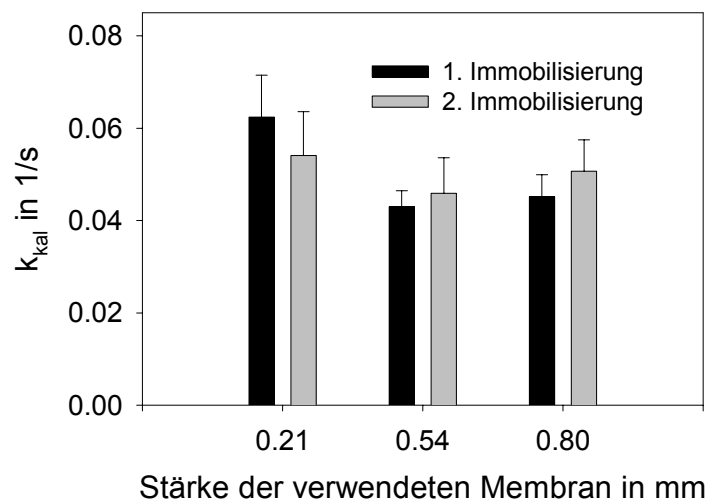


Abbildung 48: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten für 3 makroporöse Glasmembranen mit Regenerierung des Trägers und erneuter Immobilisierung

Deutlich wird, dass bei der Immobilisierung auf die regenerierten Membranen Immobilisate von gleicher Aktivität wie bei der ersten Immobilisierung erhalten werden. Wie bereits in Abbildung 46 (andere Immobilisatcharge), ist auch hier keine Abhängigkeit von der Stärke der verwendeten Membranen zu erkennen. Eine einmalige Regenerierung scheint die Eigenschaften der Membran danach nicht wesentlich zu verändern. Allerdings ist bei einer größeren Zahl von Regenerierungszyklen eventuell eine zunehmende Verengung der Poren des Trägers durch die wiederholte Silanisierung zu erwarten.

Die untersuchten makroporösen Glasmembranen stellen für sensorische Anwendungen hochinteressante Trägersysteme dar. Auf Grund der oben beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften und der sehr guten Handhabbarkeit sollten die beschriebenen Ergebnisse als Ausgangspunkt für weitere systematische Untersuchungen dienen.

Sol-Gel-Immobilisate

Die Untersuchungen an Sol-Gel-Immobilisaten dienen der Klärung der bei den Arbeiten mit dem Enzymthermistor offen gebliebenen Frage, ob die bei der Verwendung unterschiedlicher Additive beobachteten Unterschiede in der Aktivität der Immobilisate tatsächlich durch eine unterschiedliche Aktivität der eingeschlossenen Enzymmoleküle verursacht werden. Denkbar ist auch, dass der beobachtete Aktivitätsunterschied durch die Bindung unterschiedlicher Enzymmengen hervorgerufen wird, da durch den Einfluss des Additivs auf die Viskosität des Sols [42] unterschiedlich starke Gelschichten entstehen können.

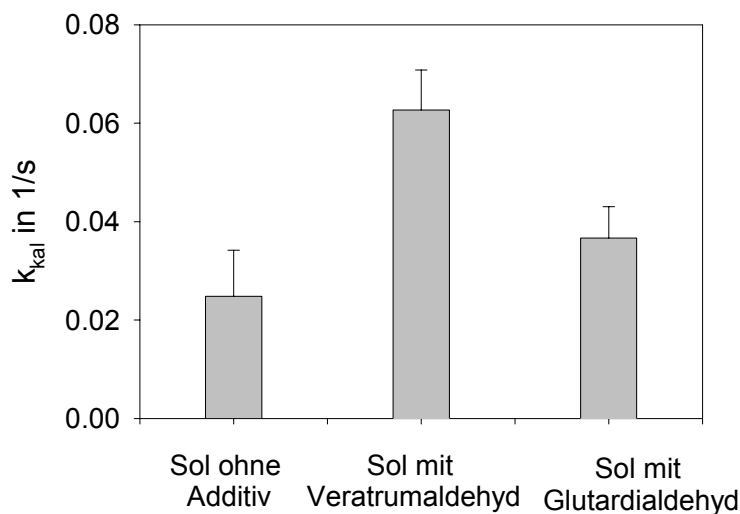


Abbildung 49: Einfluss des verwendeten Additivs auf die Aktivität von Sol-Gel-Immobilisaten auf Filterpapier

Abbildung 49 zeigt, dass die beobachteten Aktivitätsunterschiede tatsächlich auf den Einfluss der Additive zurückgeführt werden können.

7 Zusammenfassung

Immobilisierte Enzyme spielen eine immer größere Rolle als sensitive Elemente in Biosensoren oder als effiziente Katalysatoren in technischen Prozessen. Zur Bindung von Enzymen an unterschiedlichste Trägermaterialien wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt. Die Aktivität und Stabilität der entstehenden Immobilisate sind eines der Hauptkriterien bei der Auswahl der Immobilisierungsmethode für eine bestimmte Anwendung. Allerdings können die für native Enzyme entwickelten Verfahren nur eingeschränkt zur Untersuchung der Aktivität immobilisierter Enzyme angewandt werden. Das kalorimetrische Messprinzip bietet durch seine Universalität eine Möglichkeit, diese Lücke zu schließen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, kalorimetrische Methoden zur Bestimmung der Aktivität von Enzymimmobilisaten zu entwickeln.

Für die Untersuchung sphärischer Immobilisate wurde der Enzymthermistor, ein isoperiboles Strömungskalorimeter eingesetzt. Versuche zur Kalibrierung dieses Strömungskalorimeters zeigten, dass, entgegen den Angaben in der Literatur, ein signifikanter Wärmeverlust über die Wände der Messkartusche stattfindet. Unter Berücksichtigung der Wärmeableitung wurde ein Modell entwickelt, mit dem die Temperaturänderung am Ende der Kartusche in Abhängigkeit von den Parametern der Reaktion und des Kalorimeters berechnet werden kann. Mit Hilfe eines Teilmodells für eine nach dem Geschwindigkeitsgesetz von MICHAELIS und MENTEN verlaufende enzymatische Reaktion kann die Verteilung von Substrat- und Produktkonzentration sowie die Verteilung der Wärmeleistung entlang der Längsachse der Kartusche unter steady-state-Bedingungen berechnet werden. Aus dem Wärmeleistungsprofil wird mit dem zweiten Teilmodell, welches das Strömungskalorimeter beschreibt, das Temperaturprofil in der Kartusche erhalten.

Durch lineare Regression ist es mit Hilfe der Modelle möglich, die kinetischen Parameter der Reaktion aus Messungen der Temperaturänderungen als Funktion der Substratkonzentration bzw. Strömungsgeschwindigkeit zu bestimmen. Durch Fehlersimulation konnte gezeigt werden, dass für die gewählte Modellreaktion die Messung der Temperaturänderung als Funktion der Substratkonzentration zuverlässigere Werte für die kinetischen Parameter liefert, als die Messung als Funktion

der Strömungsgeschwindigkeit. Durch Simulation des Einflusses der Strömungsgeschwindigkeit auf die Genauigkeit der bestimmten kinetischen Parameter wird deutlich, dass für die Untersuchung der Reaktion ein „Fenster“ in den Reaktionsbedingungen existiert, das einerseits (bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten) durch ein starkes Anwachsen des Fehlers für die bestimmten kinetischen Parameter und andererseits durch Probleme bei der Realisierung größerer Strömungsgeschwindigkeiten begrenzt wird.

Zur Überprüfung der Modellkombination wurde das System Invertase/Saccharose verwendet. Durch photometrische Bestimmung des Substratumsatzes in der Kartusche konnten die aus der Messung der Temperaturänderung als Funktion der Substratkonzentration ermittelten kinetischen Parameter bestätigt werden.

Das beschriebene Modell wurde zur Untersuchung des Immobilisierungsverhaltens neuer Trägermaterialien aus teilkristallisierten porösen Gläsern angewandt.

Bei der Entwicklung von Immobilisierungsmethoden wird häufig eine qualitative Aussage benötigt, ob eine bestimmte Veränderung des Immobilisierungsprotokolls zu einer Veränderung der Aktivität führt. Zur Beantwortung dieser Fragen ist die Messung unter steady-state-Bedingungen und Berechnung kinetischer Parameter mit dem beschriebenen Modell aufgrund des großen Zeitbedarfes ungünstig.

Daher wurde geprüft, wie durch Messungen mit Impulsen der Substratlösung Aussagen über die Aktivität der Immobilisate gewonnen werden können.

Wie Untersuchungen mit Modellimmobilisaten zeigen, kann durch Messung mit Substratimpulsen die Aktivität gemessen werden.

Am Beispiel der Immobilisierung von Enzymen in modifizierten Sol-Gel-Schichten wurde der Einsatz der Impulsmethode für die Optimierung von Immobilisierungsvorschriften gezeigt. Zur Herstellung von Gelschichten auf porösen Trägern wurden sowohl mit verschiedenen organischen Additiven modifizierte Sol aus Tetraethoxysilan und als auch Sole aus unterschiedlich substituierten Alkyltriethoxysilanen eingesetzt. Die mit additivmodifizierten Tetraethoxysilan-Solen hergestellten Immobilisate zeigen gegenüber solchen aus unmodifizierten Solen eine deutlich erhöhte Aktivität. Dabei ist ein signifikanter Einfluss der Art und der Konzentration des Additivs zu erkennen. Eine deutliche Verbesserung der Aktivität der Immobilisate wird ebenfalls durch die Verwendung von Alkyltriethoxysilanen als Precursor erreicht. Diese Precursoren können sowohl im Gemisch mit Tetraethoxysilan, als auch rein zur Herstellung der Sol-

Gel-Systeme eingesetzt werden. Aus diesen Precursoren entstehen Gele, in denen das anorganische Si-O-Netzwerk kovalent gebundene funktionelle Gruppen enthält, an denen weitere Reaktionen stattfinden können. Immobilisate, die aus diesen Solen hergestellt werden, besitzen eine hohe und bemerkenswert stabile Aktivität.

Die Ergebnisse belegen die Vorteile der Impulsmethode zur qualitativen Charakterisierung von Immobilisaten hinsichtlich Aktivität, Langzeitstabilität, und Einfluss der Herstellungsbedingungen.

Das IC-Kalorimeter wurde erstmals zur Untersuchung immobilisierter Enzyme eingesetzt. Um zuverlässige kinetische Aussagen über die Enzymimmobilisate zu erzielen, wurde das IC-Kalorimeter mittels chemischer und elektrischer Kalibrierung hinsichtlich Empfindlichkeit und dynamischen Verhaltens charakterisiert. Sowohl die Empfindlichkeit, als auch das dynamische Verhalten des IC-Kalorimeters, ausgedrückt durch seine Zeitkonstante, werden signifikant von dem im Kalorimeter eingesetzten Wasservolumen beeinflusst.

Als Modellenzym für die Immobilisierungen wurde Katalase verwendet, die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion läuft nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung ab. Daher eignet sich von den in früheren Arbeiten vorgeschlagenen Algorithmen zur kinetischen Auswertung der Messkurven die Modellierung der Wärmeleistungskurve nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion.

Durch elektrische Kalibrierung wurde gezeigt, dass die eingesetzten Immobilisate keinen signifikanten Einfluss auf die Empfindlichkeit und das dynamische Verhalten des IC-Kalorimeters haben.

Es konnte gezeigt werden, dass die kalorimetrisch bestimmte Geschwindigkeitskonstante für immobilisierte Enzyme mit der photometrisch ermittelten übereinstimmt; damit ist die kinetische Untersuchung von Enzymimmobilisaten mit dem IC-Kalorimeter möglich.

Als besonders interessante Trägersysteme zur Herstellung von Immobilisaten erwiesen sich Membranen aus makroporösem Glas. Der Vergleich der kalorimetrisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für solche Immobilisate mit der Menge des immobilisierten Enzyms legt den Schluß nahe, dass nur das an der Oberfläche des Trägers immobilisierte Enzym zur Aktivität des Immobilisats beiträgt.

Die Ergebnisse zeigen die Anwendbarkeit des IC-Kalorimeters zur Untersuchung von Enzymimmobilisaten im Batch-Modus. Für sensorische Anwendungen ist der Einsatz

des miniaturisierten Kalorimeters im Flow-Modus äußerst interessant. In diesem Fall ist der Einsatz von Immobilisaten gegenüber gelösten Enzymen besonders vorteilhaft. Vor allem die verwendeten makroporösen Glasmembranen besitzen interessante Eigenschaften, die weitere Untersuchungen erfordern, um sie für den Einsatz in Durchflusssensoren zu optimieren.

A. Anhang

A.1. Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Invertase

Bestimmung der Aktivität nach [46]

Lösungen:

- I. 0,05 molarer Acetatpuffer, pH=4,6; (Michaelis-Puffer)
 - (0,1 l 1M Essigsäure und 0,05l 1M NaOH mit dest. Wasser zu 1 l auffüllen)
- II. 0,1 molarer Natriumphosphatpuffer pH=7,
 - 8,73 g Na_2HPO_4 und 4,62 g NaH_2PO_4 mit dest. Wasser zu 1 l auffüllen
- III. 1 molarer Tris-Puffer, pH=8,8
 - 121,5 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in dest. H_2O lösen
 - Lösung mit 1M HCl auf pH=8,8 einstellen
 - Mit dest. H_2O zu 1 l auffüllen
- IV. Saccharose-Lösung 0,15 mol/l in
 - 51 g Saccharose zu 1 l in Lösung I lösen
- V. Peroxidase-Stammlösung
 - 2 mg Peroxidase in 2 ml Lösung II lösen
- VI. Farbstofflösung
 - 1,67 mg Glucose-Oxidase
 - 20 mg 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
 - 0,16 ml Lösung V
 - mit Lösung II zu 100 ml lösen
- VII. Glucose-Stammlösung (0,55 mol/l, entsprechend 100 $\mu\text{g/ml}$)
 - 10 g Glucose in dest. H_2O zu 100 ml lösen

- Herstellung von Kalibrierlösungen durch Verdünnung dieser Stammlösung, Konzentration der Kalibrierlösungen zwischen 0,1 und 20 µg Glucose je ml

Vorgehen:

1. Aufnahme einer Glucose-Kalibrierreihe

- 0,2 ml der Glucose-Stammlösung in Küvette pipettieren
- 2,4 ml Lösung VI zupipettieren
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Extinktion bei 405 nm messen

2. Bestimmung der Invertase-Aktivität

Vorgehen:

- 20 µl Enzymlösung und 0,98 ml Lösung IV in Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,0 ml) pipettieren
- Inkubation je 30, 60, 120, 180, 240, 300 s bei Raumtemperatur
- Stop der Reaktion durch Zugabe von 0,125 ml Lösung III und 2 min Erhitzen auf 100°C (Wasserbad), abkühlen
- 0,2 ml der Lösung in Küvette pipettieren
- 2,4 ml Lösung VI zupipettieren
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Extinktion bei 405 nm messen,
- Bestimmung der Glucosekonzentration durch Vergleich mit Kalibrierreihe
- Blindprobe mit 20 µl Acetatpuffer ansetzen, Inkubation und Abstoppen wie mit Enzym

Berechnung:

$$a = \frac{c_{\text{Gl}} \cdot 1,125 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml} \cdot 180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot t} \quad (\text{A.1})$$

a Aktivität der Enzymlösung (in U/ml)

c_{Gl} Glucosekonzentration im µg/ml

Katalase

Bestimmung der Aktivität nach [44]

Lösungen:

I. Phosphatpuffer, pH = 7

a) 6,81 g KH_2PO_4 zu 1 l in dest. Wasser lösen

b) 8,90 g Na_2HPO_4 zu 1 l in dest. Wasser lösen

Lösungen a und b im Verhältnis 1:1,55 mischen

II. Wasserstoffperoxid (30 mmol/l)

0,34 ml 30% Wasserstoffperoxid mit Phosphatpuffer auf 100 ml auffüllen,

Lösung täglich frisch ansetzen

Pipettierschema:

- 1 ml Katalase-Lösung in die Küvette pipettieren
- Küvette in Photometer stellen
- Start der Reaktion durch Zugabe von 1 ml Lösung II
- Abnahme der Extinktion bei 240 nm über 30 s mit Kinetik-Software des Photometers verfolgen

Berechnung der Katalase-Aktivität nach:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{A_1}{A_2} \quad (\text{A.2})$$

A_1 Extinktion zu Beginn der Reaktion

A_2 Extinktion zum Zeitpunkt t

Die Aktivität in internationalen Einheiten U kann, bezogen auf eine definierte Konzentration dann berechnet werden nach:

$$a = k \cdot 60 \cdot v_p \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \quad (\text{A.3})$$

mit:

a Aktivität

v_p Volumen der Probe

Glucose-Oxidase

Bestimmung der Aktivität nach [154], [44]

Lösungen:

- I. 0,1 molarer Natriumphosphatpuffer pH=7
 - 8,73 g Na_2HPO_4 und 4,62 g NaH_2PO_4 mit dest. Wasser zu 1l auffüllen
- II. 33 mg o-Dianisidinhydrochlorid in 500 ml Lösung I lösen, filtrieren, Lösung dunkel und kühl aufbewahren, Haltbarkeit 30 Tage, unmittelbar vor Verwendung 15 min Sauerstoff durch die Lösung leiten
- III. Glucoselösung
 - 1 g D-Glucose zu 10 in ml dest. Wasser lösen
- IV. Peroxidase-Lösung
 - 10 mg Peroxidase in 5 ml dest. Wasser lösen, Lösung kühl und dunkel aufbewahren, Haltbarkeit 24 h

Pipettierschema:

- 2,5 ml Lösung II
- 0,5 ml Lösung III
- 0,01 ml Lösung IV
- 0,02 ml Enzymlösung
- Extinktionszunahme bei 436 nm über 210 s mit Kinetik-Software des Photometers verfolgen

Berechnung:

$$a = \frac{\Delta A \cdot v_K}{\epsilon_M \cdot d \cdot v_P} \quad (\text{A.4})$$

a Aktivität in U/ml

ΔA Extinktionsänderung pro min

v_K Volumen in der Küvette (3,03 ml)

f Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

- d Schichtdicke der Küvette
 ϵ_M mikromolarer Extinktionskoeffizient in cm^2/mol
 v_P Volumen der Enzymlösung in ml

Immobilisierte Katalase

Photometrische Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Katalase (flächige Immobilisate)

Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration modifiziert nach [155] und [156]

Lösungen:

- III. Tris-Puffer, pH = 7,2
- Stammlösung 24,3 g Tris gelöst in 1 l dest. Wasser,
 - 250 ml Tris-Stammlösung und 442 ml 0,1 mol HCl mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen
- IV. Peroxidase-Lösung,
- 50 U/mg in Tris-Puffer, pH = 7
 - 3 Tage haltbar
- V. 4-Aminoantipyrin-Lösung, 15 mmol/l
- 0,304 g 4-Aminoantipyrin in 100 ml dest. Wasser lösen,
- VI. 0,5% N,N-Dimethylanilin-Lösung
- 0,56 ml N,N-Dimethylanilin in 100 ml dest. Wasser lösen
- VII. Farbstofflösung,
- 6 ml Lösung I
 - ml Lösung II
 - ml Lösung III
 - 6 ml Lösung IV
 - 12 ml dest. Wasser
 - Das Farbreagenz ist einer dunklen Flasche bis zu drei Tagen im Kühlschrank haltbar, bei auftretender Violett-färbung verwerfen.
- VIII. Wasserstoffperoxid (20 mmol/l)
- 0,224 ml 30% Wasserstoffperoxid mit Phosphatpuffer auf 100 ml auffüllen, Lösung täglich frisch ansetzen

Pipettierschema:

- Immobilisatplättchen in 3 ml-Küvette legen
- 4,4 µl Wasserstoffperoxid-Lösung auf das Plättchen pipettieren
- nach 30 s Reaktion mit 1 ml Farbstofflösung abstoppen
- 2 ml dest. Wasser zufügen,
- 2 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Extinktion der Lösung bei 564 nm messen

Berechnung von k, analog (A.2) nach:

$$k' = \frac{1}{t} \ln \frac{A_1}{A_2} \quad (\text{A.5})$$

Dabei wird für die Extinktion A die Extinktion der Farbstofflösung verwendet. Die Proportionalität zwischen der Extinktion der Farbstofflösung und der Extinktion bei 240 nm der Wasserstoffperoxidlösung wurde nachgewiesen

A.2. Konzentrationsbestimmungen

Proteinbestimmung nach BRADFORD [142], [143]

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD wurde eine abgewandelte Form der Originalvorschrift angewandt. Wichtig bei der Proteinbestimmung ist, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der Protein beachtet werden. die Herstellung der Kalibrierreihe sollte daher mit dem zu bestimmenden Protein aufgenommen werden.

Farbreagenz:

- 100 mg Coomassie-Blau G in 100 ml 85 % Phosphorsäure und 50 ml abs. Ethanol unter Lichtausschluss lösen, nach vollständigem Lösen mit dest. Wasser zu 1 l auffüllen,

- Lösung durch Faltenfilter filtrieren
- unter Lichtabschluss aufbewahren, die Lösung ist mehrere Wochen haltbar
-

Pipettierschema:

- 0,5 ml Proteinlösung
- 2,5 ml Farbstoffreaktion
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Absorption bei 595 nm messen

Die Proteinkonzentration wird durch Vergleich mit einer unter identischen Bedingungen gemessenen Kalibriergerade bestimmt.

Wasserstoffperoxid

Bestimmung durch Extinktionsmessung bei 240 nm

Die Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration erfolgt durch Vergleich mit einer unter identischen Bedingungen gemessenen Kalibriergerade. Die Konzentration der Kalibrierlösungen wurde durch manganometrische Titration [157] bestimmt.

Glucose

Bestimmung mit Glucose-Oxidase/Peroxidase/APTS

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte wie bei der Bestimmung der Invertase-Aktivität beschrieben. Anstelle der teilweise umgesetzten Saccharose-Lösung werden 0,2ml der zu untersuchenden Lösung eingesetzt.

Glucose/Fructose (Bestimmung hydrolysierter Saccharose)

Bestimmung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure, nach [140]

Lösungen:

- 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure in 400 ml 1 M NaOH in 1 l- Kolben unter Rühren lösen (über Nacht)
- 300 g Kaliumnatriumtartrat zugeben
- Lösung auf Raumtemperatur bringen, mit dest. Wasser zu 1 l auffüllen
- Lösung in dunkler Glasflasche mehrere Woche haltbar

Vorgehen:

- in 100 ml-Kolben (bei geringeren Konzentrationen entsprechend geringere Größe) 2 ml 1 M NaOH vorlegen
- 1 ml Probenlösung zupipettieren (Konzentrationsbereich bis 0,2 mol/l reduzierende Zucker)
- ml Farbstofflösung und 2 ml dest. Wasser zugeben
- Kolben genau 5 min im Wasserbad auf 100°C erhitzen
- Unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abkühlen, mit dest. Wasser auffüllen
- Absorption bei 530 nm messen
- Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Kalibriergerade

A.3. Herleitung des Zusammenhanges für die Temperaturänderung im Enzymthermistor

Es gilt die Grundgleichung der Kalorimetrie:

$$q = m \cdot C_p \cdot \Delta T \quad (\text{A.6})$$

Die durch eine Reaktion freigesetzte Wärmemenge ergibt sich nach:

$$q = -\Delta_R H \cdot n \quad (\text{A.7})$$

aus der umgesetzten Stoffmenge n und der molaren Reaktionsenthalpie.

Kombinationen der Gleichungen (A.6) und (A.7) ergibt:

$$\frac{m \cdot C_p \cdot \Delta T}{-\Delta_R H} = n \quad (\text{A.8})$$

Die zeitliche Änderung der umgesetzten Stoffmenge ist dann:

$$\frac{m \cdot C_p \cdot \Delta T}{-\Delta_R H \cdot dt} = \frac{dn}{dt} \quad (\text{A.9})$$

Durch Einführen des Kartuschenvolumens v_K wird die Stoffmenge durch die Konzentration des Produktes ersetzt:

$$\frac{m \cdot C_p \cdot \Delta T}{-\Delta_R H \cdot v_K \cdot dt} = \frac{dc}{dt} \quad (\text{A.10})$$

Durch Ersetzen von m mit $m = v \cdot \rho$ und Einführung der Strömungsgeschwindigkeit \dot{v}

als $\dot{v} = \frac{v}{dt}$ ergibt sich:

$$\frac{\dot{v} \cdot \rho \cdot C_p \cdot \Delta T}{-\Delta_R H \cdot v_K} = \frac{dc}{dt} \quad (\text{A.11})$$

Gleichung (A.11) wird umgestellt nach ΔT :

$$\Delta T = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{-\Delta_R H \cdot v_K}{\dot{v} \cdot C_p \cdot \rho} \quad (\text{A.12})$$

Für $\frac{dc}{dt}$ kann das Zeitgesetz der untersuchten Reaktion in Gleichung (A.12) eingesetzt

werden. Wird dazu die Michaelis-Menten-Gleichung in der Form:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{k_2 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (\text{A.13})$$

verwendet, ergibt sich die Temperaturänderung in der Kartusche nach:

$$\Delta T = \frac{-\Delta_R H \cdot c_E \cdot v_K}{\dot{v} \cdot \rho \cdot C_p} \frac{k_2 \cdot c_S}{(c_S + K_M)} \quad (\text{A.14})$$

als Funktion der kinetischen Konstanten der Reaktion.

Literatur

- [1] Lehninger, A. L.; *Biochemie*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, 1987
- [2] Suelter, C. H.; *Experimentelle Enzymologie*, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart-New-York, 1990
- [3] Schellenberger, A.; *Enzymkatalyse*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1989
- [4] Hartmeier, W.; *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York-Tokyo, 1986
- [5] Koudelka-Hep, M.; de Rooij, N. F.; Strike, D.J.; *Immobilization of Enzymes on Microelectrodes Using Chemical Crosslinking*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 83 – 87
- [6] Bataillard, P.; Steffgen, E.; Haemmerli, S.; Manz, A.; Widmer, H.M.; *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.8, Nr. 2, 1993
- [7] Rüger, P.; *Amperometrische Enzymsensoren auf der Basis der Dickschicht-technologie*, Dissertation, Braunschweig, 1992
- [8] Ulber, R.; Köneke, R.; Sosnitza, P.; Pietzsch, H.-R.; *Neue Immobilisierungsmethoden für Glycoproteine und deren Anwendung für FIA-Biosensoren*, 8. Heiligenstädter Kolloquium, Tagungsband, Heiligenstadt, 1997, 244-251
- [9] de Alteris, E.; Pranscandola, P.; Pecorella, M.A.; Scardi, V.; *Biotechnology Techniques* Vol. 2, 1988, 205-210
- [10] Nelson, J. M.; Griffin, E. G.; *J. Am. Chem. Soc.*; 38, 1916, 1109-1115, zitiert in [4]
- [11] Ulbrich-Hofmann, R.; Damerau, W.; Mansfeld, J.; *Wie mobil sind immobilisierte Enzyme? - Möglichkeiten und Grenzen trägerfixierter Biokatalysatoren*, 8. Heiligenstädter Kolloquium, Tagungsband, Heiligenstadt, 1997, 232-238
- [12] Gerhartz, W. (Hrsg.); *Enzymes in Industrie*, VCH, Weinheim Basel, 1990
- [13] Beh, S. K.; Moody, G. J.; Thomas, J. D. R.; *Analyst*, Vol. 114, 1989, 1421 – 1425
- [14] Janowski, F.; Heyer, W.; *Poröse Gläser – Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1982
- [15] Enke, D. *Mesoporöse Molekularsiebe auf der Basis poröser Gläser*, Dissertation, Halle 1998
- [16] Weetall, H. H.; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 41, 1993, 157 – 187

- [17]Cardosi, M. F.; *Covalent Immobilization of Enzymes to Graphitic Particles*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 217 – 228
- [18]Janolino, V. G.; Swaisgood, H. E.; *Immobilization of Proteins on Thionylchlorid-activated Controlled-Pore Glass*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 217 – 228
- [19]Sinisterra, J. V.; *Adsorption of Lipase on Inorganic Supports*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 327 – 330
- [20]Sinisterra, J. V.; *Immobilization of Enzymes on Inorganic Supports by Covalent Methods*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 331 – 338
- [21]Hossain, M. M.; Do, D. D.; *Biotechnology and Bioengineering*, Vol XXVII , 1985, 842 – 851
- [22] *Patentschrift; DE 4435998 C1*, Forschungszentrum Jülich, 1995
- [23]Gemeiner, P.; Stefuca, V.; Bales, V.; *Enzyme Microb. Technol.* 15, 1993, 551-566
- [24]Paterson, M.; Kennedy, J. F.; *Cellulose Paper Support for Immobilization*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 153 – 165
- [25]Guisan, J. M.; Bastida, A.; Blanco, R. M.; Fernandez-Lafuenta, R.; Garcia-Junceda, E.; *Immobilization of Enzymes on Glyxyl Agarose*, in: Bickerstaff, G. F.; *Methods in Biotechnology, Vol. 1, Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press Inc., Totowa, 1997, 277 – 288
- [26]Krajewska, B.; *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 52, 1991, 157 – 162
- [27]Ichijo, H.; Nagasava, J.; Yamauchi, A.; *Journal of Biotechnology*, 14, 1990, 169-178
- [28]Artelt, U.; Staude, E.; *Macromol. Symp.* 103, 1996, 127 – 140
- [29]Kawaguchi, H.; Koiwai, N.; Ohtsuka, Y.; *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 35, 1988, 743-753
- [30]Arroyo, M.; Moreno, J. M.; Sinisterra, J. V.; *Journal of Molecular Catalysis*, 83, 1993, 261 – 271
- [31]Mansfeld, J.; Schellenberger, A.; *Biotechnology and Bioengineering*, Vol XXIX, 1987, 72-78
- [32]Fischer, J.; Ulbrich, R.; Ziemann, R.; Flatau, S.; Wolna, P.; Schleif, M.; Pluschke, V.; Schellenberger, A.; *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, Vol. 5, No. 2, 1980, 79- 96

- [33]Elcin, M. Y.; Sacak, M.; *J. Chem. Biotechnol.*, 63, 1995, 174-180
- [34]Burg, K.; Mauz, O.; Noetzel, S.; Sauber, K.; *Die angewandte Makromolekulare Chemie*, 157, 1988, 105 – 121
- [35]Wehnert, G.; Sauerbrei, A.; Schügerl, K.; *Biotechnology Letters*, Vol.7, No. 11, 1987, 827 – 830
- [36]Krajewska, B.; Lezsko, M.; Zaborska, W.; *J. Chem. Tech, Biotechnology*, 48, 1990, 337 – 350
- [37]Ganapati, S.; Butterfield, D.A.; Battacharyya, D.; *J. Chem.Tech. Biotechnol.* 64; 1995, 157-164
- [38]Ristau, O.; Pommerening, K.; Jung, C.; Rein, H; Scheller, W.; *Biomed. Biochem. Acta*, 44, 7/8, 1985, 1104 – 1111
- [39]Hoffmann, M.; Dashevsky, A.; Derdulla, H., Pietzsch, H.-R.; *Kontinuierliche Herstellung von Alginat-Mikrokapseln zur Immobilisierung von Enzymen und lebenden Zellen*, 8. Heiligenstädter Kolloquium, Tagungsband, Heiligenstadt, 1997, 244 – 251
- [40]D.Frense; *Immobilisierung von Biokatalysatoren in selbstorganisierten mikrostrukturierten Matrices*, 8. Heiligenstädter Kolloquium, Tagungsband, Heiligenstadt, 1997, 261-268
- [41]Heichal-Segal, O.; Rappoport, S.; Braun, S.; *Biotechnology*, Vol.13, 1995, 798-800
- [42]Georgi, U.; *Funktionalisierte Gelschichten aus Tetraethoxysilan und Alkyltriethoxysilanen*, Dissertation, Freiberg, 1998
- [43]Georgi, U.; Graebner, H.; Roewer, G.; Wolf, G.; *Journal of Sol-Gel-Science and Technology*, 13, 1998, 295 – 298
- [44]Bergmeyer, H.U. (Hrsg.); *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2.Auflage, Akademie-Verlag Berlin, 1970
- [45]Hüttl,R.; *Enzymatic Kinetic Determinations*; in: Meyers, R.A (Hrsg.); *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley & Sons, im Druck
- [46]Oehlschläger, K.; *Kalorimetrische Untersuchungen enzymkatalysierter Reaktionen unter dem Einfluss von Schwermetallionen*, Dissertation, Freiberg, 1998
- [47]Hüttl, R.; Bohmhammel, K.; Wolf, G.; Oehmgen, R.; *Thermochimica Acta*, 250, 1995, 1 - 12
- [48]Oehmgen, R.; *Mikrokalorimetrische Methoden für den Schadstoffnachweis mit enzymkatalysierten Reaktionen*, Dissertation, Freiberg, 1997
- [49]Försterling, H.-D.; Kuhn, H.; *Praxis der Physikalischen Chemie*, 3. Auflage, VCH, Weinheim, 1991

- [50]Gul, S.; Sreddharan, S.K.; Brocklehurst, K.; *Enzyme Assays*, in Rickwood, D.; Hames, B. D (Hrsg.); *Essential Data Series*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, 1998
- [51]Scheller, F.; Schubert, F.; *Biosensoren*, Akademie-Verlag Berlin 1989
- [52]Jespersen, N.D.; *Bioprocess. Technol.* 6, 1990, 193 – 220
- [53]Hemminger, W.; Höhne, G.; *Grundlagen der Kalorimetrie*, Akademie-Verlag, Berlin, 1980
- [54]Calvet, E.; Prat, H.; Skinner, H. A.; *Recent Progress in Microcalorimetry*, Pergamon Press, Oxford London New York Paris 1963
- [55]Wadsö, I., *Science Tools*, 13, 1966, 33 – 39
- [56]Grime, J.K.; *Analytical Solution Calorimetry*, John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, 1985
- [57]Landahl, H.D., *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84 1953, 74-79
- [58]Grime, J.K.; Lockhart, K.; Tan, B.; *Analytica Chimica Acta*, 91, 1977, 243-250
- [59]Grime, J.K.; Tan, B.; Jordan, J.; *Analytica Chimica Acta*, 109, 1979, 393-399
- [60]Beezer, A.E.; *Thermochimica Acta*, 7, 1973, 241 – 246
- [61]Kirstein, D, Schilder, L.; Kahrig, E.; *Acta Biotechnologica*, 2, 1982, 103-106
- [62]Antonelli, M. L.; Carunchio, V.; Luciani, M, Vinci, G.; *Thermochimica Acta*, 122, 1987, 95-103
- [63]Wolf, G.; *Nauchn. Appar.*, 1;1986, 76
- [64]Hüttl, R.;Bohmhammel, K.; Pritzkat, K.; Wolf, G.; *Thermochimica Acta*, 229, 1993, 205-213
- [65]Bohmhammel, K.; Hüttl, R.; Pritzkat, K.; Wolf, G.; *Thermochimica Acta*, 217, 1993, 1 – 8
- [66]Bohmhammel, K.; Hüttl, R.; Pritzkat, K.; Wolf, G.; *Thermochimica Acta*, 217, 1993, 9 – 18
- [67]Oehlschläger, K.; Hüttl, R.; Wolf, G.; *Thermochimica Acta*, 310, 1998, 185 – 189
- [68]Hüttl, R.; Oehlschläger, K.; Wolf, G.; *Thermochimica Acta*, 325, 1999, 1-4
- [69]Lezsko, M.J.; Kot, M.; Zaborska, W.; *Polish J. Chem.*; 69; 1995; 1704 – 1717
- [70]Juskiewicz, A.; Kot, M.; Lezsko, M; Zaborska, W.; *Thermochimica Acta*, 249, 1995, 301-311

- [71]Liang, Y.; Wu, Y.; Li, D.; Wang, C.; Liu, Y.; Qu, S.; Zou, G.; *Thermochimica Acta*, 307, 1997, 149 - 153
- [72]Wang, T; Yi,L.; Wan, H.; Yang, F.; Wu, D.; Qu, S.; *Thermochimica Acta*, 303, 1997, 191-196
- [73]Monk, P.; Wadsö, I.; *Acta Chemica Scandinavica*, 22, 1968, 1842-1852
- [74]Monk, P.; Wadsö, I.; *Acta Chemica Scandinavica*, 23, 1969, 29 – 36
- [75]Beezer, A. E.; Tyrell, H. J.; *Science Tools*, Vol. 19, No.1, 1972, 13-16
- [76]Beezer, A. E.; Stubbs; C. D.; *Talanta*, 20, 1973, 27-31
- [77]Beezer, A. E.; Steenson, T. I.; Tyrell, H. J. V.; *Talanta*, 21, 1974, 467-474
- [78]Cha, J.; *Analysis of Model Environmental Pollutants; Preliminary Microcalorimetric Studies*, Dissertation, Kent, 1996
- [79]Owusu, R. K, Finch, A.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 872,1986, 83-91
- [80]Owusu, R. K.; Trehwella, M. .J.; Finch, A.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 830, 1985, 282-287
- [81]Owusu, R. K.; Finch, A.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31, 1985, 221-230
- [82]Kurvits, M.; Siimer, E.: *Thermochimica Acta*, 103, 1986, 297-303
- [83]Suurkuusk, J.; Wadsö, I.; *Chemica Scripta*, 20, 1982, 155-163
- [84]Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Flow Injection Analysis*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, New York, Chichester Brisbane Toronto Singapore 1988
- [85]Kodama, T.; Kometani, K.; *Thermochimica Acta*, 163, 1990, 105-110
- [86]Thorneley, R. N. F., Ashby, G.; Howarth, J.V.; Millar, N. C.; Gutfreund, H.; *Biochem. J.*, 264, 1989, 657-661
- [87]Cooney, C. L.; Weaver, J. C.; Tannenbaum, S. R; Faller, D. V.; Shields, A.; Jahnke, M.; *Enzyme Engineering*, 2, 1974, 411-417
- [88]Tran-Minh, C.; Vallin, D.; *Analytical Biochemistry*, 50, 1978, 1874 –1876
- [89]Weaver, J.; Cooney, C. L.; Fulton, S. P.; Schuler, P.; Tannenbaum, S.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 152, 1976, 285 – 291
- [90]Coney, C. L.; Weaver, J. C.; Fulton, S.P.; Tannenbaum, S. R.; *Enz. Eng.*, 3, 1978, 436-431
- [91]Canning, L. M.; Carr, P. W.; *Analytical Letters*, 8, 1975, 359-367
- [92]Bowers, L. D., Canning, L. M.; Sayers, C. N.; Carr, P. W.; *Clin. Chem.*, 22, 1976, 1314 – 1318

- [93]Mosbach, K.; Danielsson, B.; Borgerud, A.; Scott, M.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 403, 1975, 256-265
- [94]Mattiasson, B.; Danielsson, B.; Mosbach, K.; *Analytical Letters*, 9, 1976, 867 – 889
- [95]Danielsson, B.; Mattiasson, B.; Mosbach, K.; *Applied Biochemistry and Bioengineering*, 3, 1981, 97-143
- [96]Danielsson, B.; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 7, 1982, 127-134,
- [97]Danielsson, B.; Mosbach, K.; *Theory and Application of Calorimetric Sensors*, in: Turner, A.P.F.; Karube, J.; Wilson, G.S.; *Biosensors, Fundamentals and Applications*, Oxford Science Publications, 1987
- [98]Xie, B.; Ramanathan, K.; Danielsson, B.: *Principles of Enzyme Thermistor Systems: Application to Biomedical and Other Measurements*, in: Scheper, T. (Hrsg.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Bd. 64, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1999
- [99]Sauerbrei, A., *Entwicklung und Anwendung eines Enzymthermistors – On-line Glucose-Messungen aus Kulturbrühen*, Dissertation, Hannover, 1987
- [100]Lammers, F.; Scheper, T.; *Thermal Biosensors*, in: Scheper, T. (Hrsg.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* Bd. 64, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1999
- [101]Hundeck, H.-G.; *Entwicklung und Anwendung eines Biosensorsystems auf Basis eines Mehrkanalenzymthermistors zur On-line-Prozeßkontrolle und -regelung in der Biotechnologie*, Düsseldorf, 1991
- [102]Huck, H.; Schelter-Graf, A.; Schmidt, H.-L.; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 13, 1984, 199-209
- [103]Schifreen, R. S.; *Flow Enthalpimetry (Isoperibol Flow-Injection Calorimetry)*, in Grime, J. K.; *Analytical Solution Calorimetry*, John Wiley & Sons, New York Chister Brisbane Toronto Singapore 1985
- [104]Stefuca, V.; Gemeiner, P.; Kurillova, L.; Danielsson, B.; Bales, V.; *Enzyme Microb. Technol.*; 12, 1990, 830 – 835
- [105]Welwardova, A.; Gemeiner, P.; Michalkova, E.; Welward, L.; Jakubva, A.; *Biotechnology Techniques*, 7; 1993, 809-814
- [106]Stefuca, V.; Welwardova, A.; Gemeiner, P.; Jakubova, A.; *Biotechnology Techniques*, 8, 1994, 497-502
- [107]Docolomansky, P.; Gemeiner, P.; Mislovicova, D.; Stefuca, V.; Danielsson, B.; *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1994, 286-292
- [108]Docolomansy, P.; Breier, A.; Gemeiner, P.; Ziegelhöffer, *Analytical Letters*, 28, 2585-2594

- [109] Gemeiner, P.; Docolomansky, P.; Nahalka, J.; Stefuca, V.; Danielsson, B.; *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1996, 26 – 35
- [110] Gemeiner, P.; Stefuca, V.; Danielsson, B.; *Advances in Molecular and Cell Biology*, 15 B, 411-419, 1996
- [111] Stefuca, V.; Gemeiner, P.; *Investigation of Catalytic Properties of Immobilized Enzymes and Cells bei Flow Microcalorimetry*; in: Scheper, T. (Hrsg.); *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Bd. 64, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1999
- [112] Brdicka, R.: *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1985
- [113] Stefuca, V.; Welwardova, A.; Gemeiner, P.; *Analytica Chimica Acta*, 355, 63-67
- [114] Danielsson, B.; Xie, B.; *Thermistor Based Biosensing*, in: Scheller, F.W., Schubert, F.; Fedrowitz, J. (Hrsg.); *Frontiers in Biosensors II Practical Applications*; Birkhäuser Verlag, Basel, 1997; 71-85
- [115] Xie, B.; Danielsson, B.; Norberg, P.; Winqvist, F.; Lundström, I.; *Sensors and Actuators B*, 6; 1992; 127-130
- [116] Xie, B.; Mecklenburg, M.; Danielsson, B.; Öhman, O.; Norlin, P.; Winqvist, F.; *Analyst*, 120, 1995, 155- 160
- [117] Danielsson, B.; Xie, B.; Hedberg, U.; *Sensors and Actuators B*, 13-14; 1993; 758-759
- [118] Xie, B.; Danielsson, B.; *Analytical Letters*, 29; 1996; 1921-1932
- [119] Amine, A.; Digua, K.; Xie, B.; Danielsson, B.; *Analytical Letters*, 28; 1995; 2275 – 2286
- [120] Xie, B.; Harborn, U.; Mecklenburg, M.; Danielsson, B.; *Clin. Chem.*, 40/12; 1994; 2282-2287
- [121] Shimohigoshi, M.; Yokohama, K.; Karube, I.; *Analytica Chimica Acta*, 303, 1995, 295-299
- [122] Shimohigoshi, M.; Yokohama, K.; Tamiya, E.; Karube, I.; *The development of calorimetric biosensors using chip thermistors*; in: Aoki, H. (Hrsg.) *Advanced Materials, '93/II; A: Biomaterials, Organic and Intelligent Materials*, Elsevier Science, 1994
- [123] Guilbeau, E. J.; Towe, B. C.; Muehlbauer, M. J.; *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, Bd. XXXIII, 1987, 329- 335
- [124] Muehlbauer, M. J.; Guilbeau, E. J.; Towe, B.C.; *Anal. Chem.*, 61, 1989, 77-83
- [125] Muehlbauer, M. J.; Guilbeau, E. J.; Towe, B. C.; *Sensors and Actuators*, B; 2, 1990, 223-232

- [126]Köhler, J. M.; Steinhage, G.; Krause, J.; Camman, K.; *Sensors and Actuators B*, 23; 1995, 83-91
- [127]Köhler, J. M.; Steinhage, G.; Krause, J.; Camman, K.; *Sensors and Materials*, 8/6, 1996; 357-372
- [128]Steinhage, G.; *Dünnschichtthermosäulen für die chemische und biochemische Analytik*, Dissertation, Münster, 1996
- [129]Herwaarden, A.W. van; Sarro; P.M.; Gardner, J.W.; Bataillard; *Sensors and Actuators A*; 43, 1994; 2430
- [130]Lerchner, J.; Oehmgen, R.; Wolf, G.; *Possibilities for Thermophysical Reaction Monitoring in Microreactors*, Ehrfeld, W. (Hrsg.) *Microreaction Technology – Proceedings of the First International Conference on Microreaction Technology*, Springer, Berlin Heidelberg New York ... 1998
- [131]Lerchner, J.; Oehmgen, R.; Wolf, G.; Le Parlour, P.; Daudon, J.-L.; *Supermicrocalorimetric Devices for the Investigation of Small samples*, High temperatures-high pressures, 30, 1998, 701-708
- [132]Hüttl, R. Lerchner, J.; Oehmgen, R.; Wolf, A.; Wolf, G.; *Miniaturisierte Wärmeleistungssensoren zur Ermittlung von Enzymaktivitäten und Analytkonzentrationen*, in: Baselt, J.P., Gerlach, G.; Göpel, W. (Hrsg); *Chemie- und Biosensoren-Aktuelle Anwendungen und Entwicklungstrends*, Dresdner Beiträge zur Sensorik, Bd.5, Dresden University Press, 1998
- [133]Wolf, A.; *Thermochemische Untersuchungen einiger ausgewählter enzymatischer Reaktionen*, Diplomarbeit, Freiberg, 1997
- [134]Lerchner, J.; Wolf, G.; Wolf, A.; *J. Thermal Anal.*; 55; 1999; 212
- [135]Wolf, A.; Weber, A.; Hüttl, R.; Lerchner, J.; Wolf, G., *Thermochimica Acta*, 337, (1999), 27-38
- [136]Kolb, M. persönliche Mitteilung, 1995
- [137]Krämer, D.M.; *Die Entwicklung von Eupergit C*, in: *Jahrbuch Biotechnologie 1986/87*; Carl Hanser Verlag, München Wien, 1986
- [138]Danielsson, B.; Gadd, K.; Mattiasson, B.; Mosbach, K.; *Clin. Chim. Acta*, 1977, 8, 163-175
- [139]Goldberg, R. N.; Tewari, Y. B.; *Thermodynamics of Enzyme-Catalysed Reactions*, Part 3, Hydrolases, Gaitersburg, 88-89
- [140]Proske, S.; *Untersuchungen zum Einfluss von Elektrolyten auf in Ultrafiltrationsmembranen immobilisierte Invertase*, Dissertation, Essen, 1996
- [141]Emons, H.-H.; *Lehrbuch der Technischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1988

- [142]Bradford, M.; *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254
- [143]Pingoud, A.; Urbanke, C.; *Arbeitsmethoden der Biochemie*, de Gruyter, Berlin-New-York, 1997
- [144]Schwieger, W.; Rauscher, M.; *Kristallisierte poröse Gläser mit bimodalem Porensystem*, (Anwenderbericht poröse Gläser), LABO September 1999
- [145]J.Fricke, A.Emmerling, *Chemistry, Spectroscopy and Applications of Sol-Gel-Glasses*, Monograph Series: *Structure and Bonding*, 77, Springer Verlag Berlin 1992, 37-88
- [146]Georgi, U., Schlottig, F., Graebner, H.; van Steensel, L., Wolf, G., Roewer, G., *Influence of Additives on Properties of Sol-Gel Layers*; *Journal of Non-Crystalline Solids*, im Druck
- [147]Caspar, D.; *Entwicklung und Charakterisierung eines thermochemischen Sensorsystems zur Detektion von organischen Verbindungen*, Dissertation, Freiberg, 2000
- [148]Grenthe, I., Ots, H., Ginstrup, O.; *Acta Chem. Scand.* 24, 1970, 1067-1080
- [149]Buschmann, H.-J.; *Z. Phys. Chem., N.F.* 139 1984, 113-121
- [150]Lerchner, J.; Wolf, G.; Torralba, A., Torra, V.; *Thermochimica Acta*, 302, 1997, 201-210
- [151]Enke, D.; Heyer, W.; Janowski, F.; *Zur Struktur mesoporöser Molekularsiebe auf der Basis poröser Gläser*, Proceedings 18. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, Arbeitskreis Nichtkristalline und Partielle Kristalline Strukturen, Rostock, 1997, 57
- [152]Enke, D.; Janowski, F.; Otto, K.; Heyer, W.; *Modellierung der Struktur mesoporöser Gläser*, Proceedings 19. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, Arbeitskreis Nichtkristalline und Partielle Kristalline Strukturen, Seitenroda, 1998, im Druck
- [153]Otto, K.; Persönliche Mitteilung, 1999
- [154]Qualitätsprüfungsvorschrift, Feinchemie Sebnitz GmbH
- [155]Chikuma, M.; Tanaka, H.; *Talanta*, 34, 7; 1987, 667-669
- [156]Chen, Q.; Kenausis, G. L.; Heller, A.; *Journal of the American Chemical Society*, 120, 1998, 4582 – 4585
- [157]Jäger, E.-G.; Schöne, K.; Werner, G.; *Lehrwerk Chemie, Arbeitsbuch 5, Elektrolytgleichgewichte und Elektrochemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1977