

**Biosensoren für die
Aufarbeitung in der Biotechnologie**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Peter Sosnitza
geboren am 27. April 1971 in Hannover

Hannover 1999

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 24.6.1999

Datum der Veröffentlichung: Juli 1999

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1996 bis April 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Ihm danke ich für die interessante Themenstellung, die freundliche Unterstützung und die mir gebotenen guten Arbeitsmöglichkeiten.

Ich danke PD Dr. Bernd Hitzmann für die Übernahme des Korreferates und die Hilfestellung bei Problemen mit CAFCA.

Dr. Roland Ulber danke ich für die Koordination des Forschungsprojekts, sowie für viele gute Tips und Hinweise zur Fließinjektionsanalytik. Dank neuem Büro führte der Weg bei Aufträgen zuletzt nicht immer am FET-Labor vorbei.

Bei Dr. Robert Faurie und Matthias Busse möchte ich mich für die wertvollen Ideen und Unterstützung bei allen Messungen „vor Ort“ bedanken. Den Geruch von Zuckerrübenmelasse wird man schwer wieder los...

Für die Bereitstellung der D-Serin-Dehydratase und den Einblick in die Isolierung des Enzyms bedanke ich mich bei PD Dr. Lutz Fischer und seinem Arbeitskreis: Stephanie Spöckner, Frauke Patett und Stefan Weferling

Prof. Dr. Mohammed Saleemuddin und Mariya Farooqui von der Universität Aligarh (Indien) danke ich für die Kooperation auf dem Gebiet der Immobilisierung von Glykoenzymen und Antikörpern. Ich habe großen Respekt vor der kleinen Arbeitsgruppe in Aligarh, die unter einfachsten Bedingungen erfolgreiche Forschung betreibt.

Tanja Koop und Florian Irtel haben durch ihre Arbeiten wesentlich zur Optimierung der Sensorsysteme beigetragen. Dafür meinen herzlichen Dank, auch wenn beide laut eigener Aussage ohne meine Betreuung viel effektiver arbeiten konnten!

Bei Egbert Stärk möchte ich mich für die Unterstützung bei den 2D-Fluoreszenzmessungen und für die Hilfe bei der Auswertung der Spektren bedanken.

Martina Weiß möchte ich für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft, die HPLC-Analytik und die „Hotline“ bei allen möglichen und unmöglichen Fragen zu CorelDraw ganz herzlich danken. Mein Dank gilt ebenfalls den Werkstätten und der Verwaltung des Instituts, die für Fragen und Wünsche stets ein offenes Ohr hatten.

Bei Adnan Ritzka möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Es steht schon in der Bibel: „Eine gute Simulation ersetzt jede Messung!“.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Freunden, die das Studium und das „Drumherum“ angenehmer gestaltet haben, besonders bei Claudia, Crissie & Timo, Helga & Stephan, Sven und „Banker“ Joe.

Mein Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Anne Kempers für ihre Liebe und Unterstützung bedanken.

Der Amino GmbH, Frellstedt, und der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück, danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biosensoren in der Biotechnologie	3
2.1	Grundlagen.....	3
2.2	Fließinjektionsanalyse.....	4
2.3	Eingesetzte Enzymsysteme.....	6
2.4	Transducer.....	9
2.4.1	Amperometrische Sauerstoffelektrode.....	9
3	Immobilisierung von Enzymen	11
3.1	Immobilisierung auf VA-Epoxy	11
3.2	CNBr-aktivierte Sepharose	12
3.3	Das Lektin Concanavalin A	12
3.4	Immobilisierung auf chelatisierender Sepharose	13
3.5	Kombination von chelatisierender Sepharose und Con A	14
3.5.1	Bindung von Glucose-Oxidase über Cu^{2+} -Ionen	15
3.5.2	Bindung von Invertase über Co^{3+} /Con A	16
3.5.3	Selektive Bindung und Elution von Invertase und Glucose-Oxidase	16
3.6	Bioaffinity Layering.....	19
3.6.1	Con A / Glykoenzym.....	19
3.6.2	Anti-Enzym-Antikörper / Enzym.....	19
3.6.3	Immunoaffinity Layering von Glucose-Oxidase.....	21
3.6.4	Immunoaffinity Layering von Peroxidase	24
3.6.5	Immunoaffinity Layering zur Prozeßanalytik	25
3.7	Zusammenfassung.....	26
4	Analytik von Aminosäuren in Zuckerrübenmelasse	27
4.1	Die chromatographische Melasseentzuckerung.....	27
4.1.1	Produkte der Melasseentzuckerung.....	29
4.1.2	Probleme der Prozeßführung.....	30
4.2	Analytik von D/L-Serin in Zuckerrübenmelasse	32
4.2.1	Serin-Analytik - Stand der Technik	32
4.2.2	Zielsetzung	33
4.2.3	D-Aminosäure-Oxidase.....	33

4.2.4	D-Serin-Dehydratase.....	35
4.2.5	Küvettest.....	37
4.2.6	Integration des Immobilisats in ein FIA-System.....	39
4.2.7	Stopped-Flow-Verfahren.....	42
4.2.8	Co-Immobilisierung der Lactat-Dehydrogenase.....	43
4.2.9	Schwellenwert der chromatographischen Schnittgrenzen.....	43
4.2.10	Modellversuche zur On-line-Analytik	45
4.2.11	Stabilität des D-Serin-Dehydratase-Immobilisats	47
4.2.12	Zusammenfassung.....	48
4.3	Prozeßanalytik mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie	50
4.3.1	Prinzip der 2D-Fluoreszenzmessungen.....	50
4.3.2	Messung von Proben der chromatographischen Melasseentzuckerung.....	53
4.3.3	Fluoreszenzmessung mit direkter Ankopplung über Lichtleiter	56
4.3.4	Ausblick	57
4.4	Enantioselektive Aminosäureanalytik	59
4.5	L-Phenylalanin-Dehydrogenase.....	60
4.6	Zusammenfassung.....	63
5	Analytik von Sacchariden in Zuckerrübenmelasse	64
5.1	Raffinose	64
5.1.1	Chromatographische Trennung von Raffinose	65
5.1.2	Raffinose-Analytik - Stand der Technik	65
5.1.3	Entwicklung eines Biosensors für die Raffinose-Analytik	66
5.1.3.1	Galactose-Oxidase.....	66
5.1.3.2	Messung von Raffinose.....	67
5.1.3.3	Querempfindlichkeit von Galactose-Oxidase	69
5.1.4	Vergleich unterschiedlicher Verfahren zur Raffinose-Analytik	70
5.1.5	Nachweis von Raffinose mit Invertase und Fructose-Dehydrogenase.....	72
5.1.6	Nachweis von Raffinose neben Melibiose	74
5.1.7	On-line-Messung des enzymatischen Raffinose-Abbaus.....	77
5.1.8	Zusammenfassung.....	78
5.2	Analytik von Saccharose in Zuckerrübenmelasse	79
5.2.1	Chromatographische Trennung von Saccharose	79
5.2.2	Aufbau des Biosensors zur Bestimmung von Saccharose	79

5.2.3	Messung von Saccharose am Chromatographieprozeß.....	80
6	Biosensoren zur Analytik von Aufarbeitungsprozessen	82
6.1	Biosensoren im Downstream Processing – Stand der Technik	82
6.2	Biosensorsystem zur Prozeßanalytik	83
6.3	Konzept der In-Time-Analytik	84
6.4	Charakterisierung von Änderungen im Elutionsverhalten.....	85
6.5	Optimierung des Chromatographieprozesses	89
6.6	Auswirkung der Prozeßoptimierung	91
7	Schlußbetrachtung.....	93
8	Anhang.....	98
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	98
8.2	Enzyme und Feinchemikalien.....	98
8.2.1	Enzyme.....	98
8.2.2	Feinchemikalien	99
8.3	Geräte.....	99
8.3.1	2D-Fluoreszenzspektrometer	100
8.4	Medienzusammensetzung	100
8.4.1	Synthetisches Medium für die Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 100	
8.4.2	Medien für die Kultivierung von <i>Klebsiella pneumoniae</i>	101
8.5	Isolierung der D-Serin-Dehydratase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	101
8.6	Aktivitätsbestimmung von Enzymen.....	102
8.6.1	D-Serin-Dehydratase.....	102
8.6.2	Lactat-Dehydrogenase.....	103
8.7	Immobilisierung und Pufferlösungen	104
8.8	Referenzanalytik	105
8.8.1	Aminosäure-Analyser.....	105
8.8.2	Bestimmung von Aminosäuren mit HPLC	105
8.8.3	Bestimmung von Zuckern mit HPLC.....	106
8.8.4	Raffinose-Testkit.....	106
9	Literatur	108

Abstract

Sosnitza, Peter

The application of biosensor systems in industry is often limited by the lack of stability of the biological component or the restricted usability of the system. In this work, different immobilisation methods for enzymes and antibodies are presented, that help to improve activity and stability of the biological component. A new immobilisation system is described where enzymes are bound to chelating Sepharose through different metal ions and to the lectin Concanavalin A; this leads to a high degree of reversibility and enzyme activity and allows selective elution and reloading of these enzymes in conditions irrespective of each other. This development can point the way to more flexible biosensors enabling the adaptation to different analytes or the automatic exchange of deactivated enzymes. Highly active and stable conditions can also be obtained by the use of polyclonal antibodies in the assembly of enzyme/antibody layers.

The application of biosensors for the supervision of downstream processes in biotechnology is described. Sugar beet molasses is a natural resource for various products used in daily life, ranging from sucrose (food industry) to amino acids (pharmaceutical industry). The separation of molasses into these components is performed on a large scale at the Amino GmbH (Germany). The development of biosensor systems for the analysis of serine, sucrose and raffinose during molasses desugarisation and the use of biosensors for the optimisation of biotechnological downstream processes is discussed. In-time analysis of serine leads to an improved performance of the chromatographic separation process. The preservation of energy, water and chemicals necessary for column regeneration is a step further to a sustainable development of the process.

Keywords: Biosensor, sugar beet molasses, downstream processing

Abstract

Sosnitza, Peter

Der Einsatz von Biosensoren in der Industrie ist häufig durch mangelnde Stabilität der biologischen Komponente und durch schlechte Bedienbarkeit limitiert. Es werden unterschiedliche Immobilisierungsverfahren für Enzyme und Antikörper vorgestellt, die dazu beitragen sollen, die Stabilität der biologischen Komponente zu verbessern. Mit der Immobilisierung von Enzymen über Metallionen wird ein Verfahren vorgestellt, das sich durch Reversibilität und hohe Enzymaktivität auszeichnet. Die Kombination des Lektins Concanavalin A mit chelatisierender Sepharose ermöglicht eine selektive Immobilisierung und Elution von Enzymen. Mit diesem Verfahren kann in Biosensorsystemen ein automatischer Austausch deaktivierter biologischer Komponenten oder die Umstellung auf andere Analyten realisiert werden. Das „Immunoaffinity Layering“, die Immobilisierung von Schichten von Enzym/Anti-Enzym-Antikörpern, ermöglicht eine Steigerung von Stabilität und Aktivität.

Es wird der Einsatz von Biosensoren zur Überwachung der chromatographischen Melasseentzuckerung beschrieben. Die bei der Zuckerrübenverarbeitung anfallende Zuckerrübenmelasse stellt einen interessanten nachwachsenden Rohstoff für verschiedene Einsatzbereiche dar. Das von der Amino GmbH, Frellstedt, im industriellen Maßstab betriebene Verfahren erlaubt neben der Extraktion des Zuckers auch die gezielte Anreicherung anderer Melasseinhaltsstoffe, sog. „Minor Components“. Für die Aminosäure Serin, sowie Saccharose und das Trisaccharid Raffinose wird die Entwicklung von Biosensoren zur Prozeßüberwachung und -optimierung beschrieben. Anhand des Biosensors für Serin werden die Möglichkeiten des Einsatzes von Biosensoren beim Downstream Processing diskutiert. Es wird gezeigt, daß sich Biosensoren zur In-Time-Analytik von schnellen Prozessen eignen. Als eine Maßnahme des produktionsintegrierten Umweltschutzes amortisiert sich die Ankopplung des Biosensors an den bestehenden Trennprozeß durch Einsparungen an Chemikalien, Prozeßwasser und Energie.

Schlagwörter: Biosensor, Zuckerrübenmelasse, Aufarbeitung

1 Einleitung

Die Biotechnologie gilt als Hoffnungsträger einer positiven Wirtschaftsentwicklung in Deutschland. Etwa 460 Unternehmen mit über 200.000 Beschäftigten und einem Umsatz von rund 4,4 Mrd. DM waren in diesem Bereich 1997 tätig [1]. Nach Ansicht von Marktforschern wird die Biotechnologie bis zum Jahre 2020 zu den 30 Top-Technologien zählen, die die Schaffung von neuen, innovativen Arbeitsplätzen ermöglichen [2]. Allgemein wird für die Biotechnologie mit hohen Wachstumspotentialen gerechnet, die durch verbesserte gesetzliche Rahmenbedingungen ermöglicht werden [2]. Dazu zählt die Ausschreibung des BioRegio-Wettbewerbes im Jahre 1996, der einen neuen Förderungsschwerpunkt auf die Biotechnologie legt.

Die Kommerzialisierung der modernen Biotechnologie ist weit fortgeschritten: Biotechnologisch entwickelte Wirkstoffe dominieren die aktuelle Produktentwicklung der pharmazeutischen Industrie: Zwei Drittel aller Medikamentneuentwicklungen stammen aus „Biotech-Pipelines“. Noch vor 10 Jahren waren es lediglich 5 % [3]. Experten gehen davon aus, daß nur mit Hilfe der modernen Biotechnologie dauerhafte Erfolge bei der Bekämpfung von Krankheiten wie AIDS, Multipler Sklerose und Krebs zu erzielen sind [3]. Daneben findet diese Technologie Anwendung in der Landwirtschaft, in der Lebensmittelproduktion und im Umweltbereich.

Die Anforderungen an die Ökonomie biotechnologischer Verfahren und an die so hergestellten Produkte steigen. Aufgrund der größeren Zahl der Prozeßparameter werden von biotechnologischen Verfahren höhere Anforderungen an die Automatisierung gestellt als in der traditionellen Chemie. Um die Möglichkeiten der Prozeßoptimierung und –automation zu nutzen, sind leistungsfähige Analysensysteme nötig, die möglichst ohne Zeitverzögerung und Eingriff in den Prozeß die benötigten Prozeßparameter liefern [4]. In den letzten Jahren sind für zahlreiche Analyten Biosensoren entwickelt worden, mit deren Hilfe eine schnelle Konzentrationsbestimmung möglich ist. Biosensoren werden zwar in der Forschung und Entwicklung eingesetzt, ihr industrieller Einsatz bleibt jedoch auf wenige Ausnahmen beschränkt. Die Gründe dafür liegen oft in der ungenügenden Stabilität der biologischen Komponente und in der komplizierten Handhabung der Systeme. In der

vorliegenden Arbeit wird im Rahmen eines von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Forschungsprojekts der Einsatz von Biosensoren für Anwendungen in der biotechnologischen Industrie untersucht. Für die Analytik von Aufarbeitungsprozessen (Downstream Processing) können diese Sensoren einen wertvollen Beitrag zur Prozeßoptimierung leisten. Gerade im Bereich der Biotechnologie können die Kosten für das Downstream Processing bis zu 90% der Herstellungskosten betragen, wobei der Schwerpunkt in der Anwendung chromatographischer Verfahren liegt [5].

Die Entwicklung von Biosensoren soll am Beispiel der chromatographischen Melasseentzuckerung beschrieben werden. Zunächst werden Immobilisierungsverfahren für Enzyme und Antikörper vorgestellt, die die Aktivität von biologischen Komponenten verbessern sollen. Anhand von Biosensoren für die Aminosäure Serin, sowie die Kohlenhydrate Raffinose und Saccharose soll die Entwicklung von Sensorsystemen und deren Einsatz am Prozeß der Melasseentzuckerung untersucht werden. Am Beispiel der Serin-Abtrennung soll das Potential von Biosensoren zur Prozeßoptimierung untersucht werden.

2 Biosensoren in der Biotechnologie

2.1 Grundlagen

Biosensoren sind nach einem vorläufigen Nomenklaturvorschlag der IUPAC miniaturisierte Meßwertfühler, die in Verbindung mit einer biologischen Komponente chemische Verbindungen oder Ionen selektiv und reversibel erfassen und dabei konzentrationsabhängige Signale liefern [6].

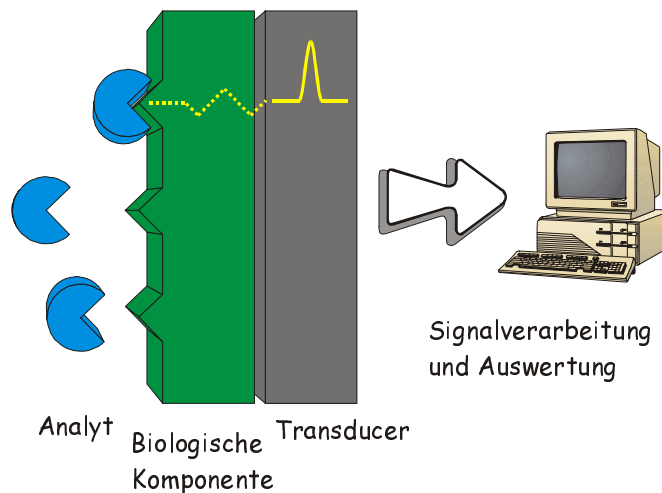


Abb. 2.1: Funktionsprinzip eines Biosensors

Die Meßsignale werden von einem Meßwandler (Transducer, siehe Kapitel 2.4) erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Eine erweiterte Definition geht davon aus, daß die biologische Komponente von Biosensoren in direktem Kontakt mit dem Transducer steht [7]. Voraussetzung ist in jedem Fall eine biologische Komponente, die möglichst selektiv nur mit dem zu bestimmenden Analyten reagiert. Als biologische Komponenten können Enzyme, Mikroorganismen, Zellen oder Antikörper eingesetzt werden. Die spezifische Reaktion von Enzymen wird zur Bioprozeßkontrolle [8, 9] und in der Lebensmittelanalytik ausgenutzt [10]. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Medizintechnik, in der Biosensoren zur Bestimmung von Blutwerten wie Glucose und Lactat eingesetzt werden [11, 12]. Setzt man Zellen als biologische Komponenten ein, wird der Analyt zu verschiedenen Produkten metabolisiert. In Kombination mit chemometrischen Methoden läßt sich der unterschiedlich schnelle Abbau von organischen Verbindungen zum analytischen

Nachweis dieser Stoffe nutzen [13]. Auch Insekten können als biologische Komponenten eines Biosensors eingesetzt werden. Der hervorragende Geruchssinn von Kartoffelkäfern läßt sich ausnutzen, indem die Signale der Fühler mit einer geeigneten Elektronik aufgefangen werden. So lassen sich kranke Kartoffelpflanzen entdecken, was zu einer Einsparung an Insektiziden führen soll [14].

Die spezifische Reaktion von Antikörpern wird ebenfalls in der Biosensorik eingesetzt. In sogenannten „Immunoassays“ wird die Antikörper-Antigen-Bindung erfaßt und ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung des Antigens [15].

Für die Anwendung in der Biosensorik werden biologische Komponenten häufig auf unterschiedlichen Trägern immobilisiert. Verschiedene Immobilisierungstechniken für Enzyme und Antikörper werden in Kapitel 3 beschrieben. Um die Messung mit einem Biosensorsystem zu automatisieren, kann dieses mit einem Fließinjektionsanalyse-System kombiniert werden. Das Prinzip dieses Analysenverfahrens wird im folgenden Kapitel erläutert.

2.2 Fließinjektionsanalyse

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) basiert auf einem Trägerstrom, der mit 0,1–3,0 ml/min kontinuierlich und möglichst pulsationsarm durch ein Analysesystem geführt wird. Mit Hilfe eines Injektors kann ein Probensegment der zu analysierenden Lösung (20-100 µl) in diesen Strom injiziert werden (siehe Abbildung 2.2). Das Segment gelangt auf diese Weise zur biologischen Komponente des Biosensors. Bei der dort ablaufenden Reaktion verändert sich eine bestimmte physikalische oder chemische Größe (z. B. pH-Wert oder Sauerstoffpartialdruck), die vom Transducer erfaßt wird. Die folgende Abbildung verdeutlicht das Prinzip der Fließinjektionsanalyse.

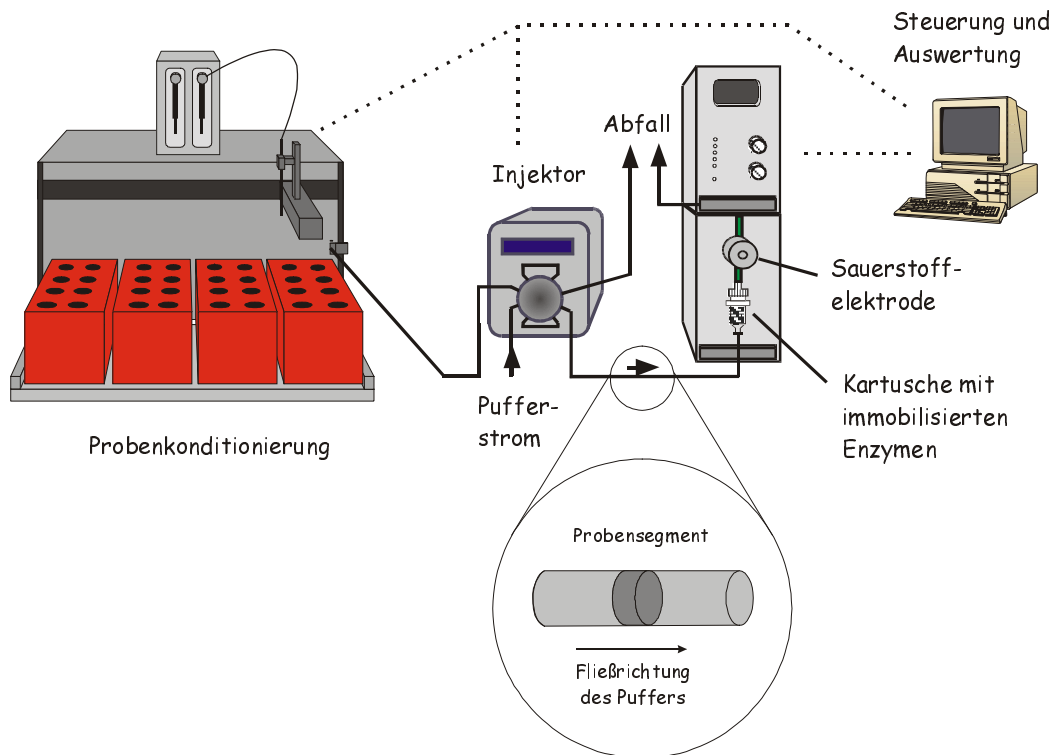


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines FIA-Systems mit Biosensor

In der vorliegenden Arbeit wurde ein FIA-System, bestehend aus einem Autosampler (Gilson 222XL) und Injektor (EVA-Line, Eppendorf, Hamburg), verwendet. Das System ist modular aufgebaut, die Ansteuerung der Module wird durch eine A/D-D/D-Karte über TTL-Impulse (Transistor-Transistor-Logic) realisiert. Zur Steuerung der Anlage wird ein 486er PC mit dem Programm CAFCA 2.0 (Computer Assisted Flow Control & Analysis, Anasyscon, Hannover) benutzt. Das in Turbo Pascal 7.0 verfaßte Programm ermöglicht neben der Ansteuerung der Module die Aufnahme und Auswertung der Meßsignale.

Der in Abbildung 2.2 dargestellte Autosampler ist in der Lage, bis zu 200 Proben zu verarbeiten. Dieses Gerät kann ebenfalls zum Konditionieren von Proben (Verdünnung oder Zusatz von Cosubstraten), zur Erstellung von Verdünnungsreihen und zur Probenahme am Prozeß eingesetzt werden.

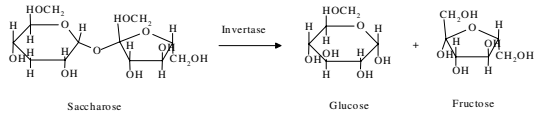
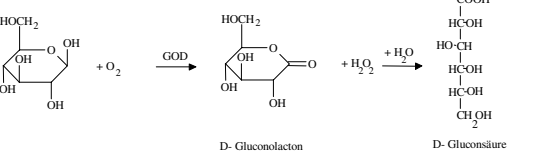
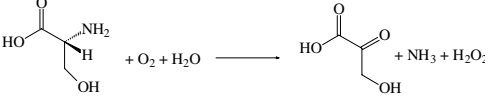
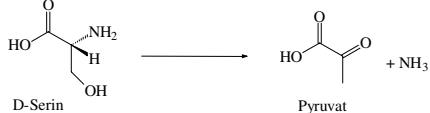
Als Alternative zur Kopplung von Biosensoren mit FIA-Systemen ist in der Literatur die Anwendung von SIA-Systemen (Sequential Injection Analysis) beschrieben [8, 9, 16]. Statt die Probe durch einen Injektor in den kontinuierlichen Pufferstrom zu injizieren, wird bei diesem Verfahren eine präzise arbeitende Pumpe benötigt, die Puffer und das definierte

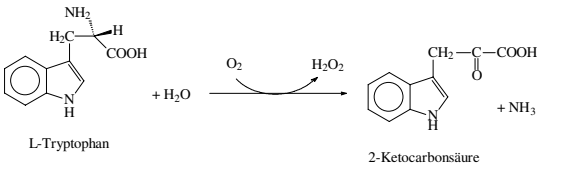
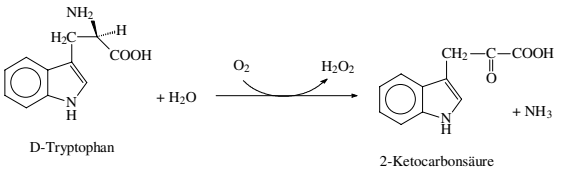
Probenvolumen ansaugt. Puffer und Probe werden anschließend in das Biosensorsystem injiziert. Der Vorteil des SIA-Verfahrens liegt im geringeren Chemikalienverbrauch und im einfacheren Aufbau des Analysensystems [16].

2.3 Eingesetzte Enzymsysteme

Als biologische Komponenten werden in dieser Arbeit immobilisierte Enzyme (siehe Kapitel 3) verwendet, die in eine Enzymkartusche gefüllt und in Fließrichtung vor dem Transducer in das FIA-System integriert werden (siehe Abbildung 2.2). Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Enzyme. Neben den Analyten und den Reaktionen sind die Einsatzgebiete in dieser Arbeit aufgeführt.

Tab. 2.1: Enzymsysteme und Anwendung in der Biosensorik

Enzym	Katalysierte Reaktion/Anwendung	Literatur
Invertase (EC 3.2.1.26): $K_M^* = 44 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt.}} = 3,5-5,5$ Aktivität** = 76,3 U/mg $M = 100.000 \text{ g/mol}$ Quelle: Bäckerhefe Hersteller: Fluka	 <ul style="list-style-type: none"> • Selektive Immobilisierung und Elution auf chelatisierender Sepharose • Saccharose- und Raffinose-Analytik 	[17] [18] [19]
Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4): $K_M^* = 33 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt.}} = 5-6$ Aktivität** = 180 U/mg $M = 160.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>A. niger</i> Hersteller: Sigma	 <ul style="list-style-type: none"> • Selektive Immobilisierung und Elution auf chelatisierender Sepharose • Immunoaffinity Layering • Saccharose-Analytik 	[17] [19] [20]
Peroxidase (EC 1.11.1.7): $K_M^* = 4 \text{ mM}$, $\text{pH}_{\text{opt.}} = 5-7,5$ Aktivität** = 200 U/mg $M = 40.000 \text{ g/mol}$ Quelle: Meerrettich Hersteller: Sigma	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ABTS}_{\text{red}} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ABTS}_{\text{ox}}$ <ul style="list-style-type: none"> • Immunoaffinity Layering • Detektion von H_2O_2 	[19] [21]
D-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.3), $\text{pH}_{\text{opt.}} = 8,0$ Aktivität** = >20 U/g (Im.) $M = 86.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>Trigonopsis var.</i> Hersteller: Boehringer	 <ul style="list-style-type: none"> • Analytik von D-Serin in Melasse 	[19]
D-Serin-Dehydratase (EC 4.2.1.14) $K_M^* = 0,6 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt.}} = 8,1$ Aktivität = 100 U/g (Im.) $M = 41.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>Klebsiella p.</i> Hersteller: Dr. L. Fischer	 <ul style="list-style-type: none"> • Analytik von D-Serin in Melasse 	[19] [22] [23] [24]
L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) $K_M^* = 0,0247 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt.}} = 7,8$ Aktivität** = 800 U/mg $M = 65.000-67.000 \text{ g/mol}$ Quelle: Kaninchenmuskel Hersteller: Sigma	$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \longrightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+$ <ul style="list-style-type: none"> • Detektionsreaktion für D-Serin-Dehydratase 	[19] [24]

<p>Galactose-Oxidase (EC 1.1.3.9) $K_M^* = 35 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt}} = 6,7$ Aktivität** = 16 U/mg $M = 68.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>D. dendroides</i> Hersteller: Sigma</p>	$\text{Raffinose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Hexodialdose} + \text{H}_2\text{O}_2$ <ul style="list-style-type: none"> Raffinose-Analytik 	[19] [25] [26] [27] [28]
<p>D-Fructose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.11) $K_M^* = 10 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt}} = 4,5$ Aktivität** = 23 U/mg $M = 140.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>Gluconobacter sp.</i> Hersteller: Sigma</p>	$\text{D-Fructose} + \text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{5-keto-D-Fructose} + \text{Fe}^{2+}$ <ul style="list-style-type: none"> Raffinose-Analytik 	[19] [29] [30]
<p>Mutarotase (EC 5.1.3.3) $K_M^* = 15,0 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt}} = 5,0-7,5$ Aktivität** = 5000 U/mg $M = 40000 \text{ g/mol}$ Quelle: Schweinenieren Hersteller: Sigma</p>	$\alpha\text{-D-Glucose} \rightleftharpoons \beta\text{-D-Glucose}$ <ul style="list-style-type: none"> Saccharose-Analytik 	[19] [24]
<p>L-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.2): $K_M^* = 20 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt.}} = 7,9$ Aktivität** = 0,27 U/mg $M = 160.000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>Crotalus atrox</i> Hersteller: Sigma</p>	 <ul style="list-style-type: none"> Enantioselektive Aminosäureanalytik 	[19] [31] [32]
<p>D-Aminosäure-Oxidase (EC 1.4.3.3) $K_M^* = 0,17 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt}} = 8,0$ Aktivität** = 1 U/mg $M = 38000 \text{ g/mol}$ Quelle: Schweinenieren Hersteller: Sigma</p>	 <ul style="list-style-type: none"> Enantioselektive Aminosäureanalytik 	[19] [32]
<p>L-Phenylalanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.20) $K_M^* = 0,25 \text{ mM}$ $\text{pH}_{\text{opt}} = 10,4$ Aktivität** = 0,2 U/g (Im.) $M = 310000-340000 \text{ g/mol}$ Quelle: <i>Bacillus sp.</i> Hersteller: Dr. L. Fischer</p>	$\text{L-Phenylalanin} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Phenylpyruvat} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$ <ul style="list-style-type: none"> Enantioselektive Aminosäureanalytik 	[19] [33] [34]

* bezogen auf den Analyten ** Herstellerangabe

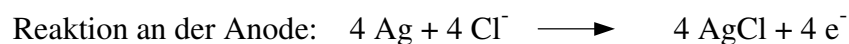
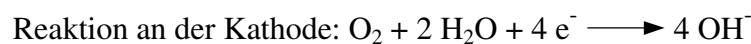
2.4 Transducer

Die Wahl des Transducers richtet sich nach der Reaktion der biologischen Komponente und den daraus resultierenden Änderungen. In der Literatur sind eine Reihe von Transducern beschrieben, die nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten [35-39]. Gebräuchlich sind Transducer auf elektrochemischer [40], elektrischer [41] oder optischer Basis [42]. Massensensitive Meßwandler werden zur Detektion von Bindungen auf Oberflächen oder Antikörpern verwendet. Je mehr Analyt gebunden wird, desto kleiner wird die Schwingungsfrequenz des verwendeten Quarzträgers [43]. In sogenannten Thermistoren können Änderungen der Temperatur detektiert werden, die durch enzymatische Reaktionen hervorgerufen werden [44].

Auf die in der Biosensorik oft verwendete amperometrische Sauerstoffelektrode soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

2.4.1 Amperometrische Sauerstoffelektrode

Zu den am häufigsten verwendeten Transducern zählt die Clark-Elektrode [45], die in der Bauart der spezifischen Anwendung angepaßt werden kann. Zu diesem Typ zählt die Gelöstsauerstoffelektrode (pO_2 -Elektrode) der Firma Anasyscon, Hannover. Sie besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, die über eine Elektrolytlösung leitend verbunden sind. Der Sauerstoff diffundiert durch eine gaspermeable Teflonmembran in den Elektrolyten und wird an der Kathodenoberfläche reduziert. Dabei laufen an den Elektroden folgende Reaktionen ab:



Der aus dieser Redoxreaktion resultierende elektrische Strom ist dem Sauerstoffpartialdruck proportional. Die Auswertung der Meßsignale erfolgt nach einer internen Signalverstärkung mit Hilfe der Software CAFCA. Die Größe des Stroms I wird nicht nur

durch den Sauerstoffpartialdruck der Probe bestimmt, sondern auch durch die Membranstärke und den Diffusionskoeffizienten durch die Membran [46].

Neben Parametern wie Membranmaterial und -dicke hängt der Stromfluß ebenfalls von Größe und Bauart der Elektrode und von den Strömungsverhältnissen ab. Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit im Bereich von 15°C bis 26°C haben gezeigt, daß deutliche Signalschwankungen auftreten [47].

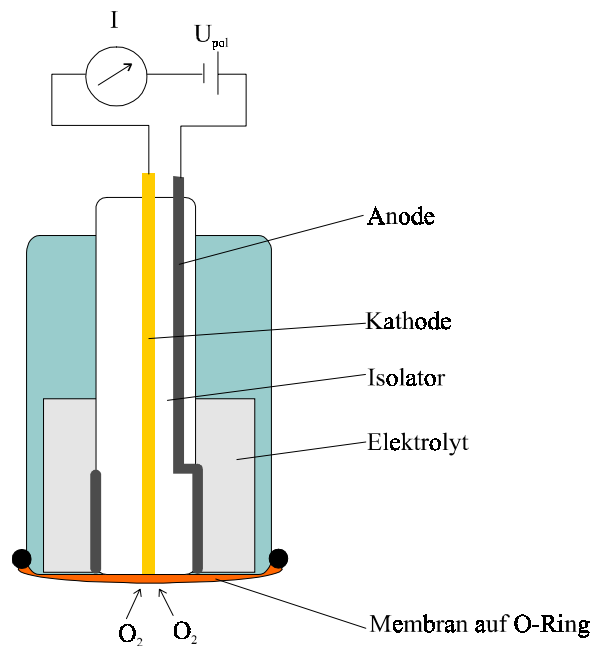


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau der amperometrischen pO₂-Elektrode [48]

Die Kombination der pO₂-Elektrode mit einem FIA-System ermöglicht die Detektion enzymatischer Reaktionen, die eine Änderung des gelösten Sauerstoffs bewirken. In Lösungen, die nur sehr wenig gelösten Sauerstoff enthalten, kann dieses Prinzip mitunter nicht angewendet werden. Mit Hilfe spezieller, Sauerstoff speichernder Membranen kann diese Limitierung aufgehoben werden [49].

Die als biologische Komponenten verwendeten Enzyme werden nicht nativ eingesetzt, sondern auf einem Trägermaterial immobilisiert und in einer Kartusche in das FIA-System integriert. Das folgende Kapitel beschreibt die verwendeten Trägermaterialien und Immobilisierungsverfahren für Enzyme und Antikörper.

3 Immobilisierung von Enzymen

Für Anwendungen in der Biotechnologie sollen Träger für Enzyme die Eigenschaft besitzen, eine große Menge Enzym ohne Aktivitätsverlust zu binden [50, 51]. Auf Biosensoren bezogen bedeutet das eine Erhöhung der Standzeit und Sensitivität des Systems. Im folgenden werden unterschiedliche Immobilisierungsverfahren für Enzyme und Antikörper beschrieben.

3.1 Immobilisierung auf VA-Epoxy

Der Polymerträger VA-Epoxy ist ein synthetisches Copolymerisat aus Vinylacetat und N,N'-Divinylethylenharnstoff. Durch gezielte Hydrolyse ist der Gehalt an Oxirangruppen und damit die Eigenschaften des Epoxyharz-Trägers einstellbar. Die Oxirangruppen reagieren mit freien Aminogruppen des Enzyms und bilden eine feste kovalente Bindung. Abbildung 3.1 zeigt den Mechanismus der Bindung zwischen Enzym und Träger.

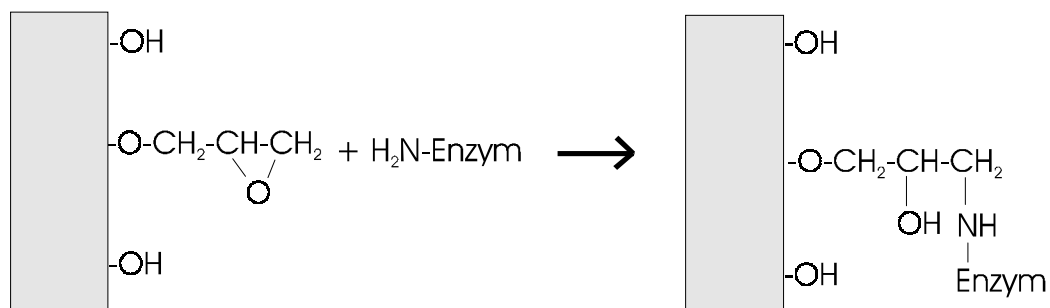


Abb. 3.1: Kopplungsmechanismus zwischen Enzym und dem Polymerträger VA-Epoxy [52]

Das Polymer wird in Enzymkartuschen ($V=1$ ml) verwendet, die Partikelgröße des Trägermaterials (125-250 μm) garantiert gute Fließeigenschaften im FIA-System [53]. Zur Immobilisierung werden 200 mg des Trägermaterials in 1 M Kaliumphosphat-Puffer (KPP) bei pH 7,0 für 24 h bei Raumtemperatur mit dem gewünschten Protein zur Reaktion gebracht [53]. Die Immobilisierungsbedingungen der verwendeten Enzyme sind in Kapitel 8.7 zusammengefaßt.

3.2 CNBr-aktivierte Sepharose

Die verwendete CNBr-aktivierte Sepharose ist ein Polysaccharid, welches durch Quervernetzung im Molekül (Crosslinking) stabilisiert wird. Um Sepharose als Träger für Enzyme nutzen zu können, müssen die freien Hydroxylgruppen durch Reaktion mit Cyanbromid funktionalisiert werden. An die entstehenden Imidogruppen können Proteine als Isoharnstoffverbindungen gebunden werden [46]. Zur Immobilisierung werden 300 mg CNBr-aktivierte Sepharose mit der gewünschten Menge Protein in 0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,2) aufgeschlämmt und für 24 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht [47]. Durch Ausbildung einer kovalenten Bindung wird das Enzym irreversibel auf dem Träger fixiert, ein Ablösen des Proteins oder die mehrmalige Verwendung des Trägermaterials ist nicht möglich.

3.3 Das Lektin Concanavalin A

Während bei der irreversiblen Immobilisierung auf VA-Epoxy und CNBr-aktivierter Sepharose eine kovalente Bindung zum Enzym geknüpft wird, stellt die Immobilisierung auf Concanavalin A (Con A) eine reversible Methode zur Bindung von Glykoenzymen dar. Bei Glykoenzymen können die Aminogruppen durch die Kohlenhydratreste an der Oberfläche regelrecht blockiert werden, so daß die kovalente Immobilisierung an VA-Epoxy erschwert ist [54, 55]. Für die Immobilisierung von Glykoenzymen bietet sich das Lektin Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis* an, das verschiedene Glykosylreste mit unterschiedlicher Affinität zu binden vermag [56]. Nach diesem Prinzip wird Con A in der Affinitätschromatographie zur Isolierung und Aufreinigung von glykosylierten Proteinen eingesetzt [57]. Diese Eigenschaften lassen sich ebenfalls zur reversiblen Immobilisierung von Glykoenzymen nutzen [58]. Man bringt auf dem Träger (z. B. Epoxyharz oder CNBr-aktivierte Sepharose) zunächst kovalent eine Schicht des Lektins auf. Auf dieser Schicht Con A lassen sich durch einfaches Inkubieren Glykoproteine wie Invertase oder Glucose-Oxidase binden [59, 60]. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der weitgehenden Erhaltung der Enzymaktivität. Die Bindung Enzym-Lektin ist stabil, es besteht jedoch die Möglichkeit, das Enzym durch einen pH-Shift oder durch Verdrängung mit einem Zucker höherer Affinität wieder von der Lektin-Schicht zu lösen und so den Träger mehrmals zu

verwenden [56]. Die Bindungskapazität des Lektins wird durch die Elution und erneute Immobilisierung nicht beeinflusst [46, 61].

3.4 Immobilisierung auf chelatisierender Sepharose

Die verwendete chelatisierende Sepharose ist mit nicht näher charakterisierten siebenatomigen Spacern modifiziert, die mit Iminodiacetatgruppen funktionalisiert sind. Diese Gruppen sind in der Lage, zwei- und dreiwertige Metallionen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} und Ni^{2+} zu komplexieren [62, 63]. Diese Eigenschaft wird in der IMAC (immobilised metal affinity chromatography) zur gezielten Aufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen ausgenutzt. In den Organismus wird hinter dem Genabschnitt für das zu produzierende Protein eine Gensequenz für einen Polyhistidin-Schwanz (His-Tag) eingeführt. Das mit dem His-Tag versehene Protein kann durch Bindung an Metallionen (z.B. Ni^{2+}) auf einem chelatisierenden Träger isoliert werden [57]. Im Idealfall kann das gewünschte Protein in einem Aufreinigungsschritt aus einem Proteingemisch entfernt werden.

Diese Eigenschaft macht chelatisierende Sepharose als Trägermaterial zur Immobilisierung von Enzymen interessant, da viele Enzyme über vorhandene Histidinzentren an komplexierte Metallionen gebunden werden können. Je nachdem, über welche Metallionen die Bindung erfolgt, können sich Unterschiede in der gebundenen Proteinmenge und Enzymstabilität ergeben. Abbildung 3.2 zeigt die unterschiedliche thermische Stabilität von Glucose-Oxidase, die über verschiedene Metallionen an chelatisierende Sepharose gebunden wurde.

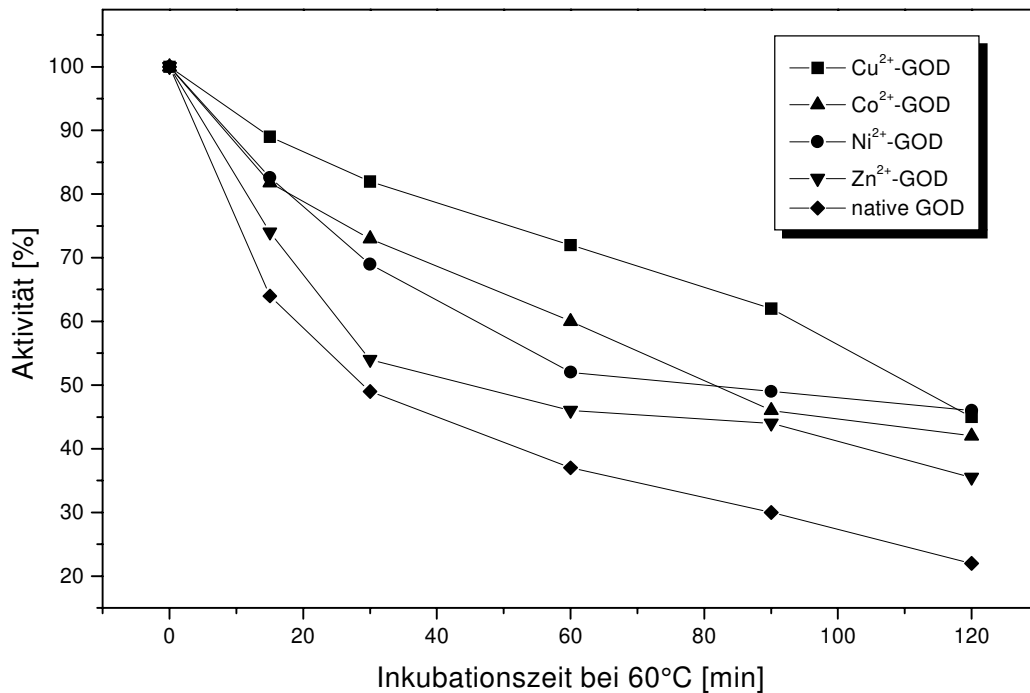


Abb. 3.2: Stabilität von Glucose-Oxidase gegen Deaktivierung bei 60°C in 20 mM KPP pH 7,2. Bindung über verschiedene Metallionen an chelatisierender Sepharose [64].

Die Metallionenkomplexe stabilisieren das Enzym gegen Deaktivierung. Der Cu²⁺-Komplex behält nach einer Stunde noch 70 % seiner ursprünglichen Aktivität, während das native Enzym nur noch 37 % der Ausgangsaktivität ausweist. In der Bindungskapazität gibt es ebenfalls Unterschiede: Von jeweils 76 U Glucose-Oxidase konnten über Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ und Co²⁺ an chelatisierender Sepharose 75, 19, 22 und 22 U gebunden werden [65]. Die Immobilisierung von Glucose-Oxidase über Cu²⁺-Ionen ermöglicht eine fast quantitative Bindung des Enzyms an den Träger und zeigt deutliche Vorteile in der Stabilität. Im folgenden Kapitel wird eine Anwendung dieses Immobilisierungsverfahrens vorgestellt.

3.5 Kombination von chelatisierender Sepharose und Con A

Die Kombination der Immobilisierung über Metallionen und der Affinitätsbindung zu Con A bietet die Möglichkeit, zwei unterschiedliche Enzyme auf dem gleichen Träger zu immobilisieren oder selektiv zu eluieren. In Biosensorsystemen können deaktivierte

Enzyme automatisch eluiert und durch frische ersetzt werden, ohne daß am Aufbau des Systems Veränderungen vorgenommen werden müssen. Eine Umstellung auf unterschiedliche Analyte kann ebenfalls on line und ohne Eingriff durch den Benutzer erfolgen. Bei Fermentationen kann beispielsweise beim Wechsel der C-Quelle der Biosensor innerhalb weniger Minuten das neue Substrat erfassen [46]. Im folgenden wird der Aufbau eines solchen Systems und die Anwendung zur Analytik von Glucose und Saccharose beschrieben.

3.5.1 Bindung von Glucose-Oxidase über Cu^{2+} -Ionen

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, läßt sich Glucose-Oxidase über Cu^{2+} -Ionen an chelatisierender Sepharose immobilisieren. Die Bindung ist nahezu quantitativ, und die Aktivität des Enzyms wird im Gegensatz zur kovalenten Bindung kaum beeinflusst. Die Bindung kann durch einen pH-Shift oder Komplexierung der Cu^{2+} -Ionen mit EDTA und anschließende Elution wieder gelöst werden. Zur erneuten Immobilisierung wird mit 50 mM CuSO_4 -Lösung und frischer Enzymlösung gespült (siehe Abbildung 3.3).

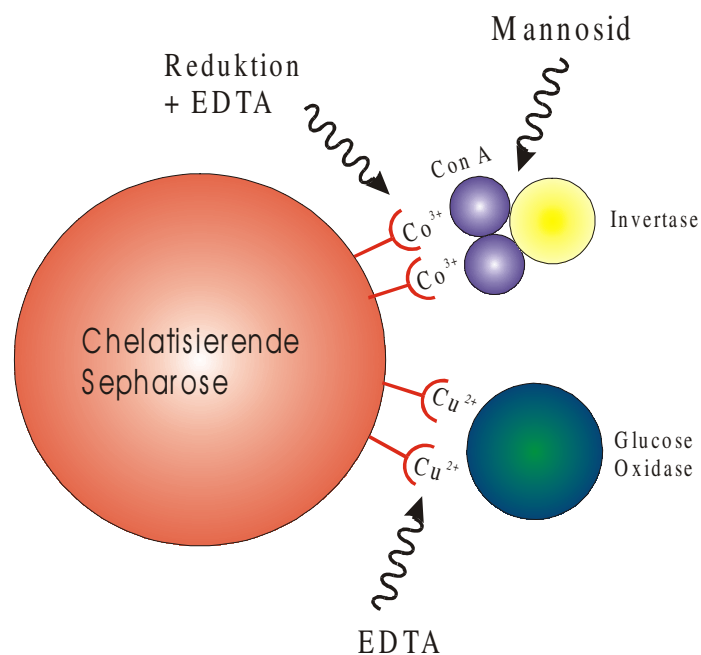


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Bindung von Glucose-Oxidase (über Cu^{2+}) und Invertase (über Co^{3+} /Con A) und die mögliche Elution der Komponenten

3.5.2 Bindung von Invertase über Co^{3+} /Con A

Das Lektin Con A kann über Metallionen (Cu^{2+} , Co^{2+}) an chelatisierende Sepharose gebunden werden. Die Bindung kann durch pH-Shift oder durch einen Komplexbildner (EDTA) wieder gelöst werden. EDTA komplexiert als mehrzähliger Ligand die zweiwertigen Metallionen [66], und das Lektin wird eluiert. Die Verwendung von Co^{2+} -Ionen und die anschließende Oxidation zu Co^{3+} mit 0,03 % H_2O_2 -Lösung stabilisiert die Bindung zum Con A: Die gebildeten Co^{3+} -Komplexe sind aufgrund der Elektronenkonfiguration (d^6 , low-spin) kinetisch inert und besitzen eine starke Affinität zu Stickstoff-Liganden [66]. Der gebildete Komplex kann weder durch einen pH-Shift noch durch EDTA gelöst werden. Auf der auf diese Art und Weise aufgetragenen Schicht Con A läßt sich Invertase (oder andere Glykoenzyme) immobilisieren. Dies geschieht durch Inkubation mit Enzymlösung und Affinitätsbindung der Glykoenzyme an das Lektin.

Die Bindung Lektin-Enzym kann durch 0,1 M α -Methyl D-mannosid-Lösung wieder gelöst werden. Das Mannosid ist durch die hohe Affinität zu Con A in der Lage, andere Zuckerreste mit geringerer Affinität zu verdrängen. Eine erneute Immobilisierung ist durch Inkubation mit konzentrierter Enzymlösung möglich, wodurch das Mannosid wieder verdrängt wird [56]. Eine schnellere Methode ist ein pH-Shift auf pH 1,0 mit 0,3 M Glycin-Lösung. Durch diesen Prozeß wird die Bindungskapazität des Lektins nicht beeinflußt, nach erneuter Inkubation kann die ursprüngliche Enzymaktivität wieder erreicht werden. Für die Elution des Lektins muß zunächst das Co^{3+} mit SDS/ β -Mercaptoethanol zu Co^{2+} reduziert werden [67], anschließend kann mit 50 mM EDTA-Lösung eluiert werden. Bei dieser Behandlung werden sowohl Con A als auch Invertase eluiert (siehe Abbildung 3.3).

3.5.3 Selektive Bindung und Elution von Invertase und Glucose-Oxidase

Die Kombination beider Verfahren ist auf dem gleichen Träger möglich. Zur Saccharose-Analytik werden Invertase und Glucose-Oxidase nach den oben beschriebenen Verfahren co-immobilisiert (siehe Abbildung 3.3). Die mit den Enzymen präparierte chelatisierende Sepharose wird in einer Enzymkartusche in ein FIA-System mit amperometrischer Sauerstoffelektrode integriert (siehe Abbildung 2.2). Ein solches System kann zur Analytik von Glucose und Saccharose genutzt werden: Abbildung 3.4 verdeutlicht das

Reaktionsschema der Spaltung von Saccharose und die Detektion der entstehenden Glucose.

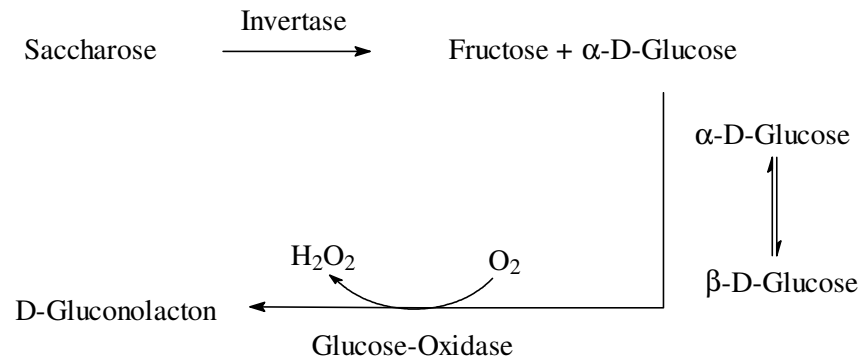


Abb. 3.4: Enzymatische Detektion von Saccharose mit Invertase und Glucose-Oxidase

Durch die Detektion des gelösten Sauerstoffs ist somit nur bei Anwesenheit von Glucose-Oxidase mit Meßsignalen zu rechnen. Saccharose kann nur nachgewiesen werden, wenn sowohl Invertase als auch Glucose-Oxidase vorliegen. In einzelnen Schritten werden beide Enzyme vom Träger eluiert und anschließend mit frischer Enzymlösung neu inkubiert. Nach jedem Inkubations- oder Elutionsschritt werden nacheinander Glucose und Saccharose bestimmt, um festzustellen, welche Enzyme sich auf dem Träger befinden. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

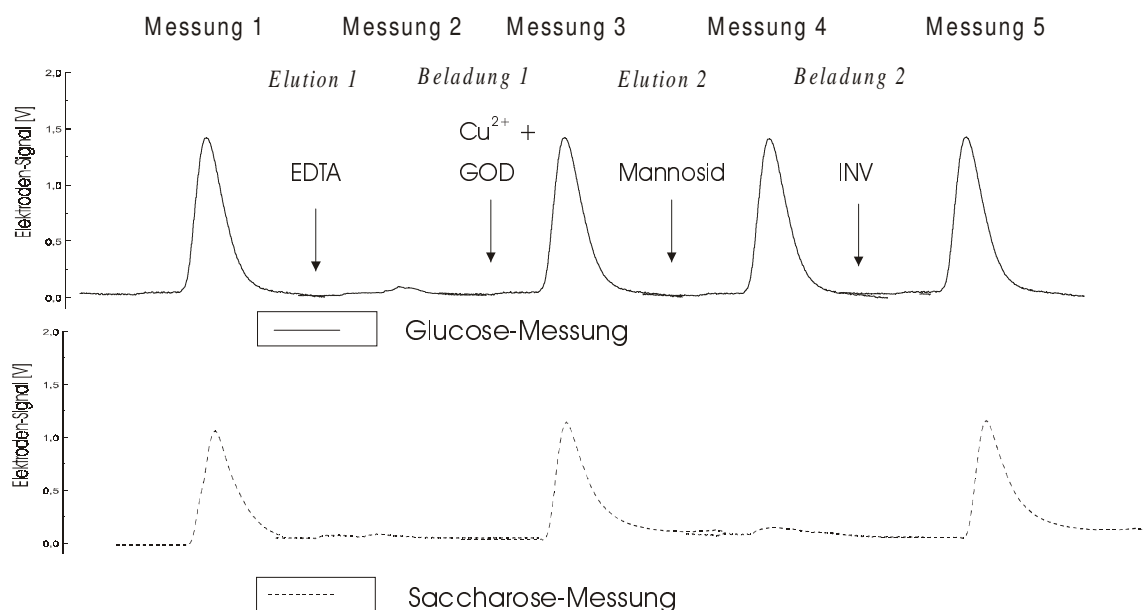


Abb. 3.5: Anwendung der selektiven Immobilisierungs- und Elutionsmethode für die Messung von Saccharose und Glucose

Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis der Messung von Glucose und Saccharose mit dem kombinierten Immobilisierungsverfahren. Mit Invertase und Glucose-Oxidase auf dem Träger erhält man sowohl bei der Glucose-Messung (oberer Teil von Abbildung 3.5) als auch bei der Saccharose-Messung (unterer Teil von Abbildung 3.5) die entsprechenden Signale (Messung 1). Nach den ersten Peaks wird die Kartusche mit EDTA-Lösung gespült: Die gebundenen Cu^{2+} -Ionen werden gemeinsam mit der Glucose-Oxidase eluiert. Die folgende Messung 2 zeigt weder für Glucose noch für Saccharose Signale, ein Beweis für die vollständige Elution der Glucose-Oxidase. Die Invertase befindet sich weiterhin auf dem Träger, die Reaktion kann jedoch mit der amperometrischen Sauerstoffelektrode nicht detektiert werden.

Nach Beladung 1 mit Cu^{2+} -Ionen und Inkubation mit frischer Glucose-Oxidase-Lösung können wieder Signale mit beiden Zuckern detektiert werden (Messung 3). Wie erwartet ist die Invertase weiterhin aktiv und ist nicht durch die Behandlung mit EDTA eluiert worden. Die Bindung von Invertase kann durch Elution 2 mit α -Methyl D-mannosid-Lösung gelöst werden. Das Mannosid mit der größeren Affinität zu Con A verdrängt dabei das Glykoenzym [56]. Bei der anschließenden Messung 4 kann als Beweis für die vollständige Elution der Invertase kein Signal für Saccharose mehr detektiert werden. Nach erneuter Inkubation mit konzentrierter Invertase-Lösung können wieder Signale für beide Zucker aufgenommen werden (Messung 5).

Die Messungen zeigen, daß die Kombination von Con A mit chelatisierender Sepharose die selektive Immobilisierung und Elution von zwei Enzymen auf dem gleichen Trägermaterial ermöglicht. Die Verbindung mit einem FIA-System gestattet die Automation der beschriebenen Elutions- und Immobilisierungsschritte. Damit könnte ein intelligentes Sensorsystem aufgebaut werden, das selbständig deaktivierte Enzyme ersetzt oder sich auf neue Analyten umstellt.

3.6 Bioaffinity Layering

3.6.1 Con A / Glykoenzym

Con A besitzt vier Bindungsstellen für Glykosylreste, so daß sich mit Hilfe des Lektins Schichten von Enzymen aufbauen lassen. Hierzu wird auf dem gebundenen Lektin wechselweise eine Schicht Glykoenzym und eine Schicht Con A aufgebracht, das sogenannte „Bioaffinity Layering“. Der Vorgang kann mehrere Male wiederholt werden, so daß ein Netzwerk von Enzym- und Lektinschichten entsteht [46, 47, 68]. Der Vorteil dieser Immobilisierungsmethode liegt in einer erhöhten Enzymaktivität und -stabilität. Bei Invertase konnte nach sieben Schichten eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 250 erreicht werden [68]. Ein ähnliches Verfahren zur Herstellung von hochaktiven Invertase-Immobilisaten wird von P. Gemeiner et al. beschrieben [69]. Die Bildung von Schichten aus Glucose-Oxidase und Peroxidase und Untersuchungen zur Diffusion werden in der Literatur beschrieben [70, 71].

3.6.2 Anti-Enzym-Antikörper / Enzym

Analog zu Kapitel 3.6.1 läßt sich das Bioaffinity Layering-Verfahren auch mit Antikörpern anstelle des Lektins Con A realisieren. Die Verwendung von Antikörpern bietet die Möglichkeit, auch nicht-glykosylierte Enzyme in Schichten immobilisieren zu können und so die Aktivität und Stabilität des Immobilisats zu steigern. Polyklonale Antikörper können Enzyme an unterschiedlichen Stellen binden. Die Ausbildung der Netzwerkstruktur erfolgt über die zwei Bindungsstellen des Antikörpers.

Zunächst werden Antikörper kovalent auf CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert, anschließend erfolgt die Inkubation mit dem entsprechenden Enzym. Auf dieser Schicht Enzym können wiederum Antikörper gebunden werden, die mit ihrer zweiten Bindungsstelle eine weitere Schicht Enzym binden können. Abbildung 3.6 zeigt eine schematische Darstellung dieses Immobilisierungsverfahrens.

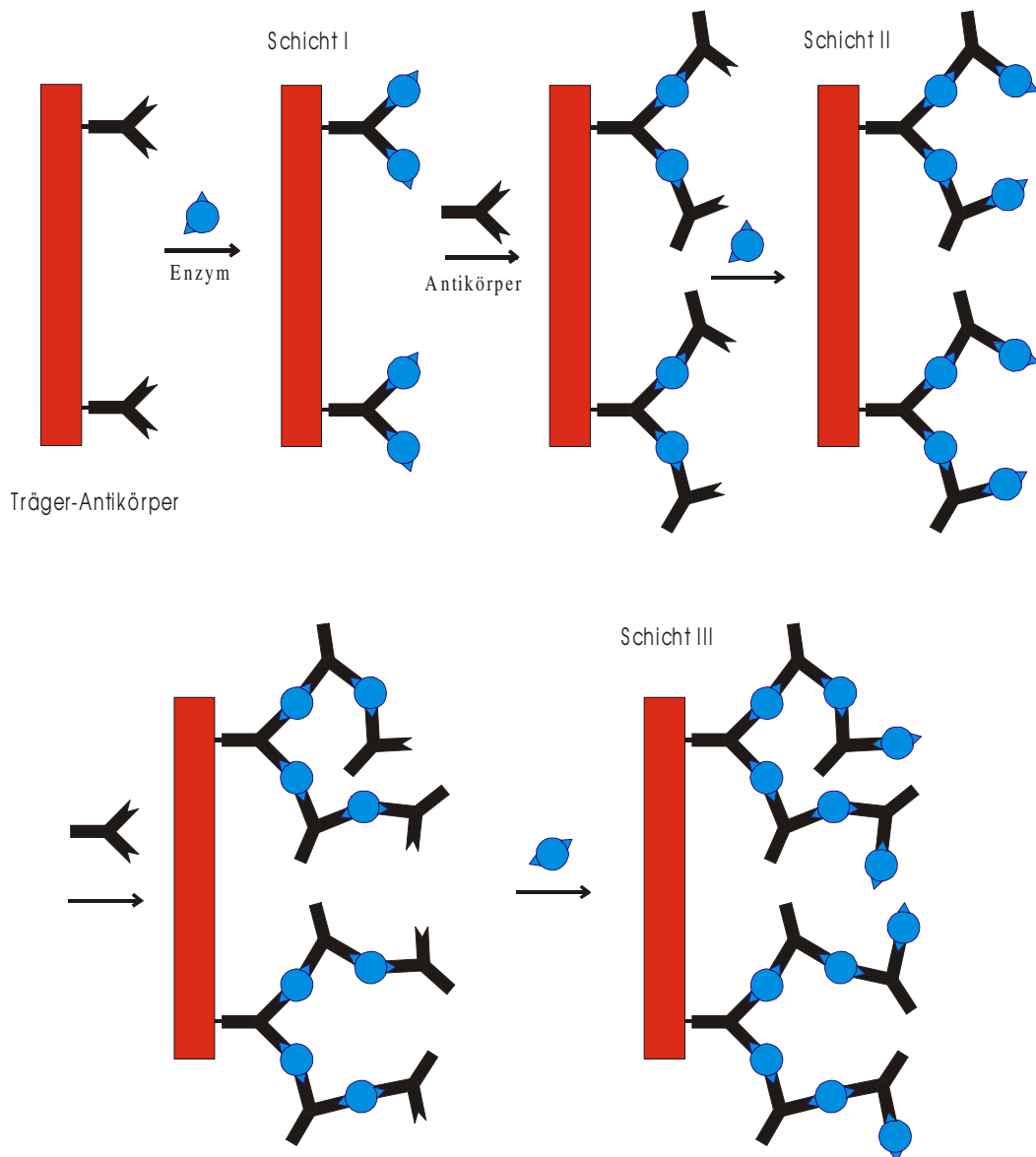


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Immunoaffinity Layering mit Anti-Enzym-Antikörpern

Im folgenden wird das Immunoaffinity Layering-Verfahren mit polyklonalen Anti-Enzym-Antikörpern gegen Glucose-Oxidase und Peroxidase beschrieben, die aus Kaninchen isoliert wurden [64, 72]. Die Antikörper werden auf 1 ml CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert und mit 70 U Glucose-Oxidase oder 150 U Peroxidase für 12 Stunden bei 20°C inkubiert [72]. Es wird wechselweise mit Antikörpern und Enzym inkubiert, bis die gewünschte Anzahl Schichten erreicht ist.

Nach der Ausbildung jeder Schicht wird das Trägermaterial in einer Enzymkartusche in ein FIA-System integriert. Dabei können Veränderungen in der Aktivität (=Sensitivität) des Systems festgestellt werden.

3.6.3 Immunoaffinity Layering von Glucose-Oxidase

Zur Charakterisierung des Immobilisats wird ein FIA-System mit amperometrischer Detektion des gelösten Sauerstoffs nach Abbildung 2.2 verwendet.

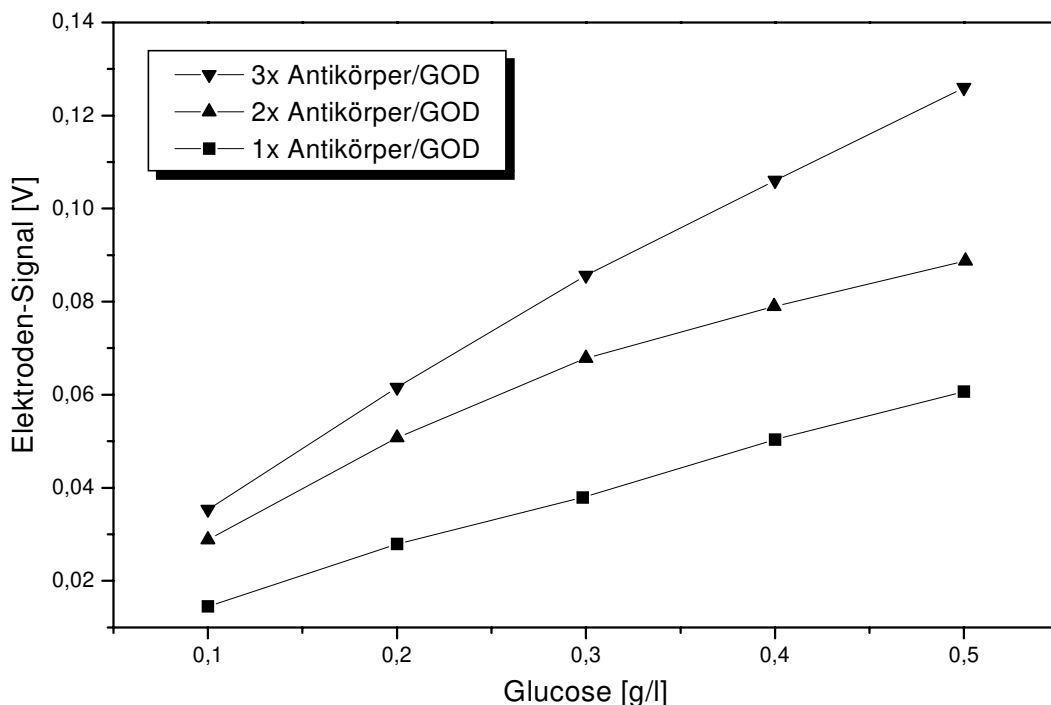


Abb. 3.7: Messung mit einer Glucose-Oxidase-Kartusche mit 1, 2 oder 3 Schichten Antikörper/Enzym. Volumenstrom 1,0 ml/min, Probenvolumen 30 μ l [72]

Abbildung 3.7 zeigt die steigenden Meßsignale an der Sauerstoffelektrode mit jeder Schicht Antikörper/Enzym. Bei einer Glucose-Konzentration von 0,5 g/l nimmt die Signalthöhe mit jeder Antikörper/Enzym-Schicht um 50 % zu. Nach Inkubation mit sechs Schichten Antikörper/Enzym konnte die Aktivität des Immobilisats um mehr als das 20fache gesteigert werden [64]. Es ist möglich, mit polyklonalen Anti-Enzym-Antikörpern ein Netzwerk ähnlich Con A/Glykoenzym aufzubauen. Die Zunahme der Aktivität mit

weiteren Schichten deutet darauf hin, daß die inneren Enzymschichten weiterhin für das Substrat erreichbar sind. Offenbar stellt das Netzwerk keine Diffusionsbarriere für die vergleichsweise kleinen Substrate dar. Die Zunahme der Aktivität ist im Vergleich zum Bioaffinity Layering mit Con A geringer, was darauf hindeuten könnte, daß Con A mit seiner tetrameren Struktur besser für die Ausbildung mehrerer Schichten geeignet ist [73].

Die Bindung an polyklonale oder monoklonale Antikörper stabilisiert Enzyme gegen verschiedene Formen der Deaktivierung [18, 74, 75]. Abbildung 3.8 zeigt die thermische Stabilität von mehreren Schichten Antikörpern/Glucose-Oxidase bei 60°C.

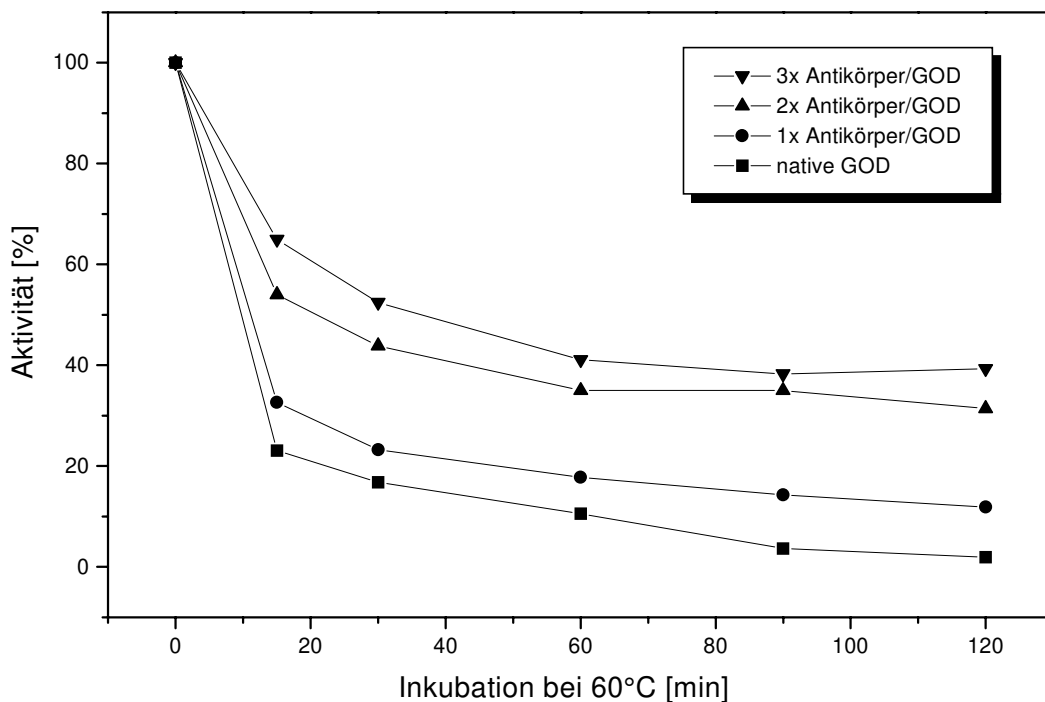


Abb. 3.8: Thermische Stabilität mehrerer Schichten Antikörper/Glucose-Oxidase gegen Denaturierung bei 60°C in 20 mM KPP, pH 7,2 [64]

Die Messung zeigt, daß die thermische Stabilität mit der Anzahl der gebildeten Schichten zunimmt. Das Immobilisat aus drei Schichten Antikörper/GOD weist nach zwei Stunden bei 60°C eine 2,5fach höhere Aktivität auf als der Träger mit einer Schicht Enzym. Bei immobilisierten Enzymen ist allgemein eine höhere thermische Stabilität beobachtet worden, je größer die Anzahl der Bindungen zum Träger ist [76-78]. Dabei spielt es offenbar keine Rolle, ob es sich um kovalente [79] oder nicht-kovalente Wechsel-

wirkungen handelt [20]. Die erhöhte thermische Stabilität der Enzyme im Netzwerk läßt sich mit der größeren Anzahl an Bindungen deuten.

Die Enzym-Antikörper-Bindung besitzt gegenüber der kovalenten Immobilisierung den Vorteil der Reversibilität. Die Bindung läßt sich innerhalb von 15 Minuten durch einen pH-Shift (0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5, 0,15 M NaCl) eluieren. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, geht die Aktivität der Kartusche vollständig zurück.

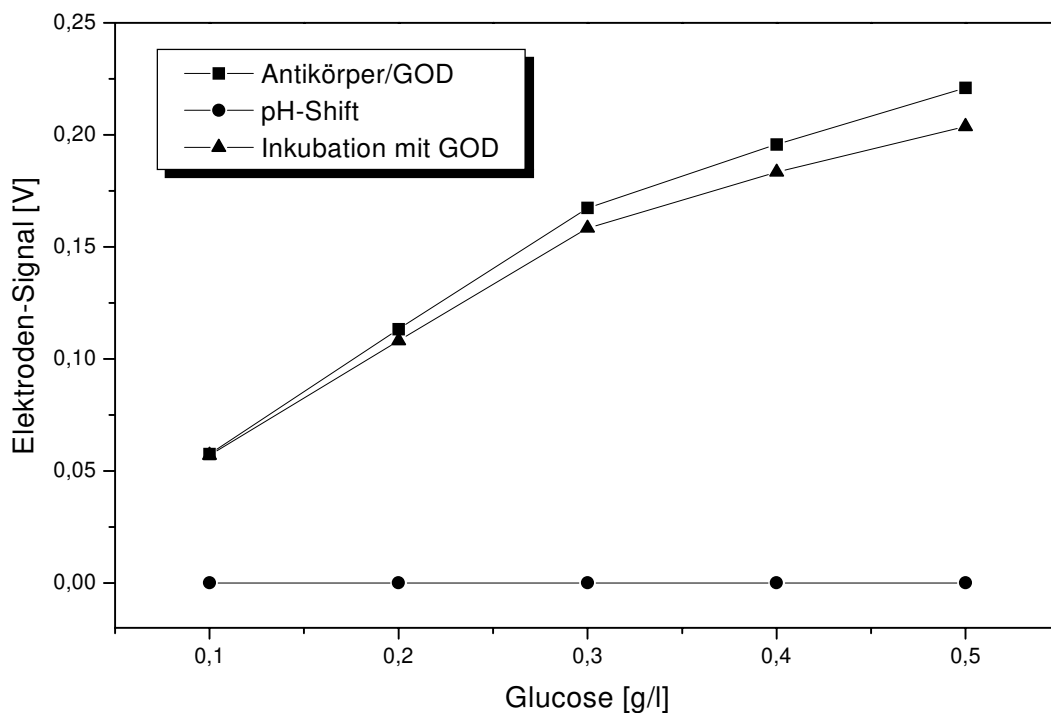


Abb. 3.9: Reversibilität der Bindung. Messung von fünf Glucose-Standards. Elution der Glucose-Oxidase durch pH-Shift und erneute Inkubation mit Enzymlösung

Nach Waschen mit Puffer wird mit frischer Enzymlösung inkubiert, wobei die ursprüngliche Aktivität nahezu wieder erreicht wird. Dieses Verfahren kann bei Biosensoren beispielsweise dazu genutzt werden, deaktivierte biologische Komponenten zu eluieren und automatisch durch frisches Enzym zu ersetzen.

3.6.4 Immunoaffinity Layering von Peroxidase

Um die Anwendbarkeit des in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Verfahrens für andere Enzyme zu überprüfen, wird Peroxidase mit Antikörpern auf CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Das Immobilisat wird in einer Enzymkartusche in ein FIA-System integriert. Für die Bestimmung von H_2O_2 wird die Oxidation von 2-2'-Azino-bis 3-Ethylbenz-thiazoline-6-sulfonsäure (ABTS) photometrisch bei 425 nm in einer Durchflußküvette verfolgt [21, 64, 72].

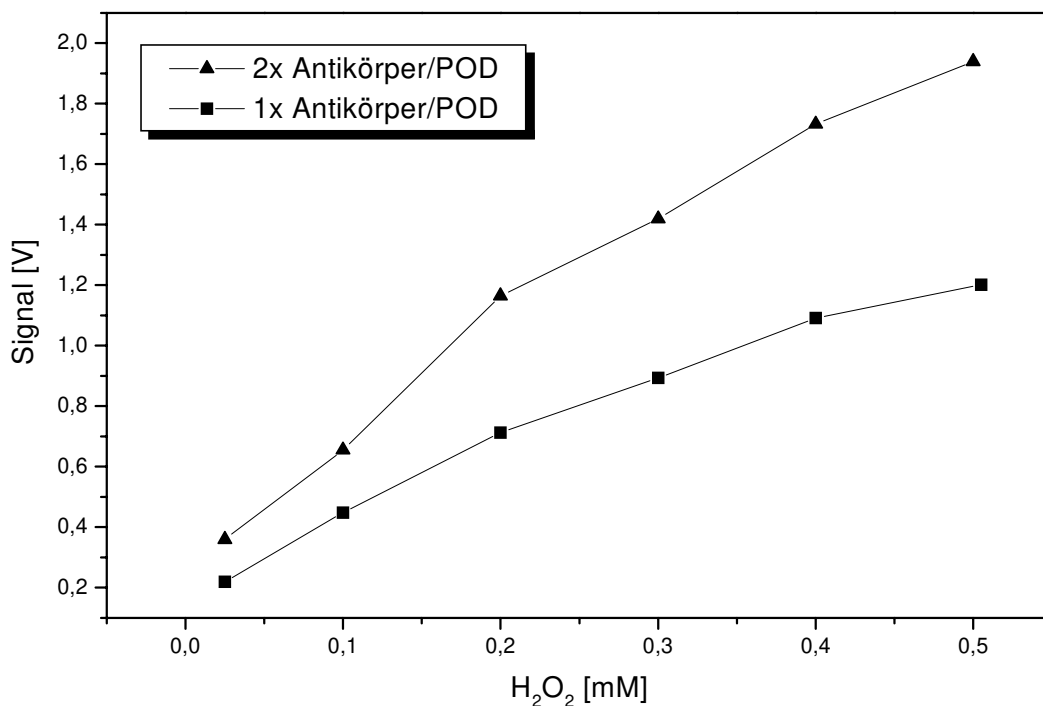


Abb. 3.10 Messung mit einer Peroxidase-Kartusche mit 1 und 2 Schichten Antikörper/Enzym. Flußrate 1,0 ml/min, Probenvolumen 670 μl , Stopped-Flow Methode

Auch bei Peroxidase zeigt sich die Zunahme der Signalthöhe um etwa 50 % von der ersten zur zweiten Schicht Antikörper/Peroxidase. Durch die gesteigerte Sensitivität wird die Bestimmung von H_2O_2 bis in den Konzentrationsbereich von 1 μM möglich (Messung nicht dargestellt, siehe [72]). Die Verwendung von Anti-Enzym-Antikörpern gestattet die spezifische Immobilisierung unterschiedlicher Enzyme. Im folgenden soll der Einsatz eines Immunoaffinity Sensors zur Prozeßanalytik untersucht werden.

3.6.5 Immunoaffinity Layering zur Prozeßanalytik

Um die Stabilität der Immunoaffinity Layering-Präparate für die Anwendung in der Biosensorik zu demonstrieren, wird bei einer Kultivierung von *S. cerevisiae* (siehe Anhang 8.4.1) on line die Glucose-Konzentration gemessen. Durch ein Probenahmemodul [80] wird kontinuierlich zellfreie Probe aus dem Fermenter gezogen. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

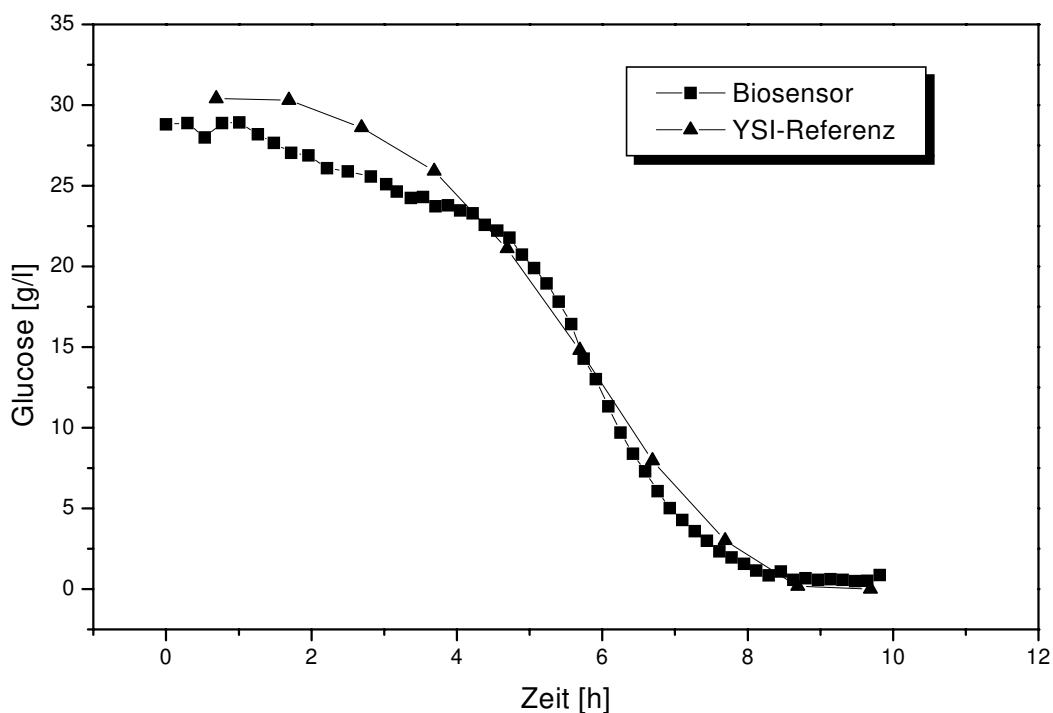


Abb. 3.11: Verlauf der Glucose-Konzentration bei der Kultivierung von *S. cerevisiae*. Messung mit einer Enzymkartusche mit drei Schichten Antikörper/Enzym und Vergleich der Meßwerte mit der Yellow-Spring-Instruments-Referenz (YSI)

Der Verlauf der Glucose-Konzentration kann während der Kultivierungsdauer von zehn Stunden in guter Übereinstimmung mit der YSI-Referenz verfolgt werden. Das Antikörper/Enzym-Immobilisat zeigt eine gute Stabilität bei Raumtemperatur und ist bei Lagerung bei + 4°C über Monate stabil.

3.7 Zusammenfassung

Ziel der Immobilisierung von Enzymen ist es, eine möglichst hohe Enzymaktivität an das Trägermaterial zu binden. Das kann besonders in der Biosensorik notwendig sein, wenn die zur Verfügung stehende Fläche auf elektronischen Bauteilen klein ist [46, 81]. Die irreversible Immobilisierung auf Polymerträgern wie VA-Epoxy oder CNBr-aktivierter Sepharose ist eine einfache und schnelle Methode, bei der jedoch ein Aktivitätsverlust des Enzyms in Kauf genommen wird. Eine reversible Immobilisierungsmethode stellt die Bindung von Enzymen über Metallionen an chelatisierende Sepharose dar. Der Aktivitätsverlust ist minimal und deaktivierte biologische Komponenten können vom Träger eluiert und durch frische Enzyme ersetzt werden. Die Stabilität von Glucose-Oxidase gegen Deaktivierung bei 60°C wurde für verschiedene Metallionen untersucht, wobei die Bindung über Cu^{2+} -Ionen die größte Stabilität zeigte.

Die Kombination von chelatisierender Sepharose mit Con A eröffnet neue Möglichkeiten bei der Immobilisierung von Glykoenzymen. Auf dem gleichen Trägermaterial können verschiedene Enzyme gezielt immobilisiert oder eluiert werden, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Es ist somit möglich, deaktivierte Enzyme in Biosensoren auf einfache Art und Weise zu ersetzen, ohne Eingriffe in die Hardware vornehmen zu müssen. Anhand der Messung von Saccharose und Glucose mit Invertase und Glucose-Oxidase konnte die Elution und erneute Immobilisierung der biologischen Komponenten gezeigt werden.

Mit dem Bioaffinity Layering-Verfahren steht eine leistungsfähige Immobilisierungsmethode zur Verfügung, die die Herstellung hochaktiver und stabiler Immobilisate gestattet. Die Enzymschichten lassen sich sowohl unter Verwendung des Lektins Con A als auch mit Antikörpern aufbauen. Die Wirksamkeit dieser Methode wurde beim Immunoaffinity Layering von Glucose-Oxidase und Peroxidase unter Beweis gestellt. Im Vergleich zur herkömmlichen Immobilisierung konnte bei jeder weiteren Enzymschicht eine Steigerung der Aktivität beobachtet werden. Zugleich war eine erhöhte Stabilität gegenüber der Denaturierung bei 60 °C zu beobachten. Die Immobilisierung von mehreren Enzymschichten ist im Vergleich zu der irreversiblen Immobilisierung jedoch aufwendiger.

4 Analytik von Aminosäuren in Zuckerrübenmelasse

4.1 Die chromatographische Melasseentzuckerung

Melasse fällt als Nebenprodukt bei der Zuckerherstellung aus Zuckerrüben an. Sie ist mit etwa 60% Trockensubstanzanteil hochviskos, tiefbraun und wird hauptsächlich als Futtermittel und Rohstoff für Fermentationen verwendet [82]. Bei der Amino GmbH, Frellstedt, werden jährlich etwa 60.000 t Zuckerrübenmelasse in ihre Bestandteile aufgetrennt. Neben der Gewinnung des 50%igen Zuckeranteils, der als Flüssigzucker anfällt, erlaubt der seit 1983 betriebene chromatographische Prozeß ebenfalls die gezielte Anreicherung anderer Komponenten: „Minor Components“, Rest- und Wertstoffe, die nur zu einem geringen Anteil (<1 %) in der Melasse enthalten sind, deren Gewinnung sich jedoch aufgrund der großen Menge anfallender Zuckerrübenmelasse lohnen kann. Dazu zählen beispielsweise Aminosäuren und Oligosaccharide.

Bei der Amino GmbH wird zur Aufarbeitung von Zuckerrübenmelasse das von Hongisto et al. sowie Heikkilä beschriebene Finnsugar-Trennverfahren eingesetzt [83-85]. Die Melasse wird nach exakter Einstellung des Trockensubstanz-Gehalts, des pH-Wertes und anschließender Enthärtung durch Ionenausschluß-Chromatographie in einzelne Fraktionen getrennt. Durch geschicktes Rückführen von Zwischenprodukten und Fraktionen wird bei gleichem Elutionswasserverbrauch eine auch von modernsten SMB-Anlagen (Simulated-Moving-Bed) nicht übertroffene Zuckerreinigung erzielt [86]. Die SMB-Technologie wird in der Literatur zur chromatographischen Trennung von Stoffgemischen beschrieben [87-90]. Gegenüber SMB-Anlagen weist die in Frellstedt installierte Entzuckerung jedoch eine wesentlich höhere Flexibilität auf, wodurch die gleichzeitige Aufreinigung von mehr als 3 Komponenten erst ermöglicht wird [91].

Die Zuckerrübenmelasse wird zunächst in sechs 80 m³-Chromatographiesäulen in Fraktionen aufgetrennt. Als Trennmateriale dienen monodisperse sulfonierte Polystyrol-DVB-Harze und als Elutionsmittel heißes Wasser (90°C). Durch osmotische Effekte unterliegt die Füllhöhe in den Säulen starken Schwankungen, die bis zu einem halben Meter betragen können [91]. Alle Säulen, obwohl gleich konstruiert und mit dem gleichen Material gefüllt, zeigen ein leicht unterschiedliches Elutionsverhalten. Die komplette

Trennung von der Aufgabe bis zur Elution dauert etwa 6 Stunden. Durch geschickte Prozeßführung ist es jedoch möglich, drei Trennläufe gleichzeitig durchzuführen, um so das Säulenvolumen besser zu nutzen. Damit reduziert sich die Zeit für einen Trennzyklus auf etwa 2 Stunden. Abbildung 4.1 zeigt das Elutionsprofil einer Trennkolonne (TK).

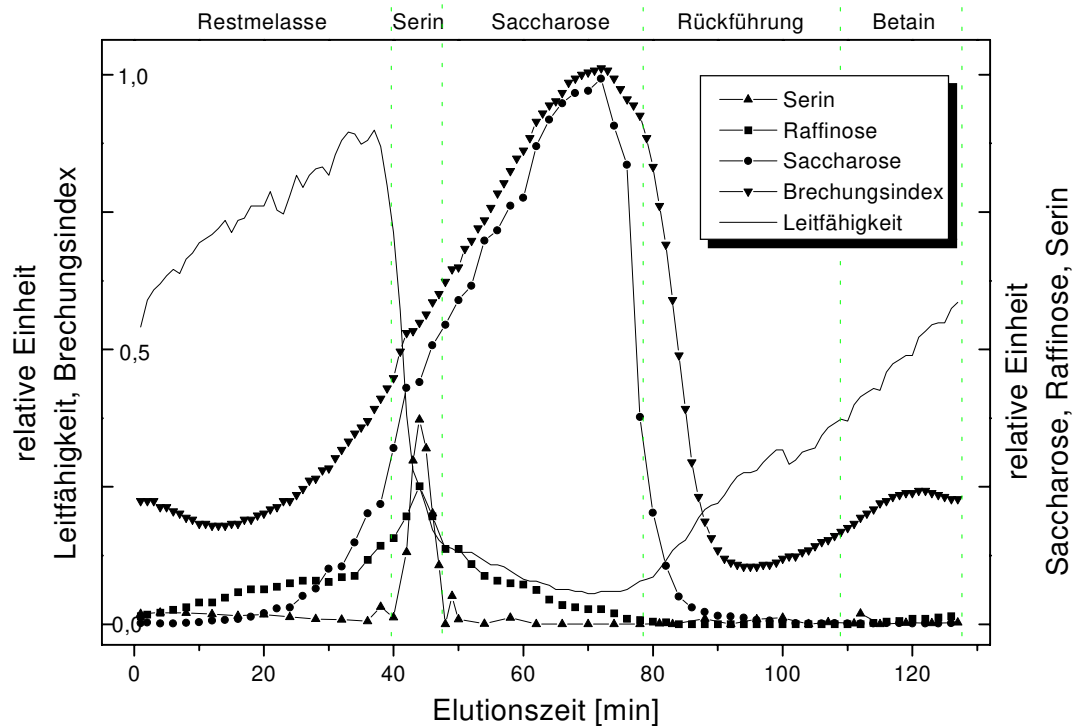


Abb. 4.1: Elutionsprofil einer Trennkolonne der chromatographischen Melasse-entzuckerung, Amino GmbH, Frellstedt, mit Schnittführung der industriellen Anlage: Restmelasse, Serin, Saccharose, Rückführung, Betain (vereinfachte Darstellung)

Die im oberen Teil der Abbildung dargestellten Hauptfraktionen werden von der Prozeßsteuerung geschnitten. So eluiert im Bereich bis zur 40. Minute die Restmelasse-Fraktion, die einen großen Teil der Salze organischer Säuren enthält. Diese Fraktion wird aufkonzentriert und gelangt als teilentzuckerte Melasse in den Handel. Anschließend wird für einen Zeitraum von etwa 5 Minuten die Serin-Fraktion gewonnen, die zu einem geringen Teil aus D-Serin besteht. Es folgt die Saccharose-Fraktion, die etwa bis zur 80. Minute geschnitten wird und bereits Saccharose in hoher Reinheit liefert. Nach einer Rückführfraktion wird Betain gewonnen, anschließend wiederholt sich der Zyklus von vorne. Die Trennkolonnen sind etwa 14-20 Tage kontinuierlich in Betrieb, bis sich die

Trennleistung verschlechtert. Anschließend erfolgt eine Rückspülung des Harzes. Durch Bruch des Polymermaterials entsteht ein geringer Verlust, der durch Zugabe neuen Harzes ausgeglichen wird. Das Harz hat eine Lebensdauer von mindestens 15 Jahren. Die hohen Temperaturen im Trennprozeß erleichtern die Diffusion in die Harzporen und beugen Foulingeffekten vor.



Abb. 4.2: Trennsäulen zur weiteren chromatographischen Aufreinigung der gewonnenen Fraktionen.

4.1.1 Produkte der Melasseentzuckerung

Die aus dem nachwachsenden Rohstoff Melasse gewonnene Saccharose wird nicht kristallisiert, sondern findet als Flüssigzucker in der Lebensmittelindustrie Verwendung. Dabei durchläuft die Saccharose-Fraktion mehrere Aufreinigungsstufen, in denen verbliebene Salze und Farbstoffe abgetrennt werden. Die gewünschte Süße kann durch Invertieren eingestellt werden (Invertzuckersirup). In diesem Prozeß wird Saccharose teilweise durch saure Hydrolyse zu Glucose und Fructose gespalten. Es sind auch farbige

Zuckerlösungen herstellbar, die noch einen Teil der Melasseinhaltsstoffe enthalten und z. B. für die Herstellung von Lebkuchen eingesetzt werden [92].

Die gewonnenen L-Aminosäuren werden als Pharmawirkstoffe in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Sie werden beispielsweise Infusionslösungen zugesetzt, finden sich aber auch in speziellen Nahrungsergänzungsmitteln. Betain ist sowohl als Pharmawirkstoff als auch als Futtermittelzusatz gefragt [92]. L-Tryptophan wird nicht direkt aus der Melasse gewonnen, sondern in einem Biotransformationsprozeß aus L-Serin und Indol hergestellt. Aus der im Trennprozeß gewonnenen D- + L-Serin-Lösung wird nach Aufreinigung an einem sauren Kationentauscher das Racemat D/L-Serin auskristallisiert und als Pharmawirkstoff vermarktet, die erhaltene L-Serin-Lösung kann zu L-Serin aufgereinigt werden oder für die enzymatische Umsetzung verwendet werden [93, 94]. Das nach Aufreinigung und Kristallisation gewonnene L-Tryptophan wird z. B. als natürliches Antidepressivum und Sedativum verwendet [92]. Mit ähnlichen Trenn- und Aufreinigungsschritten lassen sich weitere in der Melasse enthaltene Aminosäuren gewinnen.

4.1.2 Probleme der Prozeßführung

Die Prozeßführung basiert auf physikalischen Parametern, die on line gemessen werden: dazu gehören Dichte, Leitfähigkeit, pH-Wert und Temperatur. Durch densitometrische Messung des Trockensubstanzgehaltes ($1^\circ\text{Bx} \hat{=} 1 \% \text{ TS}$) und durch Bestimmung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht im Polarimeter ($1^\circ\text{S} \hat{=} 1 \% \text{ Saccharose}$) läßt sich durch Bildung des Quotienten $Q_z = \frac{^\circ\text{S}}{^\circ\text{Bx}}$ die Reinheit der Saccharose-Lösung bestimmen. Für Saccharose ist somit eine schnelle On-line-Analytik verfügbar, die die Saccharose-Konzentration im Trennprozeß, einen zur Prozeßsteuerung wichtigen Parameter, bestimmen kann. Diese Analytik liefert jedoch keine Absolutwerte und wird durch alle Melasseinhaltsstoffe gestört, die ebenfalls den Brechungsindex oder die Ebene des polarisierten Lichtes verändern (siehe Kapitel 5.2). Dazu zählen neben Aminosäuren andere Saccharide wie Raffinose. Diese Komponenten kommen jedoch im Vergleich zu Saccharose nur in geringer Konzentration in der Melasse vor, so daß die Meßmethodik eine recht gute Abschätzung erlaubt.

Für die Gewinnung von D/L-Serin, L-Serin und anderen Aminosäuren ist zur Zeit keine On-line-Analytik verfügbar, es werden nur physikalische Parameter zur Prozeßsteuerung

herangezogen. Das Elutionsverhalten der Aminosäuren im Prozeß wird aufgrund von Erfahrungswerten abgeschätzt und in regelmäßigen Abschnitten durch Probenahme und Analyse im Labor kontrolliert. Zur Analytik des Trennprozesses wird ein Aminosäure-Analyser (siehe Anhang 8.8.1) verwendet, der für die Messung einer Probe etwa 60 Minuten benötigt. Zur Charakterisierung einer Fraktion werden etwa 10-15 Proben über Nacht analysiert, d.h. es würde mit einer zeitlichen Verzögerung von mindestens 24h festgestellt werden, ob die Trennung optimal verläuft. Durch die zahlreichen Rückführ-Fractionen wird sichergestellt, daß nur wenig Verluste an Serin auftreten. Die Reinheit, Ausbeute und Konzentration der hier gewonnenen Serin-Fraktion hängt von der optimalen Schnittführung ab. Im anschließenden Aufreinigungsprozeß müssen alle Verunreinigungen und das Prozeßwasser aus dieser Serin-Fraktion wieder entfernt werden. Dieses Verfahren ist mit einem großen Einsatz von Energie und Prozeßwasser, sowie der Produktion signifikanter Abwassermengen verbunden. Mit der Etablierung einer Prozeßanalytik für Serin wäre somit eine deutliche Kostenreduktion und Umweltentlastung möglich.

4.2 Analytik von D/L-Serin in Zuckerrübenmelasse

L-Serin gehört zur Gruppe der nichtessentiellen Aminosäuren, d. h. es muß nicht durch die Nahrung aufgenommen werden, sondern kann vom menschlichen Organismus synthetisiert werden. Dort ist es in der Lage, Eisen zu binden und durch die Membranen der Zellen zu schleusen [95]. Serin hat als Phosphorsäure-Ester physiologische Bedeutung und kann sich durch die Hydroxylgruppe am Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligen.



Abb. 4.3: Strukturformel von D- und L-Serin

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, gelangt das bei der Melasseentzuckerung gewonnene Serin als Racemat oder L-Serin in den Handel. Derzeit ist jedoch der Biotransformationsprozeß zu L-Tryptophan wirtschaftlich sinnvoller.

4.2.1 Serin-Analytik - Stand der Technik

Die Analytik von Aminosäuren mit High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) wird in der Literatur beschrieben, erfordert aber eine aufwendige Vor- oder Nach-Säulen-Derivatisierung, bevor eine spektrophotometrische Analyse möglich ist [96-98]. Als Standardmethode hat sich der Aminosäure-Analyser (ASA) etabliert, bei dem die Aminosäuren unter Ausnutzung der unterschiedlichen pK_a -Werte voneinander getrennt werden [57] (siehe Kapitel 8.8.1). Mit etwa 30-120 Minuten pro Analyse sind diese Geräte zur Steuerung von schnellen Trennprozessen zu langsam; sie werden folglich zur Qualitätskontrolle eingesetzt. Erste Ansätze zur elektrochemischen Detektion von Aminosäuren werden unter [99-100] beschrieben. Eine Analysenmethode mittels NIR-Spektroskopie wird in [101] beschrieben, jedoch ist diese Methode in stark gefärbten Lösungen wie Melasse nicht anwendbar.

4.2.2 Zielsetzung

Die Serin-Fraktion eluiert, abhängig von der Trennkolonne, über einen Zeitraum von vier bis sechs Minuten (siehe Abbildung 4.1). Wie in Kapitel 4.1.2 erläutert, steht zur Zeit keine schnelle Möglichkeit zur Serin-Analytik zur Verfügung, die zur Steuerung des Trennprozesses genutzt werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Biosensors, der eine schnelle Serin-Analytik ermöglicht und ebenfalls zur Prozeßsteuerung einsetzbar ist. Die Schritte, die für den Aufbau eines solchen Systems durchlaufen werden, sind [30]:

- Auswahl geeigneter Enzymsysteme und Transducer
- Immobilisierung der Enzyme
- Optimierung der Anwendungsbedingungen
- Integration von Enzym und Transducer in ein FIA-System
- Optimierung der automatischen Analysen
- Ankopplung des Systems an den industriellen Chromatographieprozeß

4.2.3 D-Aminosäure-Oxidase

Nach ersten Versuchen mit L-Aminosäure-Oxidase (L-ASOD) als biologischer Komponente hat sich gezeigt, daß im Bereich der Serin-Fraktion etwa zehn L-Aminosäuren in unterschiedlicher Konzentration eluieren. Die L-Aminosäure-Oxidase aus *Crotalus atrox* setzt kein L-Serin um [19], so daß mit diesem Enzym kein L-Serin-Sensor aufgebaut werden konnte. Nur wenige Aminosäuren, wie Serin und Tyrosin, racemisieren teilweise aufgrund ihrer CH-Acidität bei den hohen Temperaturen (bis zu 98°C) und dem hohen pH-Wertes (bis zu pH 11,9), die während der Carbonatation (Kalkung mit CaCO₃ und CO₂ zur Abtrennung der Nichtzuckerstoffe) des Rohsaftes in der Zuckerfabrik auftreten [92]. Diesen Umstand kann man sich für die Entwicklung eines Biosensors zunutze machen, indem man das D-Enantiomer des Serins bestimmt. Wenn eine D-Aminosäure-Oxidase als biologische Komponente eingesetzt wird, sind keine Querempfindlichkeiten zu vorhandenen L-Aminosäuren zu erwarten. Die D-Aminosäure-Oxidase aus *Trigonopsis*

variabilis wird im industriellen Maßstab zur Oxidation von Cephalosporin C zu 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACA) genutzt und setzt ebenfalls D-Serin um [102]. Das Immobilisat wird in einer Enzymkartusche in ein FIA-System mit amperometrischer Sauerstoffelektrode integriert. Abbildung 4.4 zeigt die Kalibrationsfunktion des Biosensors.

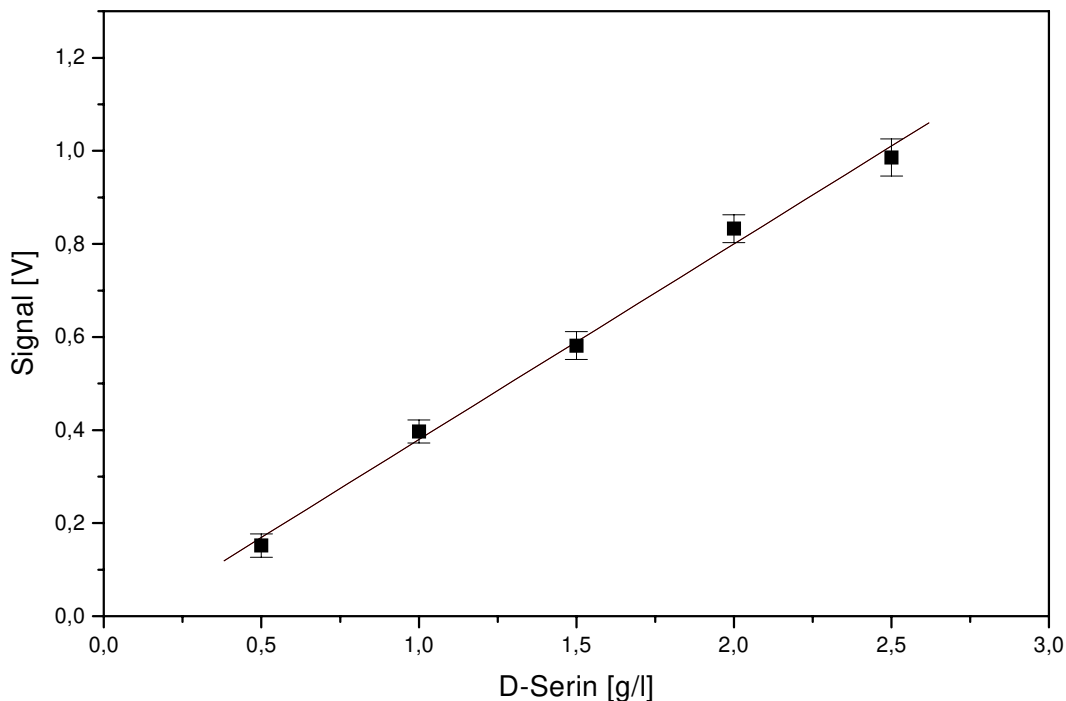


Abb. 4.4: Kalibrationsfunktion des Sensors mit D-Aminosäure-Oxidase, Volumenstrom 1,4 ml/min [47]

Die Messungen zeigen, daß der Sensor zur Bestimmung von D-Serin in Standards im Konzentrationsbereich von 0,5 – 2,5 g/l geeignet ist. Die Zeit für eine Messung beträgt etwa 5 Minuten und stellt damit eine deutlich schnellere Analytik als HPLC oder ASA dar. Die D-Aminosäure-Oxidase aus *Trigonopsis variabilis* setzt D-Serin neben weiteren D-Aminosäuren um. Es soll zunächst die Querempfindlichkeit des Enzyms zu anderen D-Aminosäuren untersucht werden. Dazu werden Proben der Serin-Fraktion in Abständen von 90 Sekunden vom chromatographischen Trennprozeß genommen. Die Proben enthalten eine Reihe L-Aminosäuren, einen Anteil D-Serin sowie D-Tyrosin und werden

mit dem Biosensor analysiert. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

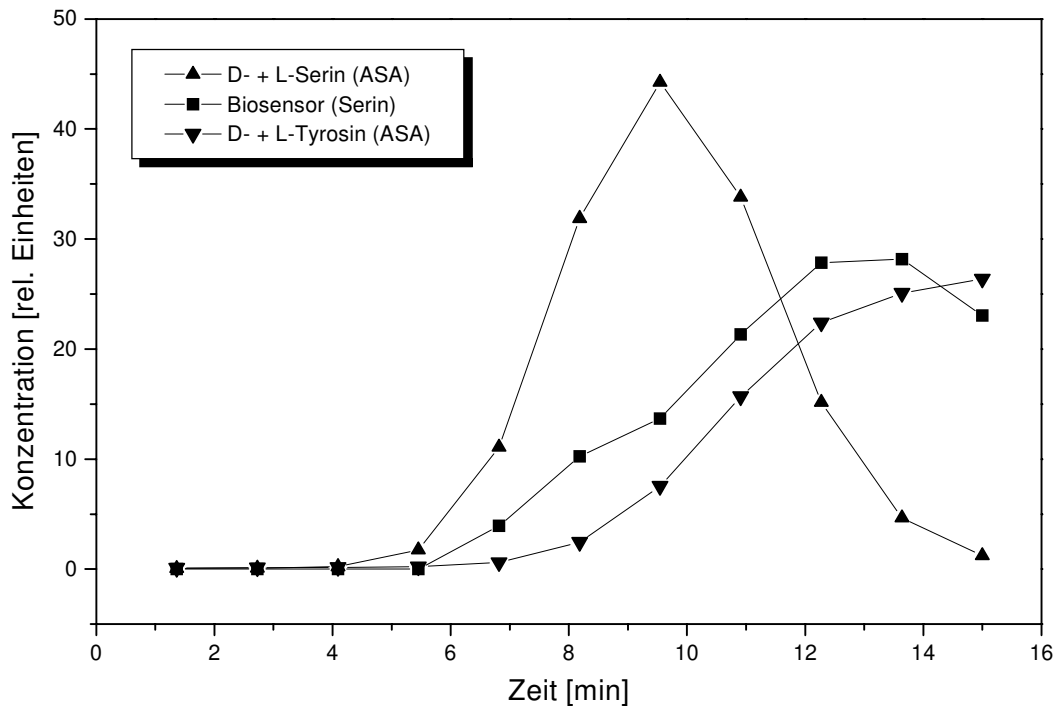


Abb. 4.5: Eluatproben aus der Serin-Fraktion. Meßwerte des Biosensors mit D-Aminosäure-Oxidase und Vergleich der Werte mit der Referenzanalytik (ASA) [47]

Es ist deutlich zu erkennen, daß der mit dem Biosensor gemessene Verlauf nicht mit dem Verlauf der Serin-Konzentration übereinstimmt, der mit dem Aminosäure-Analyser bestimmt wurde. Die Ursache sind Spuren von D-Tyrosin, welches aufgrund der Enzymspezifität bevorzugt umgesetzt wird. In der Zeit zwischen der 8. und 10. Minute erkennt man lediglich einen leichten Anstieg der Meßwerte, danach überdeckt das D-Tyrosin die D-Serin-Signale.

4.2.4 D-Serin-Dehydratase

Aufgrund der Erfahrungen mit der D-Aminosäure-Oxidase wurde nach einem spezifischeren Enzym gesucht. Eine D-Serin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* setzt D-

Serin zu Pyruvat um. Das Enzym wurde vom Arbeitskreis PD Dr. Lutz Fischer (TU Braunschweig) isoliert und zur Verfügung gestellt. Eine Beschreibung der Isolierung und teilweisen Aufreinigung findet sich im Anhang unter Kapitel 8.5.

Das Enzym reagiert nicht nur mit D-Serin (=100 %), sondern setzt ebenfalls L-Serin (7,9 %), sowie geringe Anteile L- (1,9 %) und (16,3 %) D-Threonin um [22]. D-Threonin liegt jedoch im Eluat nicht vor, so daß keine Querempfindlichkeiten zu dieser D-Aminosäure erwartet werden.

Zur Detektion der Umsetzung von D-Serin zu Pyruvat könnte das entstehende NH_3 bzw. NH_4^+ entweder photometrisch oder über die Änderung des pH-Wertes nachgewiesen werden. Das entstandene NH_3 führte jedoch zu keiner meßbaren pH-Verschiebung, so daß ein zweiter enzymatischer Reaktionsschritt zum Nachweis des Pyruvats untersucht wurde. Als Detektionsreaktion wäre der Einsatz von Pyruvat-Oxidase kombiniert mit einer amperometrischen Sauerstoffelektrode denkbar. Die Methoden erwies sich ebenfalls als nicht empfindlich genug, so daß als zweiter Reaktionsschritt die durch Lactat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion von Pyruvat zu Lactat ausgewählt wurde [22]. Ein Schema dieser gekoppelten enzymatischen Reaktion ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

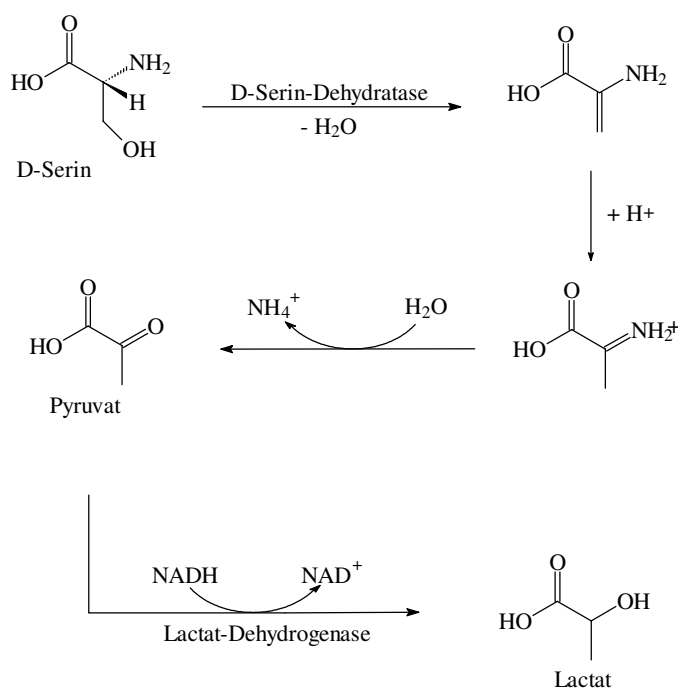


Abb. 4.6: Schema der gekoppelten Reaktion von D-Serin-Dehydratase und Lactat-Dehydrogenase zur Detektion von D-Serin [22]

Im ersten Reaktionsschritt erfolgt eine Desaminierung des D-Serins zu Pyruvat mit Hilfe der D-Serin-Dehydratase. Dabei werden als Zwischenstufen wahrscheinlich ein Aminoacrylat und ein Imin durchlaufen [22]. In der anschließenden Reaktion findet eine Umsetzung des gebildeten Pyruvats zu Lactat statt. Katalysiert wird diese zweite Reaktion durch das Enzym Lactat-Dehydrogenase, wobei Nicotinamidadenindinucleotid (NADH, reduzierte Form) als Coenzym eingesetzt wird. NADH wird in dieser Gleichgewichtsreaktion, deren Gleichgewicht weit auf der Seite des Lactats liegt, zu NAD^+ oxidiert. Die Abnahme der NADH-Konzentration wird photometrisch bei 340 nm verfolgt und ist proportional zur D-Serin-Konzentration. Dadurch, daß in der zweiten enzymatischen Reaktion nur das aus Serin gebildete Pyruvat umgesetzt wird, ist eine Steigerung der Selektivität möglich. Störende Nebenreaktionen, die bei dem ersten Reaktionsschritt auftreten können, werden auf diese Art und Weise nicht detektiert.

4.2.5 Küvettentest

Basierend auf dem in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Multi-Enzymsystem wurde ein photometrischer Assay entwickelt, der die Bestimmung von D-Serin ermöglicht [103]. Die Enzyme werden in diesem Küvettentest nativ eingesetzt und die Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm bestimmt (siehe Anhang 8.6.1). Abbildung 4.7 zeigt die Messung von Proben der Serin-Fraktion mit dem D-Serin-Dehydratase-Assay und den Vergleich der Meßwerte mit dem Aminosäure-Analyser.

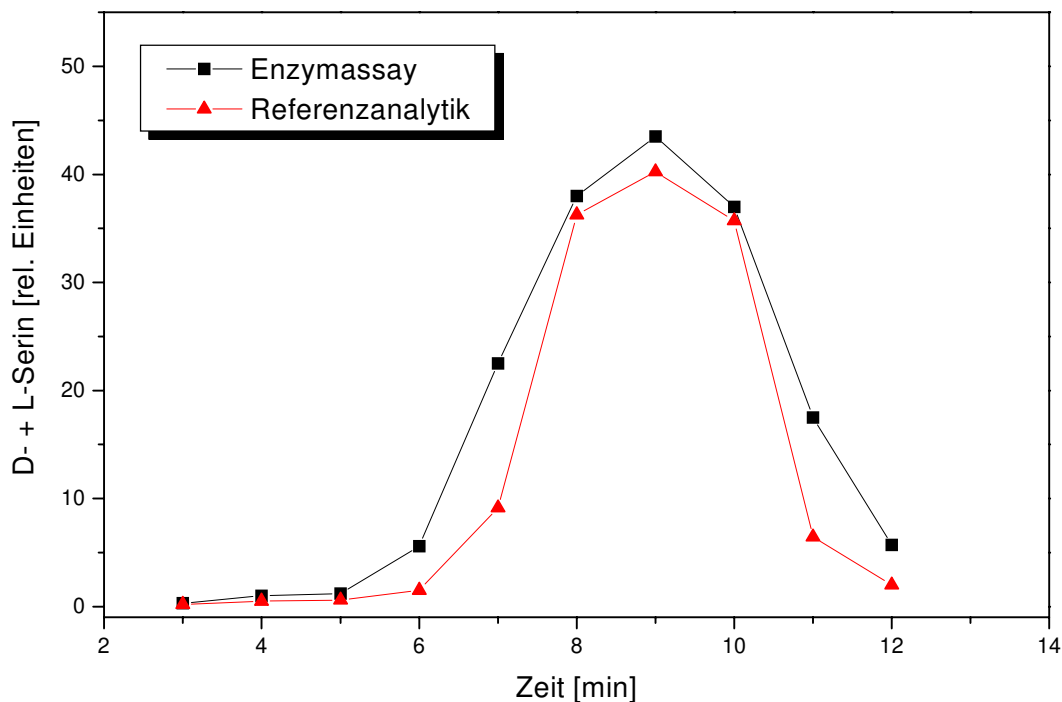


Abb. 4.7: Messung von Eluatproben mit dem Enzymassay und Vergleich der Meßwerte mit der Aminosäure-Analyser-Referenz

Mit der Messung von Proben aus dem chromatographischen Trennprozeß sollte untersucht werden, ob sich das Multi-Enzymsystem zur Analytik von Serin im Eluat der Trennkolonne eignet. Abbildung 4.7 zeigt, daß der Verlauf der Serin-Konzentration gut mit der Referenzanalytik übereinstimmt, die gemessene Serin-Konzentration liegt jedoch im Mittel 40 % über den Referenzwerten. Querempfindlichkeiten zu anderen Aminosäuren (vgl. Abbildung 4.5) sind nicht zu beobachten. Ein Nachteil des beschriebenen Assays ist der hohe Zeitaufwand pro Probe und die ungenaue Auswertung durch die von Hand zu bestimmende Tangentensteigung. Die erwähnten Nachteile sollen durch Immobilisierung der D-Serin-Dehydratase und der Integration in ein FIA-System beseitigt werden. Die Automation der Messungen soll mit dem Ziel verfolgt werden, die Meßzeit zu verkürzen und die Präzision der Messung zu erhöhen.

4.2.6 Integration des Immobilisats in ein FIA-System

Die D-Serin-Dehydratase wurde vom Arbeitskreis Dr. Lutz Fischer auf dem Polymerträger VA-Epoxy immobilisiert (siehe Kapitel 3.1) und für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Um die Aktivität des hergestellten Immobilisats zu untersuchen, wurde ein leicht modifizierter Enzymassay eingesetzt (siehe Anhang 8.6.1). Die Aktivität des frisch hergestellten Immobilisats ist abhängig von der Enzymausbeute bei der Kultivierung und der anschließenden Aufreinigung. Obwohl das Immobilisat unter gleichen Bedingungen hergestellt wurde, lag die Aktivität für verschiedene Ansätze zwischen 20 und 100 U pro g Träger [104].

Für die Optimierung des Sensorsystems wird das Immobilisat in eine thermostatisierbare Enzymkartusche ($V = 1$ ml) gefüllt und in ein FIA-System nach Abbildung 2.2 integriert. Als Transducer wird ein Photometer (340 nm) mit einer Durchflußküvette ($V = 250$ μ l) verwendet, um die Abnahme der NADH-Konzentration zu messen. Jede Probe wird mit NADH und nativer Lactat-Dehydrogenase versetzt. Die Optimierung des Systems ergab folgende Parameter [30]:

- NADH-Konzentration: 7 mM
- Lactat-Dehydrogenase-Konzentration: 100 U pro Probe
- Volumenstrom des Puffers: 0,5 ml/min (50 mM KPP, pH 8,0)
- Temperatur der Enzymkartusche: 32°C

Die eingesetzte NADH-Konzentration soll möglichst gering sein, um die Analysenkosten niedrig zu halten. Gleiches gilt für die nativ zugesetzte Lactat-Dehydrogenase. Der Volumenstrom durch das FIA-System beeinflusst sowohl die Sensitivität als auch die Meßzeit. Bei einem Volumenstrom von 0,5 ml/min ist die Messung einer Probe in etwa 5 Minuten möglich. Obwohl das Temperaturoptimum für native D-Serin-Dehydratase bei 40°C [22] und für native Lactat-Dehydrogenase bei 37°C [19] liegt, wurde als Temperaturoptimum für die gekoppelte enzymatische Reaktion 32°C ermittelt [30]. Abbildung 4.8 zeigt eine Kalibrationsfunktion nach Optimierung der Systemparameter.

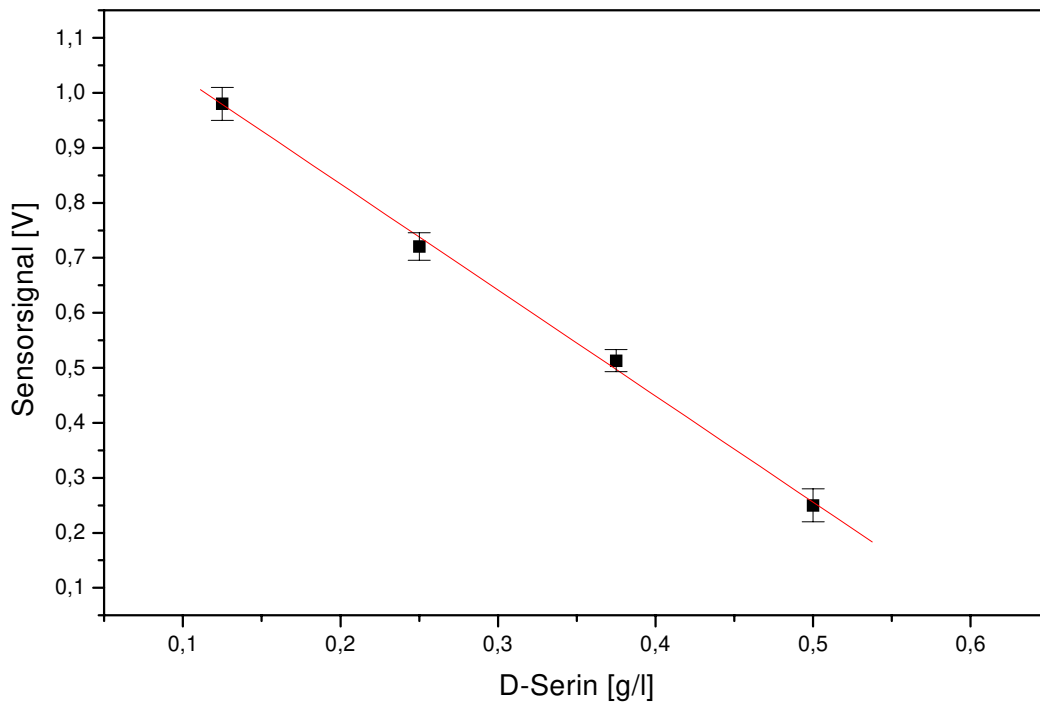


Abb. 4.8: Kalibrationsfunktion für D-Serin im Konzentrationsbereich 0,125 g/l - 0,5 g/l, 7 mM NADH, 100 U LDH pro Standard, $T=32^{\circ}\text{C}$, Volumenstrom 0,5 ml/min [30]

Die in Abbildung 4.8 dargestellte Kalibrationsfunktion hat eine negative Steigung, da das Sensorsignal mit steigender D-Serin-Konzentration abnimmt (= höherer NADH-Verbrauch). Die NADH-Konzentration muß so gewählt werden, daß auch bei der höchsten Serin-Konzentration ein geringes Restsignal zur Auswertung verbleibt. Für die angeführten Meßbedingungen liegt der lineare Bereich des Biosensors bei etwa 0,1 bis 0,5 g/l D-Serin. Die Standardabweichung für 10 Messungen mit einem Standard (0,25 g/l D-Serin) beträgt 1,3 %.

Für die Berechnung der Serin-Konzentration von Proben aus dem Chromatographieprozeß muß sowohl die Verdünnung als auch das Enantiomerenverhältnis (D-Serin/L-Serin = 25:75) beachtet werden. Für die folgenden Messungen werden die Proben 1:10 mit Puffer verdünnt.

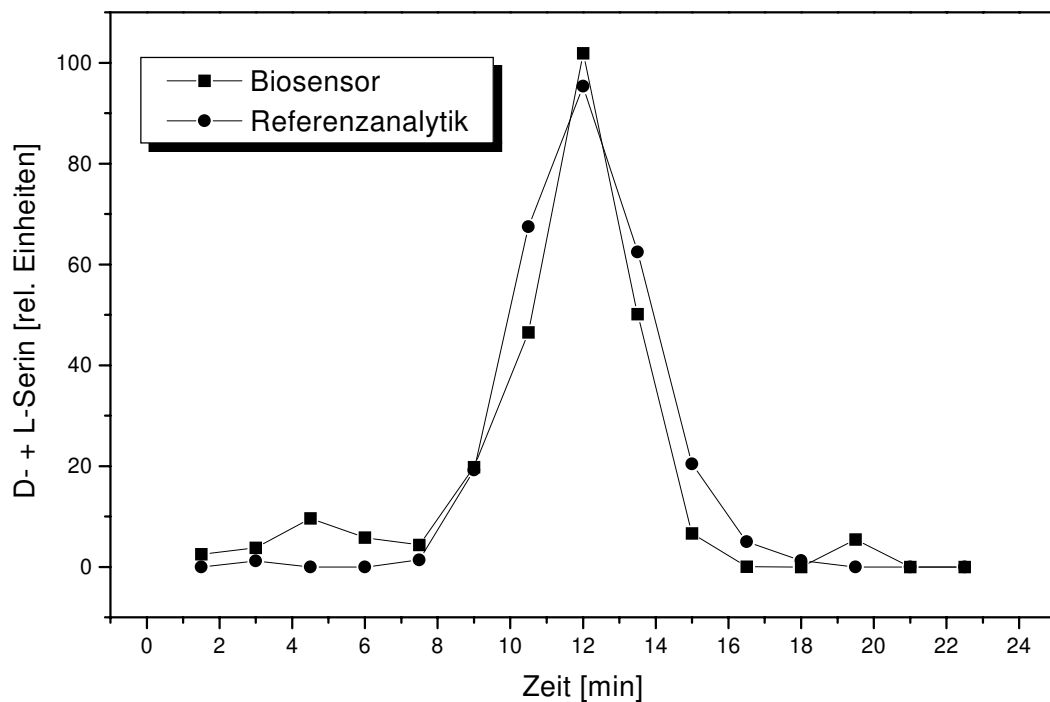


Abb. 4.9: Serin-Konzentration in Eluatproben der TK 4, 7 mM NADH, 100 U LDH pro Standard, $T=32^{\circ}\text{C}$, Volumenstrom 0,5 ml/min und Vergleich der Meßwerte mit der HPLC-Referenz [105]

Bei der Messung kann eine gute Übereinstimmung mit der Referenzanalytik erzielt werden, d.h. das Maximum der Serin-Konzentration und die Peakform werden gut erfaßt. Die mittleren Abweichungen im Vergleich zur Referenzanalytik betragen 20 %. Eine mögliche Fehlerquelle stellt das Enantiomerenverhältnis von D- zu L-Serin dar. Diese und folgende Messungen setzen dieses Verhältnis als konstant voraus [103]. Da es sich bei Melasse um einen Naturstoff handelt, sind Schwankungen im Enantiomerenverhältnis denkbar.

4.2.7 Stopped-Flow-Verfahren

Um eine weitere Verkürzung der Meßzeit bei vergleichbarer Sensitivität zu erreichen, wird der Einsatz eines Stopped-Flow-Verfahrens untersucht. Dabei wird der Trägerstrom, der durch das FIA-System fließt, in dem Augenblick gestoppt, in dem die Probe die Enzymkartusche erreicht hat. Die Probe verbleibt zur Umsetzung 15-60 Sekunden in der Kartusche, anschließend wird der Trägerstrom wieder in Bewegung gesetzt. Die Optimierung des Verfahrens wird in [105] beschrieben.

Nach der Aufnahme einer Kalibrationsfunktion mit fünf Serin-Standards wird die D/L-Serin-Konzentration von Eluat-Proben der Trennkolonnen 8 (TK 8) bestimmt. In dieser Säule wird die im Ionenausschlußprozeß gewonnene Serin-Fraktion weiter aufgereinigt. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

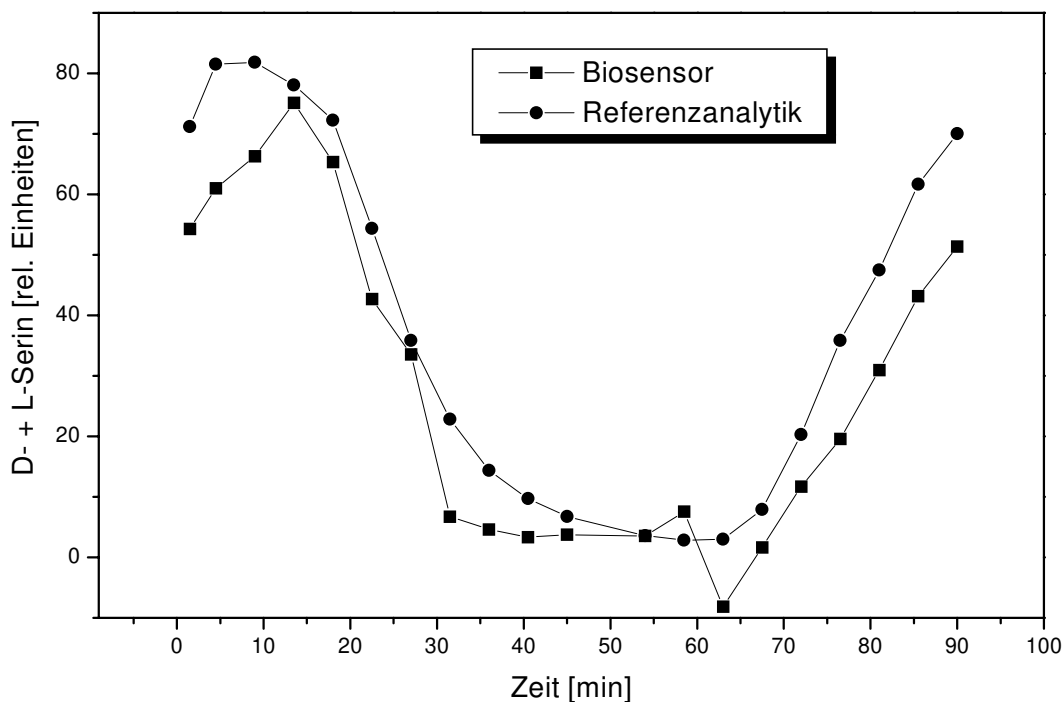


Abb. 4.10: Serin-Konzentration in Eluatproben der Serin-Trennkolonnen 8, Messung mit dem Serin-Biosensor nach Stopped-Flow-Verfahren und Vergleich der Meßwerte mit der Referenzanalytik (ASA) [105]

Abbildung 4.10 zeigt die gute Übereinstimmung zwischen den Meßdaten, die nach dem Stopped-Flow-Verfahren mit dem Biosensor aufgenommen wurden und der Referenzanalytik der Amino GmbH (ASA, siehe Anhang 8.8.1). Der Konzentrationsverlauf des Serins wird gut erfaßt.

Durch den Einsatz des Stopped-Flow-Verfahrens kann die Meßdauer verkürzt und die Sensitivität des Systems gesteigert werden. Die Zeit für eine Messung ohne Stopped-Flow liegt bei 5 Minuten, durch Einsatz des Stopped-Flow-Verfahrens kann sie auf etwa 2 Minuten reduziert werden [105]. Die Standardabweichung für diese Meßmethode liegt mit 1,7 % (10 Messungen mit einem 0,25 g/l D-Serin Standard) in der gleichen Größenordnung wie bei Messungen ohne Stopped-Flow (1,3 %) [30, 105].

4.2.8 Co-Immobilisierung der Lactat-Dehydrogenase

Zur weiteren Optimierung des Biosensors soll die bislang nativ zugesetzte Lactat-Dehydrogenase ebenfalls immobilisiert werden. Dadurch sollen die Analysenkosten gesenkt und die Probenvorbereitung vereinfacht werden. Zunächst wird Lactat-Dehydrogenase auf VA-Epoxy immobilisiert und in einer zweiten Enzymkartusche hinter der D-Serin-Dehydratase in ein FIA-System nach Abbildung 2.2 integriert. Dieses System aus zwei Enzymkartuschen kann zur Detektion von D-Serin verwendet werden. In Versuchen mit Invertase und Glucose-Oxidase hat es sich jedoch als günstig erwiesen, beide Enzyme auf dem gleichen Träger zu co-immobilisieren [47]. D-Serin-Dehydratase und Lactat-Dehydrogenase wurden vom Arbeitskreis PD Dr. Lutz Fischer auf VA-Epoxy co-immobilisiert. Das Immobilisat wird in ein FIA-System nach Abbildung 2.2 integriert und für die folgenden Messungen verwendet. Obwohl die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase mit 2-4 U/g Träger sehr gering ist, reicht die Aktivität aufgrund des niedrigen K_M -Wertes (vgl. Tabelle 2.1) zur Umsetzung des gebildeten Pyruvats aus. Die zur Immobilisierung der Lactat-Dehydrogenase eingesetzte Aktivität war jedoch mit 2000-4000 U sehr hoch, so daß die Optimierung der Immobilisierung Gegenstand weiterer Untersuchungen ist [104].

4.2.9 Schwellenwert der chromatographischen Schnittgrenzen

Die bei der chromatographischen Aufarbeitung von Melasse anfallende Serin-Fraktion erstreckt sich über einen Zeitraum von vier bis sechs Minuten (vgl. Kapitel 4.1). Die Serin-

Konzentration an den Grenzen dieses Intervalls beträgt etwa 2,5 g/l (bei idealer Prozeßführung). Für die Prozeßanalytik wäre es ausreichend zu erkennen, wann dieser Schwellenwert über- oder unterschritten wird. Die Fraktionen mit geringerem Serin-Gehalt (vor und nach der Hauptfraktion) könnten so rechromatographiert werden.

Das Prozeßleitsystem sollte erkennen können, ob die Serin-Konzentration *unter 2,5 g/l* (= Rechromatographieren) oder *über 2,5 g/l* (= Serin-Fraktion) liegt. Für das Multi-Enzym-system kann dieser Schwellenwert über die NADH-Konzentration eingestellt werden. Diese muß so gewählt werden, daß bei der höchsten D-Serin-Konzentration stets ein geringes Restsignal zur Auswertung verbleibt. Setzt man weniger Cosubstrat ein, wird das NADH vollständig umgesetzt und es wird oberhalb einer bestimmten D-Serin-Konzentration kein Signal mehr detektiert. Unterhalb dieser Konzentration verbleibt ein Restsignal durch nicht vollständig umgesetztes NADH. Abbildung 4.11 stellt die Ergebnisse mit diesem Verfahren bei unterschiedlicher NADH-Konzentration dar.

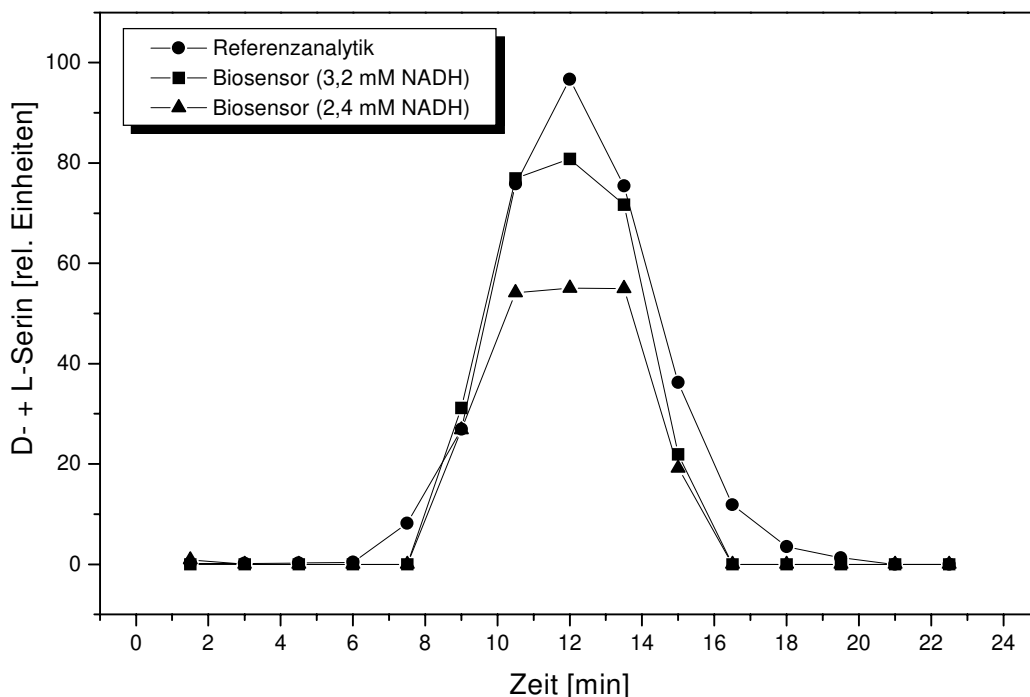


Abb. 4.11: Ermittlung eines Schwellenwertes für Serin, 3,2 mM bzw. 2,4 mM NADH, Vergleich der Meßwerte mit dem Aminosäure-Analyser (Referenz), T=32°C, Messung nach dem Stopped-Flow-Verfahren [105]

Die Messung zeigt, daß auch bei geringerer NADH-Konzentration die Peakform gut

verfolgt werden kann. Zur Entscheidung, ob eine Haupt- oder Rückführfraktion vorliegt, reicht die eingesetzte Menge von 2,4 mM NADH aus. Bei einer noch geringeren NADH-Konzentration sind keine Aussagen mehr über den Konzentrationsverlauf zu machen. Diese Methode ermöglicht eine weitere Reduzierung der Analysenkosten durch Reduktion der eingesetzten NADH-Konzentration. In der Literatur sind Methoden zur Rückgewinnung des Cosubstrats beschrieben, diese sind jedoch im analytischen Maßstab schlecht anwendbar [106].

4.2.10 Modellversuche zur On-line-Analytik

Die in Kapitel 4.2.7 beschriebenen Messungen mit dem Multi-Enzymsystem wurden offline durchgeführt. Um die On-line-Fähigkeit des Biosensors unter Beweis zu stellen, soll in einem Modellversuch der Abbau von D-Serin untersucht werden. Dazu wird in einem gerührten und auf 31 °C temperierten Reaktor ($V= 100$ ml) 0,5 g/l D-Serin und 7,1 mM NADH vorgelegt und die Reaktion nach 30 min durch Zugabe von 1000 U D-Aminosäure-Oxidase (Boehringer) gestartet. Die Probenahme erfolgt kontinuierlich mit 0,2 ml/min, alle 280 Sekunden wird die D-Serin-Konzentration mit dem Biosensor bestimmt.

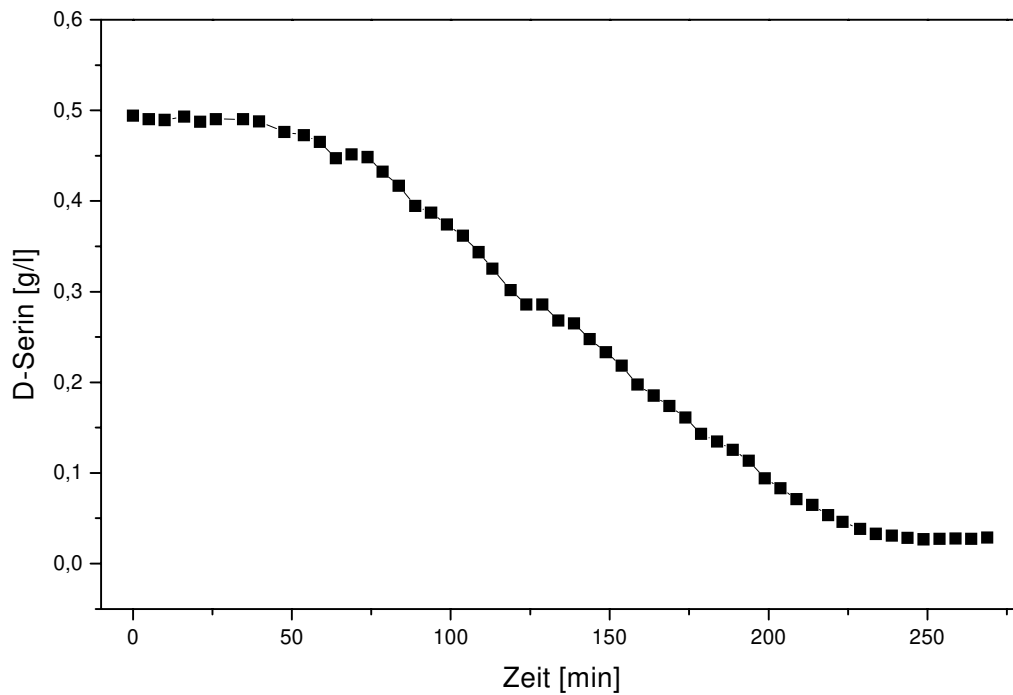


Abb. 4.12: Umsetzung von D-Serin mit D-Aminosäure-Oxidase, Messung mit Biosensor nach Stopped-Flow-Methode [105]

Die Messung zeigt, daß mit dem Biosensor der D-Serin-Abbau gut verfolgt werden kann. Durch die kurze Analysenzeit von 125 Sekunden ist das System zur schnellen Analytik von D-Serin gut geeignet. Für die weitere Charakterisierung des Sensors wird eine Gradientenmischung von L- und D-Serin on line verfolgt. Dazu werden im Gradientenmischer 50 ml 0,3 g/l D-Serin mit 50 ml 0,3 g/l L-Serin gemischt (Zugabe mit 0,2 ml/min), der Volumenstrom aus der Mischkammer beträgt 0,4 ml/min. Die Konzentration c_D des D-Serins zur Zeit t berechnet sich nach:

$$c_D(t) = c_{D_0} - \left(t \cdot \frac{Q}{2V_m} \cdot c_{D_0} \right)$$

mit

$C_D(t)$ = c(D-Serin) zur Zeit t [g/l]

c_{D0} = c(D-Serin) zur Zeit $t=0$ [g/l]

Q = Flußrate aus Mischkammer [ml/min]

V_m = Volumen der Mischkammer [ml]

t = Zeit [min]

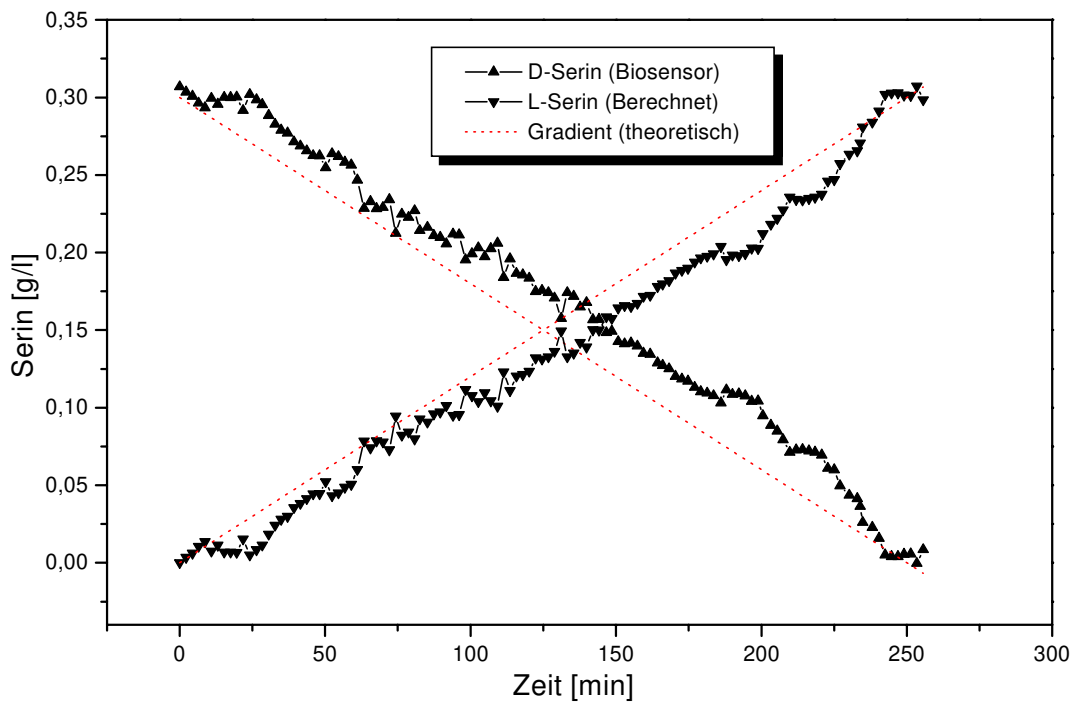


Abb. 4.13: Gradientenmischung von 0,3 g/l D-Serin mit 0,3 g/l L-Serin. Analyse der D-Serin Konzentration mit dem Biosensor, Berechnung der L-Serin-Konzentration aus dem Meßwert für D-Serin, Gepunktet: berechneter Gradient

Die Messungen zeigen, daß das System bei einer mittleren Abweichung von 5 % für die Dauer des Versuchs die D-Serin-Konzentration gut verfolgen kann. Für die Überwachung der Schnittgrenzen der Serin-Fraktion, die innerhalb von 4-6 Minuten von der Säule eluiert, ist das System jedoch nicht schnell genug, da in dem zur Verfügung stehenden Zeitraum nur zwei bis drei Meßwerte aufgenommen werden könnten.

4.2.11 Stabilität des D-Serin-Dehydratase-Immobilisats

Für einen Einsatz von Biosensoren in der Industrie ist die Langzeitstabilität von entscheidender Bedeutung. Die Stabilität der biologischen Komponente erweist sich häufig als limitierender Faktor. Bei nachlassender Aktivität sollte diese schnell und kostengünstig ausgetauscht werden können. Ein Austausch ist bei Verwendung von Enzymkartuschen auf einfache Art und Weise möglich. Um die Lagerstabilität des Immobilisats zu untersuchen, wurde in zeitlichen Abständen die Aktivität bestimmt (vgl. Anhang 8.6.1).

Tab. 4.1: Aktivität der D-Serin-Dehydratase bei Lagerung bei -18°C [105]

Zeit [Tage]	Aktivität D-Serin-Dehydratase im Immobilisat [U/g]	Aktivität D-Serin-Dehydratase im Co-Immobilisat [U/g]
0	33,8	32,2
10	32,5	30,0
15	29,3	27,1

Tabelle 4.1 ist zu entnehmen, daß die Aktivität des Immobilisats bei Lagerung bei -18°C langsam absinkt. In 15 Tagen ist ein Rückgang der Aktivität um 10-15 % zu verzeichnen. Zwischen dem Immobilisat und dem Co-Immobilisat sind keine Stabilitätsunterschiede zu erkennen. Aktivitätsverluste können durch Spannungen beim Einfrieren und Auftauen und eine damit verbundene Schädigung der Enzymstruktur entstehen. Bei Lagerung im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) sind die zu verzeichnenden Aktivitätsverluste mit 30 % für einen Zeitraum von 14 Tagen etwa doppelt so hoch [105]. Eine Aktivität von 10 U/g hat sich unter den Meßbedingungen als untere Grenze für die Anwendung im Biosensor erwiesen. Das Immobilisat kann somit etwa 3 Monate für Messungen verwenden werden, im Dauereinsatz unter Industriebedingungen reduziert sich dieser Zeitraum auf etwa 7 Tage. Das Ziel weiterer Untersuchungen wird deshalb eine verbesserte Langzeitstabilität des Immobilisats sein. Als weitere Möglichkeit könnte die D-Serin-Dehydratase weiter aufgereinigt und lyophilisiert werden, um das Enzym besser bei tiefen Temperaturen lagern zu können und bei Bedarf frisch zu immobilisieren. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob das Enzym durch Zusätze wie Raffinose, Trehalose oder Ectoinen stabilisiert werden kann [107, 108].

4.2.12 Zusammenfassung

Ziel der Arbeiten war die Entwicklung eines Biosensors zur Detektion von Serin in der chromatographischen Melasseentzuckerung. Nach ersten Versuchen mit L-Aminosäure-Oxidase konnte mit der D-Aminosäure-Oxidase aus *Trigonopsis variabilis* ein Enzym gefunden werden, das D-Serin umsetzt und sich zum Aufbau eines D-Serin-Sensors eignet. Die Querempfindlichkeit zu D-Tyrosin, welches in Spuren in den untersuchten Proben

vorhanden ist, und die bevorzugte Umsetzung durch das Enzym führten zu großen Abweichungen bei der Messung von realen Prozeßproben.

Mit dem Multi-Enzymsystem D-Serin-Dehydratase/Lactat-Dehydrogenase ist es gelungen, einen Serin-spezifischen Biosensor zu konstruieren. Beide Enzyme wurden auf dem Polymerträger VA-Epoxy co-immobilisiert und in ein FIA-System integriert. Nach Optimierung der Systemparameter konnte die Meßzeit für eine Probe auf etwa zwei Minuten reduziert und der Chemikalienverbrauch deutlich verringert werden. Mit diesem Sensorsystem wurden erfolgreich der Serin-Konzentrationsverlauf in den Trennkolonnen 1-6, sowie der Kolonne 8 off line bestimmt. Da die Serin-Fraktion nur einen Zeitraum von 4-6 Minuten umfaßt, ist das Sensorsystem für eine Prozeßkontrolle nicht schnell genug.

Im folgenden Kapitel soll deshalb mit der 2D-Fluoreszenz eine schnelle optische Analysenmethode untersucht werden.

4.3 Prozeßanalytik mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Bei vielen industriellen Prozessen ist eine schnelle und verlässliche On-line-Analytik zur Prozeßsteuerung notwendig. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, eine für die Biotechnologie neue Analysenmethode, ermöglicht automatisierte Messungen quasi in Echtzeit direkt am Prozeß [109-111]. Mehrere Analyte werden durch die Detektion eines weiten Exzitations- und Emissionsbereiches simultan sowohl qualitativ durch die Lage in der Matrix als auch quantitativ durch die Fluoreszenzintensität erfaßt. Es soll die Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Prozeßanalytik bei der chromatographischen Melasseentzuckerung untersucht werden.

4.3.1 Prinzip der 2D-Fluoreszenzmessungen

Unter Fluoreszenz versteht man die ungerichtete Emission von Licht, die nur so lange auftritt, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption elektronisch angeregt werden [109, 111, 112]. Fluoreszenzmessungen sind sehr empfindlich und selektiv und erlauben nicht-invasive On-line-Messungen am Prozeß. Das Meßprinzip einer Küvettenmessung ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

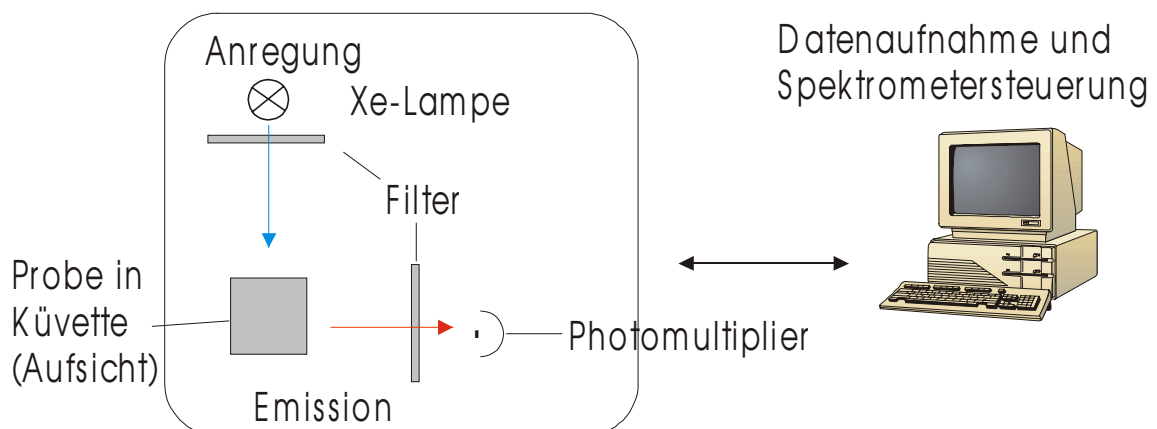


Abb. 4.14: Prinzip der 2D-Fluoreszenzmessung

Um ein 2D-Fluoreszenzspektrum zu erhalten, wird die Anregungswellenlänge eingestellt und der Filter für die Emissionswellenlänge variiert. Anschließend wird die Anregungswellenlänge verändert und erneut ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

Ein 2D-Spektrum aus bis zu 1000 Meßpunkten kann in weniger als einer Minute erstellt werden. Die Spektren können in einer isometrischen Darstellung (Abbildung 4.15) oder übersichtlicher als Konturdarstellung mit Höhenlinien (Abbildung 4.16) dargestellt werden.

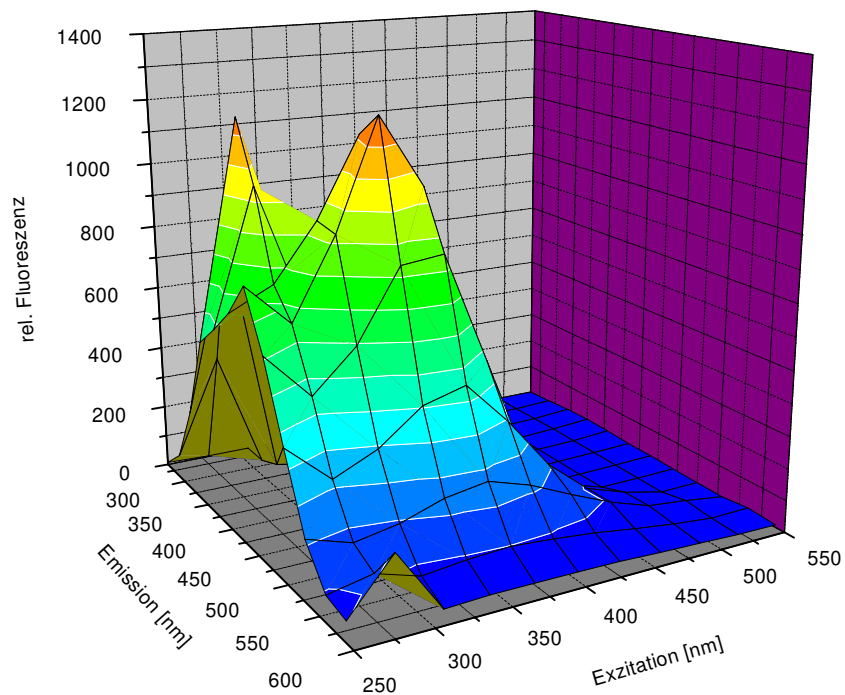


Abb. 4.15: 2D-Fluoreszenzspektrum in isometrischer Darstellung (Serin-Fraktion TK2)

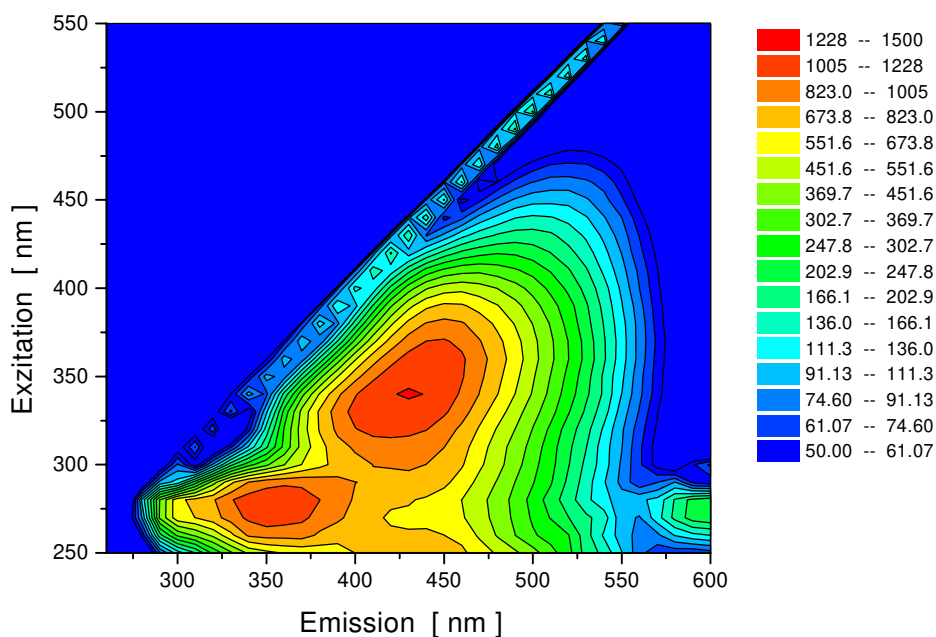


Abb. 4.16: 2D-Fluoreszenzspektrum in Konturdarstellung (Serin-Fraktion TK2)

Zur Zeit sind am Institut für Technische Chemie in Hannover zwei Typen Fluoreszenzspektrophotometer im Einsatz. Bei der Laborversion von Hitachi F-4500 (Hitachi, Japan) wird die Wellenlänge über Gitter eingestellt, während bei der Industrieversion BioView® (Delta Light & Optics, Dänemark) Filtrerräder zur Einstellung von Emissions- und Exzitationswellenlänge zum Einsatz kommen [109, 111]. Die Messungen werden ausschließlich mit dem Gerät der Firma Hitachi durchgeführt.

In Abbildung 4.16 ist zu erkennen, daß mehrere Fluorophore gleichzeitig detektiert werden können. Die Lage des Maximums liefert dabei qualitative Informationen, die Fluoreszenzintensität ist im Idealfall proportional zur Konzentration des Fluorophors. Es kann jedoch auch zu Verschiebungen des Maximums und Überlagerungen verschiedener Peaks kommen. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ist es möglich, auch überlagerte Peaks auszuwerten [113]. Veränderungen im 2D-Fluoreszenzspektrum sind oft schwer erkennbar, daher werden Differenzspektren zwischen den einzelnen Proben erstellt, um Änderungen der Fluoreszenz in Lage und Intensität sichtbar zu machen. Abbildung 4.17 zeigt ein Differenzspektrum zwischen zwei Proben aus der Serin-Fraktion.

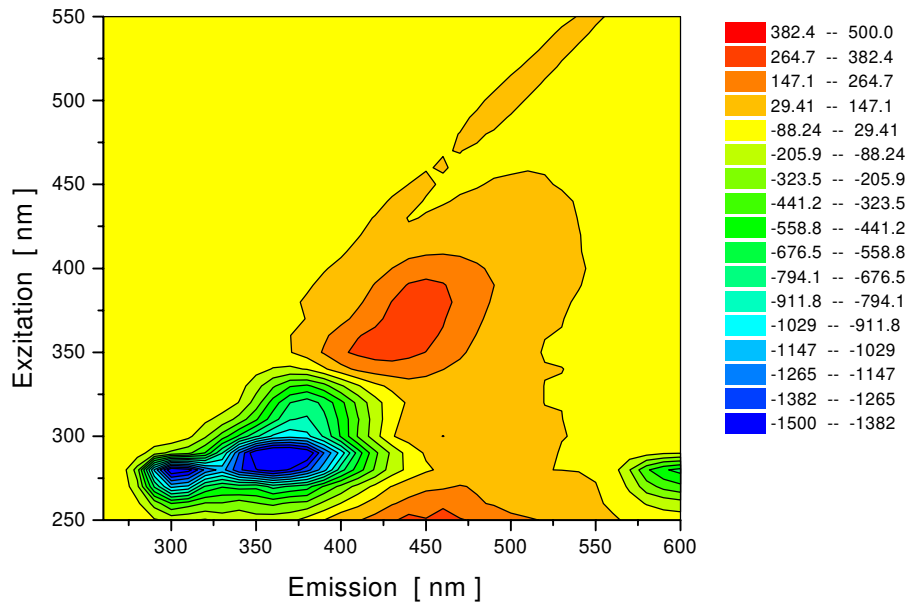


Abb. 4.17: 2D-Differenzspektrum von Proben zu Beginn und am Ende der Serin-Fraktion

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität bei den so bestimmten Exzitations-/Emissions-Wellenlängen wird über dem gesamten Prozeß ermittelt und kann mit Konzentrationsverläufen bekannter Stoffe (z.B. L-Aminosäuren) in Verbindung gebracht werden. Die Berechnung und Auswertung erfolgt mittels eines Microsoft-Excel®-Makros [114].

4.3.2 Messung von Proben der chromatographischen Melasseentzuckerung

Im folgenden werden Proben der Serin-Fraktion der Trennkolonnen 2/3, sowie Proben des gesamten Zyklus der Trennkolonne 8 untersucht. Die Eluatproben werden 1:100 mit bidest. Wasser verdünnt, 900 µl der verdünnten Probe werden in einer Fluoreszenz-Küvette vermessen. Die Auswertung der Spektren geschieht nach dem oben beschriebenen Verfahren [114].

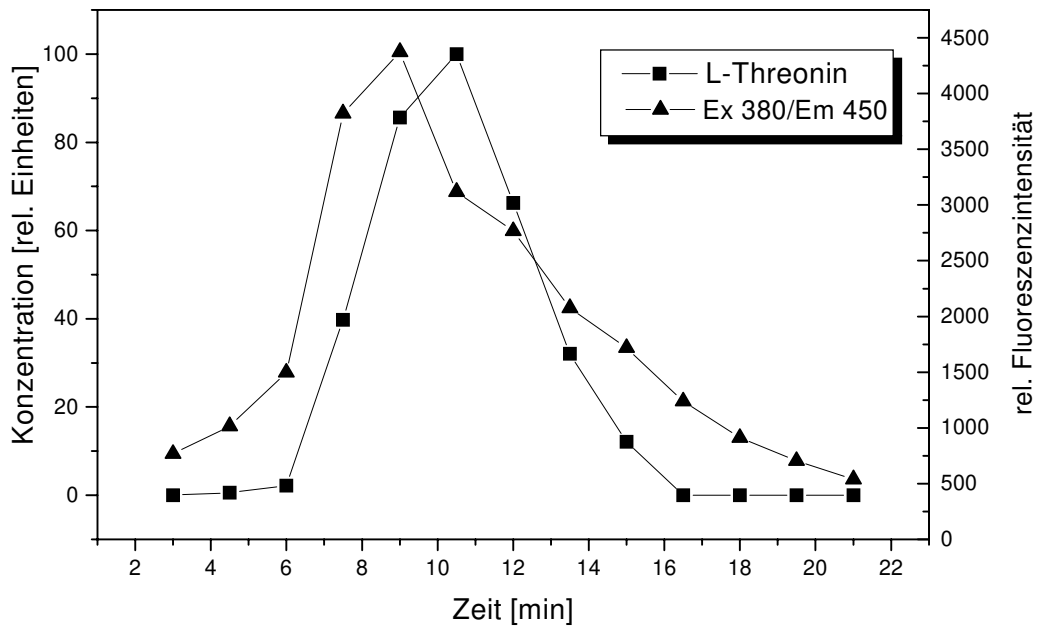


Abb. 4.18: Verlauf der L-Threonin-Konzentration (TK2, HPLC) und Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Ex 380 / Em 450 nm

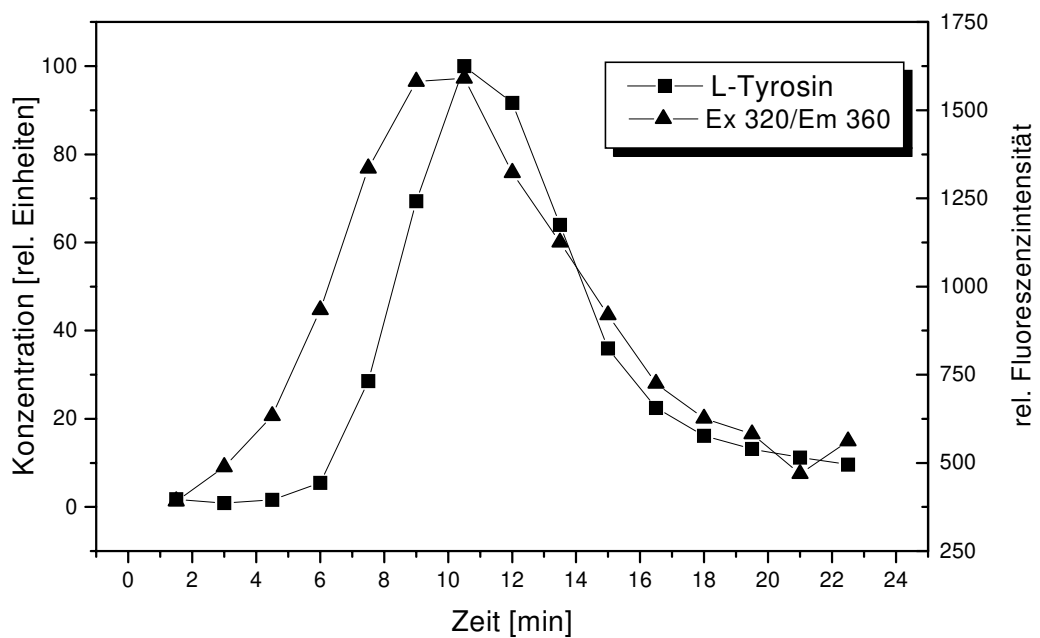


Abb. 4.19: Verlauf der L-Tyrosin-Konzentration (TK3, HPLC) und Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Ex 320 / Em 360 nm

Es ist zu erkennen, daß es sowohl bei der Trennkolonne 2 als auch bei der Trennkolonne 3 Emissions-/Exzitations-Wellenlängenpaare gibt, die sich mit Konzentrationsverläufen von L-Aminosäuren korrelieren lassen. Die in der Melasse enthaltenen L-Aminosäuren zeigen selbst keine Fluoreszenz (Ausnahme: L-Tryptophan und L-Tyrosin), jedoch können Farbstoffe, die zeitgleich eluieren, für dieses Phänomen verantwortlich sein. Zusätzlich kann die Fluoreszenzintensität durch Energieübertragung bei Anwesenheit von Begleitstoffen erhöht werden [112].

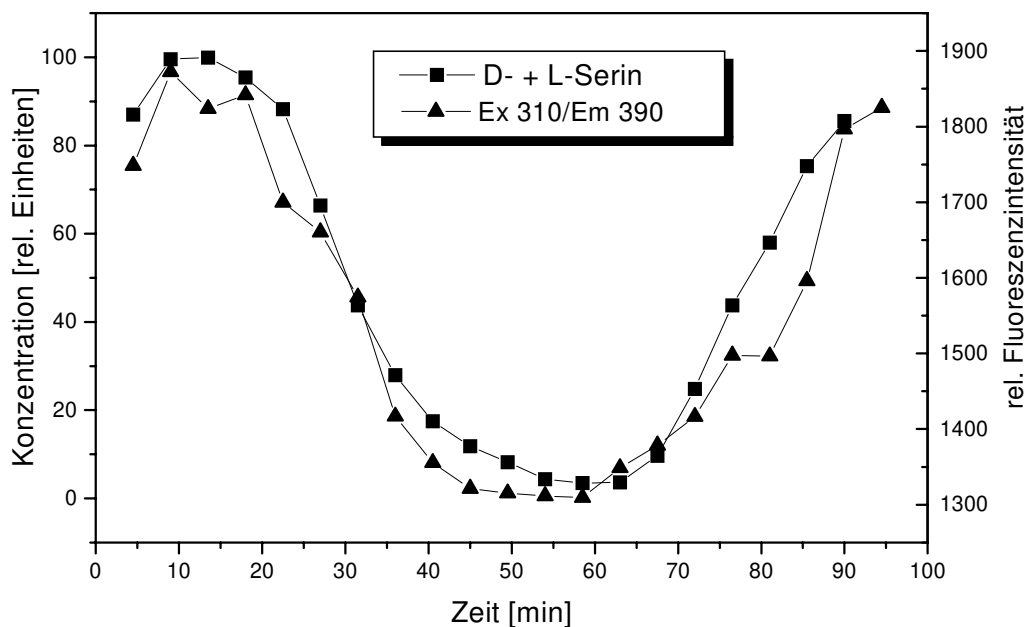


Abb. 4.20: Verlauf der Serin-Konzentration (TK8, ASA) und Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Ex 310 / Em 390 nm

Auch bei Proben der Trennkolonne 8, auf der die Serin-Fraktion weiter aufgereinigt wird, läßt sich bei Ex 310 nm / Em 390 nm ein Fluoreszenzverlauf detektieren, der gut mit dem Verlauf der D- + L-Serin-Konzentration (vgl. Abbildung 4.10) übereinstimmt. Serin zeigt keine Fluoreszenz, auch in diesem Fall könnten Farbstoffe, die ein ähnliches Elutionsverhalten wie Serin aufweisen, für diesen Effekt verantwortlich sein.

4.3.3 Fluoreszenzmessung mit direkter Ankopplung über Lichtleiter

Die direkte Ankopplung eines Lichtleiters in den Strahlengang des 2D-Fluoreszenzspektrometers („open end“-Anordnung) ermöglicht Messungen unverdünnter und trüber Proben. Für die Messung unter Lichtausschluß wurde eine thermostatisierbare Meßzelle konstruiert, die über ein auch für Licht im UV-Bereich durchlässiges Quarzglasfenster verfügt. Durch Verluste im Lichtleiter ist die Empfindlichkeit dieser Anordnung etwa um den Faktor 1000 geringer als bei der Küvettenmessung [114]. Durch den flexiblen Aufbau des Lichtleiters kann z.B. direkt in Fermentern gemessen werden, wobei nur die Fluoreszenz an der Oberfläche erfaßt wird [109].

Die Proben der Trennkolonne 2 wurden mit dem Lichtleiter in zwei Versuchsreihen bei 25°C und 75°C vermessen, um den Einfluß der Temperatur auf die Fluoreszenzintensität zu untersuchen.

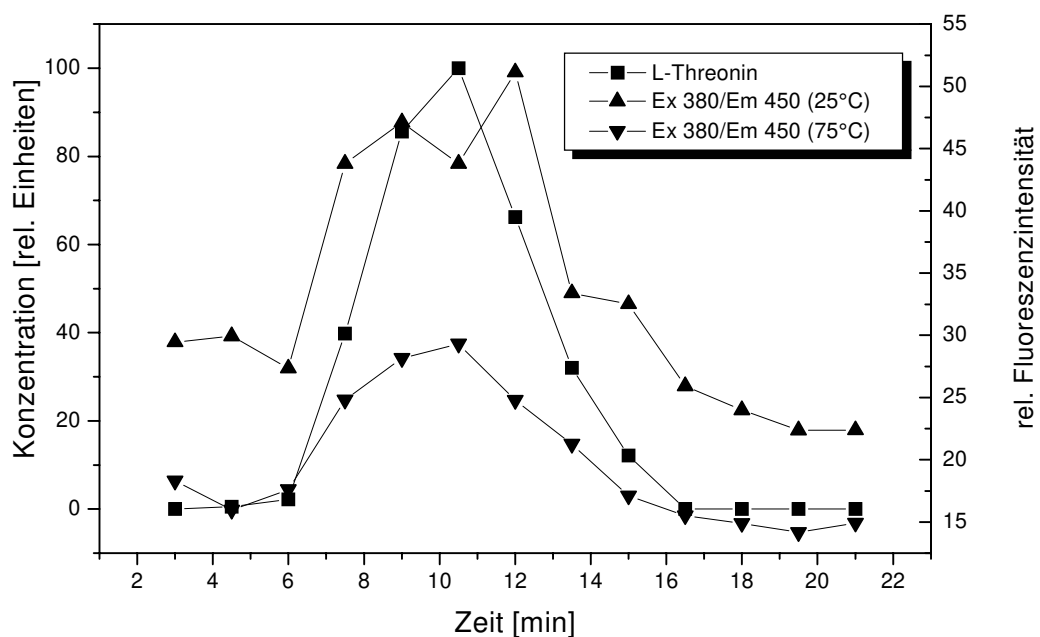


Abb. 4.21: Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Ex 380 / Em 450 nm bei 25°C und 75°C und Vergleich mit dem Konzentrationsverlauf von L-Threonin

Abbildung 4.21 zeigt, daß sowohl bei 25°C als auch bei 75°C ein der L-Threonin-Konzentration ähnlicher Verlauf bei Ex 380 nm / Em 450 nm auftritt. Die Fluoreszenzintensität ist bei der Messung mit Lichtleiter deutlich geringer als bei der Küvettenmessung. Es treten die gleichen Peaks auf, jedoch ist das Signal-Rauschverhältnis schlechter. Bei 75°C nimmt die Intensität der Signale nochmals deutlich ab. Dieses Verhalten wird im allgemeinen bei Fluorophoren beobachtet [112].

4.3.4 Ausblick

Für die Trennkolonnen 2 und 3 konnten mehrere interessante Exzitations/Emissions-Wellenlängen gefunden werden, deren Fluoreszenzintensität dem Konzentrationsverlauf einiger Aminosäuren entspricht. Bei den in der Melasse enthaltenen Aminosäuren handelt es sich nicht um Fluorophore (Ausnahmen: L-Tryptophan und L-Tyrosin), so daß es sich vermutlich um Farbstoffe mit einem ähnlichen Elutionsverhalten handelt. Falls es sich dabei um ein reproduzierbares Verhalten handelt, könnten diese Ex/Em-Wellenlängen zur Prozeßsteuerung benutzt werden.

Das Wellenlängenpaar (Ex 310 nm/Em 390 nm) bei der Trennkolonne 8 zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Verlauf der Serin-Konzentration, obwohl Serin selber nicht fluoresziert. Auch hier handelt es sich vermutlich um Farbstoffe, die sich jedoch im Elutionsverhalten kaum von Serin unterscheiden.

Proben der Trennkolonne 2 wurden mit dem Lichtleiter bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen, wobei die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur abnimmt. Die Ankopplung des Lichtleiters an das System wird zur Zeit noch verbessert, so daß mit einer gesteigerten Empfindlichkeit gerechnet werden kann [114]. Mit einem empfindlicheren System können auch Proben bei den im Prozeß vorherrschenden hohen Temperaturen gemessen werden, alternativ kann die Probe auf 25°C abgekühlt werden.

In diesen ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die 2D-Fluoreszenzspektroskopie grundsätzlich zur Analytik bei der chromatographischen Melasse-entzuckerung eingesetzt werden kann. Bis jetzt sind erst zwei Fraktionen des Chromatographieprozesses untersucht worden, so daß keine Aussage darüber gemacht werden kann, welche weiteren Fluorophore während eines chromatographischen Zyklus auftreten. Ziel

weiterer Arbeiten wird deshalb die Aufnahme weiterer 2D-Spektren zur Charakterisierung des gesamten Prozesses sein. Um zu untersuchen, ob das Elutionsverhalten der Farbstoffe reproduzierbar ist und sich im Vergleich zu den Aminosäuren nicht verändert, ist geplant, das Verhalten der Säulen über einen längeren Zeitraum zu charakterisieren [115].

4.4 Enantioselektive Aminosäureanalytik

Durch Kombination von L- und D-Aminosäure-Oxidase (ASOD) läßt sich ein enantioselektives Biosensorsystem aufbauen, das die Konzentration beider Enantiomere bestimmen kann. Besonders in der pharmazeutischen Industrie ist die Enantiomerenreinheit ein wichtiges Qualitätskriterium [116, 117]. Ein solches System kann ebenfalls bei der enzymatischen Umsetzung eines Enantiomers zur Prozeßkontrolle eingesetzt werden [118].

Zur Untersuchung dieses enantioselektiven Systems wird L- und D-Aminosäure-Oxidase auf VA-Epoxy immobilisiert und in Enzymkartuschen in ein FIA-System integriert. Nach Abbildung 2.2 wird der Sauerstoffverbrauch der enzymatischen Reaktion durch eine amperometrische Sauerstoffelektrode detektiert. Das System ist als 2-Kanal-Biosensor ausgelegt, d.h. die Messung von L- und D-Aminosäuren erfolgt parallel. Anhand eines Gradientenmischers soll die Leistungsfähigkeit des Biosensors demonstriert werden. Die Berechnung des Gradienten und die Versuchsbedingungen entsprechen Kapitel 4.2.10.

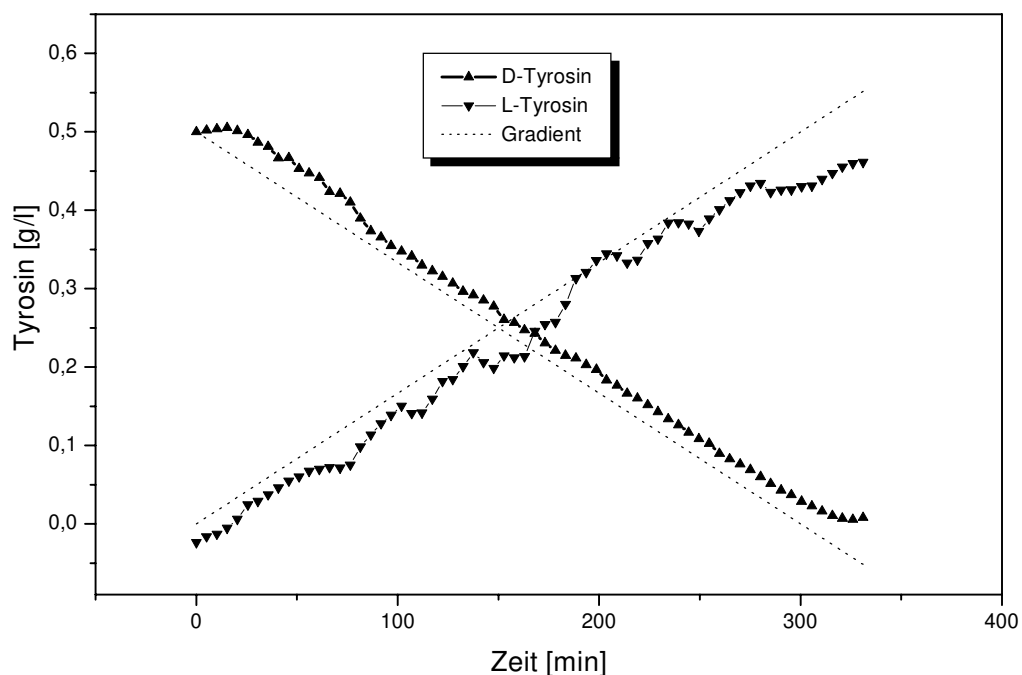


Abb. 4.22: Gradientenmischung von 0,5 g/l D-Tyrosin mit 0,5 g/l L-Tyrosin. Messung mit einem Zweikanal-Biosensor mit L- und D-ASOD. Gepunktet: berechneter Gradient

Abbildung 4.22 zeigt, daß mit dem Biosensor die Mischung von L-Tyrosin zu D-Tyrosin gut verfolgt werden kann. Der Aufbau eines 2-Kanal-Sensors besitzt den Vorteil, beide Enantiomere parallel bestimmen zu können, ein Verfahren, das sonst nur unter Derivatisierung und Analyse mittels chiraler HPLC oder GC möglich ist. Das Sensorsystem kann leicht gewartet werden (z. B. Wechsel der Kartusche), während am zweiten Kanal die Messung fortgesetzt wird. Zudem ist der Bedarf an Hardware geringer, weil für den zusätzlichen Kanal die bereits vorhandenen Peristaltikpumpen und der Computer zur Steuerung des Systems benutzt werden können. Das Gehäuse der Sauerstoffelektrode ist modular konstruiert und kann durch Einschübe erweitert werden.

4.5 L-Phenylalanin-Dehydrogenase

Ähnlich der D-Serin-Dehydratase ist in der Literatur ein Assay zur Analytik von L-Phenylalanin beschrieben worden [33]. Das Enzym wurde vom Arbeitskreis PD Dr. Lutz Fischer immobilisiert und für erste Untersuchungen zur Verfügung gestellt [104]. Im folgenden soll untersucht werden, ob sich das Enzym für eine Analytik der in der Melasse enthaltenen L-Aminosäuren eignet. Besonders die Eigenschaft, L-Tyrosin umzusetzen, macht das Enzym als biologische Komponente eines Biosensors interessant. L-Tyrosin ist in Zuckerrübenmelasse in vergleichsweise hoher Konzentration enthalten, wodurch die vollständige Abtrennung von anderen Aminosäuren erschwert wird.

Das L-Phenylalanin-Dehydrogenase-Immobilisat wird in einer Enzymkartusche in ein FIA-System integriert. Mit einer Durchflußküvette wird bei 340 nm die Zunahme des gebildeten NADH nach dem in Kapitel 4.2.7 beschriebenen Stopped-Flow-Verfahren bestimmt (vgl. Tabelle 2.1). Zunächst wird die Querempfindlichkeit des System auf andere L-Aminosäuren untersucht. In der Literatur sind Aktivitäten (bezogen auf L-Phenylalanin=100 %) für L-Methionin mit 15 % und L-Tyrosin mit 30 % angegeben [33, 34]. Diese Angaben sollen zunächst für das Immobilisat mit jeweils fünf Standards L-Phenylalanin und L-Tyrosin überprüft werden.

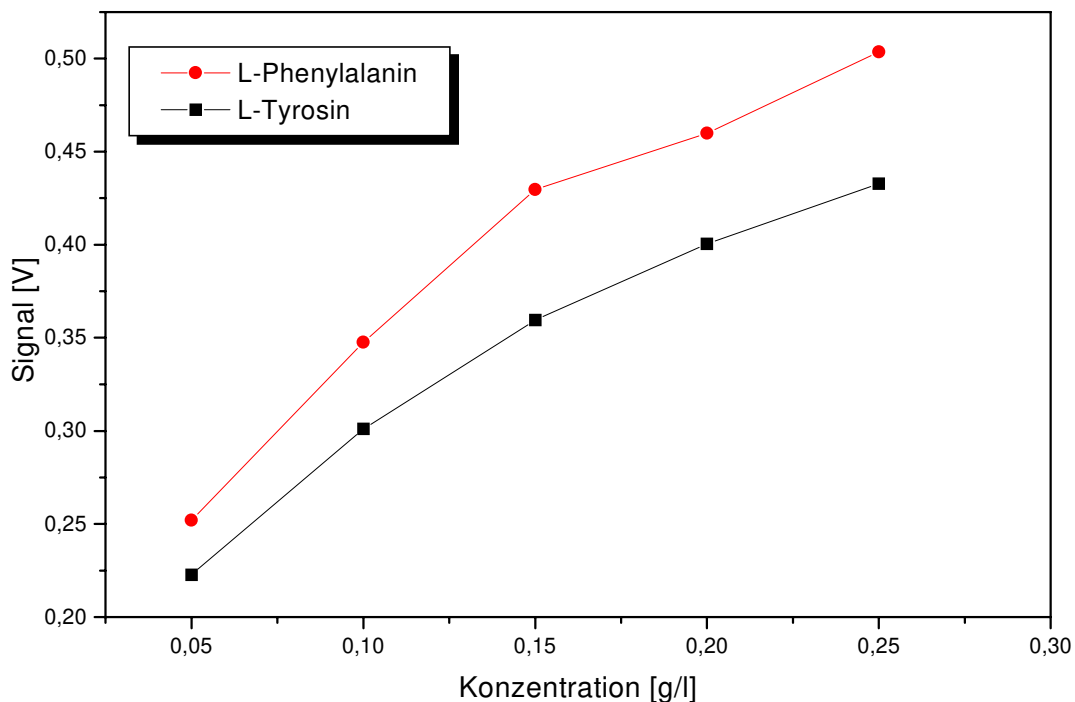


Abb. 4.23: Querempfindlichkeit der L-Phenylalanin-Dehydrogenase zu L-Tyrosin. Trägerstrom 1,5 ml/min, 2,5 mM NAD⁺ pro Probe, zeitgesteuerte Injektion (30 sec mit 1,5 ml/min) und Stopped-Flow (300 sec)

Die Messungen zeigen, daß mit der L-Phenylalanin-Dehydrogenase eine Analytik von L-Tyrosin und L-Phenylalanin in Standards möglich ist. Die Aktivität des Immobilisats ist jedoch mit 0,2 U/g (bezogen auf L-Phenylalanin) sehr gering [104]. Durch ein Probenvolumen von 750 µl und eine hohe Verweilzeit in der Kartusche kann die geringe Aktivität des Immobilisats teilweise kompensiert werden, so daß Messungen im Bereich von 0,05 bis 0,25 g/l L-Phenylalanin möglich sind.

Abbildung 4.23 zeigt, daß die Signale für L-Tyrosin etwa 15 % geringer ist als für L-Phenylalanin. Unter den gewählten Bedingungen sind die Aktivitätsdifferenzen geringer als in der Literatur angegeben [33, 34].

Mit dem Biosensor soll der L-Tyrosin-Gehalt bei der chromatographischen Melasse-entzuckerung bestimmt werden. L-Phenylalanin kommt in der untersuchten Serin-Fraktion nur in sehr geringer oder nicht nachweisbarer Menge vor, so daß keine Querempfind-

lichkeiten zu dieser Aminosäure erwartet werden. Die Proben der Serin-Fraktion der Trennkolonne 2 werden 1:10 mit Puffer verdünnt, mit 2,5 mM NAD⁺ versetzt und mit dem Sensor analysiert.

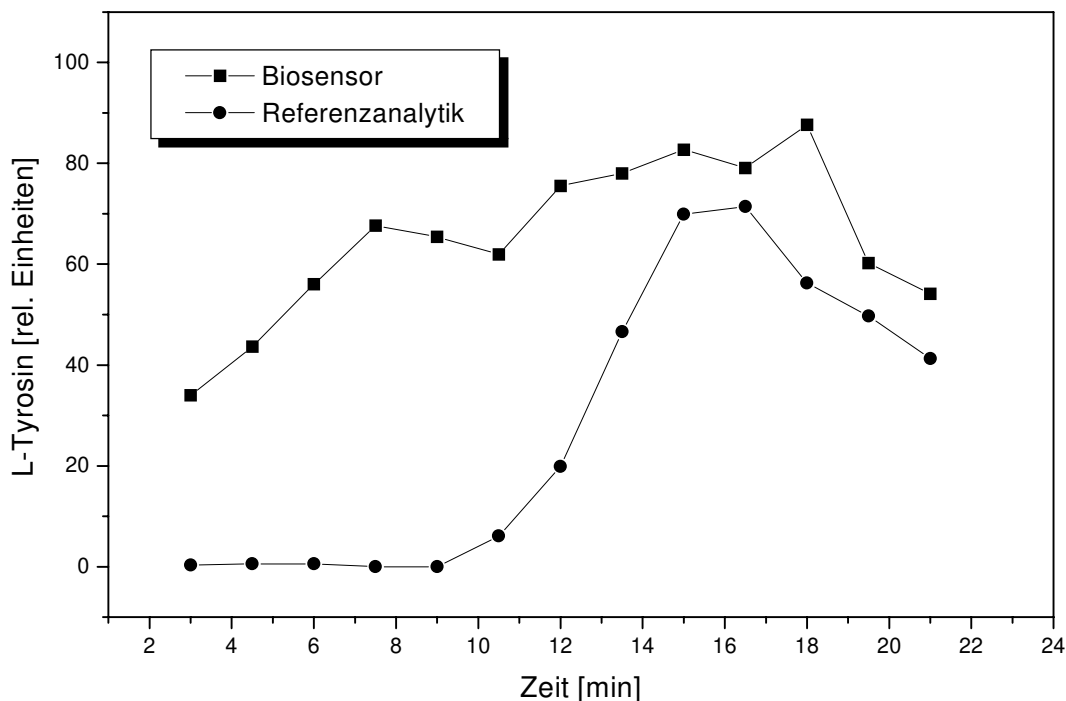


Abb. 4.24: Messung von Proben der Serin-Fraktion (TK 2) und Vergleich mit dem Aminosäure-Analyser. Meßbedingungen siehe Abbildung 4.23

Wie die Messung mit Prozeßproben verdeutlicht, wird mit dem Biosensor ein Ansteigen der Konzentration detektiert, der Konzentrationsverlauf wird jedoch im Vergleich zur Referenzanalytik nicht richtig wiedergegeben. Das in den Proben enthaltene L-Methionin eluiert nur wenig früher als L-Tyrosin und kann nicht für den starken Anstieg des Sensorsignals zwischen der 2. und 7. Minute verantwortlich gemacht werden. Basierend auf der ASA-Analyse der Proben eluiert keine L-Aminosäure in diesem Bereich in nennenswerter Konzentration, so daß bis jetzt nicht bekannte Melassekomponenten für diese Verfälschung in Frage kommen. Um in stärker verdünnten Proben messen zu können, wird zur Zeit im Arbeitskreis PD. Dr. Lutz Fischer (TU Braunschweig) die Herstellung von Immobilisaten mit höherer Aktivität untersucht [104].

4.6 Zusammenfassung

Es wurden mehrere Verfahren zur Prozeßanalytik von Aminosäuren bei der chromatographischen Melasseentzuckerung vorgestellt, die eine Optimierung des Trennprozesses ermöglichen sollen. Mit der D-Aminosäure-Oxidase wurde ein Biosensor für D-Serin entwickelt, der jedoch weitere Querempfindlichkeiten zu anderen D-Aminosäuren besitzt und somit bei der Messung von Realproben mehrdeutige Ergebnisse liefert. Das Multi-Enzymsystem D-Serin-Dehydratase / Lactat-Dehydrogenase umgeht dieses Problem durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion. Es wurde die Entwicklung eines Sensors für D-Serin beschrieben, der in der Lage ist, D-Serin in Proben des Chromatographieprozesses zu detektieren. Durch Optimierung des Systems konnte die Zeit für eine Messung auf zwei Minuten reduziert werden. Der Biosensor wurde erfolgreich zur Off-line-Bestimmung von Serin bei verschiedenen Trennkolonnen des Chromatographieprozesses eingesetzt.

Um eine noch schnellere Messung zu ermöglichen, wurden optische Detektionsmethoden untersucht. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie erweist sich in dieser Hinsicht als leistungsfähige Methode: Es konnten Exzitations-/Emissions-Wellenlängen zugeordnet werden, die in ihrem Intensitätsverlauf den Elutionsprofilen einiger Aminosäuren ähneln. Es ist zur Zeit noch nicht geklärt, durch welche Effekte diese Fluoreszenzverläufe hervorgerufen werden. In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, ob dieses Elutionsverhalten auch über einen längeren Zeitraum reproduzierbar ist und sich eventuell für eine schnelle Prozeßanalytik nutzen läßt [115].

Basierend auf D- und L-Aminosäure-Oxidase wurde ein enantioselektives 2-Kanal-Biosensorsystem aufgebaut. Ein solcher Sensor kann bei der enzymatischen Umsetzung von Aminosäureracematen eingesetzt werden. Mit dem Enzym L-Phenylalanin-Dehydrogenase wurde ein Biosensor zum Nachweis von L-Tyrosin entwickelt. Die untersuchten Biosensorsysteme sollen dazu beitragen, den Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung besser verstehen und effektiver kontrollieren zu können. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Analytik von Raffinose und Saccharose, die in der Melasse den größten Kohlenhydratanteil stellen.

5 Analytik von Sacchariden in Zuckerrübenmelasse

5.1 Raffinose

Das Trisaccharid Raffinose setzt sich aus den Monosacchariden D-Galactose, D-Glucose und D-Fructose zusammen, die über eine α - bzw. β -Bindung miteinander verknüpft sind [119]. Die Untereinheit aus D-Galactose und D-Glucose wird als Melibiose, das Disaccharid aus D-Glucose und D-Fructose als Saccharose bezeichnet.

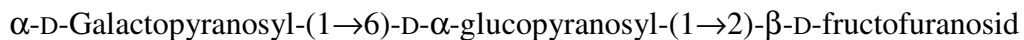
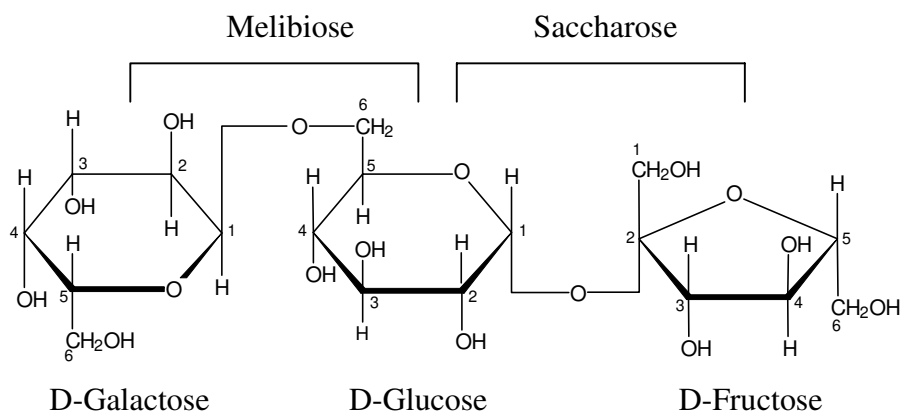


Abb. 5.1: Strukturformel von Raffinose

Mit einer durchschnittlichen Konzentration von 2,4 % stellt Raffinose neben Saccharose den größten Kohlenhydratanteil in der Zuckerrübenmelasse [120-122]. Raffinose wird in unterschiedlichen Bereichen verwendet, und es wird in den nächsten Jahren mit einer steigenden Nachfrage nach dem Trisaccharid gerechnet [123, 124]. In der Lebensmittelindustrie wird Raffinose als Austauschstoff für Lactose eingesetzt. Bei der Spaltung von Raffinose entsteht neben Fructose auch Melibiose, der eine probiotische Wirkung auf die menschliche Darmflora zugeschrieben wird [120, 125]. Ein anderes Einsatzfeld ist das Gefriertrocknen von Proteinen, bei dem Raffinose zum Erhalt der Hydrathülle eingesetzt werden kann [107]. Weiterhin wird Raffinose als Konservierungsstoff für Organtransplantate und Spermien verwendet [126].

5.1.1 Chromatographische Trennung von Raffinose

Die Raffinose eluiert in der chromatographischen Melasseentzuckerung nicht in einem scharfen Peak, sondern über einen weiten Bereich von der 5. bis etwa zur 80. Minute (siehe Abbildung 4.1). Die Abtrennung der Raffinose von der Saccharose gestaltet sich schwierig, weil die Moleküle von der Ionenausschluß-Chromatographie nicht in ausreichendem Maße getrennt werden. Zudem bereiten Farbstoffe und Salze Probleme bei der Trennung. In einem Verfahrensvorschlag wird die Kombination von Elektrodialyse (Entfärbung und Entsalzung) mit Ionenausschluß-Chromatographie (Trennung) beschrieben [125].

Das Raffinose-Maximum eluiert im Bereich des Serin-Maximums (vgl. Abbildung 4.1), so daß die Gewinnung von Raffinose aus der Serin-Fraktion möglich wäre. Diese Fraktion wird jedoch in weiteren Verfahrensschritten aufgereinigt und weiterverarbeitet [92], so daß eine Raffinose-Gewinnung aus der Serin-Fraktion nicht möglich wäre, ohne massiv in den bestehenden Produktionsprozeß einzugreifen. Zudem ist die Saccharose-Konzentration sehr hoch, was eine Abtrennung der Raffinose aus der entsprechenden Fraktion sehr erschwert [125].

Aus der Restmelasse-Fraktion, die nur eingedampft und zur teilentzuckerten Melasse zurückgeführt wird, könnte ebenfalls Raffinose isoliert werden. Der Gehalt an Raffinose ist vergleichsweise geringer, jedoch ist der störende Saccharose-Anteil niedriger, so daß sich insgesamt ein günstigeres Raffinose/Saccharose-Verhältnis ergibt. In der Restmelasse-Fraktion liegt allerdings eine höhere Konzentration an störenden Salzen und Farbstoffen vor [125].

5.1.2 Raffinose-Analytik - Stand der Technik

In der Literatur sind Ansätze zur enzymatischen Raffinose-Bestimmung mittels Galactose-Dehydrogenase [25] und mit einer Galactose-Oxidase-Elektrode [26, 127, 128] beschrieben worden. Beide Enzyme sind kommerziell erhältlich, jedoch ist die Dehydrogenase deutlich teurer als die Oxidase. Zur Galactose-Oxidase werden keine Angaben zur Stabilität oder zur Meßzeit gemacht. Auch durch eine Kopplung von HPLC und Biosensor ist die Raffinose-Analytik in Lebensmitteln möglich [27, 129], jedoch ist hier aufgrund der vorgeschalteten HPLC von einer Meßzeit von 30 Minuten auszugehen. Eine Beschreibung von Biosensoren zur Zuckernalytik in Kombination mit FIA-Systemen findet sich in

[130]. Als Standardmethode zur Zuckeranalytik werden HPLC-Methoden mit Trennsäulen auf Kationentauscher- oder NH_2 -Phasen-Basis eingesetzt [131-137]. Der Vorteil der HPLC-Systeme liegt in der gleichzeitigen Erfassung mehrerer Saccharide. Im Vergleich zu Biosensoren wirkt sich die lange Meßzeit von 25 bis 45 Minuten nachteilig aus. Somit sind die HPLC-Systeme nicht als schnelle Analytik zur Prozeßsteuerung, sondern eher zur Qualitätskontrolle einsetzbar.

5.1.3 Entwicklung eines Biosensors für die Raffinose-Analytik

Für die Optimierung des Trennprozesses und die begleitende schnelle Analytik der Aufarbeitung sollte ein Biosensorsystem entwickelt werden, das Raffinose neben anderen Bestandteilen der Zuckerrübenmelasse nachweisen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Voruntersuchungen zur Entwicklung eines Raffinose-Sensors durchgeführt. In einer begleitenden Diplomarbeit, die mit eigenen Arbeiten abgestimmt wurde, sind weitere Untersuchungen an diesem System durchgeführt worden [30].

5.1.3.1 Galactose-Oxidase

Um Raffinose neben Saccharose enzymatisch nachweisen zu können, kann der nur in der Raffinose vorhandene Galactosyl-Rest genutzt werden (s. Abbildung 5.1). Das Enzym Galactose-Oxidase oxidiert selektiv die 6-Hydroxy-Gruppe zu einem Aldehyd (siehe Pfeil) [19, 138], auch die weitere Oxidation zur Carbonsäure läßt sich in Spuren nachweisen [28].

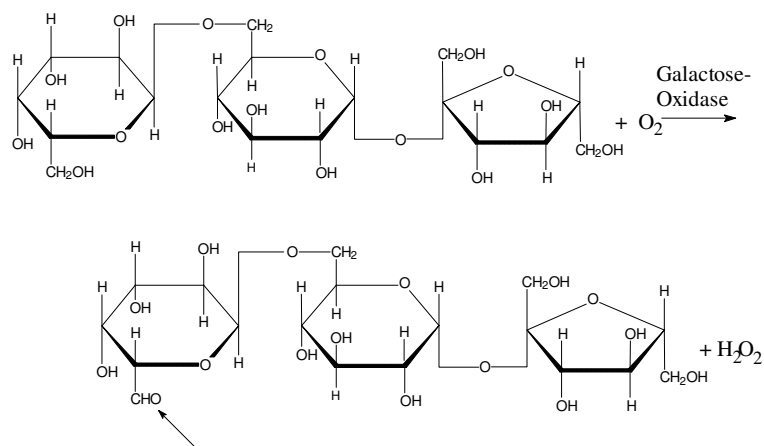


Abb. 5.2: Reaktion von Raffinose mit Galactose-Oxidase

Das Enzym setzt sowohl Galactose als auch Raffinose um [19]. Bei der enzymatischen Oxidation wird Sauerstoff verbraucht; die Abnahme des Gelöstsauerstoffs läßt sich mit einer amperometrischen Sauerstoffelektrode verfolgen. Die Galactose-Oxidase wird auf VA-Epoxy immobilisiert (siehe Anhang 8.7) und in einer Kartusche in ein FIA-System integriert. Der Aufbau dieses Biosensors ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

5.1.3.2 Messung von Raffinose

Zum Test des Sensorsystems werden Raffinose-Standards im Konzentrationsbereich von 0,6 bis 5 g/l analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Abhängig vom Volumenstrom des Trägers läßt sich Raffinose in Standards im Bereich von 0,5-10 g/l nachweisen. Der mittlere Fehler der Einzelmessung liegt mit 3,8 % im für die FIA typischen Bereich.

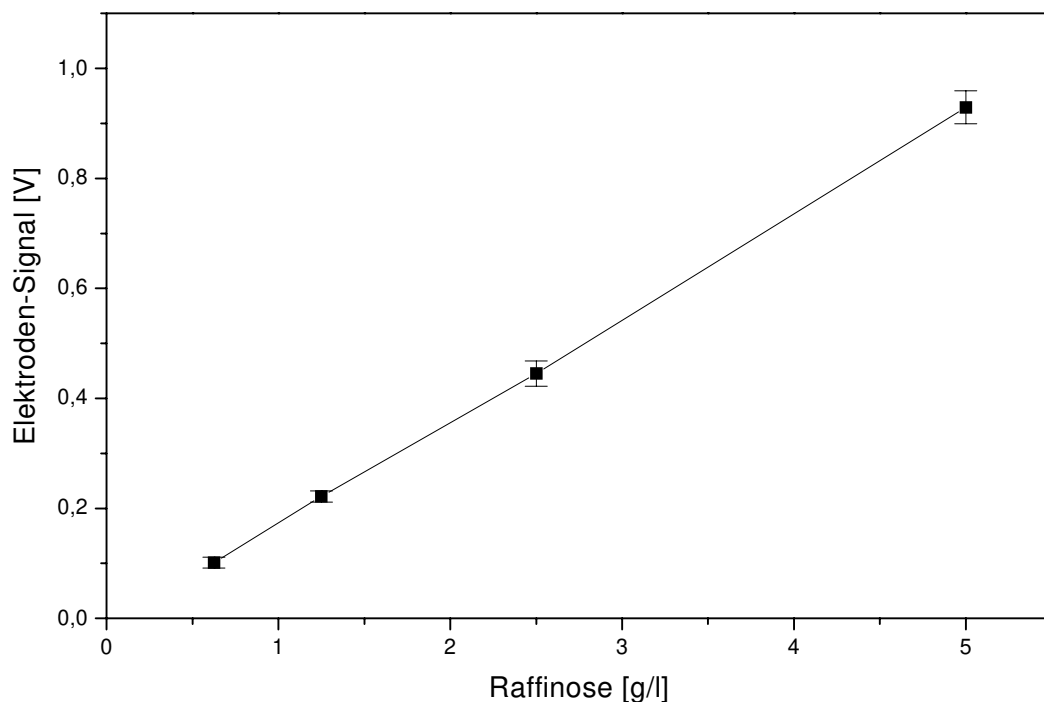


Abb. 5.3: Kalibrationsfunktion mit 4 Raffinose-Standards, Trägerstrom 1,5 ml/min

Um die Eigenschaften des Biosensors zu testen, werden Proben aus der chromatographischen Melasseentzuckerung analysiert. Die untersuchten Proben sind im Abstand

von 90 Sekunden der Restmelasse-Fraktion der Trennkolonne 2 entnommen worden. Das Sensorsystem wird mit Raffinose-Standards kalibriert, die Proben 1:2 mit Puffer verdünnt und analysiert. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

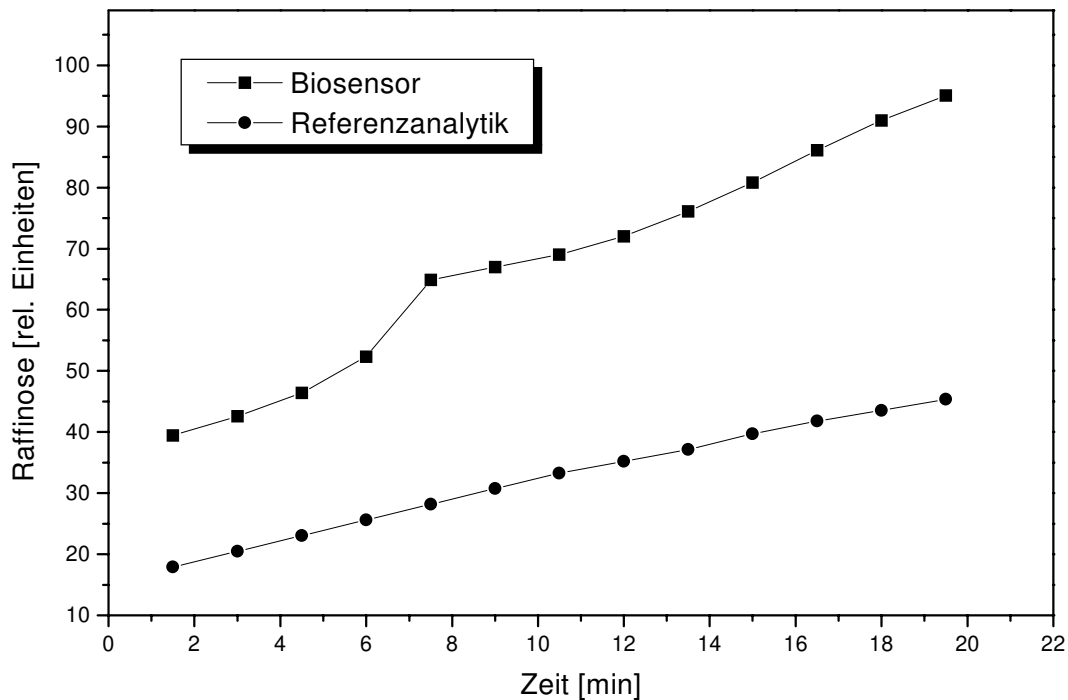


Abb. 5.4: Raffinose-Konzentration in Proben des Chromatographieprozesses (Restmelasse-Fraktion). Vergleich der Biosensor-Meßwerte mit der Zucker-HPLC [30]

Prinzipiell wird mit dem Sensorsystem der Verlauf der Raffinose-Konzentration wiedergegeben, der Vergleich mit den HPLC-Referenzwerten zeigt jedoch das deutlich zu hohe Meßergebnis des Biosensors. Offensichtlich liegen die Meßwerte systematisch zu hoch, zusätzlich ist ab der 6. Minute ein weiterer Anstieg der Signale sichtbar. Für dieses Verhalten können Störungen durch Begleitstoffe (Querempfindlichkeiten) oder Effekte der Probenmatrix verantwortlich sein.

Als Matrixeffekt bewirkt ein verringerter Sauerstoffgehalt der Proben, bedingt durch hohe Temperaturen im Chromatographieprozeß, ein Signal am Transducer und täuscht einen zu hohen Meßwert vor. Galactose-Oxidase ist kein substratspezifisches Enzym und setzt neben Raffinose und Galactose noch weitere Substrate um (siehe Kapitel 5.1.3.3).

Um die störenden Matrixeinflüsse zu minimieren, werden nach dem Standard-zusatzverfahren einigen Proben definierte Mengen Raffinose zugesetzt und die Proben mit

dem Biosensor analysiert. Auf diese Weise wird nur derjenige Anteil des Meßsignals berücksichtigt, der von der zugesetzten Raffinose hervorgerufen worden ist. Mit der so errechneten Kalibration läßt sich der Raffinose-Gehalt der Proben berechnen. Tabelle 5.1 zeigt die Ergebnisse bei Anwendung dieses Verfahrens.

Tab. 5.1: Vergleich der Meßdaten zur Bestimmung von Raffinose mit und ohne Standardzusatzverfahren (1g/l Zusatz) und der Referenzanalytik (HPLC) [30]

Probennummer	Zucker-HPLC-Analytik [g/l]	Biosensor-Analytik ohne Standardzusatz [g/l]	Biosensor-Analytik mit Standardzusatz [g/l]
1	1,4	3,1	1,6
7	2,6	5,4	3,3
13	3,5	7,4	4,8

Die Messungen zeigen, daß auch mit Standardzusatzverfahren die Biosensor-Meßwerte noch über den Referenzwerten liegen. Allerdings läßt sich die Abweichung deutlich reduzieren. Eine Ursache dafür sind die schon optisch unterschiedlichen Proben, die zu verschiedenen Zeiten dem Chromatographiezyklus (vgl. Abbildung 4.1) entnommen wurden und bei denen starke Schwankungen im pH-Wert und Salzgehalt auftreten können. Weitere Gründe für diese Abweichungen und den Konzentrationssprung in der Kurve des Biosensors im Vergleich zur HPLC-Referenz könnte die Querempfindlichkeit von Galactose-Oxidase zu einer anderen Substanz sein, die an dieser Stelle von der Säule eluiert. Das Sensorsystem soll aufgrund dieser Ergebnisse auf weitere Querempfindlichkeiten zu in Zuckerrübenmelasse vorkommenden Substanzen untersucht werden.

5.1.3.3 Querempfindlichkeit von Galactose-Oxidase

Mit dem Biosensor werden verschiedene Kohlenhydrat-Standards mit einer Konzentration von 1 g/l analysiert: Galactose, Raffinose, Melibiose, Glycerin und Stachyose.

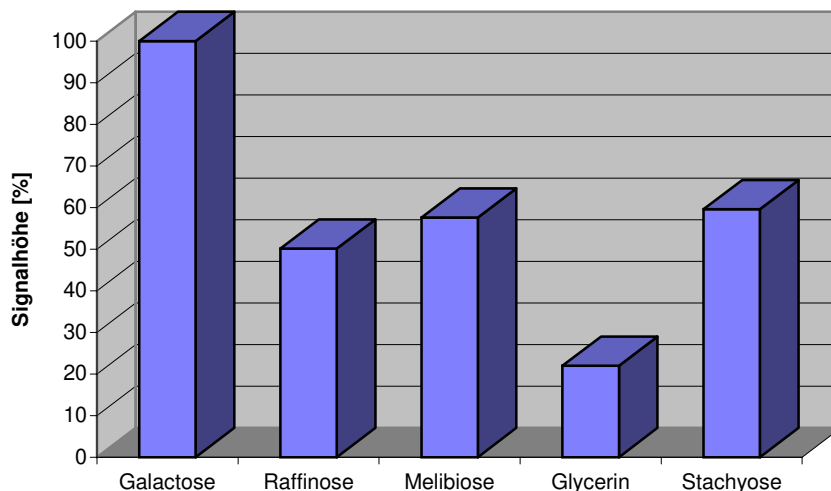


Abb. 5.5: Querempfindlichkeit von Galactose-Oxidase zu Galactose (=100 %), Raffinose, Melibiose, Glycerin und Stachyose. Trägerstrom: 0,1 M KH-Phthalat-Puffer pH 7,0, 1,5 ml/min. Konzentration der Substrate 1 g/l

Die Sensitivität ist bei Galactose am größten und sinkt bei Raffinose, Melibiose und Stachyose auf etwa 50 % des Galactose-Signals ab. Glycerin zeigt die geringsten Signale, jedoch ist Glycerin in einer Konzentration von etwa 1 g/l in Melasse enthalten. Galactose und Melibiose sind nur zu geringen Anteilen in Zuckerrübenmelasse enthalten. In der Literatur wird eine weitere Querempfindlichkeit zu Dihydroxyaceton angegeben [19].

Für die untersuchten Kohlenhydrate liegen keine Analysendaten über den Elutionsverlauf von den Trennkolonnen vor, so daß keine Aussage darüber gemacht werden kann, wodurch die erhöhten Meßwerte verursacht werden. Eine Erhöhung der Sensitivität des Biosensors würde die Möglichkeit bieten, die Proben stärker verdünnen zu können, um so Störungen durch Matrixeffekte vorzubeugen.

5.1.4 Vergleich unterschiedlicher Verfahren zur Raffinose-Analytik

Ein Vergleich unterschiedlicher Verfahren zur Raffinose-Analytik soll die Vor- und Nachteile der verschiedenen Systeme verdeutlichen. Der Biosensor wird mit dem Raffinose-Testkit (siehe Anhang 8.8.4) und der HPLC (siehe Anhang 8.8.3) verglichen. Es werden erneut Proben des Chromatographieprozesses (Serin-Fraktion der Trennkolonne 5) untersucht. Der Vergleich der Meßergebnisse ist in Abbildung 5.6, eine tabellarische Übersicht der Verfahren in Tabelle 5.2 dargestellt.

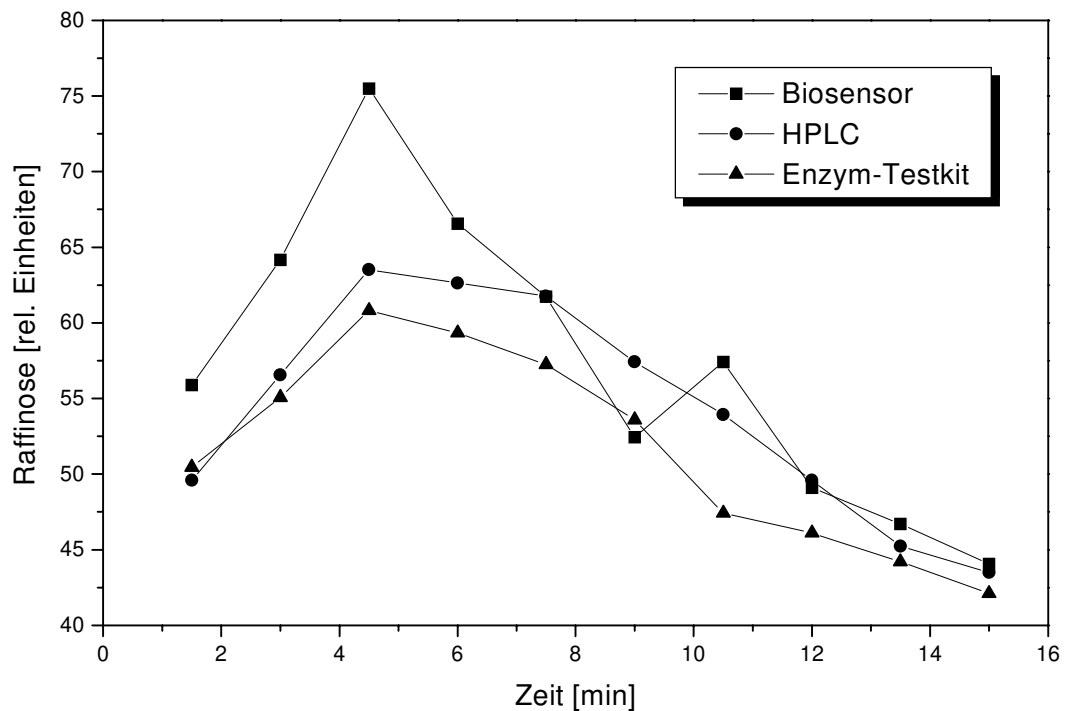


Abb. 5.6: Proben aus der Serin-Fraktion der Trennkolonne 5, Vergleich der Meßergebnisse des Galactose-Oxidase-Sensors, HPLC und des Raffinose-Testkits [30]

Die Meßergebnisse in Abbildung 5.6 zeigen bei den drei untersuchten Meßverfahren prinzipiell einen ähnlichen Verlauf der Raffinose-Konzentration. Die Meßwerte des Galactose-Oxidase-Biosensors liegen über den HPLC-Meßwerten, während mit dem Testkit niedrigere Konzentrationen gemessen wurden. Eine mögliche Erklärung liegt in der Anwesenheit von Kestosen, aus Fructose und Melibiose aufgebauten Trisacchariden, die vom verwendeten HPLC-System nicht von Raffinose unterschieden werden können. Diese Kestosen können sich in den untersuchten Fraktionen anreichern und eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Meßwerte von HPLC und Testkit darstellen [139-141].

Tab. 5.2: Vergleich unterschiedlicher Systeme zur Raffinose-Analytik [30]

System	Enzym	Zeit für Kalibration [min]	Meßzeit pro Messung [min]
Biosensor	Galactose-Oxidase	25	5
Enzym-Testkit (Boehringer)	α -Galactosidase/ Galactose-Dehydrogenase	entfällt	35
Zucker-HPLC (Amino GmbH)	entfällt	15-25	15-25

Tabelle 5.2 verdeutlicht den Vorteil des Biosensors gegenüber den anderen Verfahren: Während der Enzymtest von Boehringer sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv ist, werden für eine Messung mit dem Galactose-Oxidase Biosensor nur 5 Minuten benötigt. Zudem ist das Testkit nur mit großem Aufwand automatisierbar. Alle Verfahren eignen sich auch zum Nachweis weiterer Melasse-Bestandteile wie Galactose, Melibiose und Stachyose. Testkit und HPLC eignen sich damit als Referenzanalytik, der Biosensor mit Galactose-Oxidase ist für die schnelle Analytik zur Kontrolle des Aufarbeitungsprozesses die geeignete Wahl.

5.1.5 Nachweis von Raffinose mit Invertase und Fructose-Dehydrogenase

Um weitere Möglichkeiten der Raffinose-Detektion zu untersuchen, wird ein Biosensor aus einem Multi-Enzymsystem (Invertase und Fructose-Dehydrogenase) aufgebaut. Invertase spaltet die β -glykosidische Bindung der Raffinose und es entsteht freie Fructose, die über die Reaktion mit Fructose-Dehydrogenase nachgewiesen wird. Als Coenzym für diese Reaktion wird Kaliumhexacyanoferrat-(III) als Akzeptor eingesetzt. Da $K_3Fe(CN)_6$ ein Absorptionsmaximum bei 420 nm besitzt und bei der Umsetzung zu Kaliumhexacyanoferrat-(II) reduziert wird, kann die Reaktion photometrisch bei 420 nm verfolgt werden [142]. Abbildung 5.7 zeigt die Reaktionen des Multi-Enzymsystems.

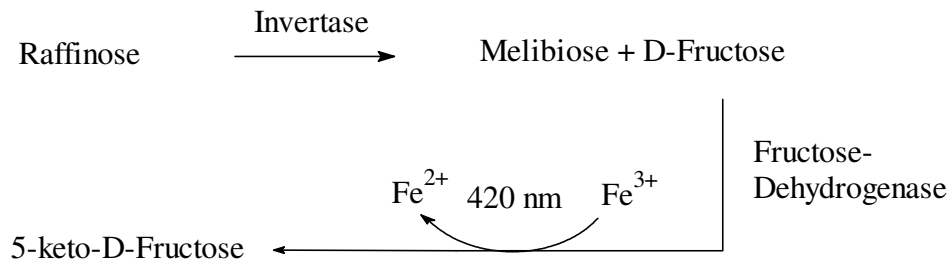


Abb. 5.7: Detektion von Raffinose mit Invertase und Fructose-Dehydrogenase

Für die Raffinose-Bestimmung wird Invertase nativ eingesetzt und die Fructose-Dehydrogenase auf VA-Epoxy immobilisiert. Das Immobilisat wird in einer Enzymkartusche mit einem FIA-System mit photometrischer Detektion des Fe^{3+} kombiniert (s. Abbildung 2.2) [30]. Zur Kalibration des Sensors wird jedem Standard zunächst 250 U native Invertase zugesetzt.

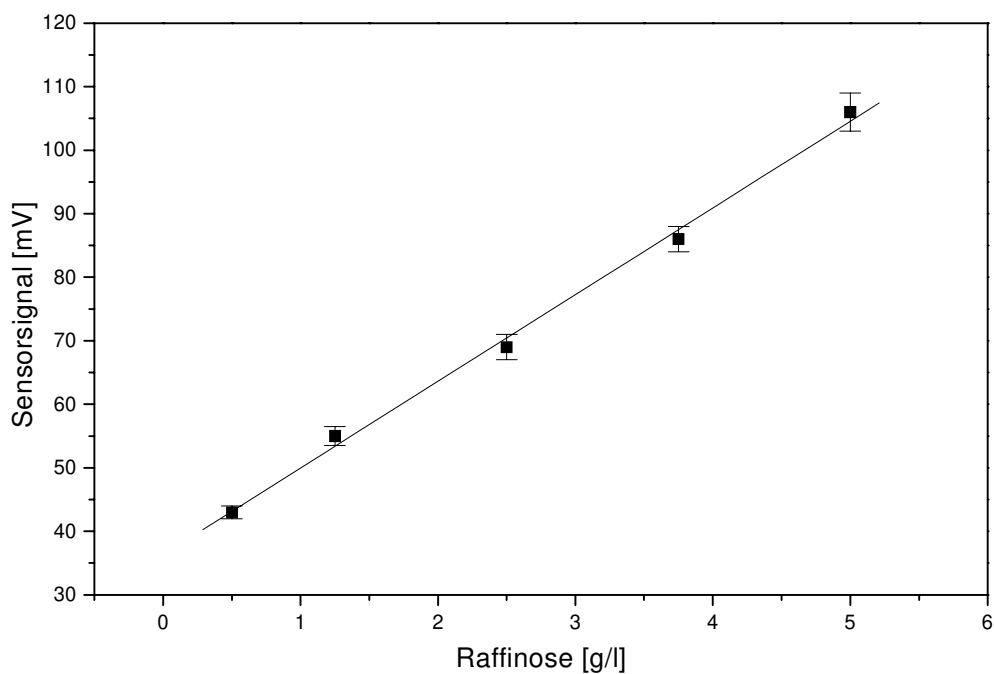


Abb. 5.8: Kalibrierung des Fructose-Dehydrogenase-Sensors mit fünf Raffinose-Standards, Trägerstrom 1,7 ml/min, 250 U native Invertase pro Probe, Reaktionszeit 20 min [30]

Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten wird die entstandene Fructose mit dem Biosensor detektiert und dient als direktes Maß für die eingesetzte Raffinose. Die Kalibration zeigt, daß mit dem Multi-Enzymsystem aus Invertase und Fructose-Dehydrogenase eine Bestimmung der Raffinose-Konzentration in Standards möglich ist. Da die freigesetzte Fructose umgesetzt wird, sind Querempfindlichkeiten zu anderen Sacchariden zu erwarten, bei denen durch Reaktion mit Invertase ebenfalls Fructose entsteht. Dazu zählt Saccharose, die in den untersuchten Fraktionen in hoher Konzentration vorkommt. Ein Nachweis von Raffinose neben Saccharose ist mit dem Multi-Enzymsystem nicht möglich, so daß der Biosensor erst nach vollständiger Abtrennung der Saccharose eingesetzt werden könnte. Das System kann jedoch in Kombination mit dem Galactose-Oxidase-Sensor zum parallelen Nachweis von Raffinose und Melibiose eingesetzt werden.

5.1.6 Nachweis von Raffinose neben Melibiose

Durch die Kombination des Galactose-Oxidase-Sensors mit dem Multi-Enzymsystem kann ein Zweikanal-Biosensor zum Nachweis von Raffinose neben Melibiose aufgebaut werden. Ein solches System könnte zur Überwachung der Melibiose-Herstellung aus der Spaltung von Raffinose in Melibiose und Fructose durch Invertase eingesetzt werden [143].

Das Disaccharid Melibiose besteht aus D-Galactose und D-Glucose, die über eine α -glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind (s. Abbildung 5.1). Wie in Kapitel 5.1.3.3 beschrieben, werden sowohl Melibiose als auch Raffinose vom Galactose-Oxidase Biosensor detektiert. Die Sensitivität liegt (Galactose=100 %) für Melibiose bei 57 % und für Raffinose bei 50 %. Liegen beide Zucker nebeneinander vor, liefert der Biosensor stets ein Gesamtsignal, das sich aus der Summe der Einzelsignale zusammensetzt. Durch Erweiterung des Biosensors zu einem 2-Kanalsystem lassen sich beide Saccharide nebeneinander nachweisen. Der erste Kanal besteht aus dem Galactose-Oxidase-Sensor und nimmt die Gesamtkonzentration beider Zucker auf. Im zweiten Kanal wird die Raffinose-Konzentration mit dem Multi-Enzymsystem bestimmt. Durch Subtraktion der Raffinose-Konzentration von der Gesamtkonzentration kann die Melibiose-Konzentration berechnet werden. Eine schematische Übersicht der ablaufenden Reaktionen des Multi-Enzymsystems ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

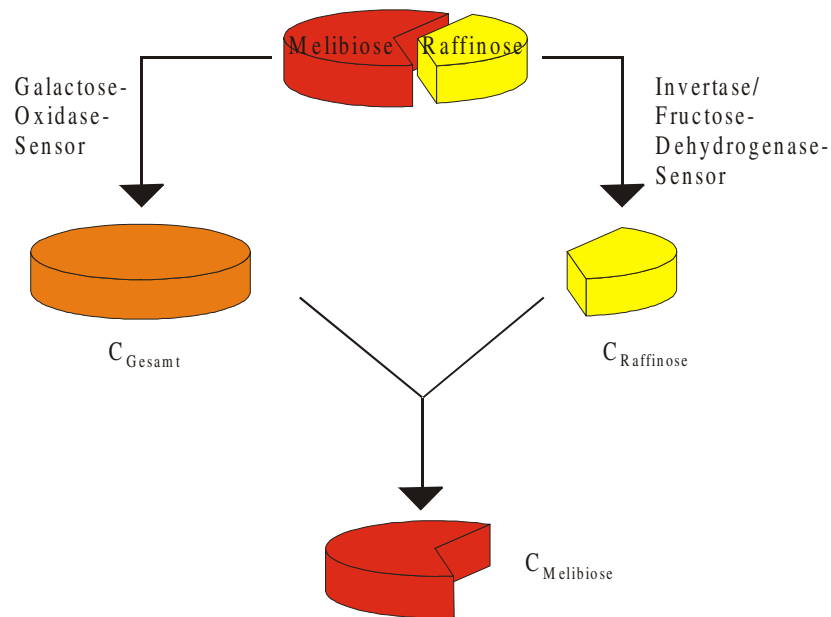


Abb. 5.9: Übersicht der ablaufenden Reaktionen des Multi-Enzymsystems zum parallelen Nachweis von Raffinose und Melibiose [30]

Die Konzentrationsbestimmung von Melibiose neben Raffinose wird nach dem in Abbildung 5.9 vorgestellten Reaktionsschema durchgeführt. Dazu werden Standards mit unterschiedlicher Raffinose- und Melibiose-Konzentration analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tab. 5.3: Ergebnisse der Analytik von Melibiose neben Raffinose: Gesamtkonzentration und Raffinose-Konzentration [30]

Zusammensetzung der Standards		Summe: Raffinose + Melibiose [g/l] (GalOD)	Fehler der Vorhersage [%]	Raffinose [g/l] (FruDH)	Fehler der Vorhersage [%]
Raffinose [g/l]	Melibiose [g/l]				
2,0	2,0	3,8	5,0	1,9	5,0
4,0	1,0	4,9	2,0	4,1	2,5
4,0	2,0	5,8	3,3	3,8	5,0
1,0	4,0	4,6	8,0	1,0	0,0
2,0	4,0	5,6	6,7	1,9	5,0

Die Messungen zeigen, daß mit beiden Kanälen des Sensorsystems die Gesamtkonzentration und die Raffinose-Konzentration bestimmt werden kann. Die Bestimmung der Gesamtkonzentration ist mit einem mittleren Fehler von 5 % möglich, da das Sensorsignal geringfügig kleiner ist als die Summe der Einzelsignale. Der mittlere Fehler der Raffinose-Bestimmung mit Fructose-Dehydrogenase ist mit 3,5 % geringer. Die berechnete Melibiose-Konzentration ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 5.4: Berechnete Konzentration von Melibiose durch Differenzbildung von Gesamtkonzentration und Raffinose-Konzentration [30]

Einwaage Melibiose [g/l]	Melibiose [g/l] {Differenz: Summe(GalOD) minus Raffinose(FruDH)}	Fehler der Vorhersage [%]
2,0	1,9	5,0
1,0	0,8	20,0
2,0	2,0	0,0
4,0	3,5	12,5
4,0	3,7	7,5

In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse der berechneten Melibiose-Konzentrationen zusammengestellt. Der mittlere Fehler, der bei der Berechnung der Melibiose-Konzentration gemacht wird, liegt bei 9 %. Die Meßfehler der beiden Biosensorsysteme können sich im ungünstigen Fall addieren, im günstigen Fall können sie sich gegenseitig aufheben.

Anhand der durchgeführten Messung läßt sich feststellen, daß sich der eingesetzte Galactose-Oxidase Sensor zusammen mit dem Multi-Enzymsystem zur Bestimmung von Raffinose neben Melibiose in Standards eignet. Die On-line-Fähigkeit des Sensors soll an einer simulierten Raffinose-Abbau-Reaktion unter Beweis gestellt werden.

5.1.7 On-line-Messung des enzymatischen Raffinose-Abbaus

In einem Modellversuch soll die Fähigkeit des Fructose-Dehydrogenase-Sensors zur On-line-Analytik untersucht werden. Dabei wird der Konzentrationsverlauf von Raffinose bei der Umsetzung mit Invertase zu Melibiose und Fructose verfolgt.

In einem gerührten und auf 32°C temperierten Reaktor werden 500 ml 0,2 M KPP-Puffer (pH 4,5), 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ und Raffinose (1 g/l) vorgelegt. Alle 6,5 Minuten wird eine Probe der Reaktionslösung analysiert. Nach Aufnahme von drei Meßpunkten wird 2500 U native Invertase zugesetzt und die Zunahme der Fructose-Konzentration durch den Raffinose-Abbau verfolgt. Nach vollständigem Umsatz werden nach 93 Minuten erneut 1 g/l Raffinose zugegeben.

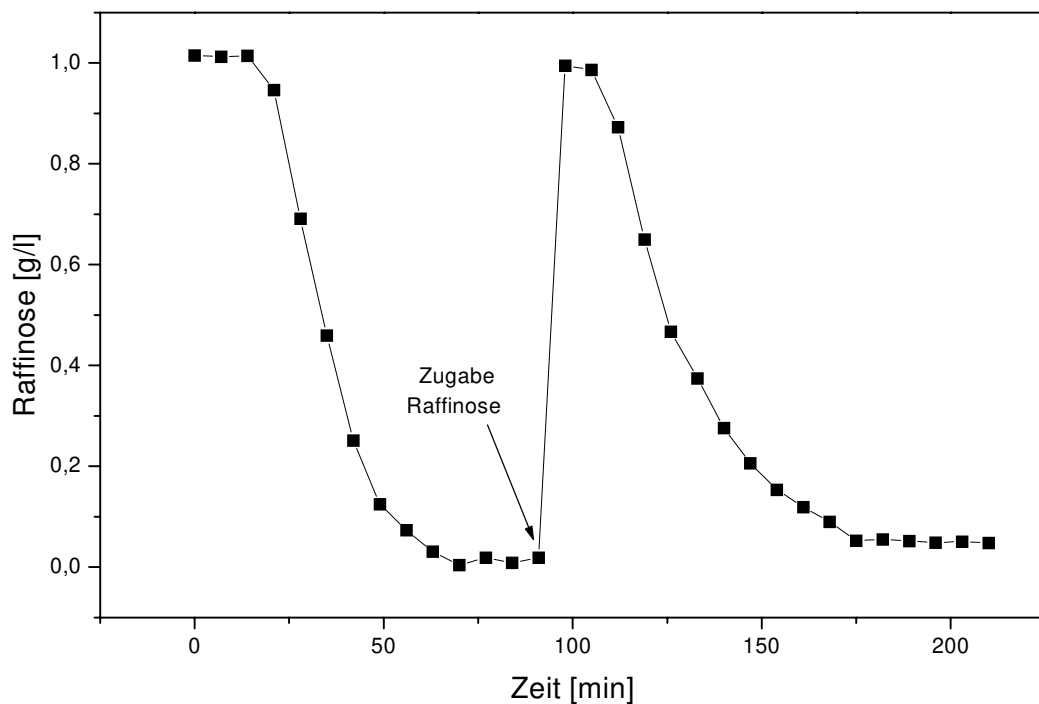


Abb. 5.10: Abbaureaktion von Raffinose durch Invertase, Detektion mit Fructose-Dehydrogenase-Sensor, $T=32^{\circ}C$, nach 93 Minuten Zugabe von Raffinose [30]

Die On-line-Messung zeigt, daß der Raffinose-Abbau mit dem Fructose-Dehydrogenase-Sensor gut verfolgt werden kann. Über einen Zeitraum von drei Stunden konnte die Umsetzung mit einer Analysenfrequenz von 9 Proben pro Stunde verfolgt werden.

5.1.8 Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung eines schnellen Analysensystems zur Detektion von Raffinose in der chromatographischen Melasseentzuckerung. Es wurde ein Biosensor aus immobilisierter Galactose-Oxidase und amperometrischer Detektion des gelösten Sauerstoffs mit einem FIA-System kombiniert. Das System eignet sich zur Bestimmung von Raffinose-Standards und bietet mit einer Meßzeit von 4-5 Minuten gegenüber HPLC oder Enzym-Testkit einen deutlichen Zeitvorteil. Die Messung von Realproben wird durch Matrixeinflüsse oder Querempfindlichkeiten beeinflusst, ist jedoch mit dem Standardzusatzverfahren möglich. Ein weiterer Vorteil ist die Automatisierbarkeit der Messungen. Der Biosensor eignet sich somit für die schnelle Abschätzung der Raffinose-Konzentration im chromatographischen Trennprozeß.

Das Multi-Enzymssystem Invertase/Fructose-Dehydrogenase mit photometrischer Detektion eignet sich ebenfalls zur schnellen Raffinose-Analytik. Als Einschränkung für dieses System gilt die Querempfindlichkeit zu Saccharose, die ebenfalls detektiert wird und in Melasse in hoher Konzentration vorhanden ist. Der Sensor eignet sich somit, nachdem die Saccharose durch geeignete Verfahren abgetrennt worden ist, zur Überwachung der Aufarbeitung und zur Abschätzung des Raffinose/Melibiose-Verhältnisses bei der Umsetzung von Raffinose zu Melibiose.

5.2 Analytik von Saccharose in Zuckerrübenmelasse

5.2.1 Chromatographische Trennung von Saccharose

Zwischen der 40. und 80. Minute des Chromatographiezyklus wird die Saccharose-Fraktion gewonnen (s. Abbildung 4.1), die anschließend in mehreren Schritten entfärbt und weiter aufgereinigt wird. Die Prozeßkontrolle richtet sich vor allem nach der densitometrischen und polarimetrischen Bestimmung des Saccharose-Gehalts. Wie in Kapitel 4.1.2 erläutert, wird die Messung durch Begleitstoffe wie Saccharide und Aminosäuren beeinflusst. Die Messung liefert somit keine Absolutwerte, sondern je nach Verunreinigung eine schnelle Abschätzung der Konzentration. Mit einem Biosensorsystem soll getestet werden, ob eine präzisere On-line-Messung der Saccharose-Konzentration möglich ist.

Off line wird die Saccharose-Konzentration mit der Zucker-HPLC bestimmt (siehe Anhang 8.8.3). In der Literatur sind eine Reihe von Verfahren beschrieben, die jedoch alle für eine Prozeßsteuerung zu langsam sind [131-133, 137, 144-146]. Die Erfassung verschiedener Saccharide mit FIA-Systemen wird in der Literatur beschrieben [130, 147].

5.2.2 Aufbau des Biosensors zur Bestimmung von Saccharose

Abb. 5.11 zeigt die Reaktionen des Multi-Enzymsystems zur Detektion von Saccharose. Als biologische Komponente werden Invertase, Glucose-Oxidase und Mutarotase auf VA-Epoxy co-immobilisiert und in einer Enzymkartusche in ein FIA-System integriert.

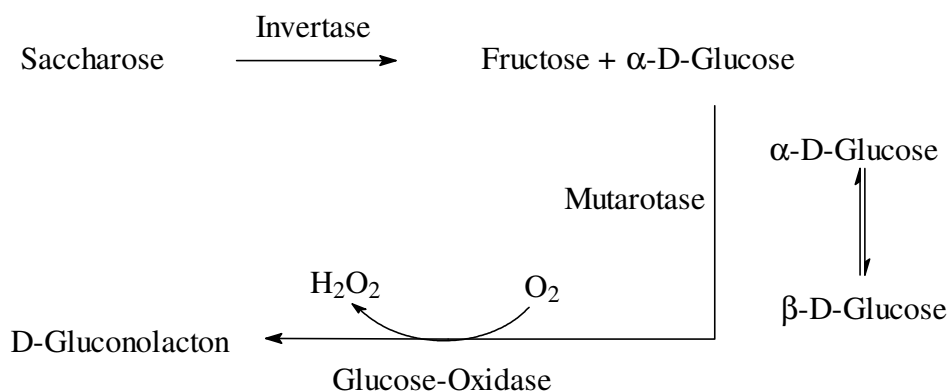


Abb. 5.11: Enzymatische Detektion von Saccharose

Invertase spaltet Saccharose in Glucose und Fructose, Mutarotase beschleunigt die Einstellung des Gleichgewichts von α - zu β -Glucose, die von Glucose-Oxidase umgesetzt wird. Der dabei verbrauchte Sauerstoff wird analog Abbildung 2.2 von einer amperometrischen Sauerstoffelektrode detektiert. Ein Vorteil des Multi-Enzymsystems ist die sehr spezifische Reaktion von Glucose-Oxidase, die nur β -Glucose umsetzt und somit Querempfindlichkeiten zu anderen Sacchariden ausschließt.

5.2.3 Messung von Saccharose am Chromatographieprozeß

Die Proben werden direkt von einer Trennkolonne in einer Mischkammer 1:4,4 mit Puffer verdünnt und der pH-Wert on line auf pH 5,0 geregelt. Zur pH-Regelung wird ein Impulsomat/Dosimat eingesetzt, der durch Zugabe von 0,1 M HCl den pH-Wert konstant hält [148]. Diese Maßnahme erweist sich für die Messung von Saccharose als notwendig, da der pH-Wert des Eluats im Verlauf des Chromatographiezyklus zwischen pH 7,8 und 10,0 schwankt und das Optimum der verwendeten Enzyme jedoch im sauren pH-Bereich liegt. Der Verbrauch an Salzsäure verursacht dabei einen Verdünnungsfehler von $< 2\%$. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 5.12 dargestellt.

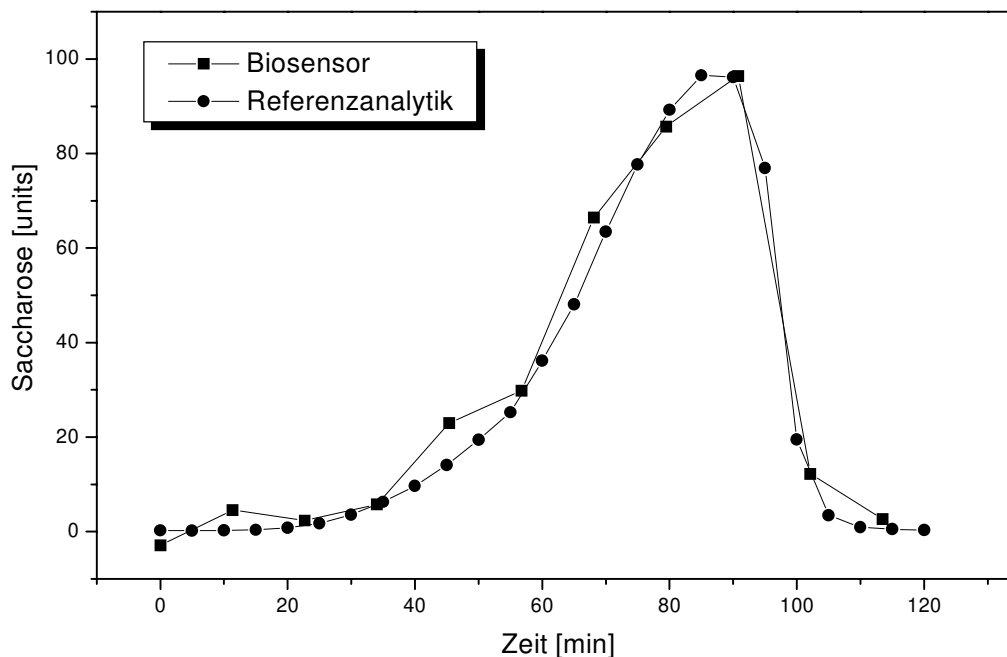


Abb. 5.12: On-line-Messung der Saccharose-Konzentration und Vergleich der Meßwerte eines Zyklus mit der HPLC-Referenz (Anhang 8.8.3)

Abbildung 5.12 zeigt die gute Übereinstimmung zwischen Biosensor und der HPLC-Referenz. Im Dauertest lief der Sensor über eine Zeit von fünf Tagen stabil. Jedoch nimmt eine Messung etwa 15 Minuten in Anspruch, was mit der langsamen gekoppelten Enzymreaktion und der Verdünnung der Probe mit Einstellung des pH-Wertes zusammenhängt. Durch Wahl der geeigneten Bedingungen (höhere Flußrate des Betriebspuffers) kann die Meßzeit verkürzt werden. Mit dieser Maßnahme nimmt jedoch gleichzeitig die Empfindlichkeit ab, die Proben können nicht im gleichen Verhältnis verdünnt werden und Störungen durch die Probenmatrix treten verstärkt auf. Im Vergleich zu anderen Fraktionen ist die Saccharose-Fraktion jedoch relativ rein, d.h. die Konzentration von Salzen, organischen Säuren und Farbstoffen, die Störungen verursachen können, ist gering. Durch die hohen Temperaturen im Trennprozeß ist jedoch der Sauerstoffgehalt der Proben gering und verursacht bei geringerer Verdünnung Störungen am Transducer. Die Messung mit dem Biosensor ist im Vergleich zur sehr schnellen densitometrischen und polarimetrischen Messung zu langsam, um sie zur Prozeßkontrolle einsetzen zu können.

Im folgenden Kapitel wird untersucht, wie sich Biosensoren, die zeitverzögert Daten liefern, zu einer Kontrolle von schnellen Prozessen einsetzen lassen. Am Beispiel des Serin-Sensors soll ein Konzept zur Optimierung des Trennprozesses erarbeitet werden.

6 Biosensoren zur Analytik von Aufarbeitungsprozessen

In der Biotechnologie liegt der Hauptaufwand oft nicht in der Produktion, sondern in der Gewinnung und Aufreinigung der Produkte. Das sogenannte „Downstream Processing“ umfaßt dabei Operationen wie die Abtrennung von Zellen, Extraktion, Kondensation, Chromatographie, Kristallisation und Trocknen [5]. In biotechnologischen Prozessen können Proteine im Konzentrationsbereich von einigen mg/l vorliegen und müssen von einer Vielzahl anderer Proteine und Verunreinigungen abgetrennt werden [5]. Die Aufreinigung sollte möglichst schnell und unter schonenden Bedingungen durchgeführt werden, weil empfindliche Proteine ihre biologische Aktivität verlieren können. Die verlangte Reinheit hängt stark vom Einsatzgebiet ab: Für Pharmaprodukte wird nicht nur die höchste Reinheitsstufe verlangt, bei der keine Verunreinigungen nachweisbar sein dürfen, sondern auch eine robuste und valide Prozeßanalytik. Im Extremfall können die Kosten für das Downstream Processing bis zu 90 % der Herstellungskosten betragen [5, 149]. Chromatographische Verfahren spielen in der Aufreinigung eine zentrale Rolle und machen zusammen mit Membranverfahren bis zu 90 % der weltweit verwendeten Technologie aus [150-154]. Die Optimierung der Aufarbeitung spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Prozeßoptimierung in der Biotechnologie [155].

Während die Kontrolle und Regelung des pH, pO_2 und der Temperatur bei Fermentationsprozessen weit entwickelt ist, stehen zur Kontrolle von Aufarbeitungsschritten oft nur unzureichende Analysenverfahren zur Verfügung [149]. Die Analytik von biotechnologisch hergestellten Produkten ist aufwendig, und es steht oft keine Methode für eine schnelle, den Aufreinigungsprozeß begleitende Analytik zur Verfügung. Diese Lücke kann durch den Einsatz von Biosensoren geschlossen werden [156, 157]. Im folgenden Kapitel wird der Einsatz des entwickelten Serin-Sensors (siehe Kapitel 4.2) zur Optimierung des Chromatographieprozesses beschrieben.

6.1 Biosensoren im Downstream Processing – Stand der Technik

Der Einsatz von Biosensoren bei der chromatographischen Aufreinigung von Enzymen ist in der Literatur beschrieben worden [158-162]. Dabei wird die enzymespezifische Reaktion zur Detektion des Proteins ausgenutzt, das Produkt stellt quasi die biologische Komponente eines Biosensorsystems dar. In diesen Arbeiten erfolgt jedoch keine

Regelung des Trennprozesses, die auf den gemessenen Daten basiert. Ziel einer Prozeßanalytik sollte es sein, sowohl die Überwachung als auch die Steuerung des Prozesses zu ermöglichen. Ein solches System basierend auf der Detektion von IgG wird von Kenney beschrieben [163]. Die Analytik beruht in diesem Fall auf der Messung der UV-Absorption und des pH-Wertes und ist somit nicht spezifisch. Holwill et al. beschreibt ein Analysenverfahren, bei dem die chromatographische Aufreinigung von Alkohol-Dehydrogenase mit mathematischen Methoden zur Vorhersage und Prozeßkontrolle kombiniert wird [149].

Im folgenden soll die Ankopplung des Sensors an den chromatographischen Trennprozeß beschrieben werden. Um Biosensoren zur Regelung von schnellen Prozessen einsetzen zu können, kann die zeitverzögerte Messung durch mathematische Verfahren kompensiert werden. Bei der Regelung von Bioprozessen wird die Verzögerung durch Probenahme und Messung bei der Regelung mit künstlichen neuronalen Netzen berücksichtigt [164]. Damit kann eine Vorhersage des Konzentrationsverlaufes gemacht werden, auf der die Regelung basiert.

6.2 Biosensorsystem zur Prozeßanalytik

Für die Messungen am Prozeß wird das Sensorsystem mit einem Autosampler kombiniert, der sowohl zur Probenahme als auch zur Probenkonditionierung eingesetzt werden kann. Abbildung 6.1 zeigt ein Bild der Laborversion des Sensorsystems.



Abb. 6.1: V.l.n.r. Autosampler, Injektor, Wasserbad, Pumpe, Photometer, PC, vorne die Steuereinheit des Autosamplers und die Durchflußküvette

Das System ermöglicht eine automatische Probenahme und die anschließende Bestimmung der Serin-Konzentration. Für die Regelung des Prozesses ist es notwendig, daß auf aktuelle Analysendaten zurückgegriffen werden kann. Im folgenden wird erläutert, wie der Biosensor zur Überwachung und Optimierung des schnellen Chromatographieprozesses eingesetzt werden kann.

6.3 Konzept der In-Time-Analytik

Da die Zeit für eine Messung mit zwei Minuten noch zu langsam für eine Regelung des Prozesses ist, wurde das Konzept der „In-Time“-Analytik entwickelt. Wie in Kapitel 4.1 erläutert, dauert ein kompletter chromatographischer Zyklus etwa zwei Stunden. Erste Untersuchungen mit dem Serin-Sensor haben gezeigt, daß sich das Elutionsverhalten der Trennkolonne nur langsam ändert, so daß von Zyklus zu Zyklus nur geringe Unterschiede zu erwarten sind. Ein Korrigieren der Schnittparameter während der Elution der Serin-Fraktion ist mit dem Biosensor zwar nicht möglich, es besteht jedoch keine Notwendigkeit dazu. Vielmehr reicht es aus, die Schnittgrenzen nachträglich zu überprüfen und eventuelle Änderungen rechtzeitig („In-Time“) durchzuführen, bevor die nächste Serin-Fraktion eluiert. In der folgenden Abbildung wird dieses Prinzip verdeutlicht.

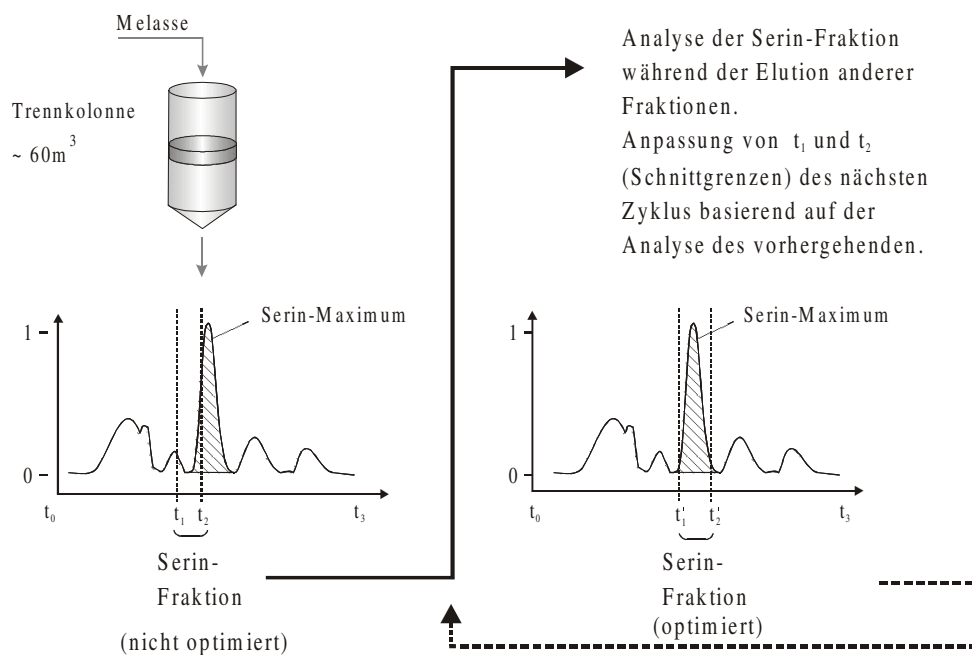


Abb. 6.2: Konzept der In-Time-Analytik zur Optimierung des Trennprozesses [24]

Der linke Teil der Abbildung beschreibt den Ist-Zustand des Prozesses: Die Serin-Fraktion wird im Bereich t_1 bis t_2 fraktioniert, jedoch eluiert das Serin erst später und gelangt fast komplett in die Rückführ-Fraktion. Zur Optimierung werden vom Zeitpunkt ($t_1-1\text{min}$) bis zur Zeit ($t_2+1\text{min}$) Proben im Abstand von 30 Sekunden gesammelt und mit dem Serin-Sensor analysiert. Die Analyse kann automatisch ablaufen, während die anderen Fraktionen (Saccharose, Betain, Restmelasse, vgl. Abbildung 4.1) eluieren. Damit stehen für die Analytik etwa 90 Minuten zur Verfügung, bevor die nächste Serin-Fraktion von der Säule eluiert. In dieser Zeit kann das Analysenergebnis der Proben an die Prozeßanalytik weitergeleitet werden und die Schnittgrenzen können bei Bedarf korrigiert werden. Bei der nächsten Serin-Fraktion kann dieses Vorgehen wiederholt werden, so daß ständig die optimalen Schnittparameter gesetzt werden. Im folgenden Kapitel wird näher auf die Messungen am Trennprozeß eingegangen.

6.4 Charakterisierung von Änderungen im Elutionsverhalten

Bei den ersten Messungen soll untersucht werden, ob Verschiebungen in aufeinanderfolgenden Zyklen festzustellen sind. Dazu werden hintereinander mehrere Serin-Fractionen einer (nicht optimierten) Trennkolonne untersucht. Das Ergebnis einer Messung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

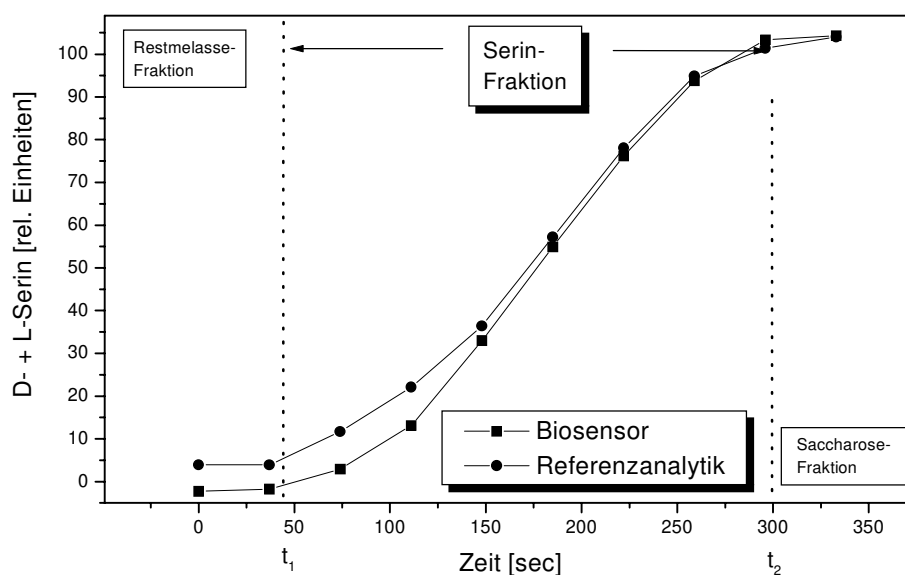


Abb. 6.3: Serin-Fraktion der Trennkolonne 1. Vergleich der Meßwerte des Biosensors mit dem Aminosäure-Analyser

In Abbildung 6.3 ist nur die linke Hälfte des Serin-Peaks dargestellt. Aus den Messungen geht hervor, daß der Verlauf der Serin-Konzentration von dem Biosensor in guter Übereinstimmung mit der Referenzanalytik wiedergegeben wird. Die eingezeichneten Schnittgrenzen t_1 und t_2 stellen die tatsächliche Schnittführung der Anlage dar. Diese kann sowohl durch ein bei jeder Probenahme ausgedrucktes Protokoll als auch durch Umschalten der Ventile am Ausgang der Säule ermittelt werden. Die Bestimmung des Ventil-Umschaltens ist mit ± 3 Sekunden genauer als das Protokoll, in dem lediglich die Zeit in Minuten vermerkt ist. Es ist auffällig, daß der Schnitt für die Serin-Fraktion deutlich zu früh erfolgt, bereits wenige Sekunden nach Erreichen des Serin-Maximums wird die nächste Fraktion geschnitten. Dieses Verhalten konnte an mehreren Trennkolumnen nachgewiesen werden, die Schnitte erfolgten teilweise mehrere Minuten zu früh. Ein verspäteter Schnitt konnte nicht detektiert werden, ein Hinweis darauf, daß sich die Serin-Fraktion möglicherweise zu längeren Retentionszeiten hin verschiebt. Die Effektivität des Trennprozesses war längere Zeit nicht durch Probenahme und Analyse kontrolliert worden.

Um Verschiebungen bei der Elution der Serin-Fraktion zu charakterisieren, wird die Peakfläche unter einer optimal geschnittenen Fraktion als 100 % angenommen. Bei allen Messungen wird die Schnittführung des Prozeßleitsystems dargestellt, die Fläche unter der Kurve zwischen den Schnittgrenzen t_1 und t_2 berechnet und auf das Optimum bezogen.

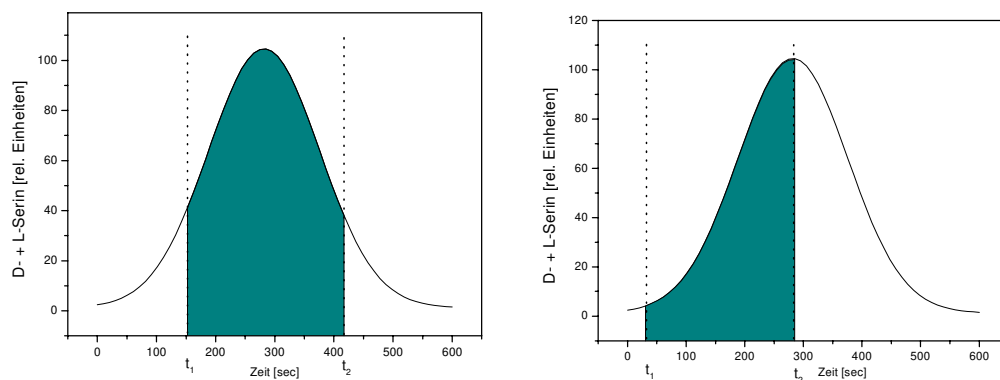


Abb. 6.4 : Peakfläche bei optimaler Fraktionierung (=100 %) und bei 120 Sekunden zu früher Schnittführung (= 61 %).

Bei dieser Darstellung bleibt unberücksichtigt, daß durch die Elution anderer Komponenten die Reinheit der Serin-Fraktion zu den Flanken hin stark abnimmt. Für die folgenden Messungen werden vier aufeinander folgende Serin-Fractionen der Trennkolonne 1 mit dem Biosensor analysiert und die Peakfläche wie beschrieben berechnet.

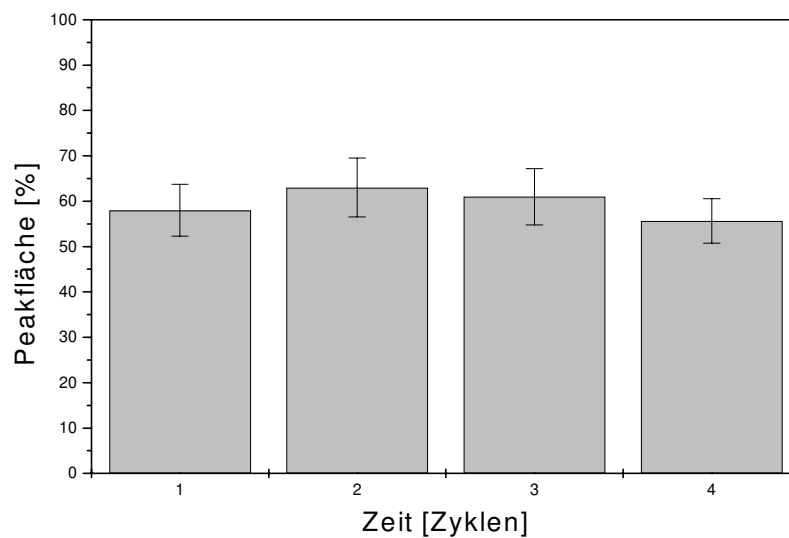


Abb. 6.5: Peakfläche von vier aufeinander folgenden Serin-Fractionen der Trennkolonne 1 im Vergleich zu idealer Schnittführung (= 100 %)

Die Integration der Peakflächen bei vier sukzessiven Zyklen zeigt nur leichte Schwankungen, die im Rahmen der Meßgenauigkeiten liegen. Der Fehler von 10 % setzt sich aus Fehlern bei der Probenahme, dem Fehler bei der Bestimmung der Schnittgrenzen und den Meßfehlern des Serin-Sensors zusammen. Ähnlich der in Abbildung 6.3 dargestellten Messung erfolgen alle Schnitte etwa 120 Sekunden zu früh, und die fraktionierte Serin-Konzentration beträgt im Mittel lediglich 59 % des Optimums.

Um zu untersuchen, ob sich im Zeitraum von einigen Tagen eine Verschiebung der Serin-Fraktion detektieren läßt, wird im Abstand von 24 Stunden die Serin-Fraktion der Trennkolonne 4 mit dem Biosensor analysiert. Aus technischen Gründen konnten die Untersuchungen nicht an der Trennkolonne 1 durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.6 dargestellt.

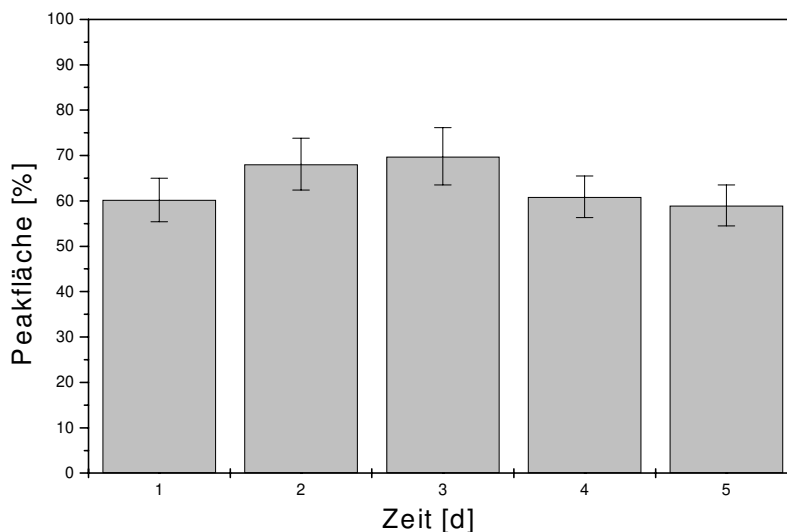


Abb. 6.6: Peakfläche von Serin-Fractionen der Trennkolonne 4 an fünf aufeinander folgenden Tagen im Vergleich zu idealer Schnittführung (= 100 %)

Die Messungen über einen Zeitraum von fünf Tagen geben ebenfalls keinen Aufschluß über eine Verschiebung der Elutionszeiten der Serin-Fraktion. Die Fraktionierung erfaßt im Mittel 63 % des Serins und liegt damit 4 % über den bei der Trennkolonne 1 bestimmten Werten.

Wie in Kapitel 4.1 erläutert, werden die Trennkolonnen für einen Zeitraum von 2-3 Wochen kontinuierlich betrieben, bevor eine Rückspülung des Harzes erfolgt. Um eventuelle Verschiebungen über einen längeren Zeitraum zu dokumentieren, wird im Abstand von 2-5 Tagen die Serin-Fraktion der Trennkolonne 2 mit dem Biosensor charakterisiert und nach dem beschriebenen Verfahren die Peakfläche berechnet. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 6.7 zusammengefaßt.

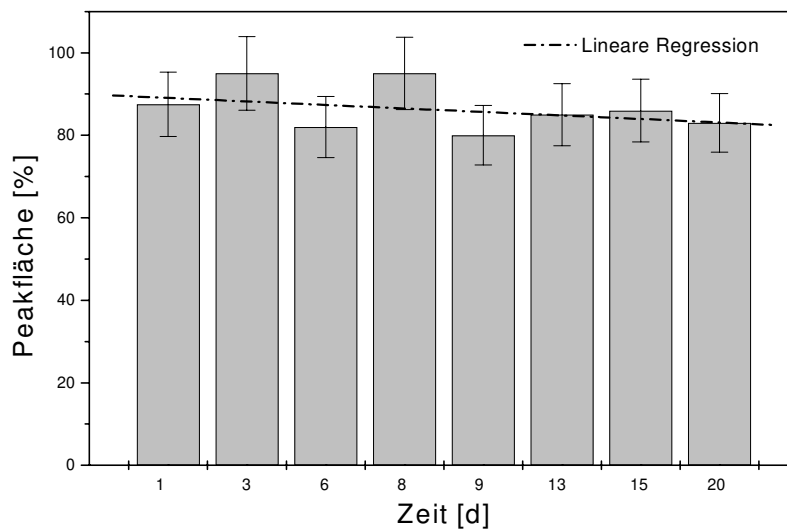


Abb. 6.7: Peakfläche von Serin-Fractionen der Trennkolonne 2 zwischen zwei Rückspülungen im Vergleich zu idealer Schnittführung (= 100 %)

Über einen Zeitraum von 20 Tagen ist eine geringe Abnahme der Peakfläche festzustellen. Wie bei den vorangegangenen Messungen sind leichte Schwankungen zu verzeichnen. Durch lineare Regression der Peakmaxima läßt sich eine Verschlechterung der Schnittführung von 0,3 % pro Tag nachweisen. Auffällig ist weiterhin, daß im Mittel 87 % des Serins erfaßt werden. Die Schnittführung der Trennkolonne 2 liegt somit deutlich über dem Niveau der Trennkolonnen 1 und 4.

6.5 Optimierung des Chromatographieprozesses

Die Messungen mit dem Serin-Sensor dienen als Grundlage für die Optimierung des Trennprozesses. Die notwendige Korrektur der Schnittgrenzen kann über die Berechnung einer Gauß-Funktion erfolgen, die aus den vorhandenen Meßdaten den gesamten Peakverlauf extrapoliert. Die optimalen Schnittgrenzen t_1 und t_2 können auf diese Art und Weise bestimmt werden.

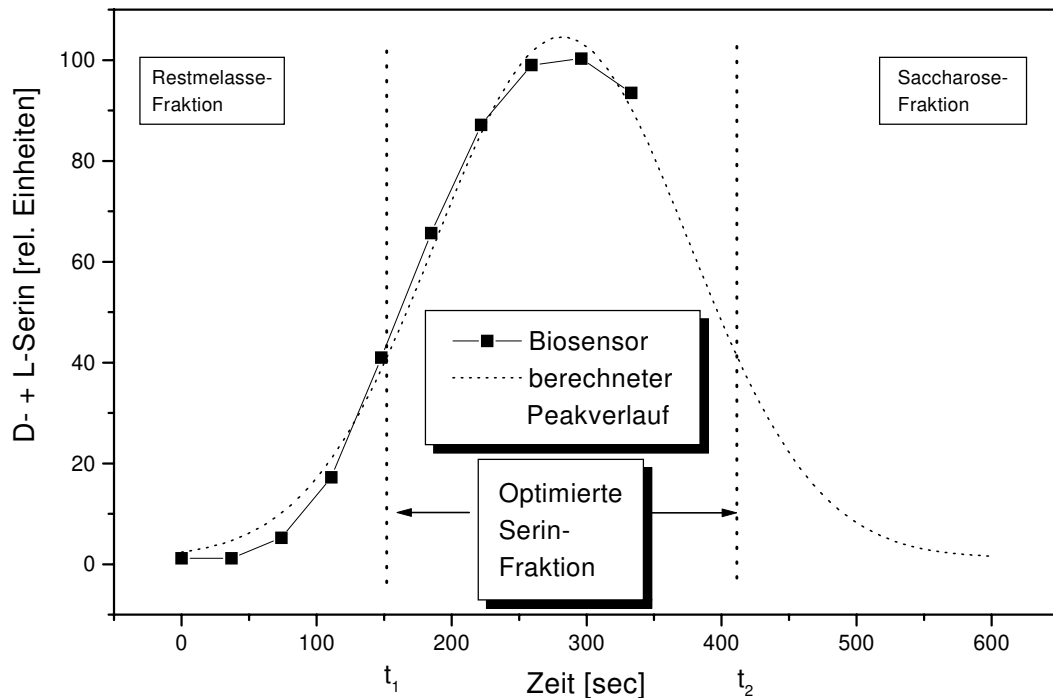


Abb. 6.8: Anpassung der Schnittgrenzen der Serin-Fraktion über eine berechnete Gauß-Funktion (Microcal Origin® 5.0). Der berechnete Peak ist gepunktet dargestellt.

Abbildung 6.8 zeigt die neu berechneten Schnittgrenzen der Serin-Fraktion, die in der Mitte des Serin-Peaks geschnitten wird. Die Schnittgrenzen müssen in diesem Fall um 120 Sekunden korrigiert werden. Gemessen an der Dauer der Fraktion (4-6 Minuten) führt ein Fehler dieser Größenordnung dazu, daß ein erheblicher Teil des Serins in den Rückführ-Fractionen rechromatographiert wird. Die Beschreibung mit der Gauß-Funktion stellt eine Näherung dar, in der Praxis wird oft mit Asymmetriefaktoren gearbeitet, die das Tailing des Peaks beschreiben [92].

Die Überwachung des Chromatographieprozesses mit dem Biosensor bietet die Möglichkeit, die Schnittgrenzen der Serin-Fraktion zu optimieren. Dabei können die Schnittparameter t_1 und t_2 entweder nach Bedarf oder kontinuierlich nachgeregelt werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Analysensystemen ergibt sich bei der Regelung von sechs Säulen parallel und der daraus resultierenden hohen Probenzahl ein großer Zeitvorteil. Zudem ist das System schnell genug, Einlaufphasen (z. B. nach Rückspülung des Harzes)

charakterisieren und optimieren zu können. Im folgenden Kapitel werden die Vorteile einer Prozeßoptimierung in Form von Energie- und Chemikalieneinsparungen belegt.

6.6 Auswirkung der Prozeßoptimierung

Durch die Anwendung der In-Time-Analytik und das optimale Setzen der Schnittgrenzen läßt sich der Verbrauch an Energie und Chemikalien verringern. Im Vergleich zum momentanen Zustand läßt sich bei optimaler Auslegung des Prozesses eine 60 % höhere Produktkonzentration erzielen. Daraus resultieren Einsparungen, die nicht primär bei der Ionenausschluß-Chromatographie, sondern bei den nachfolgenden Aufreinigungsschritten und der Biotransformation des Serins zu Tryptophan zu erzielen sind. Durch die höhere Serin-Konzentration können bei der nachfolgenden Entfärbung durch Aktivkohle und Ionenaustausch geringere Mengen an Chemikalien, Prozeßwasser und Dampf eingesetzt werden. Durch die höhere Produktreinheit wird die Kristallisation erleichtert und gleichzeitig weniger Energie (in Form von Dampf) zum Konzentrieren der Lösungen benötigt. Die Einsparungen beim CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf) resultieren aus der höheren Serin-Konzentration und –Reinheit bei der Umsetzung zu L-Tryptophan, die sich sowohl bei der Biotransformation als auch bei der anschließenden Aufreinigung positiv auswirkt. Tabelle 6.1 zeigt eine Berechnung, welche Einsparungen sich pro Jahr bei optimierter Fraktionierung des Serins realisieren lassen.

Tab. 6.1: Einsparungsmöglichkeiten bei Verwendung des Serin-Biosensors und daraus optimierter Prozeßführung [91]

Optimierungseffekt	Einsparung von		
	Energie	Chemikalien	Wasser
60% höhere Produktkonzentration	200-240 t Dampf 30 % spezifische Produktionsenergie		
25% höhere Produktausbeute		106 t HCl 84 t NaOH 80 t NH ₃ 8 t Aktivkohle	3100 m ³ Elutionswasser
35% weniger spezifische Abwasserbelastung			3100 m ³ Abwasser 80 t CSB

Mit der Ankopplung des Serin-Sensors an den Chromatographieprozeß konnte gezeigt werden, daß erheblicher Optimierungsbedarf bei der Fraktionierung des Serins besteht. Bei allen untersuchten Trennkolonnen wurde die Serin-Fraktion fehlerhaft geschnitten, wodurch bis zu 50 % des Serins in den Rückführ-Fractionen rechromatographiert wurden. Durch den Einsatz des Biosensors zur Prozeßanalytik und -optimierung kann der Chromatographieprozeß besser ausgelastet werden. Die im Zeitraum von 20 Tagen gezeigte Verschiebung der Serin-Fraktion von etwa 0,3 % pro Tag kann durch das Konzept der In-Time Analytik kompensiert werden, so daß eine dauerhaft gute Trennleistung erzielt wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ankopplung des Serin-Sensors an den bestehenden Prozeß der Melasseentzuckerung nicht nur ressourcen- und umweltschonend ist, sondern auch unter ökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll sein kann. Als eine Form des produktionsintegrierten Umweltschutzes leistet die intelligente Prozeßsteuerung somit einen wichtigen Beitrag zur Wertschöpfung von Produkten aus Rest- und Wertstoffen.

7 Schlußbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Biosensoren für industrielle Anwendungen zu entwickeln und zu optimieren. Biosensoren stoßen immer noch auf Vorbehalte in der Industrie: Die Systeme sind kompliziert zu bedienen und äußerst empfindlich.

Es wurden neue Immobilisierungsverfahren untersucht, die dazu beitragen sollen, mit hohen Enzymaktivitäten die Standzeit der biologischen Komponenten von Biosensoren zu erhöhen. Hilfreich ist dabei die Immobilisierung möglichst hoher Enzymaktivitäten, um jederzeit über eine Reserve an Enzym zu verfügen. Um ein Meßsystem vollständig zu automatisieren, sollte eine schnelle Immobilisierung der biologischen Komponente ohne Eingriff möglich sein. Für diesen Zweck wurden Immobilisierungsverfahren basierend auf chelatisierender Sepharose und Con A untersucht. Die Kombination beider Verfahren ermöglicht die selektive Immobilisierung und Elution zweier unterschiedlicher Enzyme auf dem gleichen Träger. Am Beispiel der Saccharose-/Glucose-Analytik wurde dieses Verfahren untersucht. Diese Immobilisierungsmethode bietet gegenüber einer kovalenten Bindung den Vorteil der Reversibilität. Sowohl über Metallionen als auch über Con A gebundene Enzyme lassen sich durch pH-Shift oder Verdrängung vom Träger entfernen. Nach dieser Behandlung steht der Träger für eine erneute Immobilisierung zu Verfügung. Es können somit Biosensoren konstruiert werden, die bei nachlassender Aktivität selbsttätig eine Elution und Immobilisierung der biologischen Komponente durchführen, ohne daß ein Eingriff in das System notwendig wird.

Mit dem Bioaffinity Layering wurde ein Verfahren vorgestellt, das die Immobilisierung von Glykoenzymen in Schichten von Con A und Enzym ermöglicht. Ein ähnliches Immobilisierungsverfahren wurde in Zusammenarbeit mit der Aligarh Muslim University (Indien) entwickelt. Statt des Lektins wurden Antikörper gegen Enzyme verwendet, um wechselweise Schichten von Enzym und Antikörper aufzubauen. Mit Antikörpern gegen Glucose-Oxidase und Peroxidase wurde dieses „Immunoaffinity Layering“-Verfahren untersucht und der Einsatz solcher Systeme in Biosensoren für Glucose und Wasserstoffperoxid getestet. Die Messungen haben gezeigt, daß die Anwendung des Layerings mehrere Vorteile für die Biosensorik in industriellen Anwendungen verspricht: höhere Aktivität (= Sensitivität) und Stabilität (= Standzeit im Betrieb).

Für den Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung wurde ein Biosensor entwickelt, der den Verlauf der Serin-Konzentration detektieren kann. Für die Entwicklung des Serin-Sensors wurden zunächst nach geeigneten Enzymen gesucht. Eine L-Aminosäure-Oxidase eignete sich nicht als biologische Komponente, da sie L-Serin nicht umsetzt. Jedoch wurde durch diese Untersuchungen aufgezeigt, daß eine Reihe weiterer L-Aminosäuren in der untersuchten Serin-Fraktion vorhanden sind, so daß bei der Wahl der biologischen Komponente auf die Querempfindlichkeit des Systems geachtet werden mußte.

Durch die Carbonatation (Kalkung) in der Zuckerfabrik liegt Serin zu einem geringen Anteil als D-Enantiomer vor, so daß eine Analytik über das D-Enantiomer möglich war. Die Anzahl der störenden Begleitstoffe verringert sich, da außer Serin lediglich Tyrosin teilweise racemisiert vorliegt. Die Kombination einer D-Aminosäure-Oxidase mit amperometrischer Sauerstoffelektrode liefert einen Biosensor, der D-Serin in Standards bestimmen kann. Messungen mit Proben des Chromatographieprozesses ergaben einen Nachteil des Systems: die große Querempfindlichkeit zu D-Tyrosin. Es war nicht möglich, beide D-Aminosäuren nebeneinander nachzuweisen, da D-Tyrosin aufgrund der Selektivität des Enzyms bevorzugt umgesetzt wird.

Die weitere Suche führte zur D-Serin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae*, die auch in geringem Umfang Querempfindlichkeiten zu anderen D- und L-Aminosäuren aufweist. Die Desaminierung von D-Serin zu Pyruvat wurde mit einer zweiten enzymatischen Reaktion kombiniert, die nur das gebildete Pyruvat umsetzt und Querempfindlichkeiten fast völlig ausschließt. Als Detektionsreaktion bot sich die durch Lactat-Dehydrogenase katalysierte Umsetzung von Pyruvat zu Lactat an, der NADH-Verbrauch läßt sich auf einfache Art und Weise photometrisch detektieren. Die D-Serin-Dehydratase wurde im Arbeitskreis von PD Dr. Lutz Fischer (TU Braunschweig) isoliert und beide Enzyme auf VA-Epoxy immobilisiert. Durch Kombination mit einem FIA-System und Optimierung der Parameter konnte ein automatischer Serin-Sensor entwickelt werden, der die Messung einer Probe in 125 Sekunden ermöglichte. Anhand von Proben der Serin-Fraktion konnte die Praxistauglichkeit des Biosensors nachgewiesen werden, die Meßergebnisse zeigten eine gute Korrelation mit der Referenzanalytik.

Um die Serin-Analytik weiter zu beschleunigen, wurden optische Detektionsverfahren untersucht. Hierzu wurden von Proben der Serin-Fraktion 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen und versucht, zwischen den off line bestimmten Konzentrationsverläufen und dem Fluoreszenzverlauf bei verschiedenen Emissions-/Exzitationswellenlängen einen Zusammenhang herzustellen. Dabei wurden sowohl für die Trennkolonnen 1-6 als auch für die Kolonne 8 (weitere Aufreinigung der Serin-Fraktion) Fluoreszenzverläufe detektiert, die mit den Konzentrationsverläufen bestimmter Aminosäuren übereinstimmen. Vermutlich handelt es sich dabei um Fluorophore, die zusammen mit den Aminosäuren eluieren. Zur Zeit wird untersucht, ob dieses Verhalten reproduzierbar ist und sich eventuell zu einer Kontrolle des Chromatographieprozesses nutzen läßt. Bei diesen Untersuchungen soll der gesamte Trennzyklus von 2 Stunden analysiert werden. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist als nicht-invasive und schnelle Analysenmethode ein vielversprechender Ansatz.

Für die enantioselektive Bestimmung von Aminosäuren wurde ein 2-Kanal-Biosensor mit D- und L-Aminosäure-Oxidase entwickelt. Der Nachweis der Enantiomerenreinheit ist ein wichtiger Prozeß für die pharmazeutische Industrie. Mit dem Enzym L-Phenylalanin-Dehydrogenase wurde ein Biosensor zur Bestimmung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin konstruiert. Bei der Messung von Prozeßproben traten jedoch noch deutliche Matrixeffekte und Querempfindlichkeiten auf. Die Zeit für eine Messung lag aufgrund der sehr niedrigen Enzymaktivität bei etwa 10 Minuten. Es wird zur Zeit an der verbesserten Immobilisierung des Enzyms gearbeitet.

Zur Detektion des Trisaccharids Raffinose wurde ein Biosensorsystem aus immobilisierter Galactose-Oxidase kombiniert mit amperometrischer Detektion verwendet. Der Sensor eignete sich zur Raffinose-Bestimmung in Standards, jedoch traten bei der Messung von Prozeßproben deutliche Querempfindlichkeiten und Matrixeffekte auf. Unter Verwendung des Standardzusatzverfahrens konnten diese Störungen minimiert werden, so daß sich der Biosensor zu schnellen Raffinose-Bestimmung eignete. Im Vergleich zu dem untersuchten HPLC-System und dem Enzym-Testkit zeichnete sich der Sensor durch eine sehr geringe Meßzeit von 5 Minuten aus.

Eine Alternative zur Galactose-Oxidase konnte mit dem Enzymsystem Invertase/Fructose-Dehydrogenase entwickelt werden. Mit diesem System konnte der Nachweis von Raffinose neben Melibiose verwirklicht werden. Der Nachteil dieses Multi-Enzymsystems ist die Querempfindlichkeit zu Saccharose, die ebenfalls detektiert wird. Der Biosensor eignet sich somit nicht zur Prozeßanalytik, sondern zum Einsatz bei späteren Aufreinigungsschritten oder bei der Umsetzung von Raffinose zu Melibiose.

Zur Bestimmung von Saccharose wurde ein Biosensor mit Invertase, Mutarotase und Glucose-Oxidase als biologischer Komponente verwendet. Ein solches System konnte den Saccharose-Gehalt im chromatographischen Prozeß mehrere Tage stabil bestimmen. Aufgrund der langsamen gekoppelten Enzymreaktion und der Verdünnung mit notwendiger Einstellung des pH-Wertes war die Saccharose-Bestimmung mit einer Zeit von 15 Minuten pro Messung zu langsam, um sie als Alternative zu den bestehenden Verfahren einsetzen zu können.

Beispielhaft wurde für den Serin-Sensor ein Verfahren zur Ankopplung des Biosensors an den Chromatographieprozeß entwickelt. Das Ziel war die Charakterisierung und Optimierung des Chromatographieprozesses. Dazu wurden Proben der Serin-Fraktion von den Trennkolonnen entnommen und mit dem Biosensor analysiert. Das Analyseergebnis liegt dabei In-Time vor, bevor die nächste Serin-Fraktion von der Säule eluiert. Bei den Untersuchungen zur Schnittführung wurden erhebliche Abweichungen vom Optimum registriert: An allen untersuchten Trennkolonnen wurde die Serin-Fraktion teilweise erheblich zu früh fraktioniert. Das Elutionsverhalten änderte sich dagegen im Verlauf von einigen Zyklen oder Tagen nicht meßbar. Erst im Zeitraum von 20 Tagen konnten leichte Verschiebungen der Serin-Fraktion in der Größenordnung von 0,3 % pro Tag nachgewiesen werden. Diese Verschlechterung des Trennverhaltens kann durch den Einsatz des Serin-Sensors am industriellen Prozeß verhindert werden.

Es wurde berechnet, daß sich durch Anwendung dieses Optimierungsverfahrens enorme Einsparpotentiale an Chemikalien, Energie und Prozeßwasser ergeben. Die Einsparungen beruhen auf der höheren Produktkonzentration des Serins und den daraus resultierenden Einsparungen bei nachfolgenden Umsetzungen und Aufreinigungsschritten.

Modellhaft wurde an dem bestehenden Verfahren der Serindarstellung eine Verfahrensoptimierung durch intelligente Prozeßanalytik diskutiert. Es konnte belegt werden, daß Investitionen in produktionsintegrierten Umweltschutz in Form intelligenter Prozeßsteuerung nicht nur Ressourcen und Umwelt schonen, sondern auch unter ökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll sind. Die gewonnenen Erkenntnisse sind nicht nur auf das Gesamtverfahren der Melasseauftrennung, sondern auch auf die Verarbeitung anderer nachwachsender Rohstoffe übertragbar.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°Bx	°Brix (1°Brix = 1 % Trockensubstanz)
ABTS	2-2'-Azino-bis(3-Ethylbenz-thiazoline-6-sulfonsäure)
ASA	Aminosäure-Analyser
CAFCA	Computer Assisted FIA Control & Analysis
C _D (t)	D-Serin-Konzentration zur Zeit t [g/l]
C _{D0}	D-Serin-Konzentration zur Zeit t=0 min [g/l]
Con A	Concanavalin A
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Zeit in Tagen
D-ASOD	D-Aminosäure-Oxidase
EC	Enzyme classification
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emissionswellenlänge [nm]
Ex	Exzitationswellenlänge [nm]
FIA	Fließinjektionsanalyse
FruDH	Fructose-Dehydrogenase
GalOD	Galactose-Oxidase
Gly	Glycin
GOD	Glucose-Oxidase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
INV	Invertase
KPP	Kaliumphosphat
L-ASOD	L-Aminosäure-Oxidase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Q	Flußrate aus der Mischkammer [ml/min]
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
t	Zeit [min]
TK	Trennkolonne
U	Units Enzymaktivität
V _m	Volumen der Mischkammer [ml]
YSI	Yellow Spring Instruments

8.2 Enzyme und Feinchemikalien

8.2.1 Enzyme

D-Aminosäure-Oxidase	Immobilisat, Boehringer Mannheim
D-Aminosäure-Oxidase	Sigma A 1914
D-Fructose-Dehydrogenase	Sigma F 4892
D-Serin-Dehydratase	AK Dr. L. Fischer, TU Braunschweig
Galactose-Oxidase	Sigma G 7907

Glucose-Oxidase	Sigma G 2133
Invertase	Fluka 57629
L-Aminosäure-Oxidase	Sigma A 9253
L-Lactat-Dehydrogenase	Sigma L 1254
L-Phenylalanin-Dehydrogenase	AK Dr. L. Fischer, TU Braunschweig
Mutarotase	Sigma M 4286
Peroxidase	Sigma P 8250

8.2.2 Feinchemikalien

Calciumchlorid	Sigma C 3881
Chelatisierende Sepharose	Pharmacia
CNBr-aktivierte Sepharose (4B)	Sigma C 1150 und Pharmacia
Concanavalin A	Sigma C 2010
D,L-Tyrosin	Amino GmbH
D-Serin	Sigma S 4250
D-Tryptophan	Sigma T 9753
EDTA	Sigma ED
Galactose	Sigma G 6404
Glucose	Fluka 49159
Glycin	Sigma G 7403
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 12034
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka 60300
Kaliumhydrogenphthalat	Fluka 60360
L-Lactat	Sigma L-2250
L-Tryptophan	Sigma T 8659
Magnesiumchlorid	Sigma M 2670
Manganchlorid	Sigma M 3634
Melibiose	Sigma M-5500
NADH	Sigma N-8129
Natriumchlorid	Merck 6404
Raffinose	Sigma R 0514
Saccharose	Sigma S 8501
Stachyose	Sigma S 4001
VA-Epoxy	Riedel De Haen 39354

8.3 Geräte

2-Kanalschreiber	Se 120 BBC Metrawatt, Goerz
Autosampler	Gilson 222 XL + Dilutor
Computer	Escom 486 DX/2-66
Digitalmultimeter	Voltcraft M-3650CR
FIA-System	EVA Linie, Eppendorf, Nethler & Hinz, Hamburg
Magnetrührer	Ikamag RCT
Peristaltikpumpen	IPS 4, Ismatec
pH-Elektroden	U 402-M6, Ingold

pH-Meter	Knick Typ742
Photometer	Skalar 6010
Pipetten	Eppendorf, Nethler & Hinz, Hamburg
Sauerstoffelektrode	Anasyscon, Hannover
Schüttler	Eppendorf, Nethler & Hinz, Hamburg
Thermostat	Haake K15, Haake DC1

8.3.1 2D-Fluoreszenzspektrometer

Modell Hitachi F-4500 (Hitachi, Japan)

Parameter für die Messung mit Küvette (Kapitel 4.3.2)

Exzitation:	250-550 nm (10 nm Schrittweite)
Emission:	260-600 nm (10 nm Schrittweite)
Scan-Speed:	12000 nm/min
Slit (Exzitation):	5 nm
Slit (Emission):	10 nm
	700 V PMT

Parameter für die Messung mit Lichtleiter (Kapitel 4.3.3)

Exzitation:	250-550 nm (10 nm Schrittweite)
Emission:	260-600 nm (20 nm Schrittweite)
Scan-Speed:	12000 nm/min
Slit (Ex):	10 nm
Slit (Em):	20 nm
	700 V PMT

8.4 Medienzusammensetzung

8.4.1 Synthetisches Medium für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

nach [61]

Glucose	30 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9 g/l
KCl	0,9 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,34 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,42 g/l
Na-citrat	5,9 g/l
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,015 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0,0105 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,009 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0024 g/l

m-Inosit	0,06 g/l
Ca-Pantothenat	0,03 g/l
Vitamin B ₁	0,006 g/l
Vitamin B ₆	0,0015 g/l
Biotin	0,00003 g/l

8.4.2 Medien für die Kultivierung von *Klebsiella pneumoniae*

Komplexmedium für Vorkultur [22]

Cerelose	10 g/l
THE (Thermischer Hefe Extrakt)	10 g/l
Pepton	10 g/l
Trypton	10 g/l

Medium für die Hauptkultur [22]

KH ₂ PO ₄	2 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l
D,L-Serin	20 g/l
Thiamin	10 mg/l
Biotin	1 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	25 mg/l
tri-NaCitrat x 2 H ₂ O	50 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	1 mg/l
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l

8.5 Isolierung der D-Serin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae*

Die Herstellung von D-Serin-Dehydratase erfolgt mit Hilfe des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae*. Dieser Stamm wurde aus Bodenproben durch Screening mit anschließender Vereinzelung erhalten.

Der Stamm wird zur Anzucht in ein Komplexmedium (pH=6,0) überführt. Die Vorkultur wird in einem Schüttelkolben für zwei Tage bei 30°C mit 100 rpm inkubiert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgt über Messung der optischen Dichte (Trübung). Anschließend wird in das Kultivierungsmedium übergeimpft. Die Kultivierung wird 11,5 Stunden bei pH 4,0 und 30°C durchgeführt.

Die Biomasse wird abzentrifugiert, anschließend werden die Zellen mit 0,1 M KPP-Puffer (3 mM EDTA, 0,1 M Saccharose, pH 7,5) aufgenommen. Es folgt ein mechanischer Zellaufschluß in einer Rührwerkskugelmühle. Mit Hilfe 30 % (NH₄)₂SO₄-Lösung wird eine Fällung der Zellproteine und DNA durchgeführt. Es wird abzentrifugiert und der Überstand erneut mit (NH₄)₂SO₄ bis zu einem Gehalt von 55 % versetzt. Das erhaltene Pellet enthält die D-Serin-Dehydratase und wird anschließend in einer möglichst kleinen Menge 0,1 M KPP-Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Es folgt eine Umpufferung in 1 M KPP-

Puffer durch eine Gelfiltration mit Sephadex G25 (Pharmacia). Das so aufgereinigte Enzym wird zur Immobilisierung mit VA-Epoxy versetzt. Die Menge des eingesetzten VA-Epoxy richtet sich dabei nach dem Proteingehalt. Nach 24 Stunden wird der Puffer abdekantiert und das Immobilisat mit Puffer gewaschen. Die Lagerung des Immobilisats erfolgt bei -20°C.

Bei der Fällung und anschließenden Immobilisierung gehen jeweils etwa 50 % der Enzymaktivität verloren. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mit dem in Anhang 8.6.1 beschriebenen Assay [30, 103].

8.6 Aktivitätsbestimmung von Enzymen

8.6.1 D-Serin-Dehydratase

Die Aktivität der D-Serin-Dehydratase wird mit folgendem Assay bestimmt [30, 103, 105]:

- 1 ml Küvette, Photometer 340 nm, Schreiber
- Lösung A: 0,1 M K₂HPO₄, pH 8,0
- Lösung B: Lactat-Dehydrogenase (Boehringer 127876)
- Lösung C: NADH-Lösung (10 mg/ml)
- Lösung D: D-Serinlösung, Standards (0 - 1,5 mM)
- Lösung E: Enzymlösung bzw. Immobilisat

In einer 1 ml-Küvette werden 770 µl Lösung A, 10 µl Lösung B und 100 µl Lösung D vorgelegt. Nach einem Nullabgleich am Photometer (340 nm) werden 20 µl Lösung C zugegeben und der Assay durch Zugabe von 100 µl Lösung E gestartet. Die Extinktionsabnahme wird mit einem Schreiber verfolgt, die Berechnung der Aktivität erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\text{Extinktionsänderung} * \text{Volumen (l)}}{\text{Zeit (s)} * 6300 * \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1} * \text{Schichtdicke Küvette (cm)}}$$

*Extinktionskoeffizient NADH bei 340 nm

Der gleiche Assay wird zur Bestimmung der D-Serin-Konzentration verwendet. Die Extinktionsabnahme wird mit einem Schreiber verfolgt, die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur D-Serin-Konzentration. Nach vorheriger Kalibration mit Standards kann so die D-Serin-Konzentration unbekannter Lösungen bestimmt werden. Bei bekanntem D-/L-Verhältnis (in den Proben etwa 25:75) kann die Gesamtkonzentration von D- und L-Serin berechnet werden [30, 103, 105].

8.6.2 Lactat-Dehydrogenase

Zur Aktivitätsbestimmung der co-immobilisierten Lactat-Dehydrogenase wird folgender Assay eingesetzt [105]:

- 1ml Küvette (Schichtdicke = 1 cm), Photometer 340 nm, Thermoschüttler 30°C
- Lösung A: 50 mM K_2HPO_4 , pH=8,0
- Lösung B: NADH-Lösung (10 g/l)
- Lösung C: Pyruvat-Lösung (10 g/l)

Mit Lösung A wird ein Nullabgleich am Photometer durchgeführt. Es wird eine Mischung aus 1378 μ l Lösung A, 28 μ l Lösung B und 594 μ l Lösung C hergestellt und die Extinktion der Lösung bestimmt. 50 mg des Immobilisats werden auf 30°C erwärmt, mit 1 ml der Mischung versetzt und 1 Minute bei 30°C geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wird die Extinktion des Überstands bestimmt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt analog Kapitel 8.6.1 (mit t=60 sec).

8.7 Immobilisierung und Pufferlösungen

Tab. 8.1: Immobilisierungsbedingungen und Puffer für die verwendeten Enzyme

Enzym/Menge	Träger	Bedingungen	Betriebspuffer	Kapitel
Invertase 350 U/ 5 ml	Chelatisierende Sepharose	1. 50 mM CoCl ₂ 30 min 2. 45 mg Con A 0,1 M Na-Acetat pH 5,2 3. 0,03 % H ₂ O ₂ 4. Metallionen [59]	50 mM Na-Acetat pH 5,0	3.5.2
Glucose-Oxidase 900 U/ 5 ml	Chelatisierende Sepharose	1. 50 mM CuSO ₄ 15 min	50 mM Na-Acetat pH 5,0	3.5.1
Glucose-Oxidase 70 U	CNBr-Sepharose Antikörper 5 mg/ml [64]	20 mM KPP pH 7,0 12 h 20 °C	50 mM KPP pH 7,0	3.6.3
Peroxidase 120 U	CNBr-Sepharose Antikörper 5 mg/ml [64]	20 mM KPP pH7,0 12 h 20°C	50 mM KPP pH 7,0	3.6.4
D-Aminosäure- Oxidase (Boehringer)	unbekannter Träger	Boehringer Mannheim	50 mM KPP pH 8,0	4.2.3
D-Serin-Dehydratase (AK PD Dr. Fischer)	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM KPP pH 8,0	4.2.4
Lactat-Dehydro- genase 2000 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM KPP pH 8,0	4.2.4
L-Aminosäure- Oxidase 20 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM KPP 50 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,6	4.4
D-Aminosäure- Oxidase 40 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM KPP 50 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,6	4.4
L-Phenylalanin- Dehydrogenase 1,5 ml Lösung (AK PD Dr. Fischer)	VA-Epoxy 200 mg	1 M KPP pH 10.4 72 h	0,1 M Glycin/HCl 0,1 M KCl mit KOH auf pH 10,4 einstellen	4.5
Galactose-Oxidase 50 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7,0 24 h bei RT	0,1 M KH-Phthalat pH 7,0	5
Fructose-Dehydro- genase 80 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	0,2 M KPP 10 mM K ₃ Fe(CN) ₆ pH 4,5	5.1.5
Glucose-Oxidase 180 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM Na-Acetat pH 5,0	5.2
Invertase 150 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM Na-Acetat pH 5,0	5.2
Mutarotase 500 U	VA-Epoxy	1 M KPP pH 7.0 24 h bei RT	50 mM Na-Acetat pH 5,0	5.2

8.8 Referenzanalytik

Zur Referenzanalytik der Biosensor-Messungen wurden verschiedene HPLC-Methoden und ein Aminosäure-Analyser benutzt. Im folgenden werden diese Methoden beschrieben.

8.8.1 Aminosäure-Analyser

Folgende Parameter werden für die Aminosäure-Bestimmung in Melasse verwendet [30, 91]:

Lösungen

- Eluent: Puffersystem mit pH- und Temperaturgradient
- Ninhydrinlg.: 20,0 g Ninhydrin in 5 ml 15 % Titan(III)-Chloridlg., 750 ml Ethylenglycol-Monoethylether und 250 ml Na-acetat-Puffer
- Probenvorbereitung: 4 M NaOH, 2 M HCl

Apparatur und Parameter

- Aminosäure-Analyser: Biotronik 5001, bestehend aus Steuerung, Injektor, Pumpen
- Vorsäule: 6*85 mm (Füllhöhe 25 mm), Harz BTC F
- Trennsäule: 3,2*400 mm (Füllhöhe 205 mm), Harz BTC 2710
- Säulenthermostat
- Reaktionsschlaufe: 11 m Länge
- Detektor: Photometer ($\lambda = 570$ nm und $\lambda = 440$ nm)
- Flow (Puffer): 0,30 ml/min
- Flow (Reagenz): 0,165 ml/min
- Reaktionstemp.: 125°C
- Probenvolumen: 50 μ l, membranfiltriert (0,2 μ l)
- Integrator: Shimadzu C-R3A

8.8.2 Bestimmung von Aminosäuren mit HPLC

Für die Bestimmung von Aminosäuren wird ein HPLC-Verfahren mit Vorsäulen-derivatisierung benutzt [30, 96]:

Lösungen

- Eluent A: 0,05 M Na-Acetat; 0,05 NaH₂PO₄; pH 7,0
- Eluent B: Methanol 54% und H₂O (bidest) 46%
- Regeneration: 270 mg OPA (Phthaldialdehyd) in 5 ml Ethanol auflösen, 200 μ l Mercaptoethanol zufügen und mit 0,4 M Borat-Puffer pH 9,5 auf 50 ml auffüllen.

HPLC-Apparatur und Parameter

- HPLC-Pumpe: ERC Irika 871
- Detektor: Fluoreszenz-Detektor Shimadzu R535

- Autosampler: Spark Promise II
- Degasser: ERC-3322
- Säulentermostat: ERC-125
- Säulentemperatur: 30°C
- Auswerteeinheit: HPLC-Manager-APEX
- Vorsäule: VYDAC 301 SC
- Trennsäule: Reversed phase Waters, resolve C 18, 5 µm, (3,9 * 150 mm)
- Flow: 1,0 ml/min
- Detektion: Emission 420 nm
- Probenvolumen: 10 µl
- -konzentration: ca. 0,3 - 1,0 mg/l

8.8.3 Bestimmung von Zuckern mit HPLC

Zur Bestimmung von Zuckern wird folgendes HPLC-System benutzt [30, 91].

Lösungen

- Eluent : 0,016 M NaOH, membranfiltriert (0,2 µm)
- Regeneration: 0,3 M NaOH, membranfiltriert (0,2 µm)

HPLC-Apparatur und Parameter

- HPLC-Pumpe: Knauer HPLC Pumpe 64
- Detektor: RI Detector ERC-7510 von Erna Optical Works LTD
- Injector: Knauer Injektions-Ventil Nr. V7213
- Säulentermostat: Knauer modularer HPLC-Ofen
- Säulentemperatur: 30°C
- Integrator: Shimadzu C-R3A Chromatopac
- Vorsäule: Dionex CarboPac PA 1 Guard column
- Trennsäule: Dionex CarboPac PA 1 (4 * 250 mm)
- Flow: 1,0 ml/min
- Probenvolumen: 20 µl, membranfiltriert (0,2 µm)
- -konzentration: ca. 0,15 g/100 ml

8.8.4 Raffinose-Testkit

Für die Bestimmung von Raffinose wurde ein Enzym-Testkit der Firma Boehringer benutzt (Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 428 167) [30].

Raffinose wird bei pH 4,5 durch α -Galactosidase in D-Galactose und Saccharose gespalten. Die freigesetzte D-Galactose wird durch Galactose-Dehydrogenase in Gegenwart von Nicotinamidadenindinucleotid (NAD⁺) zu D-Galactonsäure oxidiert.

Während der Reaktion entsteht NADH, das photometrisch bei 340 nm bestimmt wird. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur Raffinose-Konzentration.

Durchführung der Raffinose-Bestimmung [30]:

In je eine Küvette werden für Leerwert und Proben

- 0,2 ml Lösung 1, bestehend aus Citrat-Puffer, pH 4,5, NAD⁺ und Stabilisatoren, gelöst in bidest. Wasser
- 0,1 ml bidest. Wasser bzw. Probelösung in geeigneter Verdünnung (der Raffinose-Gehalt der Probelösung sollte zwischen 0,25 g/l und 1,3 g/l liegen) und
- 0,05 ml Suspension 2, α -Galactosidase-Suspension pipettiert, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch Zugabe von 1 ml Lösung 3 (Kaliumdiphosphat-Puffer, pH 8,6) werden die Ansätze umgepuffert, anschließend wird mit 2 ml bidest. Wasser aufgefüllt und gemischt. Nach ca. zwei Minuten wird die Extinktion (E_1) der Lösung mit dem Photometer gemessen und anschließend die Galactose-Oxidation durch Zugabe von 0,05 ml Suspension 4 (β -Galactose-Dehydrogenase-Suspension) und Mischen gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 20 Minuten) wird erneut die Extinktion (E_2) bestimmt.

Auswertung [30]:

Für den Blindwert und die Probe wird die Extinktionsdifferenz ($E_2 - E_1$) gebildet. Durch Differenzbildung ergibt sich ΔE (sollte mindestens 0,1 Extinktionseinheiten betragen):

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Nach der vom Hersteller angegebenen Formel wird die Raffinose-Konzentration bestimmt:

$$c = \frac{V * MG * \Delta E}{\epsilon * d * v * 1000} [\text{g} / \text{l}]$$

mit

V = 3,400 ml; Testvolumen

v = 0,1 ml; Probenvolumen

MG = 504,44 g/mol; Molmasse Raffinose

d = 1 cm; Schichtdicke der Küvette

ϵ = 6,31 l/mmol cm; Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm

Freie D-Galactose wird mit diesem Verfahren ebenfalls erfaßt. Sie kann in einem gesonderten Ansatz ohne Suspension 2 getrennt bestimmt werden

9 Literatur

- [1] Schitag, Ernst & Young, GIT Laborfachzeitschrift 42 (10) (1998), 978
- [2] BIOForum Forschung und Entwicklung 3 (1998), 74
- [3] BIOForum Forschung und Entwicklung 5 (1998)
- [4] BIOForum Forschung und Entwicklung 5 (1997), 197
- [5] S. Shioya, K.I. Suga, Modelling, Design and Control of Downstream Processing. In Biotechnology (2nd edition, H.J. Rehm, G. Reed eds.), Volume 4, VCH Weinheim (1991), 603-623
- [6] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, IUPAC Discussion paper, Commission V.I. (1989)
- [7] F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz, Present state and frontiers in biosensors. In „Frontiers in biosensorics I“, F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), Birkhäuser Verlag, Berlin (1997), 1-12
- [8] P.J. Baxter, G.D. Christian, J. Ruzicka, Multivariate Approach for the Simultaneous Determination of Total Biomass and Glucose from a Yeast Fermentation by Sequential Injection Analysis. Chem. Anal 40 (1995), 455-471
- [9] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis. Analytica Chimica Acta 320 (1996), 199-205
- [10] L. Bucsis, Biosensoren in der Lebensmittelanalytik, LaborPraxis 5 (1998), 44-47
- [11] D. Pfeiffer, Commercial biosensors for medical applications. In „Frontiers in biosensorics II“, F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), Birkhäuser Verlag, Berlin (1997), 149-160
- [12] H. Luedi, Challenges in the development of (bio)chemical sensors for whole blood medical diagnostic applications. In „Frontiers in biosensorics II“, F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), Birkhäuser Verlag, Berlin (1997), 141-148
- [13] M. Slama, C. Zaborosch, D. Wienke, F. Spener, Simultaneous Mixture Analysis Using a Dynamic Microbial Sensor Combined with Chemometrics. Analytical Chemistry 68, 21 (1996), 3845-3850
- [14] M. Schöning, Biosensoren riechen frühzeitig Pflanzenschäden und Schwelbrände: Kartoffelkäfer arbeiten auf Elektronikchips. BioTec 1 (1998), 8
- [15] C.J. McNeil, D. Athey, R. Renneberg, Immunosensors for clinical diagnostics. In „Frontiers in biosensorics II“, F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), Birkhäuser Verlag, Berlin (1997), 17-26

-
- [16] A. Ivaska, J. Ruzicka, From Flow Injection to Sequential Injection: Comparison of Methodologies and Selection of Liquid Drives. *Analyst* 118 (1993), 885-889
- [17] R. Bentley in "The Enzymes", 2nd edition (P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck eds.) 7 (1963), 567-568
- [18] F. Jafri, M. Saleemuddin, Immobilization of invertase on Sepharose-linked enzyme glycosyl recognizing polyclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997), 605-609.
- [19] D. Schomburg, M. Salzmann, D. Stephan, *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1994
- [20] J. Iqbal, M. Saleemuddin, Preparation and properties of Con A cellulose immobilized glucose oxidase. *Ind. J. Biochem. Biophys* 20 (1983), 33-38
- [21] G. Kleinhammer, H. Mattesberger, *Methods in enzymatic analysis*, H.U. Bergmeyer (ed.), vol. 12, 3rd edition, VCH Weinheim (1986), 217-218
- [22] W. Jacobsen, *Untersuchungen zum D-Serin Katabolismus ausgewählter Mikroorganismen*. Diplomarbeit, Universität Braunschweig (1995)
- [23] S. Kikuchi, M. Ishimoto, D-Serine-dehydratase from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biochem.* 84 (1978), 1133-1138
- [24] P. Sosniza, F. Irtel, R. Ulber, M. Busse, R. Faurie, L. Fischer, T. Scheper, Flow injection analysis system for the supervision of industrial chromatographic down stream processing in biotechnology. *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998), 1251-1255
- [25] L. Wieninger, F. Hollaus, W. Braunstein, Erfahrungen mit der enzymatischen Raffinosebestimmung mittels Galactose-Dehydrogenase in Rüben und Zuckerfabriksprodukten. *Zucker* 30 (12) (1977), 653-658
- [26] D. Schumacher, J. Vogel, U. Lerche, Construction and applications of an enzyme electrode for determination of galactose und galactose-containing saccharides. *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), 85-90
- [27] B. Pabel, A. Eberhardt, R. Galensa, D. Weßels, HPLC-Biosensor-Kopplung: Elektrochemische Detektoren mit integrierten Biosensoren für neue HPLC-Perspektiven. *LABO* 6 (1997), 64-69
- [28] F. M. Kelleher, V.P. Bhavanandan, Re-examination of the Products of the Action of Galactose Oxidase. *J. Biol. Chem.* 261 (24) (1986), 11045-11048

-
- [29] M. Ameyama, K. Matsushita, E. Shinagaaw, O. Adachi, Enzymic Determination of D-Fructose: Utilization of Membrane-bound D-Fructose-Dehydrogenase. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Volume X (1994)
- [30] F. Irtel, Aufbau und Test von Analysensystemen zur Detektion von Minor Components in Melasse, Diplomarbeit, Universität Hannover (1997)
- [31] A. Meister, D. Wellner in „The Enzymes“, 2nd edition (P.D. Boyer ed.) 7 (1963), 609-648
- [32] H.J. Bright, D.J.T. Porter in „The Enzymes“, 3rd edition (P.D. Boyer ed.) 12 (1975), 421-505
- [33] W. Hummel, H. Schütte, M.-R. Kula, Enzymatic Determination of L-Phenylalanine and Phenylpyruvate with L-Phenylalanine Dehydrogenase. *Anal. Biochem.* 170 (1988), 397-401
- [34] Y. Asano, A. Nakazawa, K. Endo, Novel Phenylalanine Dehydrogenase from *Sporosarcina urea* and *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* 262 (21) (1987), 10346-10354
- [35] M. de la Guardia, Biochemical Sensors: The State of the Art. *Mikrochim. Acta* 120 (1995), 243-245
- [36] K. Schügerl, B. Hitzmann, H. Jürgens, T. Kullick, R. Ulber, B. Weigel, Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control. *TIBTECH* 14 (1996), 21-31
- [37] P.J. Keay, Y. Wang, Applications of flow injection analysis to analytical biotechnology. *TIBTECH* 15 (1997), 76-81
- [38] E. A. H. Hall, *Biosensoren*, Springer Verlag, Berlin (1995)
- [39] K. Camman, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, Chemo- und Biosensoren- Grundlagen und Anwendung, *Angew. Chem.*, 103 (1991), 519-541
- [40] M.G. Boutelle, H. Allen, O. Hill, M. Berners, R. John, P.D. Dobson, P. Leigh, New Technologies for Amperometric Biosensors. *Journal of Molecular Recognition* 9 (1996), 664-671
- [41] V.K. Akimenko, S.M. Khomutov, A.Y. Obratsova, S.A. Vishnivetskii, N.A. Chuvilskaya, K.S. Laurinavichus, A.N. Reshetilov, A rapid method for detection of *Clostridium thermocellum* by field-effect transistor-based immunodetection. *Journal of Microbiological Methods* 24 (1996), 203-209

-
- [42] M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai, Sensitive flow-injection method with peroxyoxalate chemiluminescence detection combined with preparative high-performance liquid chromatography for determination of choline-containing phospholipids in human serum. *Journal of Chromatography B* 678 (1996), 129-136
- [43] F.L. Dickert, M. Tortschanoff, K. Weber, M. Zenkel, Process control with mass-sensitive chemical sensors – Cyclodextrine modified polymers as coatings. *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998), 21-24
- [44] B. Danielsson, B. Xie, Thermistor-based biosensing. In „Frontiers in biosensorics II“, F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (eds.), Birkhäuser Verlag, Berlin (1997), 71-86
- [45] L.C. Clark, C. Lyons. *Anm. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962), 29
- [46] R. Ulber, *Optimierung von Sensorsystemen für die Biotechnologie*, Cuvillier Verlag, Göttingen (1997)
- [47] P. Sosnitza, *Amperometrische und potentiometrische Biosensoren*, Diplomarbeit, Universität Hannover (1996)
- [48] R. Köneke, laufende Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
- [49] J. Wang, F. Lu, Oxygen-Rich Oxidase Enzyme Electrodes for Operation in Oxygen-free Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998), 1048-1050
- [50] P. Gemeiner et al., in I.A. Veliky and R.J.C. McLean (eds.), *Immobilized Biosystems: Theory and Practical Applications*, Chapman and Hall, London, Glasgow (1994)
- [51] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag, Heidelberg (1986)
- [52] P. Gemeiner, *Enzyme Engineering, Immobilized Systems*, Ellis Horwood, New York (1992)
- [53] H. Jürgens, *Charakterisierung von Enzymkartuschen in einem FIA-System*, Dissertation, Universität Hannover (1994)
- [54] F.A. Liberatore, J.E. McIssac, G.P. Royer, Immobilized carboxypeptidase: applications in protein chemistry. *FEBS Lett.* 68 (1976), 45-48
- [55] A. Pollock, R.L. Bangh, O. Adaisteinsson, G.J. Whiltside, Immobilization of synthetically useful enzymes by condensation polymerisation. *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978), 302-304

-
- [56] M. Saleemuddin, Q. Husain, Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization-A review. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991), 290-295
- [57] F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin 1998
- [58] R.K. Merkle, R.D. Cummings, *Methods Enzymol.*, 138 (1987), 232
- [59] J. Yariv, A. Kalb, A. Levitzki, *Biochim. Biophys. Acta*, 165 (1968), 303
- [60] J. Porath, R. Axen, S. Ernback, Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature (London)* 215 (1967), 1419-1492
- [61] R. Köneke, C. Menzel, R. Ulber, K. Schügerl, M. Saleemuddin, T. Scheper, Reversible coupling of glycoenzyme on fluoride sensitive FET biosensor based on lectin- glycoprotein binding. *Biosensors Bioelectr.* 11 (2) (1996), 1229-1236
- [62] F.H. Arnold, *Biotechnology* 9 (1991), 151
- [63] Z.E. Rassi, Y. Truei, Y-F. Maa, C. Horváth, *Anal. Biochem.*, 169 (1988), 172
- [64] M. Farooqui, laufende Promotion, Aligarh Muslim University, Indien
- [65] P. Sosnitza, M. Farooqui, M. Saleemuddin, R. Ulber, T. Scheper, Application of reversible immobilization techniques for biosensors. *Analytica Chimica Acta* 368 (1998), 197-203
- [66] N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin (1985)
- [67] J.E. Hale, D.E. Beidler, *Anal. Biochem.* 222 (1994), 29
- [68] M. Farooqui, M. Saleemuddin, R. Ulber, P. Sosnitza, T. Scheper, Bioaffinity Layering: A novel Strategy for the Immobilization of Large Quantities of Glycoenzymes. *J. Biotechnol.* 55 (1997), 171-179
- [69] P. Docolomansky, P. Gemeiner, D. Mislovicova, V. Stefuca, B. Danielsson, Screening of Concanavalin A – Bead Cellulose Conjugates Using an Enzyme Thermistor with Immobilized Invertase as the Reporter Catalyst. *Biotechnology & Bioengineering* 43 (1994), 286-292
- [70] M. Onda, Y. Lvov, A. Katsuhiko, T. Kunitake, Sequential action of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1996), 163-167
- [71] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Monirux, J.M. Saveant, Step by step immunological constructions of a fully active multilayer enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994), 10328-10329

-
- [72] M. Farooqui, P. Sosnitza, M. Saleemuddin, R. Ulber, T. Scheper, Immunoaffinity Layering of Enzymes : Stabilisation and Use in Flow Injection Analysis of Glucose and Hydrogen peroxide. Eingereicht
- [73] G.M. Edelman, B.A. Cunningham, G.N. Reeke Jr, J.W. Becker, M.J. Waxdal, J.L. Wang, The covalent and three dimensional structure of Con A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69 (1972), 2580-2584
- [74] E.Y. Shami, A. Rothstein, M. Ramjeesingh, Stabilization of biologically active proteins. Trends Biotechnol. 7 (1989), 186-190
- [75] F. Jafri, S. Husain, M. Saleemuddin, Stabilization of yeast invertase by insoluble immune complex formation using unfractionated, glycosyl-specific and peptide specific polyclonal antibodies. Biotechnol. Tech. 9 (1995), 117-122
- [76] B. Solomon, Z. Hollander, R. Koppel, E. Katchalski-Katzir, Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes. Methods Enzymol. 135 (1987), 160-170
- [77] J. Turkova, In bioaffinity chromatography. J. Chromatography Library. vol. 55, Elsevier Publishers, Amsterdam (1993), 55
- [78] F. Jafri, S. Husain, M. Saleemuddin, Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies. Biotechnol. Appl. Biochem. 18 (1993), 401-408
- [79] U. Koch, A.C. Schmidt, K. Mosbach, Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry, specific activity and thermal stability of enzyme bound weakly and strongly to Sepharose CL 4B. Biochemistry, 16 (1977), 2105-2109
- [80] J.M. Hilmer, T. Scheper, A new version of an in situ sampling system for bioprocess analysis. Acta Biotechnol 16(2-3) (1996), 185-192
- [81] E.T. Vandenberg, R.S. Brown, U.J. Krull, Immobilized Biosystems : Theory and practical applications (Veliky and Mclean (eds.), Blackie academic and professionals (1994), 129-232
- [82] S. Gough, A.P. McHale, Continuous ethanol production from molasses at 45°C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a continuous-flow bioreactor. Bioprocess Engineering 19 (1998), 33-36
- [83] H. Hongisto, M. Loisa, Finnsugar-Trennverfahren zur Melasseentzuckerung, Zuckerind. 27 (5) (1977), 279-283
- [84] H. Hongisto, Chromatographic separation of sugar solutions - the Finnsugar molasses desugarization process I. Int. Sugar J. 79 (940) (1977), 100-104, 3B

-
- [85] H. Heikkilä, Separating sugars and amino acids with chromatography. *Chemical Engineering*, New York 90 (1983), 50-52
- [86] H.A. Paananen, Trends in the chromatographic separation of molasses. *Zuckerind.* 122 (1997), 28-33
- [87] M. Saka, M.D. Wu, S.J. Clarke, K. Iqbal, Continuous separation of sugarcane molasses with a simulated moving-bed adsorber. Adsorption equilibria, kinetics and application. *Separation Science and Technology* 27 (13) (1992), 1711-1732
- [88] M.J. Gattuso, B. McCulloch, J.W. Priegnitz, UOP Sorbex simulated moving bed technology. A cost effective route to chiral products. *Chiral Europe* (1994)
- [89] E. Kloppenburg, E.D. Gilles, Ein neues Prozeßführungskonzept für die Chromatographie mit simuliertem Gegenstrom. *Chemie Ingenieur Technik* 70 (12) (1998), 1526-1529
- [90] J. Strube, H. Schmidt-Traub, M. Schulte, Auslegung, Betrieb und ökonomische Betrachtung chromatographischer Trennprozesse. *Chemie Ingenieur Technik* 70 (10) (1998), 1271-1279
- [91] Angaben Amino GmbH, Abt. Forschung & Entwicklung, Frellstedt (1998)
- [92] R. Faurie, Biotechnologische L-Tryptophan-Synthese. Vortrag am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover (1996)
- [93] R. Faurie, G. Fries, From Sugar Beet Molasses to Lyphan®. Integrated Quality Management from the Raw Material to the Drug. In *Tryptophan: Basic Aspect and Practical Applications, Advances in Experimental Medicine and Biology* (T. Simat ed.), Plenum Press New York (1999, im Druck)
- [94] H. Plischke, W. Steinmetzer, Verfahren zur industriellen Herstellung von L-Tryptophan. Patent DE 36 30 878 (1986)
- [95] L. Stryer, *Biochemie*. Spektrum Wiss. Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1990
- [96] J.D.H. Cooper, G. Ogden, J. McIntosh, D.C. Turnell, The stability of o-phthaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: an investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatisation technique. *Anal. Biochem.* 142 (1984), 98-102
- [97] Vorsäulenderivatisierung in der Aminosäuren-Analytik verbessert, *Labor Praxis Chromatographie*, 1994, 38-41
- [98] B. Sudhop, M. Habermann, Vorsäulenderivatisierung für die Routinebestimmung von primären und sekundären Aminosäuren im Fentomolbereich, *Git Spezial Chromatographie* 1 (1995), 13-17

-
- [99] P. Akhtar, C.O. Too, G.G. Wallace, Detection of amino acids at conducting electroactive polymer modified electrodes using flow injection analysis. Part I. Use of macroelectrodes, *Analytica Chimica Acta* 339 (1997), 201-209
- [100] P. Akhtar, C.O. Too, G.G. Wallace, Detection of amino acids at conducting electroactive polymer modified electrodes using flow injection analysis. Part II. Use of microelectrodes, *Analytica Chimica Acta* 339 (1997), 211-223
- [101] S. Schmidt, M. Kircher, J. Kasala, Near infrared spectroscopy in fermentation and quality control for amino acid production. *Bioprocess Engineering* 19 (1998), 67-70
- [102] Biocatalysts for industrial application. Katalog der Firma Boehringer Mannheim (1996)
- [103] L. Fischer, Biochemie & Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig, mündliche Angaben, Herstellung und Immobilisierung von D-Serin-Dehydratase und Immobilisierung von Lactat-Dehydrogenase
- [104] F. Patett, laufende Promotion am Institut für Biochemie & Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig
- [105] T. Koop, Analytik von Serin in Zuckerrübenmelasse, Protokoll zum Schwerpunktpraktikum. Universität Hannover (1997)
- [106] M.R. Kula, C. Wandrey, Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane Reactor with simultaneous NADH regeneration. K. Mosbach (ed.), *Methods in Enzymology* vol. 136, Academic, New York (1987), 9-21
- [107] G. Xie, S.N. Timaseff, The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophysical Chemistry* 64 (1997), 25-43
- [108] K. Lippert, E.A. Galinski, Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 37 (1992), 61-65
- [109] S. Marose, laufende Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
- [110] S. Marose, C. Lindemann, T. Scheper, Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol. Prog.* 14 (1998), 63-74
- [111] C. Lindemann, Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung, Dissertation Universität Hannover (1998)
- [112] G.G. Guilbault (ed.), *Practical fluorescence*. 2nd edition, Dekker, New York, 1990

-
- [113] T. Pekeler, C. Lindemann, T. Scheper, B. Hitzmann, Vorhersage von Bioprozeßgrößen aus 2D-Fluoreszenzspektren. *Chemie Ingenieur Technik* 70 (1998), 1610-1611
- [114] E. Stärk, laufende Promotion am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
- [115] C. Harbeck, laufende Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
- [116] T. Kullick, R. Ulber, H.H. Meyer, T. Scheper, K. Schügerl, Biosensors for enantioselective analysis. *Anal. Chim. Acta* 293 (1994), 271-276
- [117] K. Schügerl, R. Ulber, T. Scheper, Development of biosensors for enantiomeric analysis. *Trends in analytical Chemistry*. 15/2 (1996), 56-62
- [118] L. Fischer, R. Hörner, F. Wagner, Production of L-amino acids by applying D-amino acid oxidases. *Annals of the New York Academy of Science* 750 (1995), 415-420
- [119] H. Dellweg, R.D. Schmid, W.E. Trommer, *Römpp Biotechnologie*, Georg Thieme Verlag, 1992
- [120] H. Schiweck, Zusammensetzung von Zuckerübermelassen. *Zuckerind.* 120 (1995) 4, 272 – 282
- [121] H. Schiweck, Zusammensetzung von Zuckerrübenmelassen. *Zuckerind.* 119 (4) (1994), 272-282
- [122] K. Thielecke, Zur Zusammensetzung von Rübenmelassen. *Branntweinwirtschaft* 127 (13) (1987), 193-195
- [123] K. Sayama, Y. Senba, T. Kawamoto, T. Muratsubaki, Produktion of Raffinose: A new byproduct of the beet sugar industry. *Zuckerind.* 117 (11) (1992), 893-898
- [124] J.C.Y. Tsao, New by-products from molasses. *Sugar y Azucar* 59 (9) (1964), 98-99
- [125] A.K. Oeltjen, Restmelasseentsalzung mit Elektrodialyse. Diplomarbeit Fachhochschule Ostfriesland, Emden (1998)
- [126] H. Olbrich, Raffinose aus Rübenmelasse, ein Handelsprodukt ohne Marktentwicklung. *Branntweinwirtschaft* 119 (6) (1979), 100 - 102
- [127] E.E. Szabó, N. Adányi, M. Váradi, Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosensors & Bioelectr.* 11 (10) (1996), 1051-1058
- [128] S.F. Peteu, D. Emerson, R.M. Worden, A Clark-type oxidase enzyme-based amperometric microbiosensor for sensing glucose, galactose or choline. *Biosensors & Bioelectr.* 11 (10) (1996), 1059-1071

-
- [129] R. Mögele, E. Schulte, R. Galensa, Nachweis von Raffinose in Orangensaft mittels HPLC-Enzymreaktorkopplung und elektrochemischer Detektion. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 89 (8) (1993), 251-253
- [130] B. Weigel, B. Hitzmann, G. Kretzmer, K. Schügerl, A. Huwig, F. Giffhorn, Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis. J. Biotechnol. 50 (1996), 93-106
- [131] B. Herbreteau, M. Lafosse, L. Morin-Allory, M. Dreux, Automatic sugar analysis in the beet industry. Part I, J. High Res. Chrom. 13 (1990), 239-243
- [132] B. Herbreteau, Review and state of sugar analysis by high performance liquid chromatographie, Analisis 20 (1992), 355-374
- [133] L. Morin-Allory, B. Herbreteau, M. Lafosse, M. Dreux, Automatic sugar analysis in the beet industry. Part II, J. High Res. Chrom. 13 (5) (1990), 343-347
- [134] D.W. Armstrong, H.L. Jin, Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. J. Chromatogr. 462 (1989), 219-232
- [135] A. Carruthers, J.V. Dutton, J.F.T. Oldfield, C.W. Elliott, R.K. Heaney, H.J. Teague, Estimation of sugars in beet molasses. Int. Sugar J. 65 (1963), 234-237, 266-270
- [136] S.C. Churms, Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. J. Chromatogr. A 720 (1996), 75- 91
- [137] M.A. Clarke, HPLC in the sugar industry - an overview. Sugar y azucar, 21-25 (August 1985), 21-41 (October 1985), 13-33 (December 1985)
- [138] K. Aisaka, O. Terada, Purification and properties of Galactose Oxidase from *Gibberella fujikuroi*. Agric. Biol. Chem. 46 (5) (1982), 1191-1197
- [139] H. Bourzutschky, W. Mauch, Die Bildung von Kestosen und anderen Sacchariden bei der Säurehydrolyse der Sucrose. Zuckerind. 10 (1969), 545-550
- [140] E. Reinefeld, K. Thielecke, A. Karimian-Khouzani und S.H. Winkel-Meshkini, Bestimmung optisch aktiver Saccharose-Begleitstoffe - Chromatographische und enzymatische Studien, insbesondere zum Nachweis von Raffinose und Galaktinol. Teil 2. Zuckerind. 113 (8) (1988), 684-690
- [141] K.W. Swallow, N.H. Low, Isolation and Identifikation of Oligosaccharides in a Commercial Beet Medium Invert Syrups. J. Agric. Food. Chem. 41 (1993), 1587-1592

-
- [142] Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analyses, 3rd edition, Volume III, Enzymes 1, Oxidoreductases, Transferases, Verlag Chemie, (1986), 120
- [143] M.M. Reißland, Entwicklung und Charakterisierung von Aufreinigungsstrategien zur Isolierung von Raffinose und Melibiose aus Reststoffströmen der chromatographischen Melasseentzuckerung. Diplomarbeit Technische Universität Braunschweig (1997)
- [144] S.V. Vercellotti, M.A. Clarke, Comparison of modern and traditional methods of sugar analysis. *Int. Sugar J.* 96 (1151, 1994), 437-445.
- [145] W.S. Tsang, M. Bengtsson, J. Tjebbes, M.A. Clarke, Ion chromatography, flow injection analysis and other techniques for the future. *Zuckerind.* 116 (1) (1991), 42-47
- [146] W.S. Tsang, M.A. Clarke, M.M Valdes, HPLC techniques in process control in sugar factories. *Conf. on sugar processing research 1988*
- [147] M. Ugrinovits, Zuckermanalyse mit GC, HPLC, DC und enzymatisch - Ein Vergleich der Methoden. *Chromatographia* 13 (7) (1980), 386-394
- [148] T. Kullick, Neue Biosensoren für die biotechnologische Praxis. *Fortschrittberichte VDI Reihe 8 Nr. 421* (1994)
- [149] I.J. Holwill, S.J. Chard, M.T. Flanagan, M. Hoare, A Kalman Filter Algorithm and Monitoring Apparatus for At-Line Control of Fractional Protein Precipitation. *Biotechnology & Bioengineering* 53 (1997), 58-70
- [150] C. Becker, Using Chromatography in Downstream Processing. *Australian Journal of Biotechnology* 3(1) (1989), 18-19
- [151] D. Naveh, Industrial-Scale Downstream Processing of Biotechnology Products. *BioPharm* 3 (5) (1990), 28-36
- [152] E. Boschetti, Applications of chromatography in downstream processing. In *Advanced Research on Animal Cell Technology* (A.O.A. Miller ed.) (1989), 401-418
- [153] M.N. Gupta, B. Mattiasson, Novel Technologies in Downstream Processing. *Chemistry & Industry* 5 (1994), 673-675
- [154] P. Müller, W. Brümmer, Die Chromatographie, eine zentrale Methode in der biotechnischen Aufarbeitung. *Chemie Ingenieur Technik* 62 (1990), 380-390
- [155] G.J. Prokopakis, J.A. Asenjo, Synthesis of Downstream Processes. In *Bioprocess Technology* 9 (Sep. Processes Biotechnol.), J. Brown Eng. and Constr. Ltd, Portsmouth (1990), 571-601

-
- [156] H. Lüdi, M.B. Garn, P. Bataillard, H.M. Widmer, Flow injection analysis and biosensors: Applications for biotechnology and environmental control. *Journal of Biotechnology* 14 (1990), 71-79
- [157] K. Schügerl, Which requirements do flow injection analyzer/biosensor systems have to meet for controlling the bioprocess. *J. Biotech.* 31 (1993), 241-256
- [158] G.C. Chemnitz, H. Erdmann, R.D. Schmid, Solubilized Substrates for the On-line Measurement of Lipases by Flow Injection Analysis during Chromatographic Enzyme Purification. *Anal. Biochem.* 202 (1992), 16-24
- [159] W.W. Stamm, M.R. Kula, Monitoring of enzymes during chromatographic separations. *J. Biotechnol.* 14 (1990), 99-114
- [160] H. Schütte, W. Hummel, M.R. Kula, Improved enzyme screening by automated fast protein liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 151 (1985), 547-553
- [161] A. Recktenwald, K.H. Kroner, M.R. Kula, On-line monitoring of enzymes in downstream processing by flow injection analysis (FIA). *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985), 607-612
- [162] K.H. Kroner, On-line-Bestimmung von Enzymen in der Bioprozeßanalytik unter Berücksichtigung von Probenahme und Fließinjektionstechnik. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1988), 718-725
- [163] A.C. Kenney, Automation in Protein Purification: The Use of Expert Systems for Control of Process Chromatography. In *Bioprocess Technology 9 (Sep. Processes Biotechnol.)*, J. Brown Eng. and Constr. Ltd, Portsmouth (1990), 603-616
- [164] A. Ritzka, Analytik und Regelung biotechnischer Prozesse. Promotion am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (1999, eingereicht)

Lebenslauf

Name: Peter Sosnitza
Geburtsdatum: 27. April 1971
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule Pestalozzistraße, Laatzen
1981-1983 Orientierungsstufe Albert-Einstein-Schule, Laatzen
1983-1990 Gymnasium Laatzen, Abschluß: Abitur

Wehrdienst:

07/1990-06/1991 Hamburg und Wagenfeld

Studium:

10/1991-01/1996 Chemiestudium an der Universität Hannover
02/1996-08/1996 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper mit dem Thema: „Amperometrische und potentiometrische Biosensoren“
seit 9/1996 Promotion am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper mit dem Thema: „Biosensoren für die Aufarbeitung in der Biotechnologie“

Beruflicher Werdegang:

09/1996-01/1997 Freier Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
seit 02/1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover